



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.**

**Estudio del efecto de la inhibición funcional de la nucleolina transmembranal  
en un modelo de neovascularización corneal experimental.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**Joaquín Arturo Quiroz Mercado.**

**TUTOR:**

**Yonathan Omar Garfias Becerra.  
Facultad de Medicina-UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**Mario Pérez Martínez.  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM  
Arturo Edgar Zenteno Galindo.  
Facultad de Medicina-UNAM**

**Ciudad de México, noviembre de 2016.**



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.

## **Dedicatorias**

**A mis padres Susana y Joaquín.**

**A mis hermanos Susana Mónica, Alberto Jesús, Jorge y Joaquín Alejandro.**

**A Macu y Alberto.**

**Al doctor Marc Simon.**

**A todos mis maestros.**

## **Agradecimientos.**

**Agradezco de manera especial al Doctor Yonathan Omar Garfias Becerra por su apoyo, asesoría y enseñanzas durante el desarrollo de este proyecto.**

**Agradezco a los doctores Mario Pérez Martínez y Arturo Edgar Zenteno Galindo por su contribución y valiosa asesoría como miembros del comité tutor.**

**Agradezco a los doctores: Sofía Magaña, Norma Ramírez, Graciela Partido, Pamela Martínez, Mariana García, Mariana Y. García, Beatriz Buentello Alfredo Domínguez y Gibrán Estúa por sus entusiastas ideas y aportaciones durante la realización de este estudio.**

**Agradezco a los investigadores y todo el personal del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana por su atención, apoyo así como las facilidades que brindaron para desarrollar esta investigación**

**Agradezco a los integrantes del Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por su gran organización y sus atenciones durante el desarrollo del programa de especialidad, maestría y doctorado.**

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo a través del programa de becas nacionales, para el desarrollo de este proyecto de investigación (CONACYT-CVU: 315182).**

## **Resumen.**

**Introducción.** La neovascularización corneal con la consecuente pérdida de su transparencia, se debe a un desbalance de factores proangiogénicos. La nucleolina de superficie celular se ha asociado con la angiogénesis en tejidos no oculares. Existen estudios que identifican la translocación de nucleolina (NCL) del núcleo hacia la superficie celular, lo cual es esencial para la proliferación de células endoteliales. **Objetivo.** Para identificar una posible función de NCL en la formación de neovasos corneales, el objetivo de este estudio fue caracterizar la presencia y localización celular de NCL en córneas sanas y describir los cambios en su localización tisular y celular en córneas con neovascularización. Además analizar el efecto del bevacizumab sobre la distribución celular y tisular de NCL. **Materiales y métodos.** Se estandarizó un modelo murino de neovascularización corneal inducida por suturas. Se obtuvieron las córneas para realizar evaluaciones histológicas y realizar ensayos de coinmunofluorescencia empleando diferentes proteínas como: fibrilarina, miosina no muscular de cadena pesada 9, CD31, cadherinas e isolectina B4. Para determinar una posible participación de VEGF en la localización y distribución de NCL en este modelo de angiogénesis, se empleó el tratamiento con bevacizumab. Finalmente se determinó la expresión de NCL mediante Western Blot en córneas neovascularizadas y córneas control. **Resultados.** El marcaje de NCL se observó principalmente en el núcleo de células epiteliales basales de córneas normales. Sin embargo la inducción de angiogénesis produjo cambios en la localización de NCL tanto de manera tisular como celular donde el marcaje se identificó en el espacio extranuclear en células epiteliales, estromales y células que conforman vasos sanguíneos. Estos cambios fueron revertidos con el tratamiento de bevacizumab. La NCL fue capaz de marcar únicamente vasos corneales aberrantes en contrastarse con vasos sanguíneos de retina. La expresión de NCL fue mayor en córneas con neovascularización que en córneas control. **Conclusiones.** El incremento en la expresión de NCL y su movilización fuera del núcleo durante la angiogénesis corneal podría tener una probable función como molécula proangiogénica en la córnea.

Palabras clave: Nucleolina, Córnea, Angiogénesis, Bevacizumab.

## **Abstract.**

**Introduction:** Corneal neovascularisation (CNV), with consequent loss of transparency, is due to an imbalance of proangiogenic factors. Cell-surface nucleolin (NCL) has been associated with neo-angiogenesis in non-ocular tissues. There are studies identifying NCL translocation from nucleus to the cell surface, which is essential for endothelial cell proliferation. **Purpose.** To find the possible role of NCL in the generation of corneal neovessels, the aim of this study was to characterise the NCL presence and cell-localization in noninjured corneas, as well as to describe the changes in NCL cell and tissue localization in CNV, and to analyze the effect of bevacizumab on NCL cellular and tissular distribution. **Materials and methods:** Suture-induced CNV was performed in mice. The corneal tissues were obtained and the histological and coimmunofluorescence assays were performed using different proteins, such as fibrillarin, non-muscle myosin heavy chain 9, CD31, cadherin and isolectin B4. To determine the possible role of VEGF in NCL presence and localization in our CNV model, bevacizumab was concomitantly used. Finally, NCL expression was determined by Western Blot assays in both suture neovascularised corneas and controls. **Results:** Nucleolin was principally observed in the nucleus of the basal epithelial cells of normal corneas. Interestingly, angiogenesis-induced changes were observed in the localization of NCL, not only in tissue but also at the cellular level where NCL was extranuclear in epithelial cells, stromal cells and neovessels. In contrast, these changes were reverted when bevacizumab was used. Besides, NCL was able to stain only aberrant corneal neovessels in comparison with retinal vessels. NCL expression was greater in neovascularised corneas than in controls. **Conclusions:** Increased expression of NCL and mobilization outside the nucleus during angiogenesis could have a possible role as a proangiogenic molecule in the corneal tissue.

Keywords: Nucleolin. Cornea. Angiogenesis. Bevacizumab.

**Contenido.**

	<b>Página</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>6</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>6</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>6</b>
<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>6</b>
<b>Material y métodos .....</b>	<b>7</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>18</b>
<b>Discusión y conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>Perspectivas del proyecto .....</b>	<b>62</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>62</b>



## **Índice de tablas.**

Tabla 1. Anticuerpos o marcadores utilizados y sus concentraciones empleadas para la técnica de inmunofluorescencia .....	<b>pag. 9</b>
Tabla 2. Anticuerpos y sus concentraciones empleadas para la técnica de Western Blot .....	<b>pag. 18</b>
Tabla 3. Hallazgos clínico-patológicos seriados de ratones tratados con la colocación de sutura en el estroma de la córnea .....	<b>pag. 27</b>

## **Lista de figuras.**

Figura 1. Colocación de los puntos de sutura para la inducción de angiogénesis .....	<b>pag. 10</b>
Figura 2. Densitometría del marcaje de NCL celular .....	<b>pag. 15</b>
Figura 3. Presencia de nucleolina (NCL) en el tejido corneal sano de ratón BALB/c .....	<b>pag. 19</b>
Figura 4.- Colocalización de NCL con fibrilarina .....	<b>pag. 20</b>
Figura 5. Expresión de nucleolina en una córnea de ratón BALB/c .....	<b>pag. 20</b>
Figura 6. Representación histológica (imagen superior) y clínica (imagen inferior) de córneas con inducción de angiogénesis mediante diferentes metodologías .....	<b>pag. 21</b>
Figura 7. Desarrollo inicial de angiogénesis inducida por la colocación de sutura .....	<b>pag. 23</b>
Figura 8. Desarrollo de vasos sanguíneos en la córnea después de cinco días de la colocación de sutura .....	<b>pag. 24</b>
Figura 9. Desarrollo de vasos sanguíneos en la córnea después de seis días de la colocación de sutura .....	<b>pag. 25</b>
Figura 10. Desarrollo de vasos sanguíneos en la córnea después de siete días de la colocación de sutura .....	<b>pag. 25</b>
Figura 11. Desarrollo de vasos sanguíneos en la córnea después de catorce días después de la colocación de sutura .....	<b>pag. 26</b>
Figura 12. Presencia de vasos sanguíneos en un corte histológico de córnea luego de catorce días de la colocación de sutura .....	<b>pag. 27</b>
Figura 13.- Evaluación histológica de la córnea con inducción de angiogénesis mediante tinciones especiales .....	<b>pag. 29</b>
Figura 14. Ejemplo de la cuantificación del área corneal afectada por angiogénesis .....	<b>pag. 30</b>
Figura 15. Evaluación clínica del área de la córnea afectada por vasos sanguíneos generados por aplicación de sutura .....	<b>pag. 31</b>

Figura 16. Número de vasos sanguíneos identificados por campo en tejido corneal tratado con la aplicación de sutura .....	<b>pag. 32</b>
Figura 17. Número de células que conforman la pared de los vasos sanguíneos en corneas obtenidas en diferentes días posteriores a la colocación de sutura .....	<b>pag. 33</b>
Figura 18. El conteo de células inflamatorias en el tejido corneal es mayor en el día cinco posterior a la colocación de la sutura .....	<b>pag. 34</b>
Figura 19. Identificación de vasos sanguíneos mediante un anticuerpo anti-CD31 .....	<b>pag. 35</b>
Figura 20. Marcaje anti-CD31 de células presentes en el estroma de la córnea al inducir angiogénesis por colocación de puntos de sutura .....	<b>pag. 35</b>
Figura 21. Identificación de vasos sanguíneos en córnea generados por la colocación de puntos de sutura mediante inmunohistoquímica .....	<b>pag. 36</b>
Figura 22. Evaluación comparativa del inmunomarcaje anti-nucleolina en el epitelio anterior de la córnea sano y con inducción de angiogénesis .....	<b>pag. 37</b>
Figura 23. Identificación del inmunomarcaje anti-nucleolina en células que constituyen vasos sanguíneos en córnea .....	<b>pag. 38</b>
Figura 24. Localización de la nucleolina mediante inmunofluorescencia en el tejido corneal con inducción de angiogénesis .....	<b>pag. 39</b>
Figura 25. Marcaje de nucleolina en las estructuras vasculares encontradas en diferentes días posteriores a la inducción de angiogénesis .....	<b>pag. 40</b>
Figura 26. Caracterización de la localización de la nucleolina en el tejido corneal con inducción de angiogénesis .....	<b>pag. 41</b>
Figura 27. Coinmunomarcaje entre NCL y MyH9 en corneas con angiogénesis experimental. Microfotografías de un corte histológico de córnea con angiogénesis .....	<b>pag. 43</b>
Figura 28. Movilización de la nucleolina durante la angiogénesis de la córnea .....	<b>pag. 44</b>
Figura 29. Colocalización de nucleolina e isolectina en un vaso sanguíneo de una córnea con inducción de angiogénesis mediante sutura .....	<b>pag. 45</b>

Figura 30. Marcaje anti-NCL e isolectina de un vaso inducido con puntos de sutura .....	<b>pag. 46</b>
Figura 31. Marcaje de NCL con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa fluor 488 e isolectina conjugada con Alexa fluor 594 en estructuras vasculares de córnea identificadas con DIC .....	<b>pag. 47</b>
Figura 32. Inhibición de la angiogénesis mediante la aplicación tópica de bevacizumab .....	<b>pag. 48</b>
Figura 33. La administración tópica de bevacizumab redujo la extensión de la córnea afectada por la angiogénesis .....	<b>pag. 49</b>
Figura 34. Disminución del número de vasos sanguíneos en corneas tratadas con bevacizumab .....	<b>pag. 50</b>
Figura 35. Efecto de la inhibición de la angiogénesis sobre el marcaje de nucleolina en corneas de ratón BALB/c .....	<b>pag. 51</b>
Figura 36. Expresión selectiva de NCL en vasos neoformados en condiciones patológicas .....	<b>pag. 52</b>
Figura 37. Las células de vasos sanguíneos neoformados en córnea expresan NCL en núcleo y fuera del núcleo .....	<b>pag. 53</b>
Figura 38. Marcaje de NCL en vasos retinianos durante su desarrollo .....	<b>pag. 53</b>
Figura 39. Incremento de la expresión de NCL en córneas con inducción de angiogénesis .....	<b>pag. 54</b>

## **Introducción.**

En condiciones normales la córnea se caracteriza por mantener un estado homeostático de avascularidad, a lo que se denomina privilegio angiogénico (Han y col., 2012, Maddula y col., 2011). Esta característica se mantiene debido a la presencia de factores antiangiogénicos como: angiostatina, endostatina y trombospondina 1, entre otros. Además, expresados en forma ectópica, el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 3 y el receptor soluble del factor de crecimiento endotelial vascular 1 y 2 contribuyen a la ausencia de vasos sanguíneos en la córnea al captar algunos tipos de factores de crecimiento endotelial vascular y así impedir que ejerzan su actividad inductora de angiogénesis. La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos a partir de estructuras vasculares preexistentes (Regenfuss y col., 2012, Vieira y col., 2012, Stevenson y col., 2012, Maddula y col., 2011). Varias condiciones patológicas como inflamación, infección, hipoxia, degeneración y traumatismo pueden alterar el balance fisiológico entre moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas, generando la neovascularización corneal así como la consecuente pérdida de transparencia del tejido. Este desarrollo de vasos en la córnea provoca alteraciones en la agudeza visual y disminución del inmunoprivilegio (Han y col., 2012, Maddula y col., 2011). Por otra parte existen diversos mediadores que participan promoviendo la angiogénesis en la córnea como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor transformante del crecimiento (TGFbeta), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este último ha sido ampliamente evaluado, siendo considerado el factor angiogénico más reconocido en este tejido ya que se sobreexpresa en córneas vascularizadas de humano (Vieira y col., 2012). Sin embargo, en la actualidad se han identificado otras moléculas relacionadas con el proceso de angiogénesis en diferentes tejidos. Una molécula recientemente estudiada es la nucleolina (NCL) asociada a la membrana celular, observada en la superficie de células tumorales en proliferación y en células endoteliales de vasos

sanguíneos de tumores. También se ha determinado un incremento de nucleolina en la superficie de células endoteliales cuando se adiciona VEGF y el bloqueo o la inhibición de esta proteína en la superficie celular, impide la migración de células endoteliales y evita la formación tubulocapilar (Birmas y col., 2012a, Kotula y col., 2012).

La nucleolina es una de las proteínas más abundantes del nucleolo y representa aproximadamente el 10% del contenido de proteínas dentro de este compartimento (Tajrishi y col., 2011). Se encuentra conformada por 707 aminoácidos (Srivastava y Pollard, 1999). Su masa molecular aparente es de 100 a 110 kDa mientras que la calculada es de 77 kDa (Tajrishi y col., 2011, Srivastava y col., 1990, Srivastava y Pollard, 1999, Ginisty y col., 1999). Es una proteína que está constituida por tres dominios estructurales y multifuncionales: una porción amino terminal que contiene varias uniones altamente acídicas, que parecen ser un sitio de unión de ligandos ricos en aminoácidos básicos presentes en proteínas como midkina, bFGF y proteínas de matriz con dominio de unión a heparán (Huang y col., 2006). La región central que tiene cuatro dominios de unión a RNA, se conoce como el motivo de reconocimiento de RNA (RRM por sus siglas en inglés), también llamado dominio de unión a RNA (RBD por sus siglas en inglés). El extremo carboxilo, que es un dominio rico en glicina/arginina (Tajrishi y col., 2011), presenta 9 repeticiones del tripéptido arginina-glicina-glicina (Arg-Gly-Gly o dominio RGG por sus siglas en inglés) (Krust y col., 2011).

La nucleolina interactúa con las estructuras tallo del RNA a través de su RRM y participa en la modificación y procesamiento del preRNA ribosomal. El dominio RBD también interactúa con telomerasas, lo que es importante para la localización subcelular de estas enzimas. La región acídica o básica del extremo amino y el dominio carboxilo terminal rico en repeticiones RGG media la interacción proteína-proteína con la histona H1, con el RNA pequeño nucleolar U3 (U3 snoRNP) y con proteínas del ribosoma. El dominio carboxilo terminal se encuentra involucrado en el ensamblaje de ribosomas y la importación nuclear de proteínas ribosomales.

Este dominio probablemente funciona en las interacciones entre proteínas (Tajrishí y col., 2011).

La nucleolina se encuentra altamente fosforilada y su fosforilación es regulada durante el ciclo celular. La localización de la nucleolina dentro de la célula puede estar regulada por la fosforilación de su extremo amino. La fosforilación de la nucleolina por cinasa-2 de caseína ocurre en la interfase (se correlaciona con la transcripción activa de rRNA) y por el homólogo 2 de la proteína de control de división celular (CDC2) durante la mitosis (Tajrishí y col., 2011). Esta fosfoproteína no histona, se encuentra presente en la región fibrilar densa y en la región granular del nucleolo; de acuerdo con Srivastava M y cols., la nucleolina intacta representa el 5% de la proteína nucleolar en células que se dividen activamente (Srivastava y Pollard, 1999), mientras que en células quiescentes se expresa predominantemente formas degradadas de varios tamaños moleculares debido a su autodegradación. Puede tener actividad de helicasa, de chaperona y es capaz de interactuar con varios factores de la transcripción y componentes nucleares. Cumple una función de regulación de la replicación del DNA y del crecimiento celular (Tajrishí y col., 2011). Se ha relacionado a la nucleolina con una inhibición de la replicación del DNA inducida por choque de calor, lo que parece estar mediado por su asociación con el factor de replicación A (Velichko y col., 2012).

Se considera que la nucleolina de citoplasma y de superficie celular es proteína recién sintetizada en la célula (Koutsidoumpa y Papadimitriou, 2014). En el citoplasma la nucleolina transporta proteínas hacia el núcleo y proporciona una regulación postranscripcional de RNA mensajeros. Aunque carece de un dominio transmembrana o una secuencia señal, la nucleolina se ha encontrado en la superficie de varios tipos de células (Chen y col., 2008, Hovanessian y col., 2000). Sin embargo aún no se conoce bien como se transporta a la superficie celular (Fogal y col., 2009). Se ha reportado una asociación estrecha entre la nucleolina de membrana con la actina del citoesqueleto (Hovanessian y col., 2000). Sobre la superficie celular sirve como una proteína de unión para varios ligandos, desde

factores de crecimiento hasta microorganismos y partículas virales (Destouches y col., 2008, Fogal y col., 2009, Krust y col., 2011). Existen reportes que relacionan ligandos de la nucleolina de superficie con la diferenciación y proliferación celular. Entre estas moléculas se encuentran el factor de crecimiento de hepatocitos, el péptido regulador afín a la heparina, midkina, el receptor del factor de crecimiento epitelial ErbB y endostatina. Todos ellos tienen una participación en el desarrollo de tumores y en la angiogénesis (Birmpas y col., 2012a). La nucleolina es un receptor de endostatina que media la función antiangiogénica y antilinfangiogénica de esta proteína (Ding y col., 2012). Además, existen otras moléculas de unión a nucleolina de superficie como la laminina-1, la glicoproteína catiónica conocida como factor J, las selectinas L y P que regulan la adhesión celular, el tráfico de leucocitos, la inflamación y la angiogénesis, (Birmpas y col., 2012a).

Se ha identificado la presencia nucleolina en la superficie de células tumorales así como en células endoteliales de vasos sanguíneos durante el desarrollo de neoplasias (Destouches y col., 2008). La nucleolina de superficie se ha reportado como un marcador específico de células endoteliales en estado de angiogénesis (Christian y col., 2003, Fogal y col., 2009). Esta proteína en la superficie es importante para la migración y formación de túbulos de células del endotelio y su incremento en la membrana se atribuye a un transporte desde el núcleo. El VEGF puede estimular la translocación de nucleolina de manera sinérgica cuando las células endoteliales se adhieren a la matriz extracelular. Bajo la estimulación con el VEGF ocurren una serie de eventos celulares como la activación de varias cinasas; la matriz extracelular induce a las células para remodelar sus citoesqueletos de actina (Huang y col., 2006). Huang y cols., asocian la localización y movilización de la nucleolina con la fosforilación de su extremo amino, este evento que también se encuentra relacionado con la formación de filamentos de estrés de miosina, como la miosina no muscular de cadena pesada 9 (MyH9) (Huang y col., 2006). El dominio carboxilo de MyH9 específicamente se une a la nucleolina y funciona como un adaptador entre la nucleolina y la actina



del citoesqueleto (Huang y col., 2006). La proteína de choque térmico 70 (denominada en inglés heat shock cognate 70) interactúa con la nucleolina y modula su translocación hacia la superficie celular, aumentando su estabilidad y la interacción con MyH9 durante el proceso de angiogénesis, esto indica la importancia que tiene esta chaperona molecular en la movilización y aparición de la nucleolina en la superficie celular (Ding y col., 2012).

Existen estudios que indican que el bloqueo y la regulación negativa de la nucleolina de superficie en células endoteliales inhibe su proliferación, migración y evita la formación túbulo-capilar (Destouches y col., 2008, Birmpas y col., 2012a). Debido a que nucleolina de superficie es una proteína que no se expresa en vasos sanguíneos de tejidos normales (Christian y col., 2003), se han utilizado diferentes moléculas para el tratamiento anti-angiogénico que se encuentran dirigidas contra esta proteína en la membrana, tal es el caso del anticuerpo anti-nucleolina, conocido como NCL3, que se une específicamente a la nucleolina de superficie de células que conforman vasos sanguíneos (Christian y col., 2003). Se conoce que NCL3 disminuye los niveles de RNAm de la molécula antiapoptótica Bcl-2 lo que induce la apoptosis de células endoteliales (Fogal y col., 2009).

A partir de estudios que han observado un incremento de VEGF en córneas vascularizadas, las investigaciones se han encaminado al bloqueo de esta molécula o de sus receptores como son los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular 1 y 2, lo que permite reducir el proceso angiogénico (Chen y col., 2010). Una molécula recientemente empleada para este fin es bevacizumab (anticuerpo monoclonal humanizado contra VEGF), la cual reduce la angiogénesis inducida por inflamación, sin embargo se ha reportado un retraso en la reparación corneal y una alteración en la regeneración del plexo nervioso sub-basal de córneas de ratas tratadas con esta molécula en gotas oftálmicas (Regenfuss y col., 2012). También se ha referido que en estudios clínicos, además de defectos epiteliales, puede existir un adelgazamiento del estroma de la córnea cuando se aplica tópicamente este anticuerpo (Stevenson y col., 2012). Por lo tanto, evaluar

las diferentes vías de angiogénesis corneal permitiría identificar blancos terapéuticos antiangiogénicos. Aunque falta por conocer la función que desempeña la nucleolina de membrana dentro del proceso de neovascularización de la córnea; su participación como receptor de varias moléculas proangiogénicas, puede ser un blanco de estudio que permita contrarrestar el desarrollo de vasos sanguíneos ocasionado por diferentes enfermedades.

