



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA NUCLEOLINA DE SUPERFICIE MEDIANTE
APTÁMEROS EN UN MODELO DE NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL Y SU
REPERCUSIÓN EN LA NEOANGIOGÉNESIS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. VIVANCO ROJAS OSCAR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1212/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted qué en la reunión ordinaria del Subcomité Biología Evolutiva, Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **6 de septiembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **VIVANCO ROJAS OSCAR** con número de cuenta **402085416** con la tesis titulada **“ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA NUCLEOLINA DE SUPERFICIE MEDIANTE APTÁMEROS EN UN MODELO DE NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL Y SU REPERCUSIÓN EN LA NEOANGIOGÉNESIS”**, realizada bajo la dirección del **DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. VÍCTOR MANUEL BAUTISTA DE LUCIO
Vocal: DR. ARMANDO PÉREZ TORRES
Vocal: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ
Vocal: DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de diciembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por aceptarme, a la beca Conacyt numero 306128. Este trabajo fue apoyado por los proyectos: SECTEI 250/2019; CONACYT-Problemas Nacionales 0311 y DGAPA-PAPIIT-UNAM IN20382. También agradecer al comité tutor: Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra, Dr. Roberto Alejandro Arreguin Espinosa de los Monteros y al Dr. Luis Felipe Jiménez García .

Agradecimientos:

Quiero agradecer a mis padres por apoyarme y creer en mi siempre, no importando donde nos encontremos, siempre estaremos juntos, luchando.

A mis hermanos, amontonados, pero encontrando el equilibrio para sonreír juntos, gracias por cada risa, por cada chiste, son los mejores.

Al Dr. Yonathan Garfias por enseñarme a mejorar día a día, entre ciencia y filosofía.

Al grupo de trabajo del laboratorio de Biología Celular y Tisular del Conde de Valenciana: a Yolande, Dra. Bety, Alfredo, Gibran, Emilio, Sofía, Lalo a los primos Diana, Toño, por cada sonrisa y resultado encontrado.

Y no menos importante, quiero darle las gracias a Ilse Castro Salas, por darme la felicidad en un par de ojos llenos de ese sabor café, por poner su fe en mi y su corazón en este par de manos que cuidaran de el hasta que la vida se me escape.

Indice	
Abreviaturas	
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
1.- Neovascularización corneal	3
2.-Factores angiogénicos como blancos terapéuticos	4
3.-Nucleolina y la neovascularización	6
4.-Aptámeros como terapia contra la neovascularización	8
5.-Nucleolina, miRNA y la neovascularización	9
Planteamiento del problema	11
Hipótesis	12
Objetivo General	12
Objetivos particulares	12
Metodología	13
1.-Modelo de neovascularización en ratón	13
2.-Inhibición de la neovascularización corneal en un modelo murino	14
3.-Obtención de células estromales del limbo humano	16
4.- Determinación de la presencia de nucleolina en células del limbo humano por estímulo de rhVEGF	16
5.-Efecto de AS1411 en HLSC estimuladas con rhVEGF	19
6.-Niveles de expresión de NCL en presencia de AS1411 en HLSC	21
Resultados	24
1.- El rhVEGF insertado intraestromal estimula la neovascularización corneal en un modelo murino	24
2.-Los neovasos corneales generados por rhVEGF se tiñen con azul de Evans	25
3.-El tratamiento tópico con AS1411 disminuye la neovascularización corneal más eficazmente que bevacizumab	26
4.-El aptámero AS1411 disminuye la presencia de neovasos en estroma corneal	27
5.- Los neovasos del estroma corneal generados por rhVEGF presentan marca para NCL.	29
6.- Las HLSC proliferan por estímulo de rhVEGF	31
7.- AS1411 y anti-NCL muestran un patrón anular de NCL en superficie de HeLa.	33
8.-Las HLSC expresan NCL en superficie por acción de rhVEGF.	34
9.- La proliferación de HLSC por rhVEGF, disminuye en presencia de AS1411	36
10.-AS1411 inhibe la migración con mayor eficiencia que bevacizumab	36
11.- Las interacciones celulares entre las HLSC estimuladas con rhVEGF disminuyeron en presencia de AS1411.	38
12.- VEGF disminuye la cantidad de mRNA de NCL aun en presencia de AS1411, pero no modifica los niveles de proteína	39
13.-EL aptámero AS1411 disminuye la expresión de miR21 y miR221 generada por rhVEGF.	41

Discusión	42
Conclusión	46
Perspectivas	46
Referencias bibliograficas	47
Anexo (Articulo requisito para la obtención de grado)	54