### **Planteamiento del problema.**

El proyecto busca valorar si las células de la córnea así como las células endoteliales de neovasos inducidos de forma experimental, expresan la nucleolina de superficie y si el bloqueo de esta proteína asociada a la membrana celular, inhibe el desarrollo de vasos sanguíneos en el tejido.

### **Hipótesis.**

Las células residentes de la córnea expresan la nucleolina de superficie durante la angiogénesis corneal.

### **Objetivo General.**

Identificar la presencia de nucleolina asociada a la superficie celular durante la angiogénesis corneal.

### **Objetivos Específicos.**

- a. Identificar la presencia de la nucleolina y caracterizar su localización tisular en córneas de ratones mediante inmunofluorescencia.
- b. Describir la localización celular de la nucleolina en las células de la córnea de ratón.
- c. Identificar los cambios en la localización tisular y celular de la nucleolina en córneas con neovascularización.
- d. Determinar si las células endoteliales de los neovasos sanguíneos en córnea o sus precursores expresan la nucleolina de superficie.

- e.- Identificar los cambios en la localización tisular y celular de la nucleolina en córneas con inducción de neovascularización y tratamiento antiangiogénico.
- f.- Identificar el marcaje de nucleolina en vasos sanguíneos de origen angiogénico y vasculogénico mediante inmunofluorescencia.
- g.- Identificar la expresión de NCL en tejido corneal con angiogénesis y sin angiogénesis mediante Western Blot.

### **Material y métodos.**

Bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-200-1999 relacionada con las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, se empleó ratones BALB/c y C57BL/6 sin signos de enfermedad ocular y se obtuvo las córneas bajo microscopio estereoscópico (Leica Stereozoom EZ4, Heerburgg Switzerland) para la evaluación histológica, inmunofluorescencia o Western Blot. Los desechos biológicos se manejaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Inmunofluorescencia.

Se identificó la presencia de la nucleolina y se caracterizó su localización tisular en córneas de ratones BALB/c y C57BL/6 mediante inmunofluorescencia siguiendo los siguientes pasos:

Luego de la aplicación de la eutanasia en los ratones mediante la administración de CO<sub>2</sub>, se realizó una queratectomía de espesor completo y se transportaron las córneas a 4° C en PBS. Se fijaron las córneas en PFA al 4% durante toda la noche. Las muestras se incluyeron en parafina y se montaron sobre portaobjetos. Se desparafinaron e hidrataron los cortes histológicos, sumergiendo las laminillas durante 5 minutos en las siguientes sustancias de manera consecutiva: xilol, xilol 2, etanol absoluto, etanol 50%, etanol 10%. Se realizó un desenmascaramiento antigénico, colocando las laminillas en solución de citrato sódico 10X durante 10 minutos en baño María. Posteriormente se colocó solución de bloqueo sobre la

muestra. Se preparó la solución con albúmina de suero fetal bovino (BSA) al 5%, 0.1% de Tritón 100X y PBS. Se cubrieron las laminillas con 300 µl de esta solución durante 1 hora. Después se realizaron tres lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno. Se colocó el anticuerpo primario e incubó durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda. Se agregó PBS 1X sin anticuerpos primarios al control negativo, o un anticuerpo como control de isotipo; al siguiente día se agregaron los anticuerpos secundarios. También se utilizó un marcador para identificar vasos sanguíneos en los tejidos (tabla 1). Se sacaron las laminillas de refrigeración y se dejaron a temperatura ambiente por 5 min. Luego se retiró el exceso de anticuerpo primario de las muestras, realizando tres lavados con PBS 1X, cada lavado tuvo una duración de 5 minutos. Se prepararon los anticuerpos secundarios diluidos en PBS de acuerdo a la concentración indicada en la tabla 1, colocando un volumen de 300 µl por laminilla; el anticuerpo secundario se dejó durante 1 hora protegiendo la muestra de la luz. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X. Se colocó DAPI diluido con PBS 1X (relación 1:4) para identificar núcleos y se dejó incubar durante 10 minutos protegiendo de la luz. Se realizaron tres lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno. Sobre cada muestra se aplicó de una a tres gotas de solución de PBS 1X más Glicerol con una relación de 1:1, luego se colocó un cubreobjetos y se selló la laminilla. Se realizó la evaluación de las muestras bajo microscopio ApoTome II (Carl Zeiss, Jena Germany).

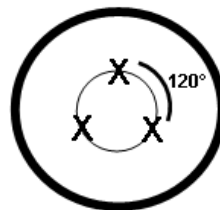
Se identificó la localización intracelular de la nucleolina en el tejido corneal sano utilizando co-inmunomarcaje con proteínas de los diferentes compartimentos celulares.

<b>Tabla 1. Anticuerpos o marcadores utilizados y sus concentraciones empleadas para la técnica de inmunofluorescencia</b>	
<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>
Anti-Nucleolin (ab50279, Abcam Cambridge, England). Rabbit anti-mouse. 10 µg/ml (1:160).	Alexa fluor 488 Donkey anti-rabbit A21206. Life technologies OR, Eugene, USA. 1:200.
Normal rabbit IgG (sc-2027, Dallas, TX USA). Control de isotipo. 1:160.	Alexa fluor 488 Donkey anti-rabbit A21206. Life technologies OR, Eugene, USA. 1:200.
Anti-Fibrillarin (ab4566 Abcam Cambridge, England). Mouse anti-mouse. 1:500.	Alexa fluor 594 Goat anti-mouse A11005 Life technologies OR, Eugene USA. 1:500-1:600.
Anti-CD31 PECAM-1 (V-16): sc-31045 Santa Cruz Biotechnology INC, Dallas, TX USA. Goat anti-mouse. 1:100.	Alexa fluor 594 Chicken anti-goat A21468 Life technologies, Carlsbad CA, USA. 1:200.
Anti-Pan Cadherin (ab6528, Abcam Cambridge, England). Mouse anti-mouse. 1:100.	Alexa fluor 594 Goat anti-mouse A11005 Life technologies OR, Eugene USA. 1:300
Anti-Myosin heavy chain type A. Human anti-mouse AbD Serotec, Oxford UK. A Bio-Rad Company. 1:50.	Alexa fluor 594 Goat anti-human Life technologies OR, Eugene USA. 1:300.
Dy light 594 Griffonia (badeiraea) simplicifolia. Lecnina I, Isolectina B4 DL-1207. Vector laboratories. Burlingame CA, USA. 1:200.	

Se caracterizaron mediante inmunofluorescencia los cambios observados en la localización de la nucleolina en el tejido corneal con inducción de angiogénesis.

Modelo de inducción de angiogénesis en córnea.

Se desarrolló un modelo de neovascularización corneal *in vivo*. Luego de evaluar diferentes metodologías para generar la formación de vasos sanguíneos en córnea, se eligió el modelo de neovascularización corneal mediante la aplicación de puntos de sutura en el estroma. Se utilizaron ratones BALB/c machos o hembras de entre seis y ocho semanas de edad los cuales fueron anestesiados con Ketamina a una dosis de  $\sim 1.85$  mg/Kg en combinación con Xilacina a dosis de  $\sim 1.75$  mg/Kg o mediante anestesia inhalada, empleando sevofluorano. La inducción se realizó saturando la cámara de anestesia con un incremento gradual del dial del vaporizador de 0 hasta 5 y posteriormente se mantuvo la anestesia con mascarilla y flujo continuo, empleando una apertura del dial entre 3.5 y 4.5. Se aplicó por vía tópica en el ojo derecho (OD) una gota de tetracaína a una concentración de 5 mg/ml. A un grupo de ratones se les colocó puntos de sutura simples de material no absorbible en el ojo derecho (Nylon monofilamento de 10-0 u 11-0), tres puntos en los límites de la córnea central y periférica con una separación de aproximadamente  $120^\circ$  (figura 1) (método modificado de(Giacomini y col., 2014). Se utilizó un grupo control para cada experimento.



Zona pericentral

Figura 1. Colocación de los puntos de sutura para la inducción de angiogénesis. Se aplicaron tres puntos de sutura de nylon de 10-0 u 11-0 en el límite de la córnea central y periférica con una separación de aproximadamente 120 grados (OD).

Se realizaron evaluaciones diarias con biomicroscopio y lámpara de hendidura y se empleó un microscopio estereoscópico (Leica Stereozoom EZ4, Heerburgg Switzerland) para obtener fotografías con un aumento de 20X una vez que se identificó la presencia de vasos en córnea. Se determinó el tiempo en el que se formaron los vasos sanguíneos y se estimó clínicamente el desarrollo de las estructuras vasculares o área afectada en la córnea, mediante el programa Pixcavator Image Analyzer (Intelligent Perception, Huntington, W. Va., USA). Se anestesió con sevoflurano a cada ratón y se colocó en decúbito lateral para fotografiar la superficie ocular utilizando el microscopio estereoscópico ajustado a 20X. Para identificar en mejor forma la zona de la córnea con vasos sanguíneos, la imagen digital se procesó con el brillo o contraste del programa PhotoShop (San José California USA) y con la escala de grises así como la función de contraste del programa Microsoft PowerPoint (Redmond Washington USA); luego mediante el uso del programa Paint (Redmond Washington USA), se obtuvo solo la imagen de la córnea afectada por el desarrollo de vasos sanguíneos. Posteriormente las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Pixcavator (software de descarga libre) para determinar el área expresada en píxeles (metodología modificada de (Akar y col., 2013). Finalmente se analizaron los valores y se representaron en gráficas utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla CA, USA).

Los otros modelos evaluados de inducción de angiogénesis, se realizaron siguiendo la metodología que a continuación se describe. 1.- Quemadura química por álcali: se sumergió durante 15 segundos una porción de papel filtro de 6 mm de diámetro en solución de hidróxido de sodio a una concentración de 1 mol/L. Se aplicó una gota de tetracaína en el ojo derecho. Posteriormente se colocó el papel impregnado con la solución alcalina sobre la zona central de la córnea durante 5 segundos y se enjuagó la superficie ocular con solución salina fisiológica durante un minuto aproximadamente (método modificado de (Shi y col., 2011). 2.- Lesión química con etanol al 90%. Se sumergió un fragmento de papel filtro de 6 mm de

diámetro en solución de etanol al 90% y posteriormente se colocó sobre la superficie corneal durante 30 segundos; se enjuagó con solución salina fisiológica durante un minuto aproximadamente y después se realizó un desbride del epitelio anterior de la córnea (modificación del procedimiento descrito por (Lee y col., 2014). 3.- Inyección intraestromal de albúmina sérica bovina. Se inyectaron 250  $\mu$ l de albúmina sérica bovina a una concentración de 0.1 g/ml, disuelta en solución salina fisiológica por vía intraperitoneal. Después de 15 días se inyectó en el estroma de la córnea, 2  $\mu$ l de albúmina sérica bovina a una concentración de 0.2 g/ml diluida con solución salina. La inyección se realizó utilizando una aguja biselada calibre 34 para jeringa tipo Hamilton (Hamilton Company Reno Nevada, USA) (Shi y col., 2011). Los procedimientos descritos se realizaron bajo anestesia general y aplicando previamente una gota de tetracaína en el ojo tratado (OD). Además se empleó un microscopio estereoscópico (Leica Stereozoom EZ4, Heerburgg Switzerland) para realizar cada técnica y evaluar clínicamente a los 7, 14 o 21 días.

Caracterización de vasos sanguíneos en córnea.

Se confirmó la presencia de vasos sanguíneos mediante histología empleando tinciones de hematoxilina-eosina, tinción tricrómica de Masson y tinción de Mallory. Además, se utilizó inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, usando un anticuerpo anti-CD31 como marcador de angiogénesis.

Se la evaluó del número de vasos sanguíneos de tres campos elegidos al azar con el objetivo de 100X de cortes histológicos de días consecutivos a partir de la identificación clínica de vasos sanguíneos en la córnea (es decir del día 4, 5, 6, 7 y 14). Para identificar los vasos se consideraron criterios como: presentar una pared claramente definida, presencia de células conformando la pared, presencia de una luz vascular y la irregularidad del estroma adyacente. También se contó el número de células que constituyen cada vaso sanguíneo y el número de células



inflamatorias (como neutrófilos, histiocitos y linfocitos) presente en los campos de los cortes histológicos analizados.

Inmunohistoquímica.

Desparafinación e hidratación de muestras. Se colocaron las laminillas con los cortes histológicos sobre xilol y etanol en las siguientes concentración y orden: xilol, xilol 2, etanol absoluto, etanol 50%, etanol 10%, agua destilada durante cinco minutos en cada uno de las sustancias. Se realizó el desenmascaramiento antigénico, colocando las laminillas con solución de citrato sódico durante 10 minutos y tratamiento con calor en baño María, se continuó con enfriamiento a temperatura ambiente.

Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena. Se realizó lavado de las muestras colocando sobre las laminillas agua destilada en dos ocasiones durante cinco minutos cada uno. Se retiró el exceso de líquido y se cubrieron las laminillas con solución de peróxido de hidrógeno al 3% y se dejó actuar por 10 minutos, se repitió el lavado colocándole a cada laminilla agua destilada en dos ocasiones durante 5 minutos cada uno.

Para el bloqueo proteico, se colocó solución de bloqueo (Tris HCL 0.05 mol/L, albúmina sérica bovina 1%) a cada una de las laminillas y se dejó actuar durante una hora, se realizó lavado con agua destilada en dos ocasiones durante cinco minutos.

Colocación de anticuerpo primario. Se incubó con el anticuerpo primario (anti-CD31), con dilución 1/50 durante toda la noche, se realizó lavado de las laminillas con solución de lavado (Tris Buffered Saline with Tween 0.05 mo/L) durante diez minutos, se dejaron incubar las muestras con anticuerpo biotinilado (Biotinylated link, inmunoglobulinas biotiniladas anti-conejo, anti-ratón, anti-cabra en PBS, Dako Carpintería California, USA) durante treinta minutos, se realizó lavado con agua

destilada en dos ocasiones durante cinco minutos y luego se desarrolló incubación con Streptavidina-HRP (Streptavidin-HRP) incluida en kit (Dako LSAB+ System-HRP, Code K0679, K0690 Carpintería California, USA) durante 30 minutos.

Sistema de detección o revelación con cromógeno (3,3'diaminobenzidine cromógeno). Se realizó mezcla de una gota de DAB+Chromogen (solución de 3,3'diaminobenzidine cromógeno, Dako Carpintería California, USA) por 1ml DAB+Substrate Buffer (Solución buffer de sustrato, pH 7.5, peróxido de hidrogeno, Dako Carpintería California, USA). Se colocó la lamilla sobre microscopio, se aplicó la mezcla antes preparada, se observó bajo microscopio para detectar el inicio de la reacción del cromógeno, así como medir el tiempo en el cual se produce, al detectarlo se introdujo la laminilla sobre agua destilada para detener la reacción.

Contra coloración. Se realizó tinción con hematoxilina de Mayer, durante 7 minutos y se realizó lavado con agua destilada por dos minutos. Posteriormente se realizó deshidratación de la muestra al introducir sobre etanol 10%, etanol 50%, etanol absoluto, xilol 2, xilol siguiendo este orden durante 5 minutos cada uno. Se prepararon las muestras colocando el cubreobjetos sobre laminillas y se aplicó resina diluida con PBS 1X con una relación de 1:1.

Inhibición de angiogénesis mediante bevacizumab.

Por medio de inmunofluorescencia se caracterizó el marcaje de NCL al inhibir la angiogénesis, empleando un anticuerpo anti-VEGF (bevacizumab). Después de colocar tres puntos de sutura en el estroma de la córnea derecha de ratones BALB/c, se aplicó una gota de bevacizumab empleando la concentración de 10 mg/ml cada 12 horas durante siete días. Como control, a otro grupo de ratones se le administró empleando la misma posología, el anticuerpo desnaturalizado

mediante calentamiento a 80° C durante 15 minutos con base en la metodología descrita por (Rocher y col., 2011).

Se comparó el área de la córnea afectada en los individuos de cada grupo y el número de vasos sanguíneos presentes en tres campos de cortes histológicos de córneas teñidos con tinción tricrómica de Masson, esta evaluación se realizó con el objetivo de 100X. El conteo de vasos se estandarizó iniciando desde la periferia hacia el centro.

Para evaluar la diferencia en el marcaje de NCL en el compartimento nuclear y extranuclear se realizó un análisis de densitometría de tres áreas de 0.5 µm seleccionadas al azar tanto en el área nuclear (identificada con el marcaje del núcleo) como en la zona extranuclear (Ververis y col., 2016). Se obtuvieron los promedios de los valores de la relación no-nuclear y nuclear de tres células epiteliales y tres células estromales seleccionadas de manera aleatoria de cada imagen obtenida con el objetivo de 100X en cada uno de los grupos tratados. La densitometría se realizó utilizando el software Axiovison Rel.4.8 (Carl Zeiss, Jena Germany) (figura 2).

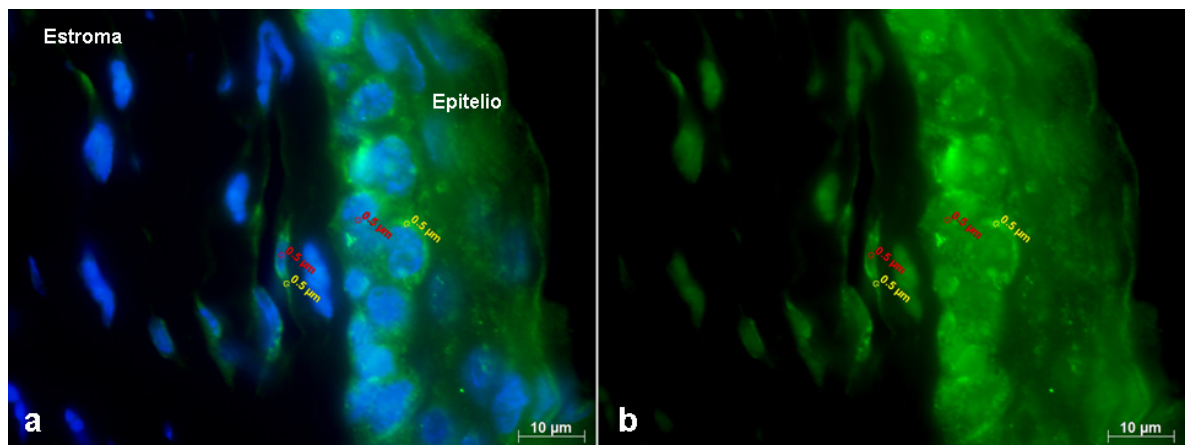


Figura 2. Densitometría del marcaje de NCL celular. Microfotografías de tejido corneal con inducción de angiogénesis que ejemplifican la metodología empleada

para la densitometría realizada en células del epitelio anterior y del estroma. Luego de identificar el compartimento nuclear y no nuclear de células del epitelio y del estroma mediante el empleo de DAPI (a), se seleccionaron tres áreas de cada compartimento de manera aleatoria para realizar el análisis de densitometría (b). El área en rojo corresponde a un área seleccionada en el compartimento nuclear y el área amarilla delimita una zona del compartimento no nuclear.

Inmunofluorescencia de tejidos completos de córnea y retina montados en plano.

Luego de la eutanasia de los ratones de 6-8 semanas de edad, se realizó enucleación de los ojos y se mantuvieron en PBS 1X. Para evaluar la presencia de NCL en el desarrollo de vasos de la retina, se obtuvieron los globos oculares de ratones neonatos a los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 después del nacimiento y se contuvieron en PBS 1X. El tejido se mantuvo en refrigeración. Se disecó la córnea y retina se realizaron entre 5 y 6 cortes radiales para extender el tejido. Luego se colocó el tejido disecado en paraformaldehído 4% durante 30 min. Se transfirieron las muestras a una caja de cultivo de 24 pozos y se dejaron en PBS 1X durante 10 min. Se removió el exceso de PBS y se secó el tejido con esponjas quirúrgicas para oftalmología. Se colocó metanol mantenido a  $-20^{\circ}$  C, aplicándolo gota por gota sobre la muestra y empleando una pipeta bajo microscopio estereoscópico. Se almacenó el tejido en tubos de Eppendorf conteniendo metanol. Se eliminó el metanol enjuagando con PBS 1X. Agregando 1ml de PBS al tubo y agitando durante 15 min. Se eliminó el PBS y se agregó solución de bloqueo (PBS+ Tritón al 0.3% + ASB 0.2% + Suero de burro al 5%). Se incubó durante 1h en agitación. Se retiró la solución de bloqueo y se colocó el anticuerpo primario diluida con solución de bloqueo (volumen total 100  $\mu$ l). Se incubó durante toda la noche a  $4^{\circ}$  C.

Se removió el anticuerpo primario y se enjuagó cuatro veces durante 5 min con PBS1X + Tritón 0.3% (PBST). Se colocó el anticuerpo secundario diluido con solución PBST y se incubó durante 4h a temperatura ambiente. Se eliminó el

anticuerpo secundario mediante cuatro lavados de 15 min cada uno con 2 ml de PBST. Posteriormente se incubó con isolectina B4 toda la noche para luego hacer lavados. Se agregó DAPI y se enjuagó.

El tejido se transfirió a un portaobjetos y se eliminó el exceso de PBST. Se colocó un cubreobjetos y se selló para observar al microscopio.

#### Western Blot.

Se disecó el tejido y con nitrógeno líquido se congeló y pulverizó empleado un mortero mantenido previamente a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó solución de lisis para extraer proteínas (Tritón 0.1% con inhibidor de proteasas). Se emplearon 50  $\mu\text{l}$  de solución de lisis por cada córnea contenida en un tubo de Eppendorf. Se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  cada alícuota para almacenarla. Se descongeló la muestra y se agitó cada 15 min durante una hora manteniendo la muestra a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se extrajo el sobrenadante para pasarlo a otro tubo de Eppendorf. Se cuantificó la proteína mediante método de Lowry.