Abreviaturas

4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato	(DAPI)
Albumina sérica bovina	(BSA)
Amortiguador fosfatos salinos	(PBS)
Azul de Evans	(EBD)
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	(MTT)
Caseína cinasa 2	(CK2)
Células de cáncer de próstata humano	(DU145)
Células endoteliales de la microvasculatura humana	(HMEC)
Células endoteliales de la vena umbilical humana	(HUVEC)
Células estromales del limbo humano	(HLSC)
Células humanas de carcinoma de cérvix	(HeLa)
Cinasa regulada por señal extracelular	(ERK)
Degeneración macular asociado a la edad	(AMD)
Dimetilsulfoxido	(DMSO)
El receptor 6 de quimiocina	(CCR6)
El receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4	(CXCR4)
Epitelio pigmentario de la retina	(EPR)
Factor de crecimiento de fibroblastos	(FGF)
Factor de crecimiento de hepatocitos	(HGF)
Factor de crecimiento derivado de epitelio pigmentado	(PEDF)
Factor de crecimiento endotelial y vascular	(VEGF)
Factor de crecimiento placentario	(PIG)
Factor de crecimiento transformante beta	(TGF- β)
Factor de necrosis tumoral alfa	(TNF- α)
Hematoxilina y eosina	(HE)
Isolectina B4	(IsoB4)
Leucemia mieloide aguda	(LMA)
Microscopía de transmisión electrónica	(TEM)
Neovascularización corneal	(NVC)
Nucleolina	(NCL)
Paraformaldehído	(PFA)
Proteína cinasa B	(AKT)
Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real	(qRT-PCR)
RNA de transferencia	(tRNA)
RNA mensajero	(mRNA)
RNA no codificantes	(ncRNA)
RNA ribosomal	(RNAr)
Suero fetal bovino	(SFB)
Trombospondina	(TSP)

Resumen

Introducción. La neovascularización corneal (NVC) es causada por el desequilibrio de factores pro y anti angiogénicos; este desequilibrio se origina en la córnea cuando sufre un daño. Algunas proteínas como la nucleolina (NCL) pueden favorecer la angiogénesis. Existen estudios donde la expresión de NCL de superficie está involucrada con el incremento de la supervivencia y proliferación de células endoteliales. La NCL es una proteína multifuncional, sus funciones están relacionadas con su localización celular; de tal manera que cuando se localiza en la superficie celular posee funciones proangiogénicas en células endoteliales. **Objetivo.** Identificar el efecto que tiene el bloqueo de NCL de superficie mediante aptámeros, en un modelo de NVC murino y describir los efectos que tienen los aptámeros sobre mecanismos de la angiogénesis como proliferación, migración y formación de túbulos en un modelo celular, además, caracterizar los cambios en la expresión de miRNAs implicados en la angiogénesis (Angiomirs). **Materiales y métodos.** Se desarrolló un modelo de NVC por inserción de pellets con VEGF, se administró tratamiento para bloquear VEGF con bevacizumab y aptámeros específicos para la NCL de superficie (AS1411), se realizaron cortes histológicos e inmunofluorescencias contra NCL e isolectina B4 para caracterizar vasos en córnea. Para la identificación de NCL de superficie, se realizó aptámero-fluorescencia, además de medir el efecto de VEGF y AS1411 en la proliferación, migración y formación de túbulos de células estromales del limbo humano. Además, se determinó el cambio en la concentración de proteína, transcritos de NCL y los Angiomirs21 y 221 implicados en la angiogénesis. **Resultados.** Se encontró que los neovasos de córnea inducidos por VEGF expresaron NCL y que el tratamiento con AS1411 contrarresta la NVC inducida por VEGF, incluso mejor que un antiangiogénico (bevacizumab) ya aprobado para su uso en humanos; también se demostró que AS1411 disminuye los mecanismos asociados a la angiogénesis en células estromales del limbo humano. Y mientras que los transcritos de NCL disminuyen en presencia de VEGF y no son afectados por AS1411, los miR21 y miR221 que aumentaron en presencia de VEGF disminuyen con AS1411. **Conclusiones.** La presencia de NCL de superficie es estimulada por VEGF incrementando la neoangiogénesis, mientras que AS1411 disminuye los efectos de VEGF y es probable que la disminución sea regulada con la reducción de los transcritos de miR21 y miR221 implicados en la angiogénesis. Estos resultados sugieren que el uso de aptámeros podrían servir como una herramienta terapéutica en procesos de neovascularización aberrante corneal.