Se redujo y desnaturalizó la proteína calentando la muestra en baño María a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Se mezcló con buffer de carga (Tris 0.375 M, pH 6.8, SDS 12%, glicerol 60%, azul de bromofenol 0.06% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.350 M) y se calentó en baño María a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Se cargaron 25  $\mu\text{g}$  de proteína en cada pozo de gel de gradiente Mini-Protean TGX. Precast Gels 4-20%, 10-well comb 50  $\mu\text{l/well}$  Cat #456-1094. (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hércules, CA, USA). Se hizo el corrimiento a 120 V, 150 mA, 6 W durante 1h 30 min. Posteriormente la transferencia se realizó 120 mA durante 45 min en cámara bajo condiciones semisecas. Se empleó membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Membranes, 0.2  $\mu\text{m}$  transfer of low MW proteins or nucleic acids. Bio-Rad Laboratories, München, Germany). Se identificó la presencia de proteína luego de la transferencia con rojo de Ponceau. Se trató la membrana con los anticuerpos mencionados en la tabla 2. Se reveló con el kit de SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Thermo Scientific Rockford, IL, USA, mezclando los dos reactivos a una dilución

de 1:1. Se desnudó la membrana realizando lavados con PBS 1X durante 4 horas en agitación y realizando el cambio de la solución de PBS cada 15 min. Las imágenes se capturaron y digitalizaron con el programa G-Box system y Gene Snap Software version 7.12.06 (Syngene, London UK).

<b>Tabla 2. Anticuerpos y sus concentraciones empleadas para la técnica de Western Blot.</b>		
<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Anticuerpo terciario</b>
Anti-Nucleolin (ab50279, Abcam Cambridge, England). Rabbit anti-mouse 1 µg/ml.	Biotin-SP-conjugated Goat anti-rabbit (H+L) Jackson Immunoresearch. West Grove PA, USA 1:1000	Anti-Biotin antibody (HRP) (ab19221, Abcam Cambridge, England) 1:1000.
Anti-β tubulin (ab6046, Abcam Cambridge, England). Rabbit polyclonal anti mouse 1/500.	Biotin-SP-conjugated Goat anti-rabbit (H+L) Jackson Immunoresearch West Grove PA, USA 1:1000.	Anti-Biotin antibody (HRP) (ab19221, Abcam Cambridge, England) 1:1000.

Análisis estadístico.

Los datos se colectaron y se analizaron mediante pruebas U de Mann-Witney para determinar las diferencias entre grupos. Se estableció una  $P < 0.05$  para considerar una diferencia estadísticamente significativa. El programa utilizado para el análisis fue GraphPad Prism software (GraphPad, La Jolla CA, USA).

## Resultados.

1.- La nucleolina se expresa en el tejido corneal sano de ratones BALB/C y C57BL/6.

Mediante inmunofluorescencia se identificó la presencia de nucleolina en córneas de ratones sanos de las cepas BALB/c y C57BL/6 tanto en cortes de tejidos congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  como en cortes incluidos en parafina (figura 3). No se observó diferencia en el marcaje de nucleolina entre las dos cepas de ratón lo cual revela que ambas cepas son útiles para el desarrollo de investigaciones relacionadas con esta proteína en tejido corneal sano. Tampoco se identificó alguna diferencia en el marcaje de nucleolina entre los cortes de córnea congelados y los cortes incluidos en parafina, sin embargo esta última metodología permitió conservar en mejor forma la integridad del estroma al evaluarse histológicamente con la tinción de hematoxilina y eosina.

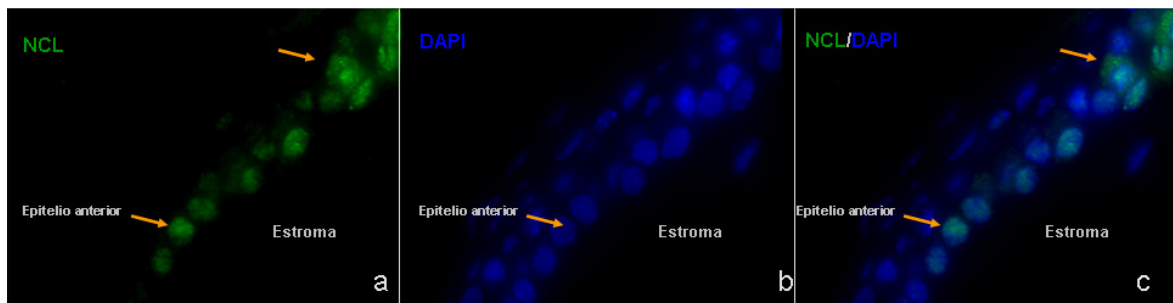


Figura 3. Presencia de nucleolina (NCL) en el tejido corneal sano de ratón BALB/c. Microfotografía de un corte tejido corneal de ratón BALB/c, expresando marcaje positivo anti-nucleolina principalmente en los núcleos de la capa basal del epitelio anterior de la córnea (a). Núcleos de las células del epitelio anterior de la córnea teñidos con DAPI (b). Empalme de a y b (c). Aumento de 100X.

2.- El marcaje de nucleolina se presenta de manera diferencial en cada una de las capas que conforman a la córnea bajo condiciones no patológicas.

El marcaje en el tejido corneal de ambas cepas de ratón se presentó principalmente en la capa basal de células epiteliales y en menor grado en algunas células del estroma. En la mayoría de los ensayos no se observó marcaje en células del endotelio corneal lo cual podría estar relacionado con la baja actividad proliferativa característica de esta capa.

Se caracterizó la localización intracelular de la nucleolina en condiciones no patológicas. El marcaje de nucleolina dentro de las células de la córnea se observó principalmente en el compartimiento nuclear, delimitándose al nucleolo en algunas células del epitelio anterior donde incluso se observó una colocalización con una proteína nucleolar como fibrilarina (figura 4). También se identificó un marcaje principalmente en la zona perinuclear, con un patrón granular aparentando vesículas en células del estrato basal del epitelio anterior. Solo algunas células del estroma presentaron un marcaje de NCL confinado al núcleo. (figura 5).

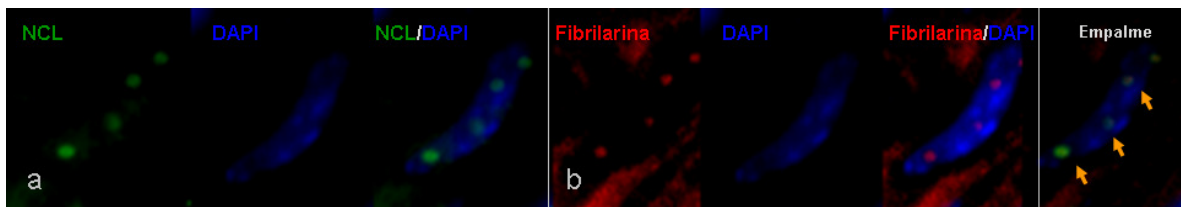


Figura 4.- Colocalización de NCL con fibrilarina. Microfotografía (100X) de una célula del epitelio anterior de la córnea donde se observa el marcaje de NCL localizado en los nucleolos (a). El marcaje en este compartimento celular se corrobora al emplear un marcador de nucleolos como lo es fibrilarina (b). En el empalme se identifica la colocalización de NCL y fibrilarina en los nucleolos de la célula. En azul se identifica el núcleo de la célula marcado con DAPI.



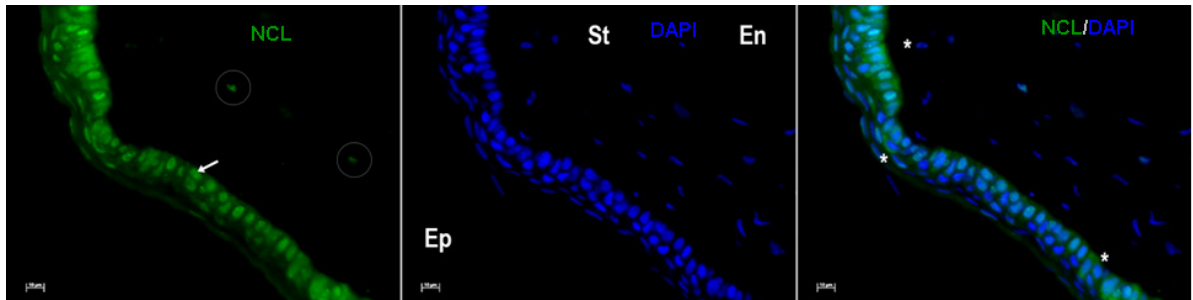


Figura 5. Expresión de nucleolina en una córnea de ratón BALB/c. Microfotografía de fluorescencia de una córnea de ratón BALB/c. Se observa un marcaje delimitado a un probable nucleolo en una célula epitelial de la capa basal (flecha blanca) y en dos células del estroma (círculos). Marcaje perinuclear y citoplásmico simulando vesículas (asteriscos). Ep: Epitelio anterior, St: estroma corneal, En: endotelio. Fotografía representativa de doce ensayos. Aumento de 40X.

3.- La aplicación de suturas intraestromales se considera un modelo de angiogénesis que permite evidenciar el desarrollo de vasos sanguíneos sin alterar las características del tejido tanto en la evaluación clínica como histológica.

Se evaluaron modelos de inducción de angiogénesis en el tejido corneal y se identificó la presencia de vasos sanguíneos mediante exploración clínica, histología, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. Los modelos evaluados de angiogénesis corneal consistieron en quemadura con etanol al 90%, quemadura con álcali, colocación de puntos de sutura e inyección intraestromal de albúmina sérica bovina. Luego de evaluar las diferentes metodologías para inducir angiogénesis de manera experimental, se eligió el modelo de colocación de sutura debido al desarrollo de vasos sanguíneos en un tiempo menor a una semana, además de existir un moderado infiltrado inflamatorio y preservar en mejor forma la integridad histológica de la córnea (figura 6).

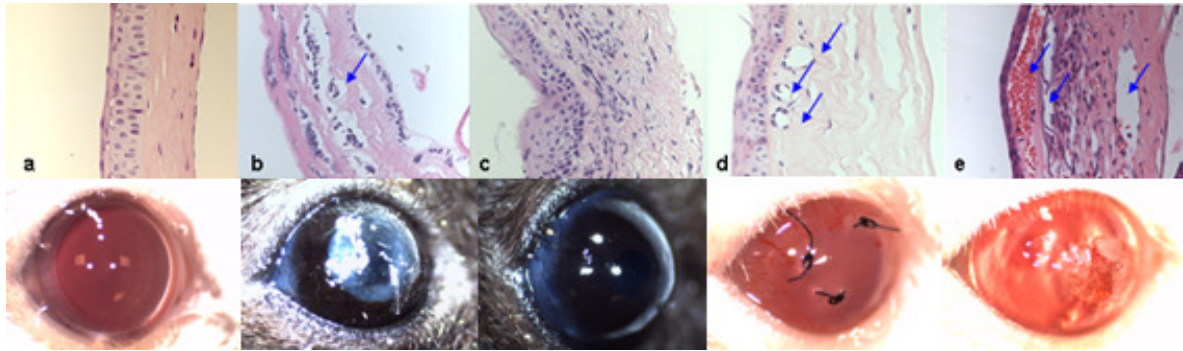


Figura 6. Representación histológica (imagen superior) y clínica (imagen inferior) de córneas con inducción de angiogénesis mediante diferentes metodologías. Microfotografías de cortes histológicos de la córnea teñido con hematoxilina-eosina (40X). Corte histológico de una córnea sana donde se observa de izquierda a derecha el epitelio anterior, estroma, membrana de Descemet y endotelio. Clínicamente se puede observar la transparencia del tejido en la imagen inferior correspondiente a un ratón BALB/c. Aumento de 20X (a). Corte histológico de una córnea con inducción de angiogénesis mediante quemadura con hidróxido de sodio donde se observa pérdida de las características del tejido, la flecha indica una estructura vascular observada a los siete días del procedimiento. En la fotografía clínica de un ratón C57BL/6 se identificó marcada opacidad de la córnea pero escasa presencia de vasos sanguíneos (b). Córnea con un gran infiltrado celular debido a quemadura por etanol, no se observa desarrollo de vasos sanguíneos después de un seguimiento de dos semanas del tratamiento. El aspecto macroscópico del tejido de un ratón C57BL/6 presentó una mínima opacidad sin desarrollo de vasos sanguíneos (c). Corte de córnea posterior a siete días de ser tratada con la colocación de suturas, las flechas señalan los vasos sanguíneos en la región subepitelial; también se observa un infiltrado celular mínimo y la integridad del tejido se conserva. Clínicamente es posible evidenciar claramente la presencia de vasos sanguíneos en un ratón BALB/c (d). Inducción de angiogénesis en córnea mediante la inyección intraestromal de albúmina sérica

bovina posterior a la sensibilización sistémica; las flechas indican los vasos sanguíneos seccionados en forma longitudinal que se mostraron claramente hasta el día 21 después de la inyección local. La imagen inferior denota los vasos sanguíneos presentes en medio de una importante opacidad blanquecina de la córnea de un ratón BALB/c (e).

4.- La inducción de angiogénesis mediante colocación de sutura permite identificar el crecimiento de vasos sanguíneos a partir del día 4 de la aplicación de los puntos tanto en la evaluación clínica como histológica.

La colocación de los tres puntos de sutura en la córnea de ratones BALB/c generó desarrollo de vasos sanguíneos. Entre el día 1 y 3 se observó una hiperemia de vasos pericorneales (figura 7). La neovascularización se identificó clínicamente y en la evaluación histológica, entre el día 4 y 5 posteriores a la colocación de las tres suturas, siendo más marcado en el cuadrante infratemporal de la córnea.

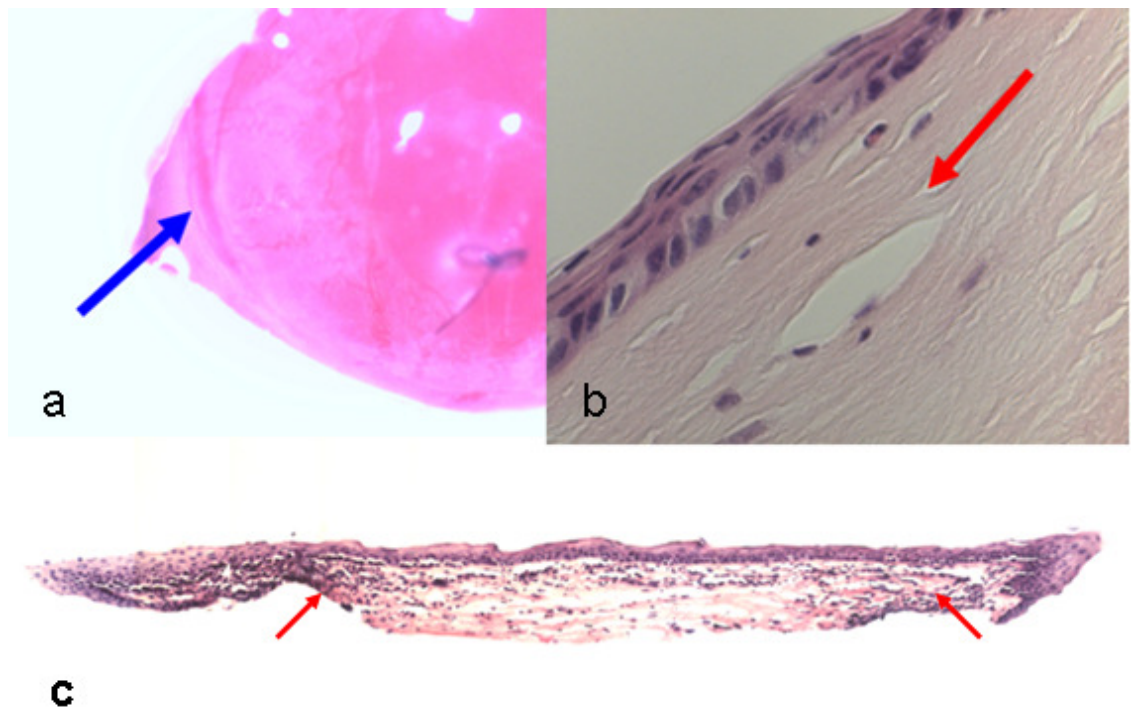


Figura 7. Desarrollo inicial de angiogénesis inducida por la colocación de sutura. (a) Fotografía de córnea de ratón BALB/c OD obtenida mediante microscopía estereoscópica donde se observa hiperemia de vasos sanguíneos localizados en el limbo temporal (flecha azul) cuatro días después de la colocación de la sutura (aumento de 20X). Microfotografía del corte histológico de la misma córnea teñida con tinción de hematoxilina-eosina (b). La flecha roja señala una aparente estructura vascular en la periferia de la córnea de ratón luego de cuatro días de la aplicación de la sutura (100X). (c) Reconstrucción histológica longitudinal de la unión limbo-corneal, teñida con hematoxilina-eosina, donde se observa un infiltrado celular inflamatorio en la periferia entre los días 4 y 5 (flechas). Aumento de 20X.

Cinco días posteriores a la colocación de los puntos de sutura, se identificó claramente estructuras vasculares en la evaluación clínica e histológica (figura 8).

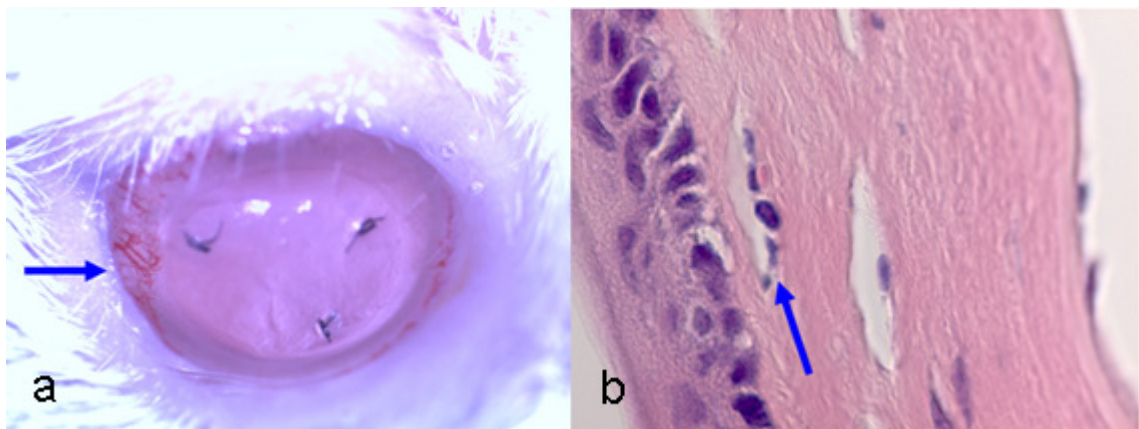


Figura 8. Desarrollo de vasos sanguíneos en la córnea después de cinco días de la colocación de sutura. Fotografía de córnea de ratón BALB/c OD obtenida mediante microscopía estereoscópica donde se observa desarrollo de vasos sanguíneos en la región temporal (flecha azul) después de cinco días de la colocación de la sutura (aumento de 20X) (a). Microfotografía de la misma córnea

teñida con hematoxilina-eosina, la flecha señala un vaso sanguíneo localizado en la región subepitelial (100X) (b).

A los seis y siete días de la colocación del punto de sutura observó desarrollo de vasos sanguíneos casi alcanzando la zona del punto de sutura, las estructuras vasculares presentaron una pared mejor definida y conformada por una mayor cantidad de células (figura 9 y 10).

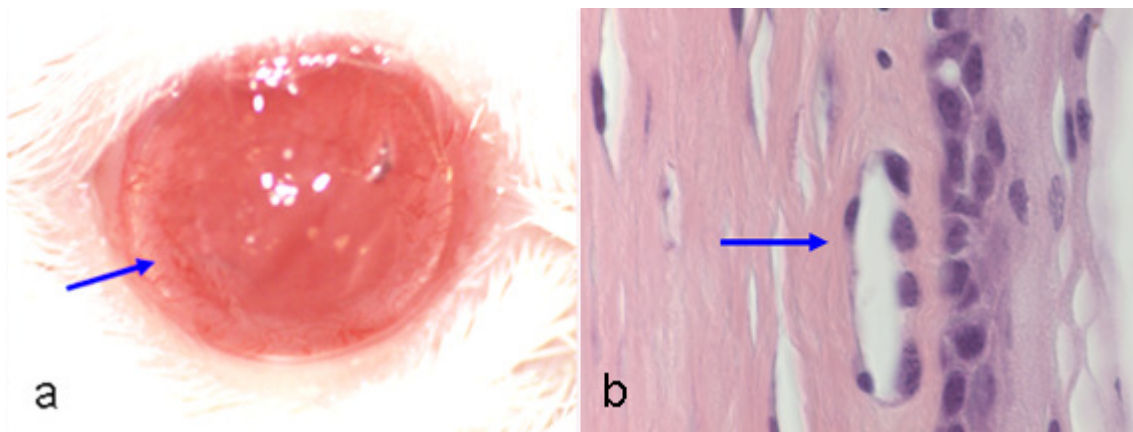


Figura 9. Desarrollo de vasos sanguíneos en la córnea después de seis días de la colocación de sutura. Fotografía de córnea de ratón BALB/c OD obtenida mediante microscopía estereoscópica donde se observa la presencia vasos sanguíneos en la zona temporal de la córnea luego de seis días de la aplicación del material de sutura. Aumento de 20X (a). (b) Microfotografía histológica de la córnea donde se identifica un vaso sanguíneo subepitelial (100X).

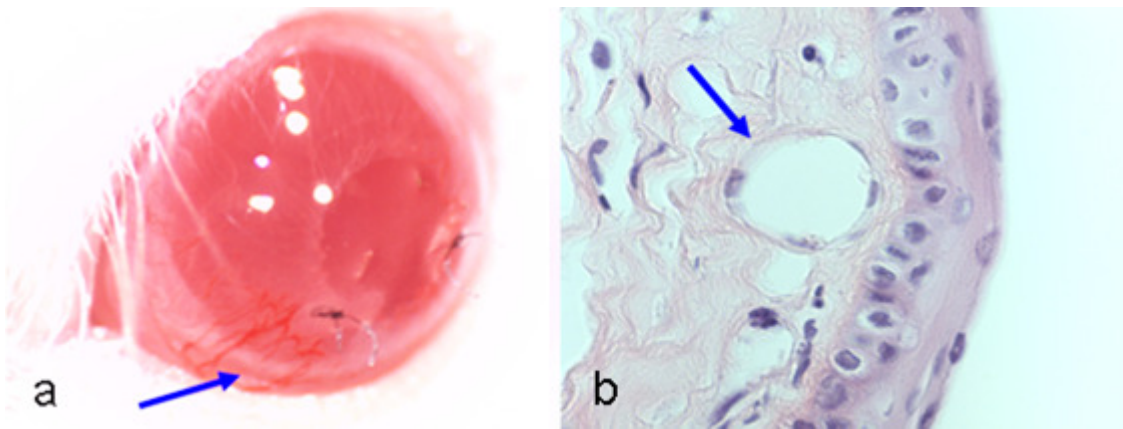


Figura 10. Desarrollo de vasos sanguíneos en la córnea después de siete días de la colocación de sutura. Fotografía de córnea de ratón BALB/c OD obtenida mediante microscopía estereoscópica donde se observa la presencia vasos sanguíneos alcanzando la localización del punto de sutura posterior a siete días de su colocación. Aumento de 20X (a). Microfotografía histológica de la córnea donde se identifica un vaso sanguíneo subepitelial (63X).

A Los 14 días de la colocación de las suturas, se encontró un crecimiento de neovasos sobrepasando la zona donde se encontraba el punto de sutura. Estos vasos presentaron un aspecto ramificado y de localización superficial sin aparente formación de tejido de granulación (figura 11).

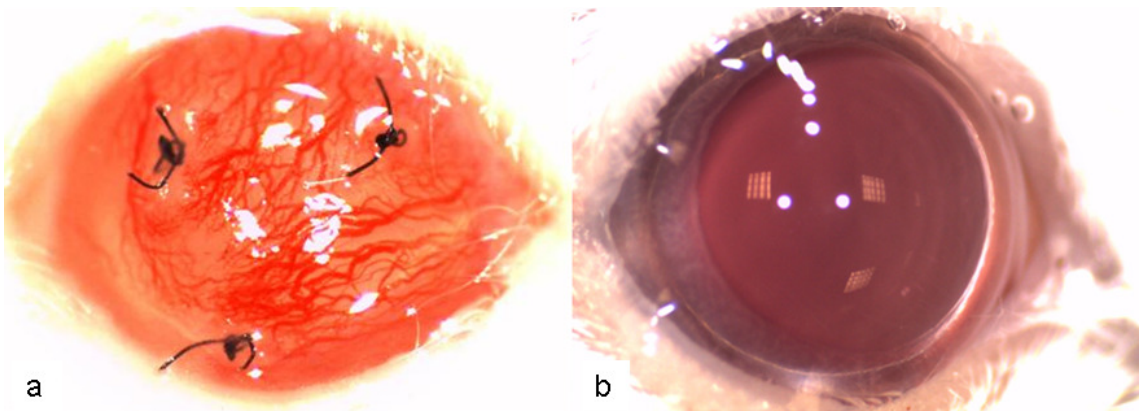


Figura 11. Desarrollo de vasos sanguíneos en la córnea después de catorce días de la colocación de sutura. Fotografía de córnea de ratón BALB/c OD obtenida mediante microscopía estereoscópica donde se observa la presencia vasos sanguíneos sobrepasando la localización del punto de sutura (a). OD de un ratón control (b). Aumento de 20X.

En la evaluación histológica de las corneas de catorce días posteriores a la colocación de los tres puntos de sutura, se identificó la presencia de vasos sanguíneos en el estroma anterior (región subepitelial). Se preservó de manera adecuada la estructura histológica con un mínimo infiltrado de leucocitos en el estroma anterior (figura 12). Tabla 3.

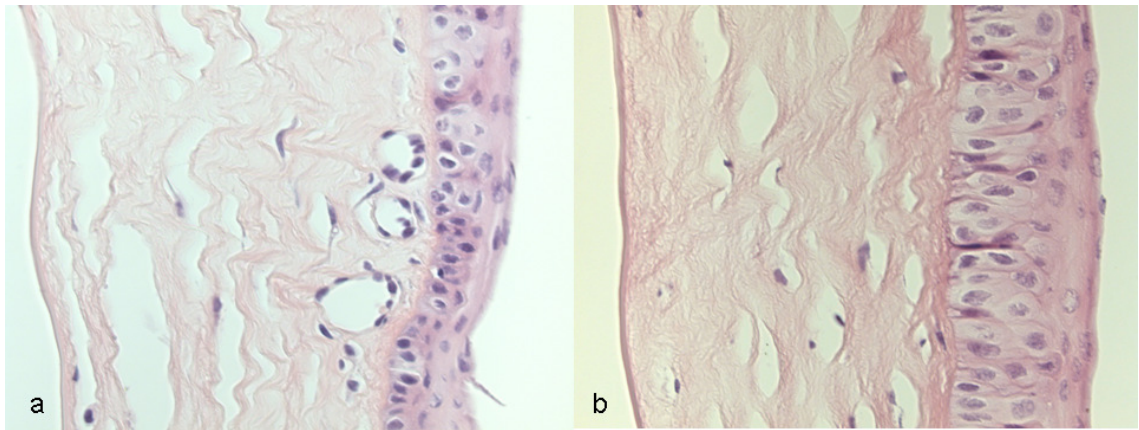


Figura 12. Presencia de vasos sanguíneos en un corte histológico de córnea luego de catorce días de la colocación de sutura. Microfotografía donde observa corte histológico de la cornea teñido con hematoxilina-eosina (40X). Se observa el corte histológico de una córnea a los 14 días de la colocación de un punto de sutura, donde es posible identificar tres estructuras vasculares en el estroma anterior. También se aprecia un ligero infiltrado de leucocitos (a). Corte histológico de la córnea de un ratón control (b).

Tabla 3. Hallazgos clínico-patológicos seriados de ratones tratados con la colocación de sutura en el estroma de la córnea.								
Día posterior al tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	14
Evaluación clínica	Ligera hiperemia de conjuntiva  Edema corneal en la zona de ubicación de los puntos  Blefaroespasmó	Hiperemia moderada de conjuntiva  Edema corneal en la zona de ubicación de los puntos	Hiperemia marcada de vasos pericorneales  Ligera disminución del edema corneal en la zona de localización de los puntos	Hiperemia marcada de vasos pericorneales  Aparición de neovasos en la córnea periférica principalmente en la región infratemporal	Hiperemia marcada de vasos pericorneales  Desarrollo de neovasos en forma de ramificaciones de mayor calibre, alcanzando la mitad de la distancia entre el limbo y la zona del punto de sutura	Hiperemia marcada de vasos pericorneales  Desarrollo de neovasos en forma de ramificaciones de mayor calibre alcanzando tres cuartas partes de la distancia entre el limbo y la zona del punto de sutura	Hiperemia marcada de vasos pericorneales  Desarrollo de neovasos en forma de ramificaciones superficiales de mayor calibre y alcanzando la zona del punto de sutura	Hiperemia marcada de vasos pericorneales  Desarrollo de neovasos en forma de ramificaciones superficiales de mayor calibre sobrepasando la zona del punto de sutura  En algunos casos se identificó reducción de la neovascularización en zonas donde el punto de sutura se perdió
Evaluación histológica			Infiltrado de neutrófilos en el limbo y córnea periférica	Infiltrado marcado de neutrófilos en el limbo y córnea periférica  Se identificó algunas estructuras vasculares con una pared constituida por algunas células en el estroma anterior de la región periférica de la córnea  Áreas de separación en el estroma de la córnea  Aplanamiento de células del epitelio anterior de la córnea	Infiltrado marcado de neutrófilos en el limbo y córnea periférica  Se identificó algunas estructuras vasculares en el estroma anterior con una luz bien definida y una pared constituida por moderada cantidad de células  Áreas de separación en el estroma de la córnea  Aplanamiento de células del epitelio anterior de la córnea	Infiltrado moderado de neutrófilos y células mononucleares así como algunas células con  Se identificó algunas estructuras vasculares con una luz bien definida y con una pared constituida por una mayor cantidad de células  Áreas de separación en el estroma de la córnea  Aplanamiento de células del epitelio anterior de la córnea	Infiltrado ligero de neutrófilos y células mononucleares  Se identificó algunas estructuras vasculares con una pared bien desarrollada constituida por mayor cantidad de células	Disminución del infiltrado inflamatorio  Se identificó algunas estructuras vasculares con una pared bien desarrollada, constituida por mayor cantidad de células en el estroma anterior de la región central de la córnea

5.- La tinción tricrómica de Masson permite identificar claramente las estructuras vasculares durante el desarrollo de angiogénesis corneal.

Además de teñir los cortes histológicos de córnea con inducción angiogénesis empleando tinción de hematoxilina-eosina, se evaluó dos tinciones especiales como la tricrómica de Masson y tricrómica de Mallory, con el propósito de



identificar la mejor opción que permitiera el reconocimiento de los vasos sanguíneos. La tinción tricrómica de Masson fue considerada la mejor alternativa para poder diferenciar las estructuras vasculares en cortes histológicos de la córnea debido a que las células y paredes vasculares, teñidas definitivamente de un color marrón, contrastaron de manera clara con el colágeno del estroma teñido de azul (figura 13).

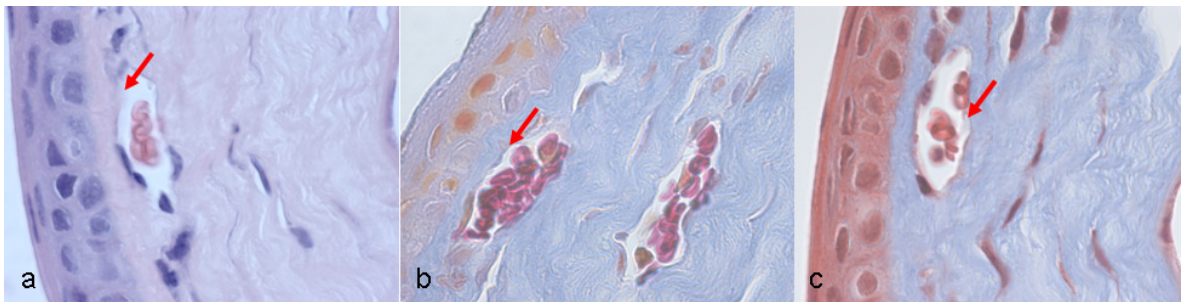


Figura 13.- Evaluación histológica de la córnea con inducción de angiogénesis mediante tinciones especiales. Se observa una microfotografía de un corte de córnea teñido con hematoxilina-eosina con un vaso sanguíneo en el estroma anterior; la flecha indica la pared del vaso sin marcarse de manera clara (a). Vaso sanguíneo subepitelial donde la flecha señala una pared teñida sutilmente al emplear la tinción tricrómica de Mallory (b). Tinción tricrómica de Masson que permite diferenciar de manera clara la pared de los vasos sanguíneos presentes en la córnea. La flecha indica la pared del vaso teñida de color marrón (c). Aumento de 100X.

6.- El mayor desarrollo clínico de vasos sanguíneos en el tejido corneal se alcanza al día siete posterior a la colocación de los puntos de sutura.

Con base en los hallazgos anteriores, se decidió implementar una metodología que permita cuantificar clínicamente el desarrollo de la neovascularización en la córnea. Después de obtener la fotografía digital de la córnea con microscopio

estereoscópico, se extrajo el área afectada de la cornea y se midió contando el número de píxeles dentro de esta, utilizando el programa Pixcavator Image Analyzer (Intelligent Perception, Huntington, W. Va., USA) (figura 14). Se evaluaron las imágenes tomadas con microscopio estereoscópico en los días 4, 5, 6, 7, 14 y 21. Además se analizó histológicamente el desarrollo de vasos sanguíneos contando el número de estructuras vasculares por campo de 100X.

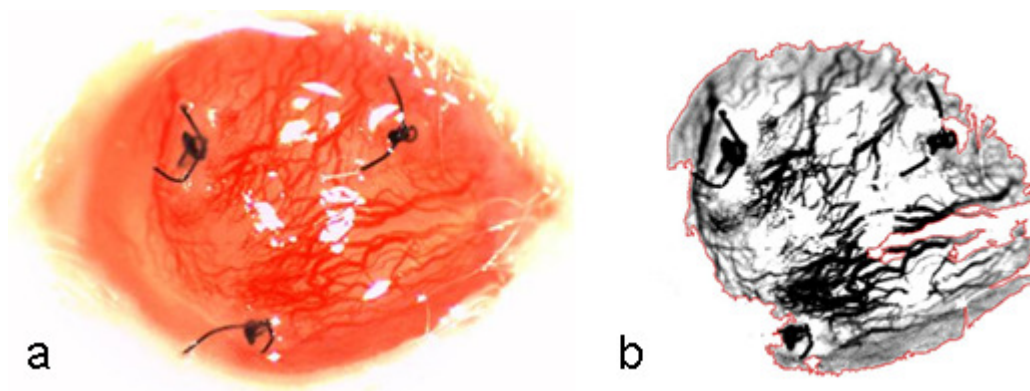


Figura 14. Ejemplo de la cuantificación del área corneal afectada por angiogénesis. Fotografía digital de la superficie de una córnea de ratón con inducción de angiogénesis mediante la colocación de puntos de sutura, aumento de 20X (a). Imagen obtenida de la fotografía (a) para el análisis con el programa Pixcavator Image Analyzer (Intelligent Perception, Huntington, W. Va., USA); se observa el área afectada por vasos sanguíneos delimitada con la línea roja. El número de píxeles dentro del objeto equivale al tamaño del área afectada por la angiogénesis; el valor obtenido para esta imagen fue de 107968 píxeles (metodología modificada de (Akar y col., 2013).

El análisis de desarrollo de vasos sanguíneos en la córnea se realizó con un grupo de tres ratones a los que se les colocó tres puntos de sutura. Al igual que en los ensayos preliminares, la presencia de vasos sanguíneos se observó clínicamente a partir del día 4 posterior al tratamiento y alcanzó la mayor extensión de tejido

corneal en el día 7 (figura 15). Luego el área disminuyó gradualmente hasta el día 21. Además de una reducción del área afectada por vasos sanguíneos hacia el día 21, se observó una disminución del calibre de los vasos y la presencia de tejido de granulación rodeando o cubriendo algunos puntos de sutura.

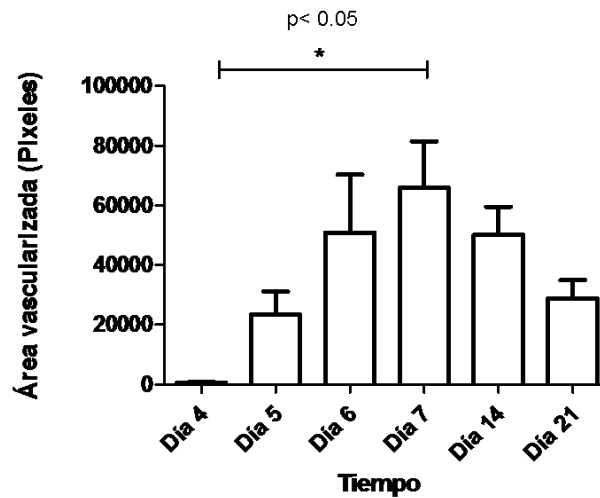


Figura 15. Evaluación clínica del área de la córnea afectada por vasos sanguíneos generados por aplicación de sutura. Al día siete después de la colocación de los puntos de sutura, se identificó la mayor extensión del área corneal afectada por angiogénesis. Clínicamente se identificó la presencia de vasos sanguíneos sobre la córnea a partir del día cuatro después de la aplicación de la sutura y fue posible observar una reducción del área corneal afectada por vasos sanguíneos, posterior al día siete. En la representación gráfica es posible observar una mayor área afectada de vasos sanguíneos en el día siete en comparación con el día cuatro (día de aparición clínica de vasos en córnea). Cada barra representa el promedio del área corneal afectada por angiogénesis en cada uno de los días posteriores a la colocación de sutura. El asterisco representa  $P < 0.05$ .

7.- El número de vasos sanguíneos identificados en cortes histológicos de córnea se incrementa a partir del día 5 posterior a la colocación de la sutura.

Se evaluó el número de vasos sanguíneos por campo de 100X de muestras histológicas obtenidas entre los días cuatro al catorce. Se contó el número de vasos sanguíneos de tres campos de 100X de cortes histológicos de córneas obtenidas a los días 4, 5, 6, 7, y 14 con inducción de angiogénesis por colocación de suturas. Se obtuvo un conteo mayor de vasos en las muestras a partir del día 5, no obstante se observó que algunos tejidos evaluados después del día 5 presentaban un aparente menor número de vasos sanguíneos por observarlos en un sentido longitudinal en vez de transversal, esto debido a la orientación del corte. Además estos vasos presentaban características estructurales bien definidas (figura 16).

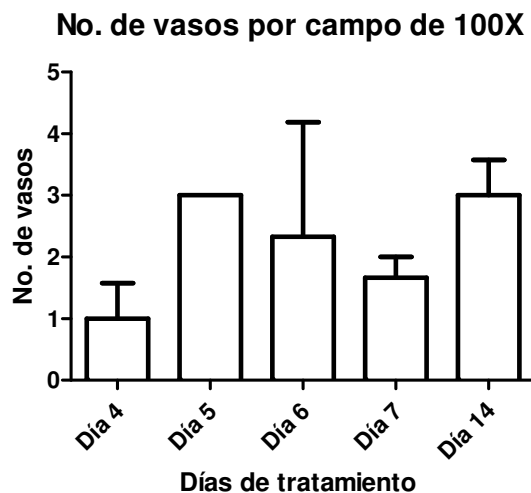


Figura 16. Número de vasos sanguíneos identificados por campo en tejido corneal tratado con la aplicación de sutura. En la representación gráfica se observa la media del número de vasos contados por cada 3 campos (100X) evaluados de manera aleatoria del tejido corneal obtenido de manera seriada luego de la aparición clínica de la neovascularización. En este análisis se identificó el mayor número de vasos en el día 5 y 14 posterior a la aplicación de la sutura.

Se cuantificó el número de células que conforman tres vasos sanguíneos seleccionados de forma aleatoria, de cortes obtenidos durante los días 4, 5, 6, 7 y 14 posteriores a la colocación de sutura. Se observó un mayor número de células

en la pared de los vasos sanguíneos en los tejidos obtenidos en el día 14 (figura 17). Sin embargo, fue posible identificar que el número de células variaba según la orientación del vaso. En el caso de vasos observados en un corte con orientación longitudinal, se presentará un mayor número de células que en los vasos observados en un corte transversal.

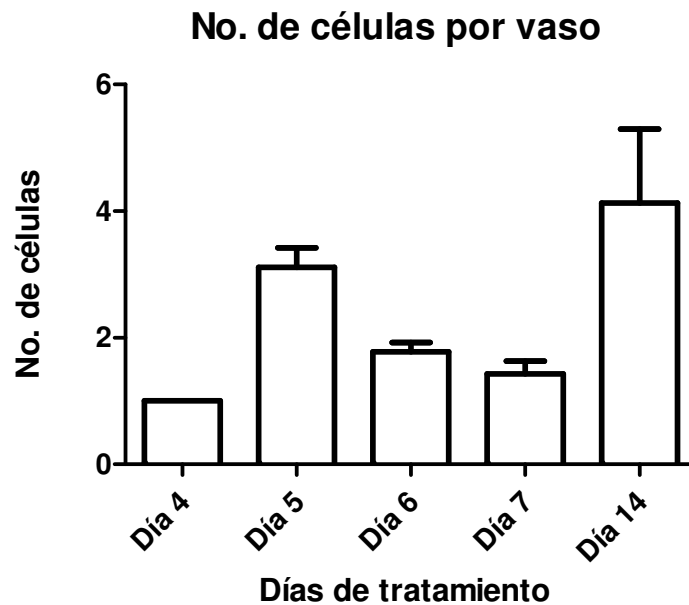


Figura 17. Número de células que conforman la pared de los vasos sanguíneos en corneas obtenidas en diferentes días posteriores a la colocación de sutura. En la gráfica se representa la media del número de células contadas en la pared de cada vaso sanguíneo (tres vasos seleccionados de manera aleatoria) de tres campos de tejido corneal obtenido en diferentes días posteriores a la colocación de puntos de sutura. Se observó un mayor número de células en la pared de los vasos sanguíneos en los tejidos obtenidos en el día 14.

8.- El mayor infiltrado de células inflamatorias en el tejido corneal, se identifica en el día cinco posterior a la colocación de suturas.

Se cuantificó el número de células inflamatorias en tres campos de 100X de cortes histológicos de córnea de los días 4, 5, 6, 7, y 14 posteriores a la colocación de la sutura. Se encontró un mayor número de células durante el día 5 (figura 18).

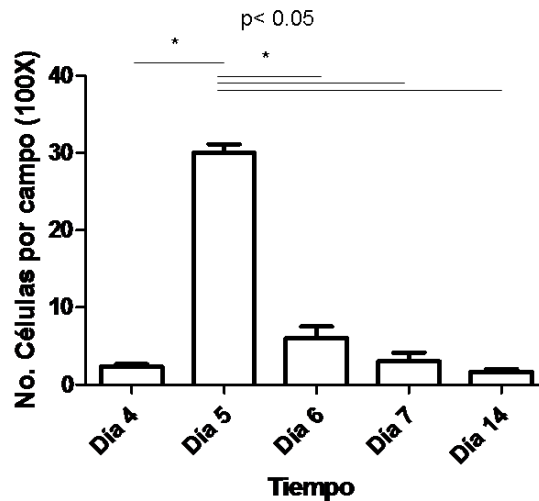


Figura 18. El conteo de células inflamatorias en el tejido corneal es mayor en el día cinco posterior a la colocación de la sutura. En la gráfica se representa la media del conteo de células inflamatorias de tres campos evaluados de manera aleatoria de tejidos corneales obtenidos en días seriados luego de la colocación de los puntos de sutura. Valores obtenidos de tres experimentos independientes. El mayor conteo se obtuvo en el día cinco posterior a la colocación de los puntos de sutura. El asterisco representa  $P < 0.05$ .

9.- Las estructuras vasculares de la cornea con inducción de angiogénesis mediante puntos de sutura expresan CD31.

Mediante inmunofluorescencia se identificó la presencia de vasos sanguíneos de la córnea generados por la colocación de puntos de sutura. El marcaje se identificó no solo en la membrana celular sino también en citoplasma (figura 19).

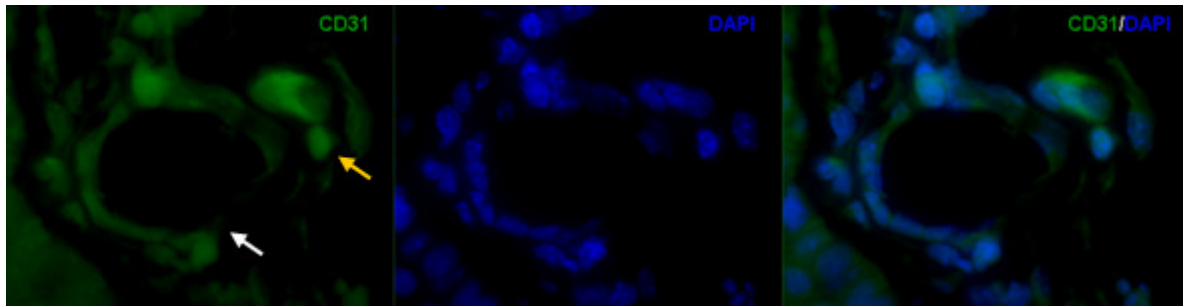


Figura 19. Identificación de vasos sanguíneos mediante un anticuerpo anti-CD31. Microfotografía representativa de ocho ensayos donde se observa una estructura vascular localizada en el estroma de la córnea con un marcaje positivo a CD31 (100X). En la imagen de la izquierda se observa la presencia de CD31 en células que constituyen la pared del vaso estromal (flecha blanca) y en algunas células perivasculares (flecha amarilla). En la imagen del centro se observa el marcaje de los núcleos de las células con DAPI. En la imagen de la derecha se presenta el empalme donde se identifica la presencia del marcaje de CD31 en el compartimento extranuclear.

Al realizar la inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-CD31 en cortes de tejido corneal con angiogénesis y un abundante infiltrado celular, también se observó un marcaje de células inflamatorias presentes dentro del estroma de la córnea (figura 20).

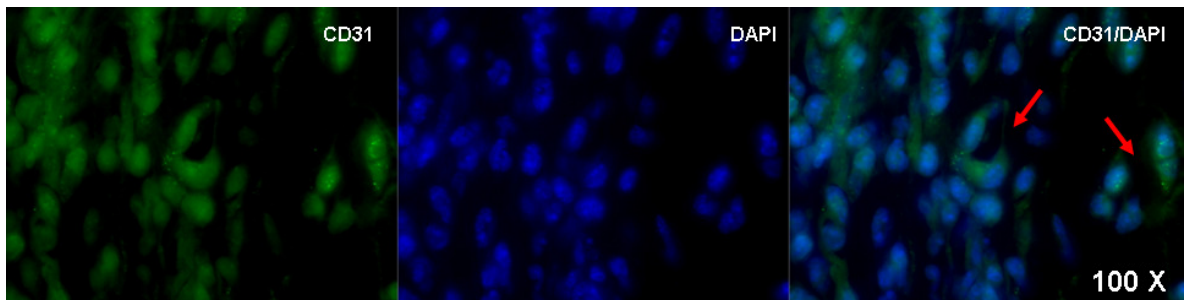


Figura 20. Marcaje anti-CD31 de células presentes en el estroma de la córnea al inducir angiogénesis por colocación de puntos de sutura. Microfotografías de un corte histológico de córnea donde se aprecia el marcaje para CD31, marcaje nuclear y la combinación. En la fotografía de la derecha se identifican dos estructuras vasculares señaladas por las flechas, donde se observa una expresión de CD31 en la membrana y citoplasma de las células que conforman la pared de los vasos sanguíneos. Sin embargo es evidente la expresión de CD31 en un gran número de células que se encuentran infiltrando el estroma de la córnea.

También se identificaron vasos sanguíneos mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-CD31 (figura 21).

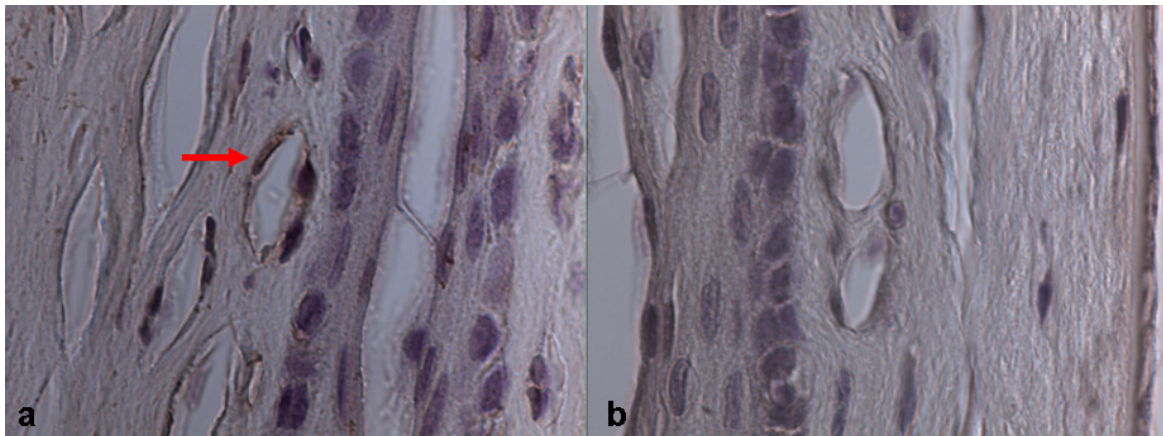


Figura 21. Identificación de vasos sanguíneos en córnea generados por la colocación de puntos de sutura mediante inmunohistoquímica. Microfotografía (100X) de tejido corneal donde se observa un vaso sanguíneo subepitelial con marcaje positivo para CD31 (a). Control negativo (b). La contratinción se realizó con hematoxilina de Mayer.

10.- Cambios en la expresión de la nucleolina en el tejido corneal con inducción de angiogénesis.



En el marcaje anti-nucleolina de las córneas con neovascularización generada por la colocación de suturas, se observó en varias zonas del tejido una localización de nucleolina dentro del citoplasma y aparentemente en la superficie celular. Lo que contrastó con las córneas control donde el marcaje se presentó principalmente en el compartimento nuclear de las células de la capa basal del epitelio anterior (figura 22). Además fue posible identificar un marcaje en células que constituyen los vasos sanguíneos formados por la aplicación de sutura, con aparente colocalización en citoplasma y en la membrana celular (figura 23 y 24).

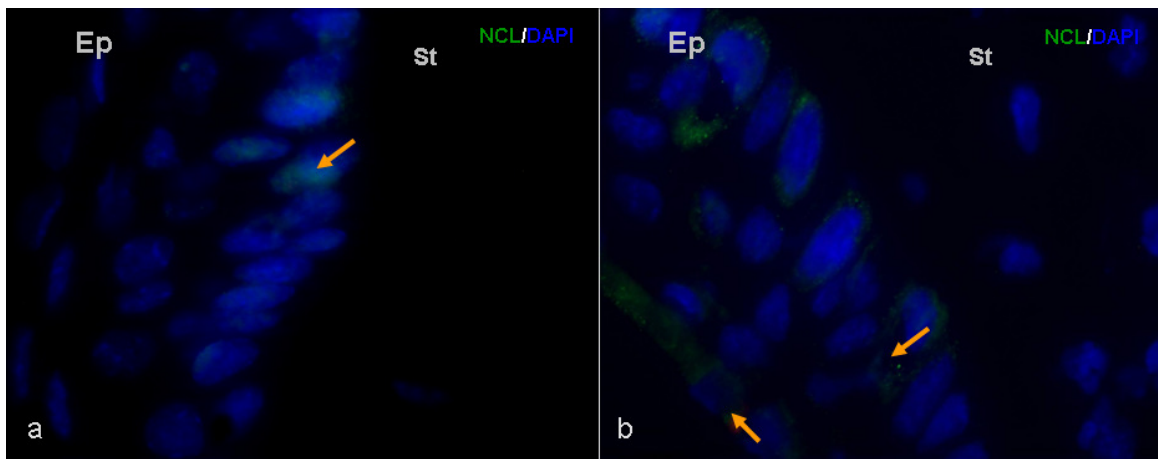


Figura 22. Evaluación comparativa del inmunomarcaje anti-nucleolina en el epitelio anterior de la córnea sano y con inducción de angiogénesis. (a) Marcaje anti-nucleolina localizado en la región del núcleo de células de la capa basal del epitelio anterior de una córnea sana. (b) Microfotografía de inmunofluorescencia de corte histológico de córnea con angiogénesis donde se observa un marcaje en la región perinuclear y en el citoplasmática de la capa basal de células del epitelio anterior (flecha), marcaje empleando anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Ep: Epitelio anterior, St: estroma corneal (100X). En azul se identifican los núcleos celulares con DAPI.

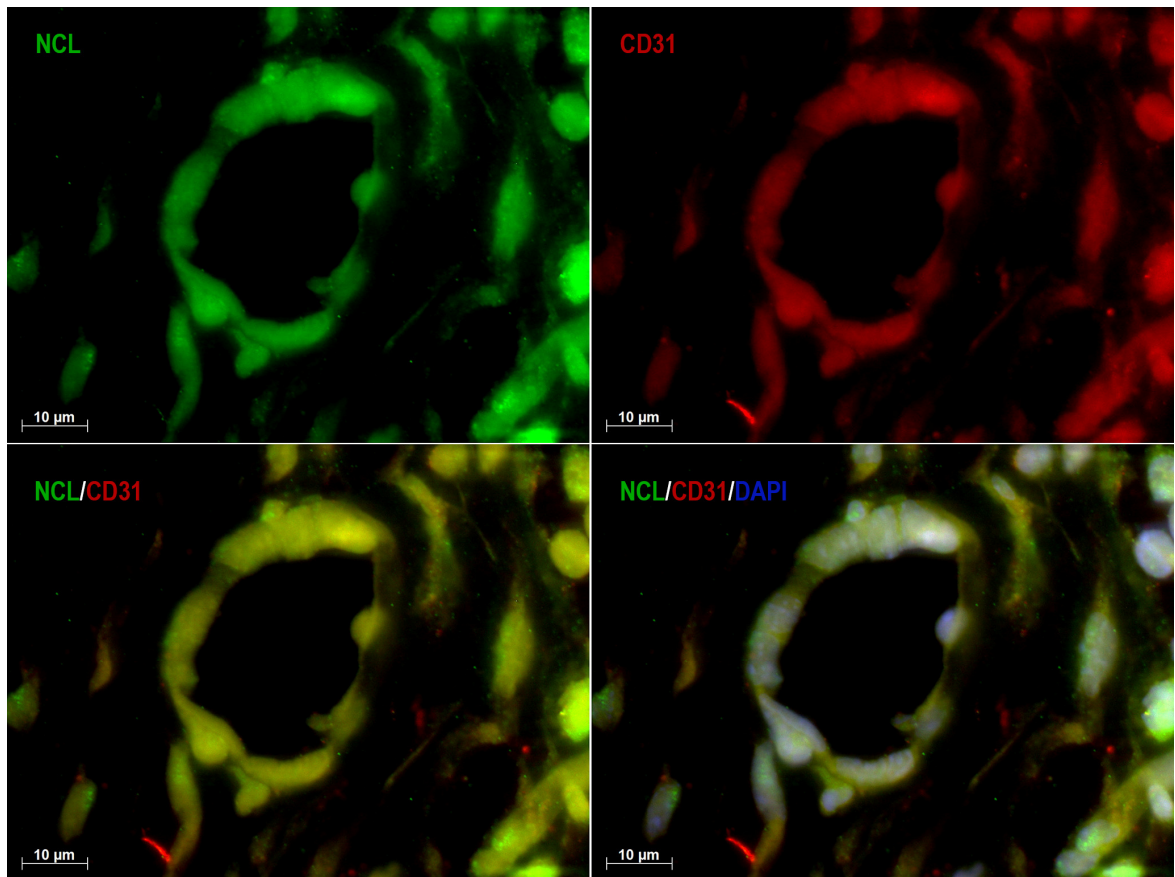


Figura 23. Identificación del inmunomarcaje anti-nucleolina en células que constituyen vasos sanguíneos en córnea. Microfotografía (100X) de inmunofluorescencia de corte histológico de córnea con angiogénesis donde se observa colocalización de nucleolina y CD31 en células de la pared de un vaso sanguíneo localizado en el estroma.

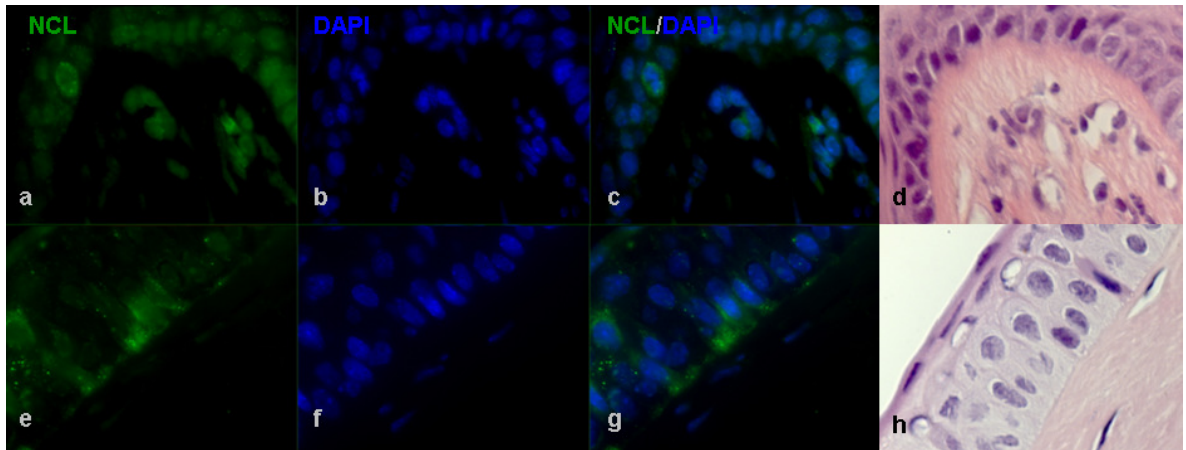


Figura 24. Localización de la nucleolina mediante inmunofluorescencia en el tejido corneal con inducción de angiogénesis. Microfotografías de cortes de seriados de córneas con neovascularización. Marcaje de nucleolina en estructuras vasculares de la córnea periférica neovascularizada (a-c). Corte histológico seriado teñido con hematoxilina-eosina donde se aprecia la zona del estroma con presencia de vasos sanguíneos y células con expresión de nucleolina (d). Marcaje de nucleolina en una córnea de ratón sin neovascularización con mínima cantidad de células en el estroma las cuales expresan la proteína en menor cantidad y en el compartimento nuclear principalmente (e-g). Corte seriado del tejido teñido con hematoxilina-eosina de un ratón control (h). Aumento 100X.

Se presentó un marcaje de NCL en las córneas obtenidas en los días 4, 5, 6, 7 y 14 después de la colocación de los puntos de sutura. El marcaje se identificó en citoplasma y superficie celular de células que conforman los vasos sanguíneos de la córnea, presentando un patrón similar en cada corte (figura 25).

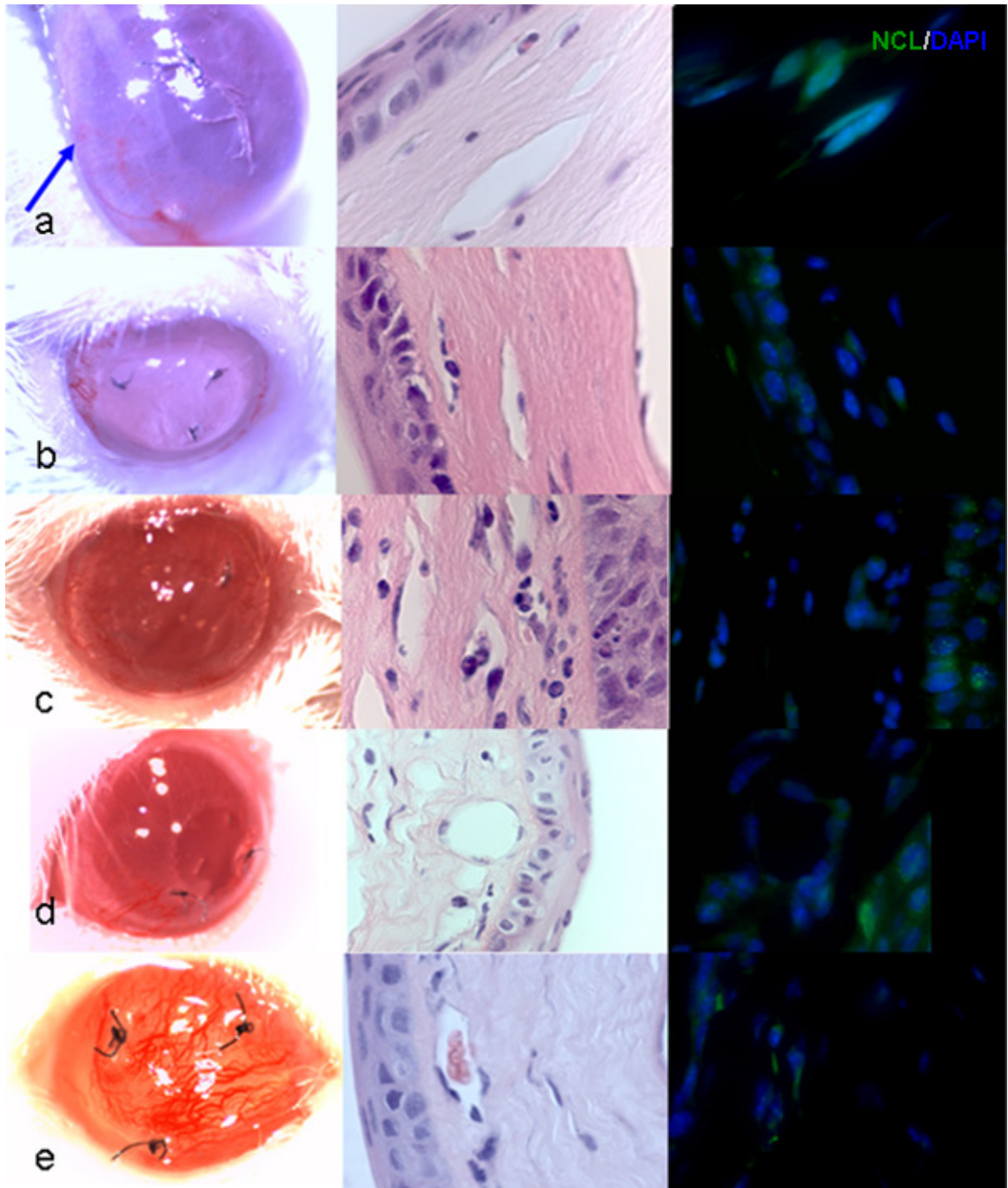


Figura 25. Marcaje de nucleolina en las estructuras vasculares encontradas en diferentes días posteriores a la inducción de angiogénesis. En la secuencia de imágenes se observa la fotografía clínica de una córnea con la presencia clínica

de vasos sanguíneos, el corte histológico de la misma córnea teñido con hematoxilina-eosina donde es posible observar un vaso sanguíneo y el marcaje anti-NCL del corte seriado teñido con HE al día 4 (a). Imágenes correspondientes al día 5 (b). Imágenes correspondientes al día 6 (c). Imágenes correspondientes al día 7 (d). Imágenes correspondientes al día 14 (e). En cada caso es posible identificar un marcaje anti-NCL en las células que conforman los vasos sanguíneos.

Para poder evaluar los cambios en la localización de la nucleolina en el tejido corneal con inducción de angiogénesis, se realizó un doble marcaje con proteínas de membrana como cadherinas. Fue posible identificar colocación en la membrana y aparentemente en citoplasma al evaluar las imágenes seriadas con el microscopio de fluorescencia (figura 26).

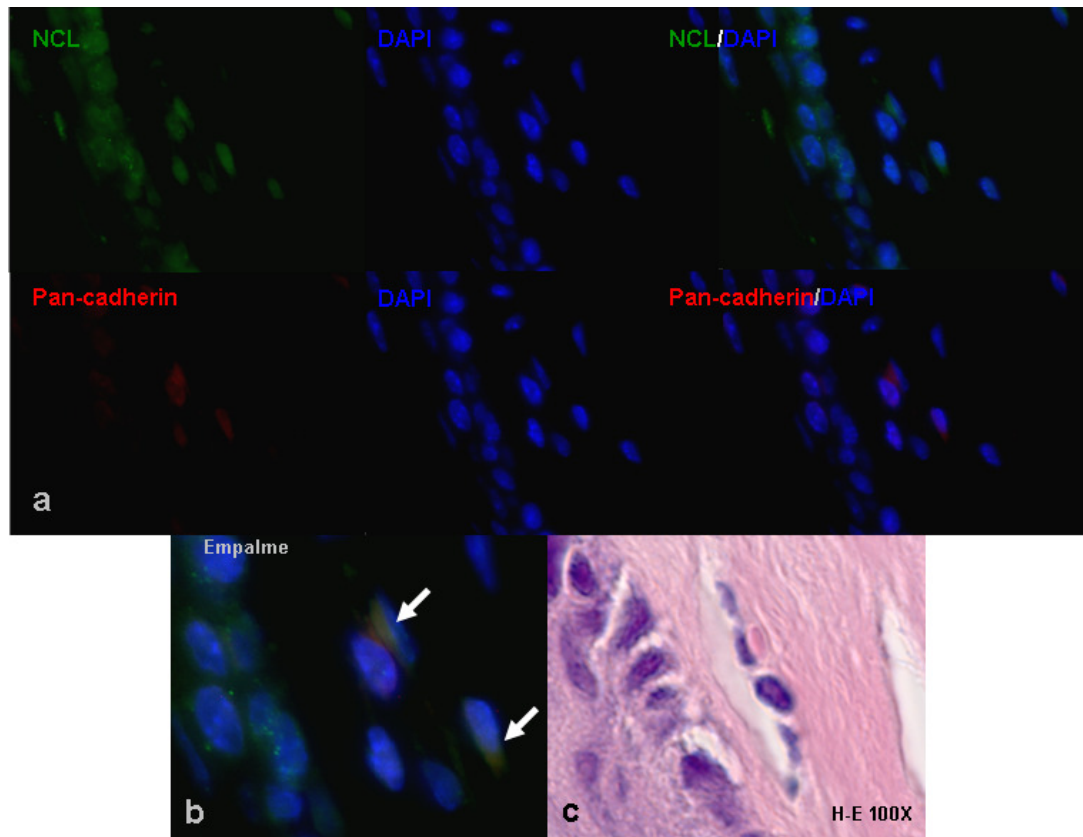


Figura 26. Caracterización de la localización de la nucleolina en el tejido corneal con inducción de angiogénesis. Microfotografía (100X) del tejido corneal con desarrollo de vasos sanguíneos donde se observa marcaje de nucleolina y de pancadherina en células del epitelio anterior, y células conformando un vaso del estroma subepitelial (a). Acercamiento del epitelio y del vaso sanguíneo donde se aprecia la colocalización en células que conforman la estructura vascular (flechas) (b). Corte histológico seriado del vaso subepitelial de la córnea tratado con puntos de sutura (tinción de hematoxilina-eosina). Aumento 100X (c).

Otro coinmunomarcaje fue utilizando un anticuerpo anti-NCL y una proteína del citoesqueleto como la miosina no muscular de cadena pesada 9 (MyH9), la cual se ha identificado que participa como enlazador de la nucleolina del citoesqueleto y la nucleolina de membrana (Huang y col., 2006). En estos ensayos fue posible identificar un doble marcaje en citoesqueleto en células de la pared de vasos sanguíneos y algunas células del estroma con angiogénesis experimental tanto en cortes del día 4 y 7 posterior a la colocación de la sutura (figura 27).

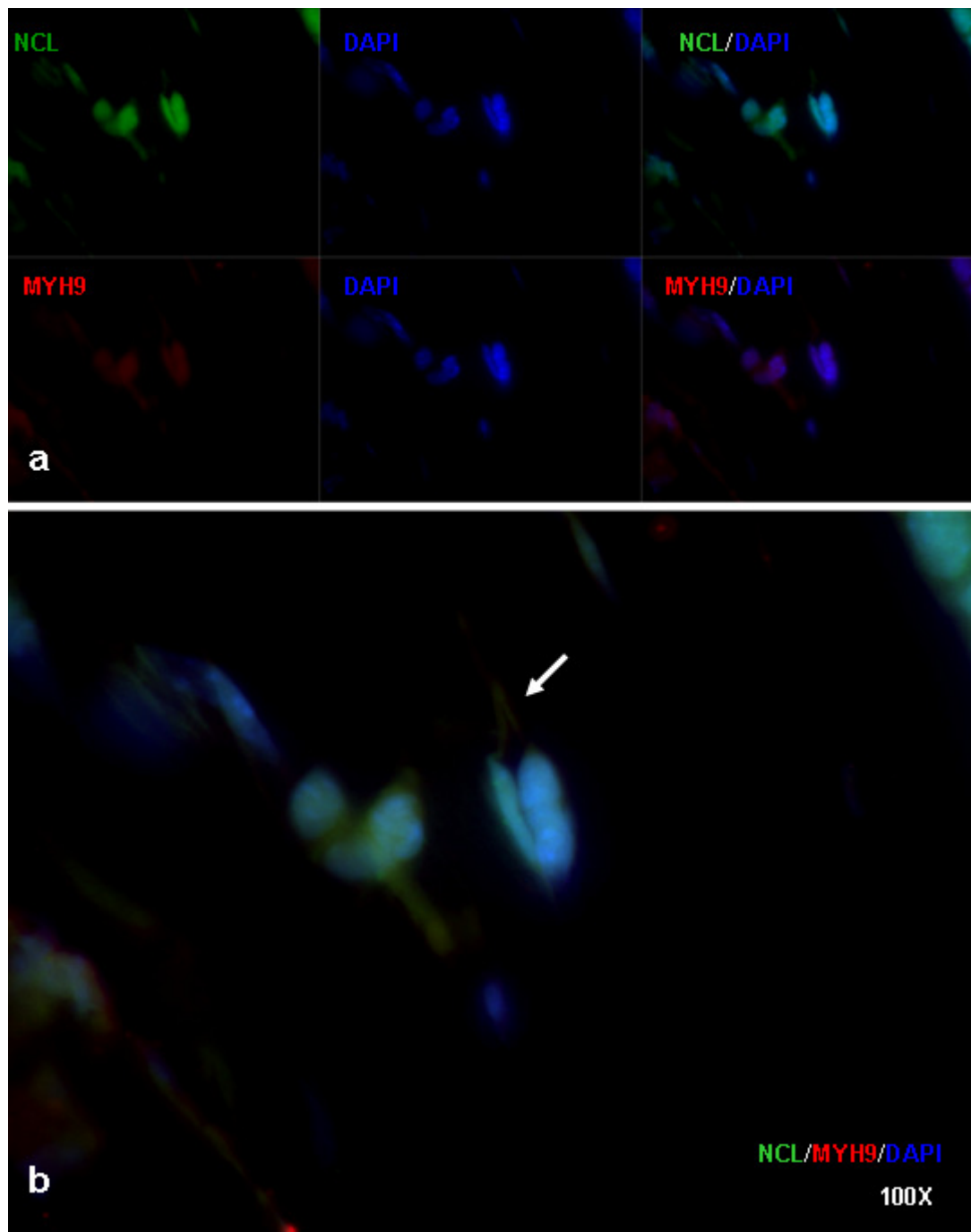


Figura 27. Coinmunomarcaje entre NCL y MyH9 en corneas con angiogénesis experimental. Microfotografías de un corte histológico de córnea con angiogénesis. En donde es posible observar un marcaje anti-NCL en verde y anti-MyH9 en rojo

(a). Microfotografía que representa tres ensayos donde es posible identificar una colocalización en células que constituyen los vasos sanguíneos (flecha).

Para corroborar una movilización de nucleolina hacia la membrana celular, se empleó un marcaje de superficie utilizando isolectina B4; por medio de la colocalización fue posible distinguir la presencia de nucleolina en la superficie de células de la capa basal del epitelio anterior de la córnea y de células que conforman las estructuras vasculares inducidas de manera experimental. Esta movilización de nucleolina fue evidente al comparar los cortes histológicos de córnea en condiciones no patológicas y con inducción de angiogénesis (figura 28).

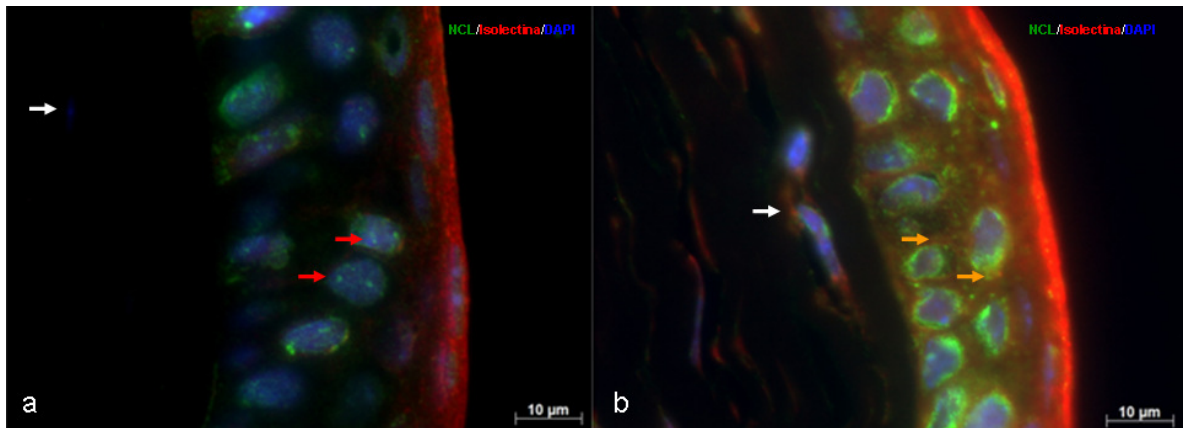


Figura 28. Movilización de la nucleolina durante la angiogénesis de la córnea. Microfotografía obtenida con microscopía de fluorescencia donde se aprecia el marcaje de NCL en el núcleo y nucleolos de células epiteliales de una córnea control (flechas rojas). En la imagen se observan células del estroma sin marcaje de NCL como lo indica la flecha blanca (a). Imagen obtenida de un corte histológico de córnea con inducción de angiogénesis donde se aprecia la movilización de NCL hacia el citoplasma y membrana celular colocalizando con isolectina (flechas amarillas). Además se aprecia un marcaje en los mismos compartimentos en células del estroma superficial de la córnea (flecha blanca). Aumento de 100X.



También se presentó una expresión de nucleolina en el citoplasma y la superficie celular de células que conforman las estructuras vasculares en córneas con la colocación de suturas. Lo anterior fue corroborado empleando un marcaje con el anticuerpo anti-nucleolina y el marcaje de superficie con isolectina B4 (figura 29 y 30).

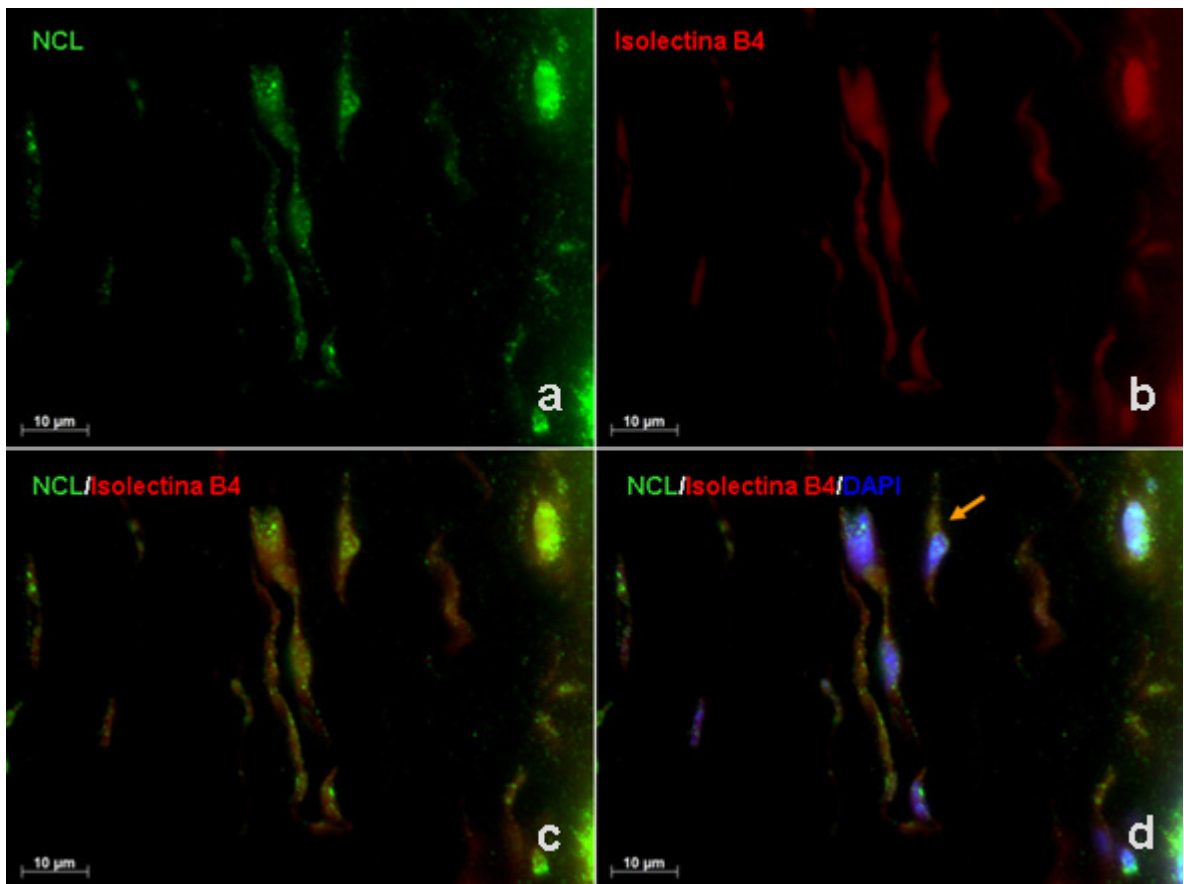


Figura 29. Colocalización de nucleolina e isolectina en un vaso sanguíneo de una córnea con inducción de angiogénesis mediante sutura. Microfotografía de córnea que representa el doble marcaje en un vaso sanguíneo de una córnea con inducción de angiogénesis. Marcaje de NCL en una estructura vascular subepitelial que permite evidenciar su presencia delimitando el vaso (a). Marcaje con isolectina B4 para identificar la estructura vascular (b). Sobreposición del

marcaje de NCL e isolectina B4 para identificar la colocación en células que conforman la pared del neovaso (c). Identificación de los núcleos de las células que conforman la estructura vascular para evidenciar el marcaje de NCL e isolectina en el espacio extranuclear. La flecha señala una zona de colocación en una célula del estroma (d). Aumento de 100X.

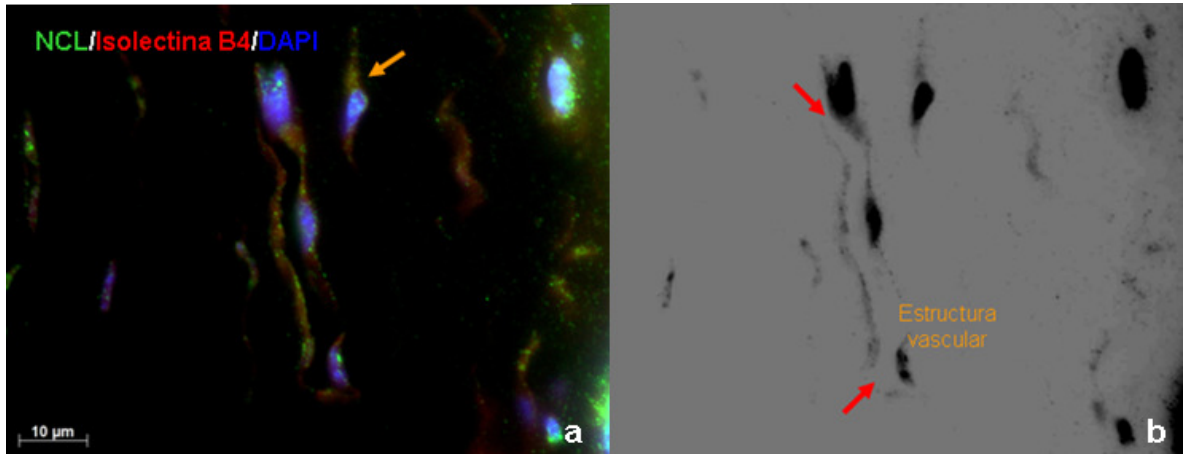


Figura 30. Marcaje anti-NCL e isolectina de un vaso inducido con puntos de sutura. Microfotografía de la imagen 29 utilizada para ejemplificar la manera en la que se corroboró la presencia de estructuras vasculares (a). La misma imagen fue procesada para poder distinguir la pared del vaso sanguíneo en el estroma anterior, aplicando la escala de grises y contraste del programa Microsoft PowerPoint (Redmond Washington USA) (b). Aumento de 100X.

La identificación de un doble inmunomarcaje se presentó en estructuras vasculares que solo fueron identificadas una vez que se empleó la función de contraste de interferencia diferencial (DIC) del programa AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss, Jena Germany), donde se logra sobreponer la imagen obtenida con Apotome y la imagen obtenida en campo claro (figura 31).

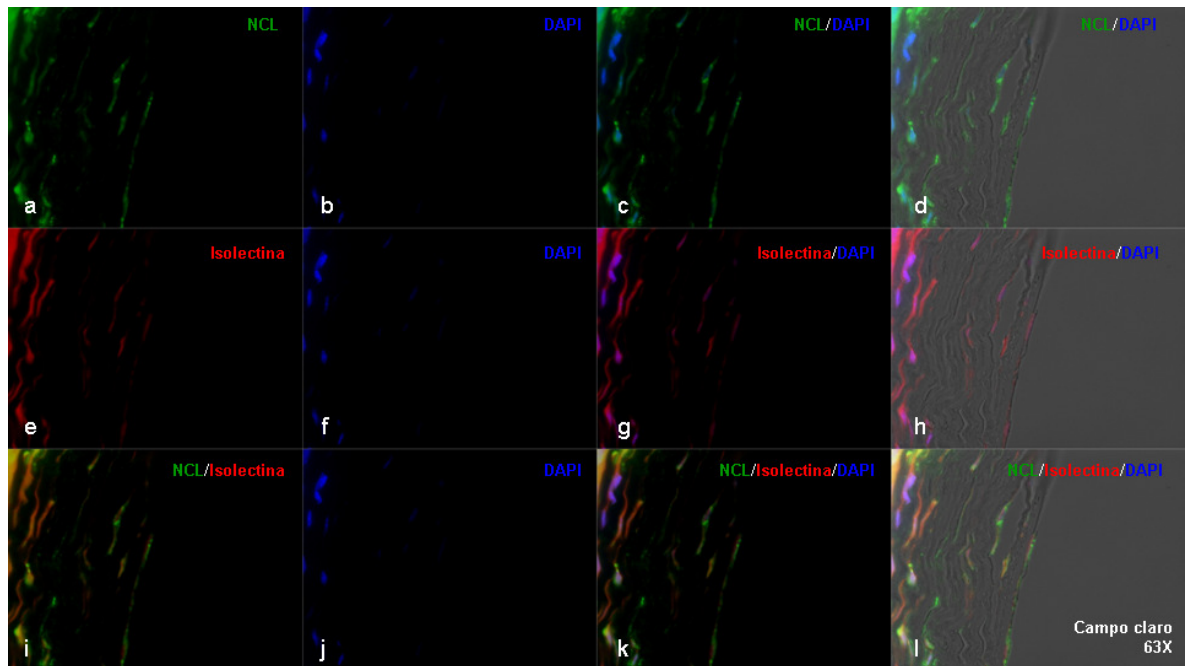


Figura 31. Marcaje de NCL con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa fluor 488 e isolectina conjugada con Alexa fluor 594 en estructuras vasculares de córnea identificadas con DIC. Microfotografías de un vaso sanguíneo de córnea con un marcaje anti-NCL (a, b, c) y la imagen del vaso identificado con la observación con DIC (campo claro). En esta imagen es posible distinguir la luz y la pared del vaso (d). Marcaje para isolectina y vista en campo claro (e, f, g, h). Doble marcaje observado en fluorescencia convencional y con DIC (campo claro) para reconocer la estructura vascular (i, j, k, l). Aumento de 63X.

11.- El anticuerpo anti-VEGF (bevacizumab) reduce el desarrollo de vasos sanguíneos en córnea y promueve cambios en la localización tisular de NCL en el modelo de angiogénesis por aplicación de sutura.

En la evaluación clínica luego de siete días de tratamiento con sutura y la aplicación tópica de bevacizumab, se observó una disminución del área de la córnea afectada por vascularización en comparación con el grupo de ratones tratados con anti-VEGF desnaturalizado (figura 32 y 33). También se encontró un

conteo menor de vasos sanguíneos en los tejidos de córneas tratadas con el anticuerpo (figura 34).

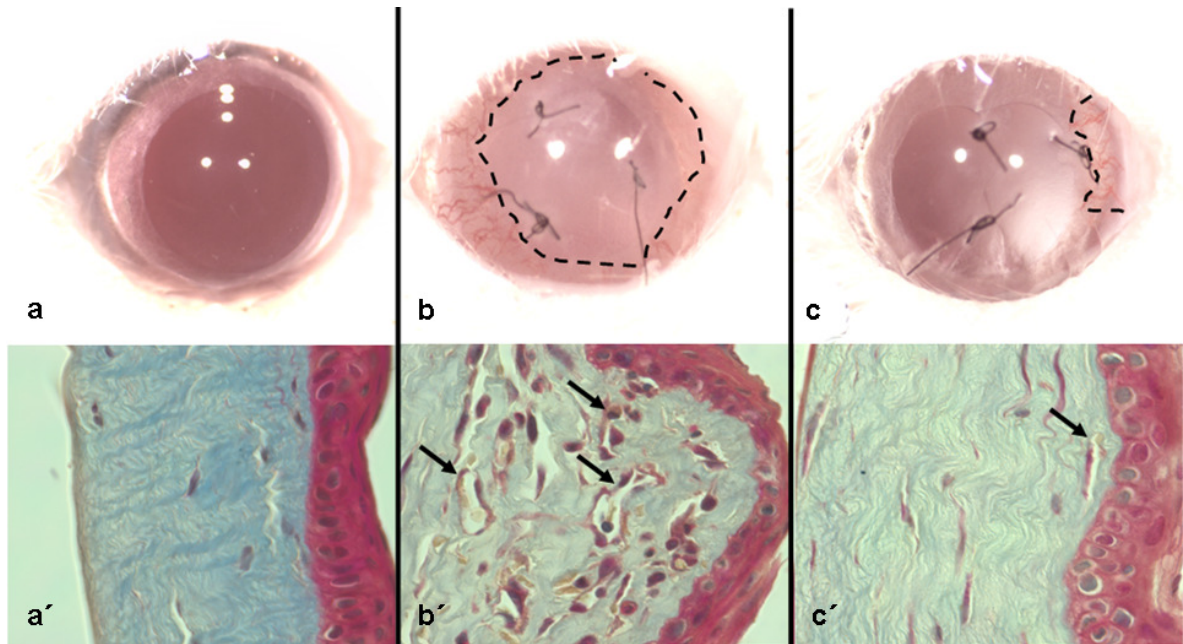


Figura 32. Inhibición de la angiogénesis mediante la aplicación tópica de bevacizumab. Fotografía (20X) representativa de una córnea sin alteraciones patológicas (a). Microfotografía (63X) de un corte histológico teñido con tinción tricrómica de Masson, de una córnea sin alteraciones patológicas (a'). Fotografía clínica representativa (20X) de una córnea con inducción de angiogénesis mediante la colocación de sutura y la aplicación tópica de bevacizumab desnaturalizado. Es posible observar los vasos sanguíneos que casi alcanzan la zona del punto de sutura y que surgen desde todo el limbo esclerocorneal (la línea interrumpida delimita el área corneal infiltrada por vasos sanguíneos) (b). Microfotografía de esta córnea donde se identifica una gran cantidad de vasos sanguíneos en todo el estroma (flechas) (b'). Fotografía clínica (20X) de una córnea tratada con aplicación de sutura y la administración tópica de bevacizumab que ejemplifica la inhibición de vasos sanguíneos (la línea interrumpida delimita

una menor área infiltrada por vasos sanguíneos) (c). Corte histológico (63X) representativo de una córnea tratada con bevacizumab tópico que permite identificar una menor cantidad estructuras vasculares en el tejido (flecha) (c'). Imágenes representativas de cinco ojos evaluados, de cinco experimentos independientes.

### Efecto anti-angiogénico del anticuerpo anti-VEGF

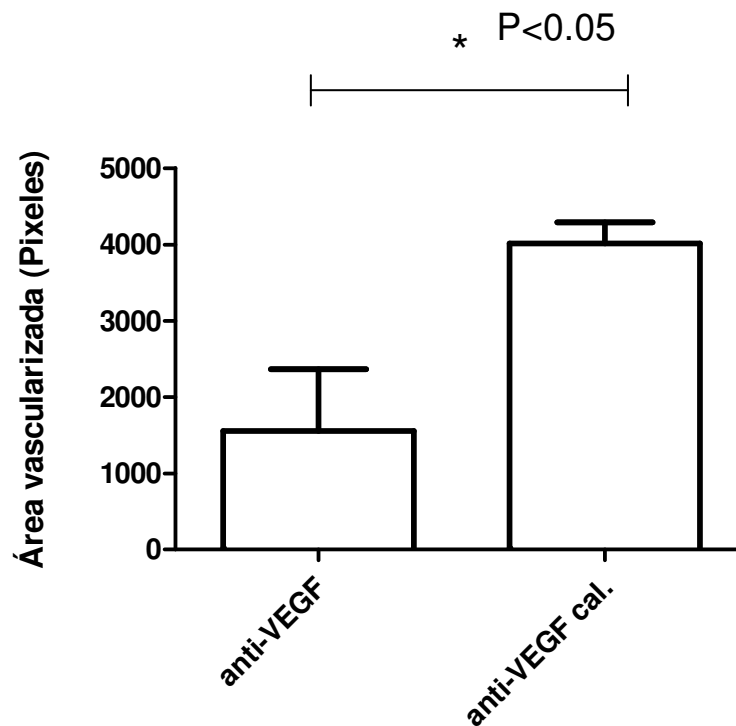


Figura 33. La administración tópica de bevacizumab redujo la extensión de la córnea afectada por la angiogénesis. En la gráfica se observa que el grupo tratado con el anticuerpo anti-VEGF, presenta una disminución del área corneal afectada por el desarrollo de vasos sanguíneos, en comparación con el grupo control tratado con el anticuerpo desnaturalizado por calor (anti-VEGF cal). El área corneal afectada por angiogénesis se representa en píxeles al hacer el análisis con el programa Pixcavator Image Analyzer (Intelligent Perception, Huntington, W. Va., USA). El asterisco representa  $P < 0.05$ .

### Inhibición del no. de vasos sanguíneos mediante ac. anti-VEGF

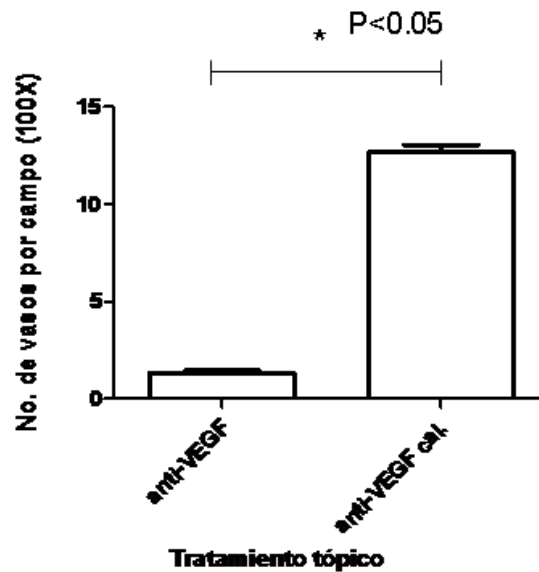


Figura 34. Disminución del número de vasos sanguíneos en corneas tratadas con bevacizumab. Representación gráfica que demuestra una disminución en el número de vasos sanguíneos de los cortes de corneas tratadas con bevacizumab (anti-VEGF) en comparación de los cortes de corneas tratadas con el anticuerpo desnaturalizado por calor (anti-VEGF cal) a los siete días de la colocación de suturas. El asterisco representa  $P < 0.05$ .

Mediante inmunofluorescencia se evaluó la expresión de NCL en el tejido corneal al bloquear la angiogénesis mediante un anticuerpo anti-VEGF (bevacizumab). Se observó que al inhibir la angiogénesis de la córnea se presentó un patrón de expresión similar al de una córnea control, es decir, el marcaje anti-NCL se delimitó principalmente en el núcleo de la célula. No obstante en cortes de corneas tratados con anti-VEGF también se identificó una moderada expresión de NCL fuera del núcleo. En las corneas tratadas con anti-VEGF desnaturalizado, se identificó un mayor número de vasos sanguíneos en el estroma cuyas células expresaron marcaje de NCL fuera del núcleo y en la membrana celular, esta

misma característica se presentó en las células epiteliales del epitelio anterior de la córnea cuando se marcó la membrana celular con isolectina (figura 35).

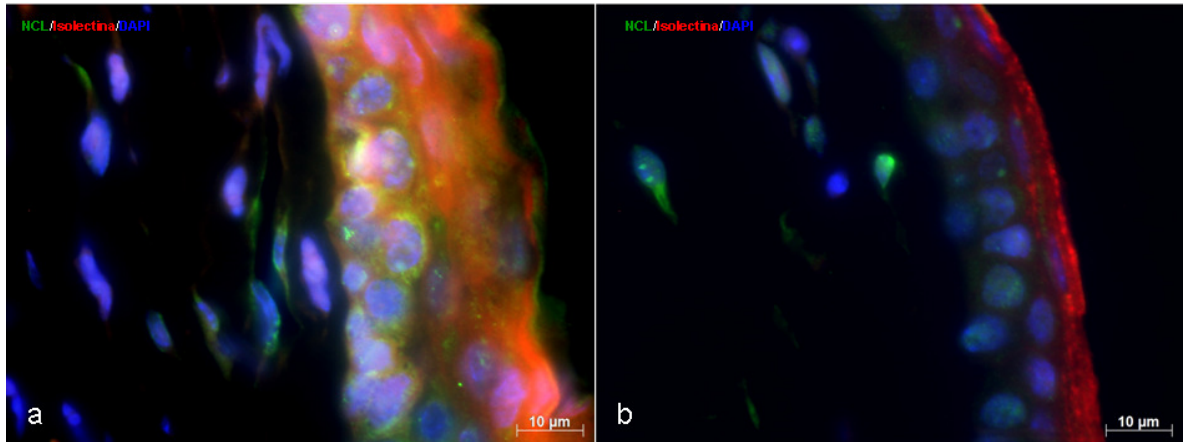


Figura 35. Efecto de la inhibición de la angiogénesis sobre el marcaje de nucleolina en corneas de ratón BALB/c. Microfotografía de 100X que representa un corte histológico de córnea tratada con bevacizumab desnaturalizado donde predomina un marcaje de NCL de manera perinuclear y asociado a la membrana de células epiteliales y células que conforman la pared de vasos sanguíneos (a). El marcaje se limita principalmente al núcleo de células del estroma y del epitelio anterior de la córnea en el tejido tratado con el anticuerpo anti-VEGF (b).

Para evaluar el marcaje de NCL entre vasos sanguíneos neoformados en condiciones patológicas y vasos maduros formados desde una etapa embrionaria, se realizó inmunofluorescencias de tejidos completos montados en plano de córnea con inducción de angiogénesis mediante la colocación de suturas y tejidos de retina. Empleando un doble marcaje con anticuerpo anti-NCL y un marcador de isolectina B4, se identificó que las células de los vasos formados en córnea presentan un claro marcaje de NCL tanto en el núcleo como fuera de la de este ya que en algunas células se observó una combinación de ambos marcadores. Por el contrario, los vasos sanguíneos de retina de ratones de 6-8 semanas, no presentaron marcaje de NCL pero si fueron identificados con el marcador de

isoelectina. De manera interesante, las células de la retina mostraron presencia de NCL en sus núcleos (figura 36 y 37).

Considerando que el desarrollo de vasos sanguíneos de la retina se presenta posterior al nacimiento (Stahl y col., 2010), se buscó identificar la presencia de NCL en el desarrollo de vasos sanguíneos de la retina en ratones neonatos desde el día uno hasta el día siete. De manera interesante se observó claramente un marcaje de NCL en los extremos de algunos vasos de retina en el día 4 (figura 38).

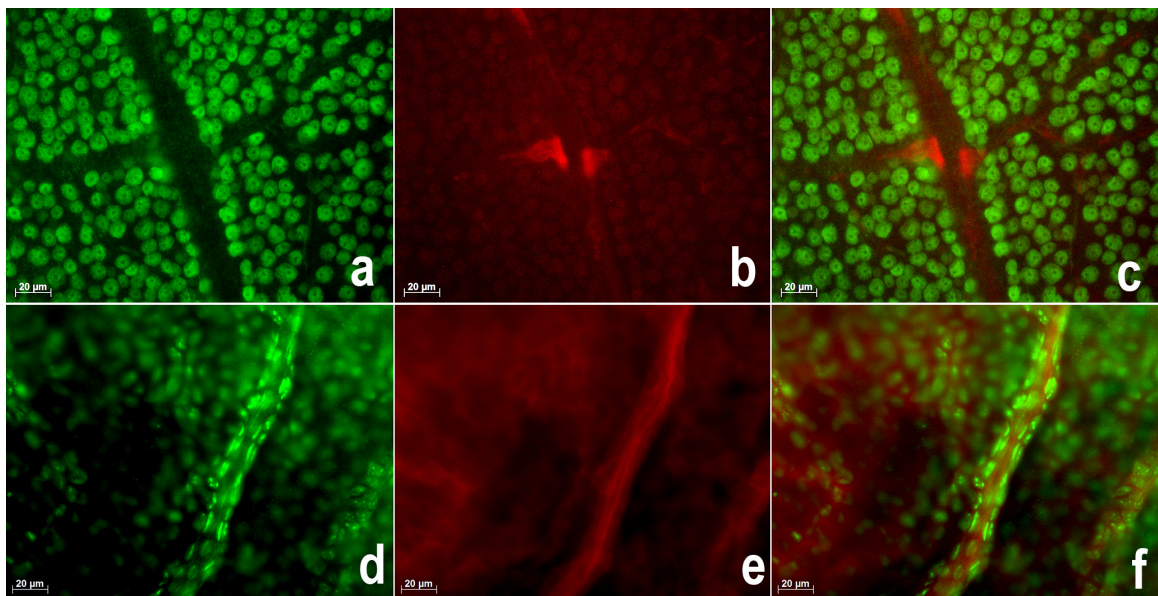


Figura 36. Expresión selectiva de NCL en vasos neoformados en condiciones patológicas. Microfotografías de fluorescencia de tejidos completos montados en plano, que muestran ausencia de marcaje para NCL en las células de los vasos sanguíneos. Marcaje de NCL en los núcleos de las células de la retina (a). Marcaje de isoelectina B4 en la pared de un vaso de la retina (b). Empalme de a y b que delimita un vaso de retina y sus ramificaciones (c). Presencia de NCL en células que conforman un vaso sanguíneo neoformado en córnea (d). Marcaje de isoelectina en el mismo vaso donde también es posible identificar las uniones



intercelulares del epitelio corneal (e). Empalme de d y e que permite delimitar el vaso sanguíneo (f). Aumento de 40X.

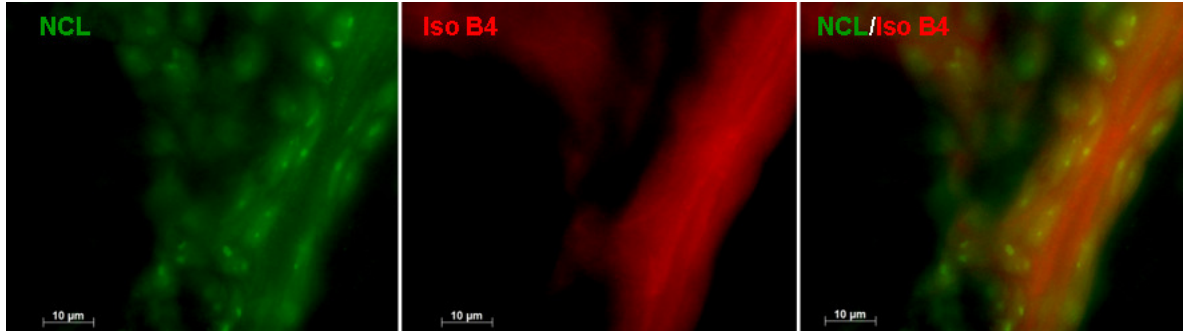


Figura 37. Las células de vasos sanguíneos neoformados en córnea expresan NCL en núcleo y fuera del núcleo. Microfotografías de un vaso sanguíneo de córnea inducido con la colocación de sutura. La presencia de un empalme del marcador de NCL e isolectina B4, puede indicar un marcaje de la proteína en estudio relacionada con la superficie celular. Aumento de 100X.

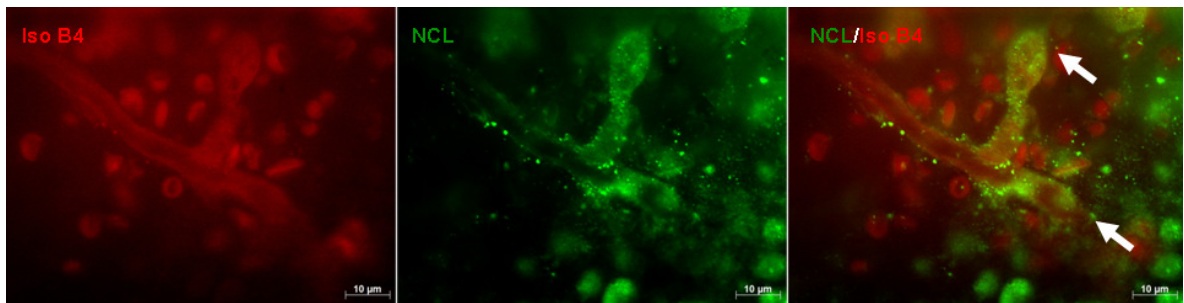
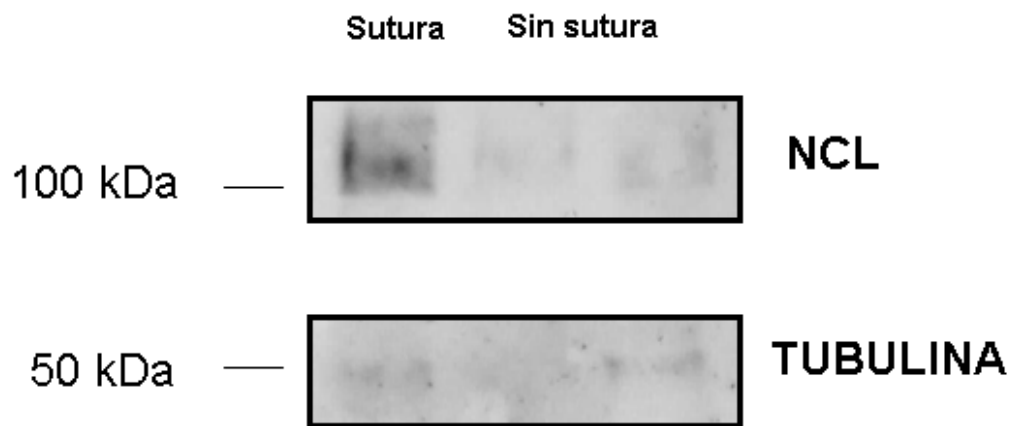


Figura 38. Marcaje de NCL en vasos retinianos durante su desarrollo. Microfotografías de un vaso sanguíneo de retina en desarrollo donde es posible identificar el extremo del vaso en formación (brote). La imagen de la izquierda permite delimitar el extremo del vaso sanguíneo marcado con isolectina B4. En la imagen del centro se evidenció un marcaje de NCL principalmente en la terminación de la estructura vascular. En la imagen de la derecha se observa la

sobreposición de ambos marcajes sobre dos células de la punta del vaso con un marcaje de NCL (flechas) en una retina de un ratón de 4 días de nacido.

Mediante análisis de Wester Blot se buscó identificar diferencias en la expresión de NCL tanto en córneas sin angiogénesis como en córneas con angiogénesis inducida por la colocación de puntos de sutura. Se observó una mayor expresión de NCL en córneas con angiogénesis respecto a las córneas control (figura 39a). De manera clara se presentaron bandas con marcaje de NCL de menor peso molecular como: 75, 63, 20 y 17 kDa en el tejido corneal con angiogénesis. Por otro lado también se identificaron bandas de 63 y 17 kDa en los tejidos de corneas control (figura 39b).



**a)**

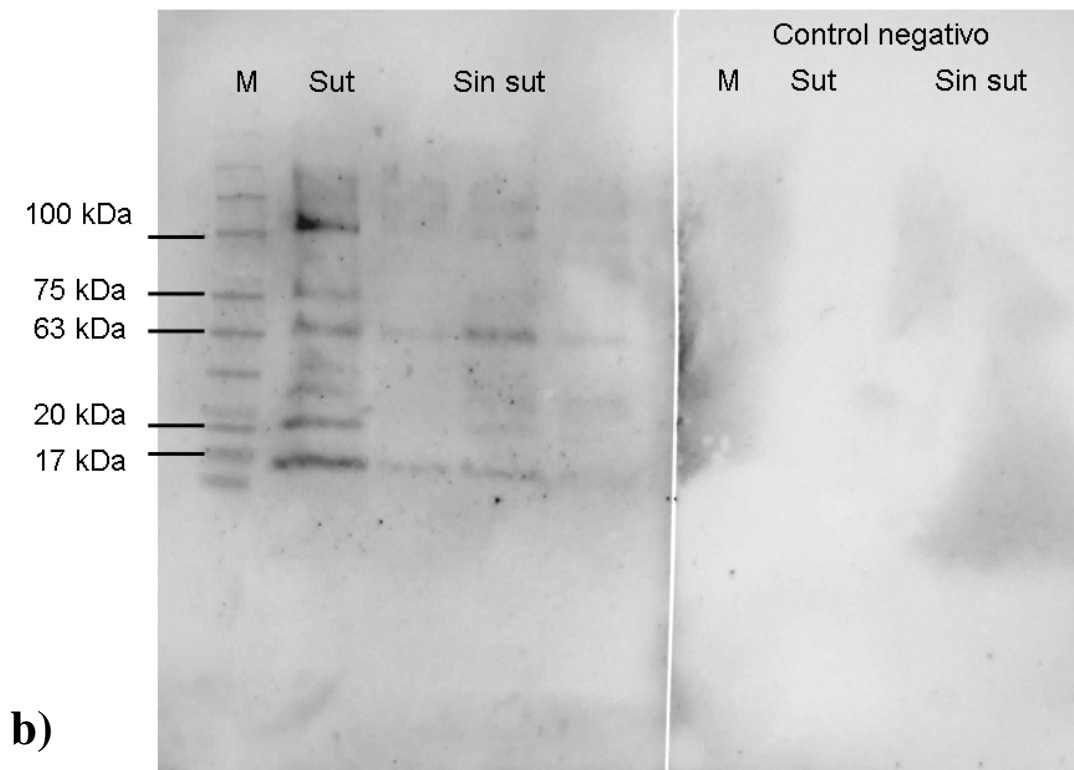


Figura 39. Incremento de la expresión de NCL en córneas con inducción de angiogénesis. Fotografía de Western Blot realizado en córneas con angiogénesis y córneas sin angiogénesis (control). En el carril de la izquierda se aprecia la expresión incrementada de NCL en el tejido corneal con angiogénesis inducida por colocación de sutura, los carriles de la derecha muestran la expresión de NCL en córneas control (a). En la imagen de la izquierda se observa un marcaje anti-NCL correspondiente a la banda de 100 kDa siendo más marcado en el carril correspondiente al tejido corneal con angiogénesis (sut) en comparación con los siguientes tres carriles que corresponden con tejido control (sin sut). Además de la banda de 100 kDa, es posible observar bandas de menor peso molecular que podrían relacionarse con fragmentos de NCL. La imagen de la derecha corresponde a la membrana tratada sin anticuerpo primario (control negativo) (b).

## **Discusión y conclusiones.**

Se sabe que la nucleolina es una proteína que se expresa en la superficie de células endoteliales durante la angiogénesis (Christian y col., 2003, Fogal y col., 2009, Destouches y col., 2008, Huang y col., 2006, Birmpas y col., 2012a, Liang y col., 2013). Sin embargo en la actualidad no se ha reportado si esta proteína participa en el proceso de formación de vasos sanguíneos en el tejido corneal. Por lo tanto el presente proyecto es uno de los primeros estudios en los que se evalúa la presencia de nucleolina en el tejido corneal de ratones, al comparar condiciones no patológicas y condiciones de inducción de angiogénesis.

La colocación de tres suturas en el estroma corneal se considera un modelo de angiogénesis experimental que permite clínicamente observar vasos sanguíneos a partir del día 4 después del procedimiento. En estudios previos se ha reportado la presencia de vasos sanguíneos con una longitud de 0.4 mm en córneas luego de tres días de ser tratadas con la colocación de suturas (Shi y col., 2011). El mayor desarrollo de vasos sanguíneos se identificó a partir de día siete (estos resultados concuerdan con lo reportado por Shi y colaboradores en 2011) y se mantuvo en algunos casos hasta el día 14; posteriormente la zona afectada con angiogénesis disminuyó gradualmente hasta el día 21 y 28 donde también se apreció un claro adelgazamiento de los vasos con presencia de tejido de granulación en la zona de los puntos de sutura (datos no mostrados). El infiltrado de células inflamatorias en la córnea se observó en los cortes histológicos desde el día uno después de la colocación de la sutura, sin embargo el mayor conteo se obtuvo en el día 5 y luego disminuyó gradualmente, desapareciendo para el día 14. Shi y colaboradores en 2011, reportaron que el mayor grado de infiltrado inflamatorio se da al tercer día después de colocar suturas y posteriormente existe una reducción para el día 14; esta disminución de células inflamatorias también estuvo acompañada de una regresión de vasos sanguíneos. Estos hallazgos podrían indicar que en el modelo de inducción de angiogénesis mediante la aplicación de sutura, el proceso

inflamatorio altera el privilegio angiogénico de la córnea al promover la expresión de moléculas proangiogénicas que posteriormente inducen y mantienen la neovascularización del tejido como se ha reportado por (Regenfuss y col., 2012). Tras comparar el modelo de angiogénesis por colocación de suturas, el modelo de quemadura química por álcali y el modelo de inyección intraestromal de albúmina sérica bovina, fue posible conservar apropiadamente las características histológicas del tejido con el primer método, condición que permitió identificar cada una de las capas de la córnea y la localización de las estructuras vasculares. El desarrollo de vasos sanguíneos mediante la aplicación de suturas, predominó en el estroma superficial de la córnea. En varios animales se observó un desarrollo inicial de vasos sanguíneos a partir de la región del limbo infratemporal, zona que podría ser un blanco de estudio para la investigación de la angiogénesis en la córnea. A diferencia de metodologías descritas por Shi y colaboradores, 2011 o Giacomini y colaboradores, 2014, en este modelo no se realizó el marcaje de la córnea utilizando trépano antes de la colocación de los puntos de sutura, lo que podría asociarse con una mínima presencia de células inflamatorias y de tejido de granulación en los cortes histológicos evaluados al día siete de la colocación de la sutura.

Aunque existen varios marcadores de angiogénesis como la cadherina de endotelio vascular (sus siglas en inglés VE-Cadherin), la molécula de adhesión intercelular 1 o la molécula de adhesión celular vascular 1 (Sivak y col., 2011), el marcaje de CD31 continua siendo empleado para la identificación de vasos sanguíneos en córnea y otros tejidos (Shi y col., 2011, Giacomini y col., 2014, Vestweber, 2008, Bourghardt Peebo y col., 2011, Yuen y col., 2011). Por medio de técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, en el presente estudio se observó un marcaje positivo para CD31 en células que conformaron la mayoría de las estructuras vasculares; este marcaje no sólo se limitó a la membrana celular sino también al citoplasma. También se identificó un marcaje de CD31 en células que infiltraron el estroma corneal. Está reportado que la expresión de CD31 se

puede presentar en leucocitos como neutrófilos, monocitos o algunos subgrupos de linfocitos T y que esta molécula está implicada en el proceso de migración transendotelial (Chosay y col., 1998, Liu y Shi, 2012), por lo tanto la expresión de CD31 en estas células (algunas de las cuales presentaron un núcleo multilobulado similar al de los neutrófilos), puede estar relacionado con procesos de migración leucocitaria dentro del tejido corneal.

Para la evaluación histológica de la córnea con inducción de angiogénesis se emplearon las tinciones de hematoxilina-eosina, tinción tricrómica de Mallory y tinción tricrómica de Masson. En esta última se observó con mayor claridad la estructura de los vasos sanguíneos que contrastó con las fibras de colágeno del estroma. A pesar de existir información acerca del uso de tinciones tricrómicas como la de Mallory (Barros y col., 1998) para evaluar la integridad de la córnea o identificar vasos sanguíneos (Harper y col., 2005), el presente proyecto propone la tinción tricrómica de Masson como una opción para evaluar la integridad de la córnea y estudiar el desarrollo de angiogénesis en el tejido al emplear este modelo experimental.

Se caracterizó la expresión de nucleolina mediante inmunofluorescencia en un modelo de angiogénesis inducido por la colocación de suturas. A diferencia de la córnea sana en donde el marcaje de nucleolina se limitó principalmente a la región nuclear de las células de la capa basal del epitelio anterior de la córnea y en menor grado en algunas células del estroma, el marcaje de esta proteína se identificó en el compartimiento citoplásmico y la membrana celular de células epiteliales del epitelio anterior así como en células del estroma bajo el tratamiento de colocación de sutura para inducir angiogénesis. También fue posible identificar un marcaje de nucleolina con estas características, en células que constituyen la pared de vasos sanguíneos. Este fenómeno de localización diferencial de NCL en los diferentes compartimentos celulares se observó al emplear un doble marcaje con proteínas del nucleolo como fibrilarina; del citoplasma como MyH9 y de la

membrana celular como cadherinas, CD31 y con mayor claridad, con isolectina B4. Lo anterior indica un proceso de translocación del núcleo hacia la superficie celular. Se ha reportado la sobreexpresión de nucleolina en el proceso de angiogénesis de la dermis (Liang y col., 2013), también en vasos sanguíneos de tumores (Destouches y col., 2008). Esta presencia de nucleolina en la superficie celular durante el proceso de angiogénesis de la córnea, podría tener una participación importante dentro de la formación de vasos sanguíneos en este tejido. Aunque falta por conocer la función que desempeña la nucleolina de membrana dentro del proceso de neovascularización de la córnea, su participación como receptor de varias moléculas proangiogénicas, puede ser un blanco de estudio que permita contrarrestar el desarrollo de vasos sanguíneos ocasionado por diferentes enfermedades. Se ha identificado la localización de NCL en el citoplasma y en la superficie de células endoteliales durante angiogénesis de tumores (Koutsoumpa y Papadimitriou, 2014). Asimismo la presencia de nucleolina se ha empleado como marcador del pronóstico en el desarrollo neoplasias y de respuesta al tratamiento (Zhao y col., 2013, Guo y col., 2014), utilidad que podría ser evaluada en el tejido corneal.

Al evaluar el tratamiento anti-angiogénico mediante la aplicación tópica de bevacizumab en córneas con inducción de angiogénesis a través de la colocación de sutura, se observó una inhibición de la vascularización de la córnea que pudo reconocerse tanto clínica como histológicamente. Existen estudios que comprueban la penetración de la molécula de bevacizumab a través de córneas afectadas por neovascularización e inflamación ya que estas condiciones reducen la integridad de las uniones intercelulares del epitelio anterior y lo vuelve más poroso, permitiendo la entrada de macromoléculas como el bevacizumab (149 KDa) a partes más profundas del tejido (Dastjerdi y col., 2011). Varias investigaciones han identificado que el tratamiento tópico de bevacizumab reduce la neovascularización de la córnea en diferentes modelos experimentales

(Ozdemir y col., 2014, Rocher y col., 2011, Nakao y col., 2012, Kim y col., 2013, Kadar y col., 2014, Oner y col., 2012).

Las muestras del tejido corneal del grupo de ratones tratados con bevacizumab, presentaron un patrón de marcaje de NCL semejante al observado en córneas sin alteraciones patológicas. Por otro lado, las córneas de ratones tratados con sutura más el tratamiento tópico con bevacizumab desnaturalizado por calor, presentaron un mayor desarrollo de vasos sanguíneos que las córneas tratadas con la molécula de bevacizumab íntegra. En estas muestras el marcaje de NCL se identificó principalmente en el citoplasma y en la superficie de las células, con un patrón de distribución tisular similar a las córneas con inducción de angiogénesis por sutura. Se ha reportado que el VEGF incrementa la cantidad de NCL en la superficie celular de células endoteliales de microvasculatura humana y de venas umbilicales de humano (Koutsioumpa y Papadimitriou, 2014). Esta diferencia en el marcaje de NCL en el tejido corneal con angiogénesis más bevacizumab, podría indicar una relación de VEGF con la distribución celular de NCL. Aunque aun no se conoce como se da la translocación de NCL bajo la influencia del VEGF, es posible que NCL se una a proteínas que tengan dominios con homología de pleckstrinas que podrían unir proteínas con fosfoinosítidos producidos por fosfoinositol 3-quinasa en respuesta a factores de crecimiento. La inhibición de fosfoinositol 3-quinasa puede interferir con la inducción de la localización NCL en la superficie celular bajo la influencia de VEGF (Koutsioumpa y Papadimitriou, 2014). Existen estudios que indican una relación entre NCL y la expresión de VEGF-D; de tal manera que el bloqueo de NCL reduce la traducción de VEG-D por ejemplo (Morfoisse y col., 2016).

Se ha establecido que la NCL de superficie es un marcador específico de células endoteliales de vasos sanguíneos formados en el proceso de angiogénesis (Christian y col., 2003, Birmpas y col., 2012b). En el presente estudio, la diferencia en el marcaje de NCL en vasos sanguíneos de córneas con inducción de angiogénesis y vasos sanguíneos de retina (de ratones de 6-8 semanas) sin



alteraciones patológicas, permite considerar a esta proteína como un marcador selectivo de vasos neoformados en el tejido corneal. Sin embargo fue posible identificar un marcaje de NCL en la punta de vasos sanguíneos en desarrollo de ratones de cuatro días de edad, lo cual podría indicar que en esta etapa, la generación de estructuras vasculares se presenta bajo un proceso de angiogénesis. Se ha reportado que el desarrollo vascular primario a través de la superficie interna de la retina, se produce por vasculogénesis (formación de vasos sanguíneos a partir de angioblastos), mientras que el establecimiento de la red vascular secundaria en la capa plexiforme interna, se produce por angiogénesis (Fruttiger, 2002). Debido a lo anterior es posible que el marcaje de NCL en los tejidos completos de ratones neonatos, dependa de la sección evaluada de la capa de la retina así como de la etapa del desarrollo en la que se encuentren estos vasos sanguíneos. Además, identificar a la NCL en la superficie celular de células de la punta de vasos sanguíneos de la retina en desarrollo, podría indicar una función relevante durante el proceso de angiogénesis en este tejido.

Los ensayos preliminares de Western Blot muestran una expresión en mayor grado de NCL en tejidos de cornea con angiogénesis, cuando se compara con córneas sin angiogénesis. Por otro lado es importante considerar que la molécula de NCL puede sufrir procesos de degradación, por ejemplo, se ha aludido que adenosín difosfato puede inducir degradación de esta proteína (Wang y col., 2014), también se han reportado una capacidad de autodegradación (Tajrishi y col., 2011). Lo anterior podría explicar la presencia de bandas con marcaje de NCL de menor peso molecular a 100-110 kDa. En otros estudios de NCL mediante esta misma técnica, se han identificado bandas de menor peso molecular en células o tejidos no oculares, que se relacionan con fragmentos debido a la escisión de la proteína (Krust y col., 2011, Christian y col., 2003, Hovanessian y col., 2000). La molécula íntegra de NCL, de 110 kDa, se identifica principalmente en células que encuentran bajo división activa, mientras que las formas

degradadas son relativamente abundantes en células que no se dividen (Xie y col., 2007).

### **Perspectivas del proyecto.**

Se identificará el efecto del bloqueo de la nucleolina de membrana mediante un anticuerpo policlonal y un aptámero en un modelo de angiogénesis *in vivo*.

### **Referencias.**

- AKAR, E. E., ONER, V., KUCUKERDONMEZ, C. y AYDIN AKOVA, Y. 2013. Comparison of subconjunctivally injected bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib for inhibition of corneal neovascularization in a rat model. *Int J Ophthalmol*, 6, 136-40.
- BARROS, P. S., GARCIA, J. A., LAUS, J. L., FERREIRA, A. L. y SALLES GOMES, T. L. 1998. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. *Vet Ophthalmol*, 1, 119-123.
- BIRMPAS, C., BRIAND, J. P., COURTY, J. y KATSORIS, P. 2012a. Nucleolin mediates the antiangiogenesis effect of the pseudopeptide N6L. *BMC Cell Biol*, 13, 32.
- BIRMPAS, C., BRIAND, J. P., COURTY, J. y KATSORIS, P. 2012b. The pseudopeptide HB-19 binds to cell surface nucleolin and inhibits angiogenesis. *Vasc Cell*, 4, 21.
- BOURGHARDT PEEBO, B., FAGERHOLM, P., TRANEUS-ROCKERT, C. y LAGALI, N. 2011. Time-lapse in vivo imaging of corneal angiogenesis: the role of inflammatory cells in capillary sprouting. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 3060-8.
- CHEN, P., YIN, H., WANG, Y., MI, J., HE, W., XIE, L. y WANG, Y. 2010. Multi-gene targeted antiangiogenic therapies for experimental corneal neovascularization. *Mol Vis*, 16, 310-9.
- CHEN, X., KUBE, D. M., COOPER, M. J. y DAVIS, P. B. 2008. Cell surface nucleolin serves as receptor for DNA nanoparticles composed of pegylated polylysine and DNA. *Mol Ther*, 16, 333-42.
- CHOSAY, J. G., FISHER, M. A., FARHOOD, A., READY, K. A., DUNN, C. J. y JAESCHKE, H. 1998. Role of PECAM-1 (CD31) in neutrophil transmigration in murine models of liver and peritoneal inflammation. *Am J Physiol*, 274, G776-82.
- CHRISTIAN, S., PILCH, J., AKERMAN, M. E., PORKKA, K., LAAKKONEN, P. y RUOSLAHTI, E. 2003. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol*, 163, 871-8.

- DASTJERDI, M. H., SADRAI, Z., SABAN, D. R., ZHANG, Q. y DANA, R. 2011. Corneal penetration of topical and subconjunctival bevacizumab. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 8718-23.
- DESTOUCHES, D., EL KHOURY, D., HAMMA-KOURBALI, Y., KRUST, B., ALBANESE, P., KATSORIS, P., GUICHARD, G., BRIAND, J. P., COURTY, J. y HOVANESSIAN, A. G. 2008. Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PLoS One*, 3, e2518.
- DING, Y., SONG, N., LIU, C., HE, T., ZHUO, W., HE, X., CHEN, Y., SONG, X., FU, Y. y LUO, Y. 2012. Heat shock cognate 70 regulates the translocation and angiogenic function of nucleolin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, e126-34.
- FOGAL, V., SUGAHARA, K. N., RUOSLAHTI, E. y CHRISTIAN, S. 2009. Cell surface nucleolin antagonist causes endothelial cell apoptosis and normalization of tumor vasculature. *Angiogenesis*, 12, 91-100.
- FRUTTIGER, M. 2002. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 522-7.
- GIACOMINI, C., FERRARI, G., BIGNAMI, F. y RAMA, P. 2014. Alkali burn versus suture-induced corneal neovascularization in C57BL/6 mice: an overview of two common animal models of corneal neovascularization. *Exp Eye Res*, 121, 1-4.
- GINISTY, H., SICARD, H., ROGER, B. y BOUVET, P. 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 6), 761-72.
- GUO, X., XIONG, L., YU, L., LI, R., WANG, Z., REN, B., DONG, J., LI, B. y WANG, D. 2014. Increased level of nucleolin confers to aggressive tumor progression and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Diagn Pathol*, 9, 175.
- HAN, K. Y., FAHD, D. C., TSHIONYI, M., ALLEMANN, N., JAIN, S., CHANG, J. H. y AZAR, D. T. 2012. MT1-MMP modulates bFGF-induced VEGF-A expression in corneal fibroblasts. *Protein Pept Lett*, 19, 1334-9.
- HARPER, J. Y., SAMUELSON, D. A. y REEP, R. L. 2005. Corneal vascularization in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and three-dimensional reconstruction of vessels. *Vet Ophthalmol*, 8, 89-99.
- HOVANESSIAN, A. G., PUVION-DUTILLEUL, F., NISOLE, S., SVAB, J., PERRET, E., DENG, J. S. y KRUST, B. 2000. The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*, 261, 312-28.
- HUANG, Y., SHI, H., ZHOU, H., SONG, X., YUAN, S. y LUO, Y. 2006. The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin. *Blood*, 107, 3564-71.
- KADAR, T., AMIR, A., COHEN, L., COHEN, M., SAHAR, R., GUTMAN, H., HORWITZ, V. y DACHIR, S. 2014. Anti-VEGF therapy (bevacizumab) for sulfur mustard-induced corneal neovascularization associated with delayed limbal stem cell deficiency in rabbits. *Curr Eye Res*, 39, 439-50.
- KIM, J., KIM, D., KIM, E. S., KIM, M. J. y TCHAH, H. 2013. Topically administered bevacizumab had longer standing anti-angiogenic effect than

- subconjunctivally injected bevacizumab in rat corneal neovascularization. *Int J Ophthalmol*, 6, 588-91.
- KOTULA, J. W., PRATICO, E. D., MING, X., NAKAGAWA, O., JULIANO, R. L. y SULLENGER, B. A. 2012. Aptamer-mediated delivery of splice-switching oligonucleotides to the nuclei of cancer cells. *Nucleic Acid Ther*, 22, 187-95.
- KOUTSIOUMPA, M. y PAPANIMITRIOU, E. 2014. Cell surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 9, 137-52.
- KRUST, B., EL KHOURY, D., NONDIER, I., SOUNDARAMOURTY, C. y HOVANESSIAN, A. G. 2011. Targeting surface nucleolin with multivalent HB-19 and related Nucant pseudopeptides results in distinct inhibitory mechanisms depending on the malignant tumor cell type. *BMC Cancer*, 11, 333.
- LEE, J. Y., JEONG, H. J., KIM, M. K. y WEE, W. R. 2014. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells affect immunologic profiling of interleukin-17-secreting cells in a chemical burn mouse model. *Korean J Ophthalmol*, 28, 246-56.
- LIANG, P., JIANG, B., LV, C., HUANG, X., SUN, L., ZHANG, P. y HUANG, X. 2013. The expression and proangiogenic effect of nucleolin during the recovery of heat-denatured HUVECs. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 4500-12.
- LIU, L. y SHI, G. P. 2012. CD31: beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 94, 3-5.
- MADDULA, S., DAVIS, D. K., MADDULA, S., BURROW, M. K. y AMBATI, B. K. 2011. Horizons in therapy for corneal angiogenesis. *Ophthalmology*, 118, 591-9.
- MORFOISSE, F., TATIN, F., HANTELYS, F., ADOUE, A., HELFER, A. C., CASSANT-SOURDY, S., PUJOL, F., GOMEZ-BROUCHET, A., LIGAT, L., LOPEZ, F., PYRONNET, S., COURTY, J., GUILLERMET-GUIBERT, J., MARZI, S., SCHNEIDER, R. J., PRATS, A. C. y GARMY-SUSINI, B. H. 2016. Nucleolin Promotes Heat Shock-Associated Translation of VEGF-D to Promote Tumor Lymphangiogenesis. *Cancer Res*, 76, 4394-405.
- NAKAO, S., ZANDI, S., LARA-CASTILLO, N., TAHER, M., ISHIBASHI, T. y HAFEZI-MOGHADAM, A. 2012. Larger therapeutic window for steroid versus VEGF-A inhibitor in inflammatory angiogenesis: surprisingly similar impact on leukocyte infiltration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 3296-302.
- ONER, V., KUCUKERDONMEZ, C., AKOVA, Y. A., COLAK, A. y KARALEZLI, A. 2012. Topical and subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization in an experimental rat model. *Ophthalmic Res*, 48, 118-23.
- OZDEMIR, O., ALTINTAS, O., ALTINTAS, L., OZKAN, B., AKDAG, C. y YUKSEL, N. 2014. Comparison of the effects of subconjunctival and topical anti-VEGF therapy (bevacizumab) on experimental corneal neovascularization. *Arg Bras Oftalmol*, 77, 209-13.
- REGENFUSS, B., BOCK, F. y CURSIEFEN, C. 2012. Corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 12, 548-54.

- ROCHER, N., BEHAR-COHEN, F., POURNARAS, J. A., NAUD, M. C., JEANNY, J. C., JONET, L. y BOURGES, J. L. 2011. Effects of rat anti-VEGF antibody in a rat model of corneal graft rejection by topical and subconjunctival routes. *Mol Vis*, 17, 104-12.
- SHI, W., MING, C., LIU, J., WANG, T. y GAO, H. 2011. Features of corneal neovascularization and lymphangiogenesis induced by different etiological factors in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 249, 55-67.
- SIVAK, J. M., OSTRICKER, A. C., WOOLFENDEN, A., DEMIRS, J., CEPEDA, R., LONG, D., ANDERSON, K. y JAFFEE, B. 2011. Pharmacologic uncoupling of angiogenesis and inflammation during initiation of pathological corneal neovascularization. *J Biol Chem*, 286, 44965-75.
- SRIVASTAVA, M., MCBRIDE, O. W., FLEMING, P. J., POLLARD, H. B. y BURNS, A. L. 1990. Genomic organization and chromosomal localization of the human nucleolin gene. *J Biol Chem*, 265, 14922-31.
- SRIVASTAVA, M. y POLLARD, H. B. 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J*, 13, 1911-22.
- STAHL, A., CONNOR, K. M., SAPIEHA, P., CHEN, J., DENNISON, R. J., KRAH, N. M., SEAWARD, M. R., WILLETT, K. L., ADERMAN, C. M., GUERIN, K. I., HUA, J., LOFQVIST, C., HELLSTROM, A. y SMITH, L. E. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 2813-26.
- STEVENSON, W., CHENG, S. F., DASTJERDI, M. H., FERRARI, G. y DANA, R. 2012. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: ranibizumab (Lucentis) vs bevacizumab (Avastin). *Ocul Surf*, 10, 67-83.
- TAJRISHI, M. M., TUTEJA, R. y TUTEJA, N. 2011. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol*, 4, 267-75.
- VELICHKO, A. K., PETROVA, N. V., KANTIDZE, O. L. y RAZIN, S. V. 2012. Dual effect of heat shock on DNA replication and genome integrity. *Mol Biol Cell*, 23, 3450-60.
- VERVERIS, K., MARZULLY, S., SAMUEL, C. S., HEWITSON, T. D. y KARAGIANNIS, T. C. 2016. Qualitative and Quantitative Analysis of Histone Deacetylases in Kidney Tissue Sections. *Methods Mol Biol*, 1397, 279-89.
- VESTWEBER, D. 2008. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 223-32.
- VIEIRA, A. C., HOFLING-LIMA, A. L., GOMES, J. A., FREITAS, D., FARAH, M. E. y BELFORT JR, R. 2012. Intrastromal injection of bevacizumab in patients with corneal neovascularization. *Arq Bras Oftalmol*, 75, 277-9.
- WANG, W., LUO, J., XIANG, F., LIU, X., JIANG, M., LIAO, L. y HU, J. 2014. Nucleolin down-regulation is involved in ADP-induced cell cycle arrest in S phase and cell apoptosis in vascular endothelial cells. *PLoS One*, 9, e110101.
- XIE, M., KOBAYASHI, I., KIYOSHIMA, T., YAMAZA, H., HONDA, J. Y., TAKAHASHI, K., ENOKI, N., AKAMINE, A. y SAKAI, H. 2007. Functional

- implication of nucleolin in the mouse first molar development. *J Biol Chem*, 282, 23275-83.
- YUEN, D., LEU, R., SADOVNIKOVA, A. y CHEN, L. 2011. Increased lymphangiogenesis and hemangiogenesis in infant cornea. *Lymphat Res Biol*, 9, 109-14.
- ZHAO, H., HUANG, Y., XUE, C., CHEN, Y., HOU, X., GUO, Y., ZHAO, L., HU, Z., HUANG, Y., LUO, Y. y ZHANG, L. 2013. Prognostic significance of the combined score of endothelial expression of nucleolin and CD31 in surgically resected non-small cell lung cancer. *PLoS One*, 8, e54674.