Abstract

Introduction. Corneal neovascularization (CNV) is caused by the disproportion of pro- and anti-angiogenic factors; this disproportion originates the cornea suffers a damage. Some proteins such as nucleolin (NCL) may promote angiogenesis. There are studies where surface NCL expression is involved with increased survival and proliferation of endothelial cells. NCL is a multifunctional protein, its functions are related to its cellular localization; in such a way that when it is located on the cell surface it has proangiogenic functions in endothelial cells. **Objective.** To identify the effect of surface NCL blockade by aptamers in a murine CNV model and to describe the effects that aptamers have on angiogenesis mechanisms such as proliferation, migration and tubule formation in a cellular model, in addition to characterizing the changes in the expression of miRNAs involved in angiogenesis (Angiomirs). **Materials and methods.** A model of CNV by insertion of pellets with VEGF was developed, treatment was administered to block VEGF with bevacizumab and aptamers specific for surface NCL (AS1411), histological cuts and immunofluorescences were performed against NCL and isolectin B4 to characterize vessels in cornea. For the identification of surface NCL, aptamerfluorescence was performed, in addition to measuring the effect of VEGF and AS1411 on the proliferation, migration and formation of tubules of stromal cells of the human limb. In addition, the change in protein concentration was determined, transcribed from NCL and Angiomirs21 and 221 involved in angiogenesis. **Results.** VEGF-induced corneal neovessels expressed NCL were found to express NCL and AS1411 treatment counteracts VEGF-induced CNV even better than an antiangiogenic (bevacizumab) already approved for use in humans; AS1411 was also shown to decrease the mechanisms associated with angiogenesis in human limb stromal cells. And while the transcripts of NCL decrease in the presence of VEGF and are not affected by AS1411, the miR21 and miR221 that increased in the presence of VEGF decrease with AS1411. **Conclusions.** The presence of surface NCL is stimulated by VEGF by increasing neoangiogenesis, while AS1411 decreases the effects of VEGF, and it is likely that the decrease will be regulated with the reduction of miR21 and miR221 transcripts involved in angiogenesis. These results suggest that the use of aptamers could serve as a therapeutic tool in corneal aberrant neovascularization processes.

Introducción:

1. La neovascularización corneal

La neovascularización es la formación de nuevas estructuras vasculares en zonas que eran avasculares [1]. Existen 2 posibilidades de formar estos neovasos; la vasculogénesis que es la formación de vasos generados de angioblastos derivados de células embrionarias de médula ósea durante la embriogénesis, y la angiogénesis que es la formación de neovasos a partir de vasos preexistentes [2, 3]. Es un proceso complejo que involucra a distintas células, componentes solubles y factores de la matriz extracelular. Estos eventos tienen gran importancia en diversos procesos fisiológicos y patológicos del organismo. La regulación se lleva a cabo mediante un equilibrio entre la síntesis y secreción de factores estimulantes e inhibidores, que aumentan o disminuyen de acuerdo con las necesidades y tipo de tejido [4]. La córnea, ubicada en la parte más externa del ojo, es una estructura transparente que forma la capa fibrosa del globo ocular, contiene estructuras entramadas de diferentes escalas con distintos patrones de organización. Además, la composición de cada capa es distinta, con variaciones en el tipo y densidad de colágenos, elastina, fibronectina, lamininas y proteoglicanos [5]. En condiciones normales la córnea se caracteriza por mantener un estado homeostático de avascularidad, lo que se denomina privilegio angiogénico [6, 7]. Esta característica se mantiene debido al equilibrio que existe entre factores antiangiogénicos y angiogénicos. Este equilibrio puede ser afectado por distintas condiciones patológicas; lesiones oculares que incluyen infección, inflamación, isquemia, degeneración, trauma y pérdida de células madre del limbo esclerocorneal. Las patologías corneales como queratopatía lipídica, úlceras y cicatrices corneales, enfermedad ocular por herpes, queratitis infecciosa, quemaduras químicas, rechazo a injertos y condiciones hipóxicas por el uso de lentes de contacto, entre otras condiciones, generando la formación de estructuras vasculares en la cornea llamada neovascularización corneal (NVC) [8]. La NVC es una afección que pone en riesgo la vista y es un problema de salud pública cada vez mayor. Un estudio informó una tasa de incidencia de 1,4 millones de personas por año y el 12% sufrió una pérdida de la visión [9].

El estado inflamatorio de la NVC en las distintas patologías es un factor determinante en la presencia de las estructuras vasculares. Por ello, algunos tratamientos se enfocan en controlar la inflamación, mediante el uso de esteroides que disminuyen el proceso inflamatorio. Pero el tratamiento prolongado con esteroides puede producir glaucoma, coinfecciones oculares y formación de cataratas. Además, aunque los esteroides suelen ser eficaces en reducir la inflamación, pero tienen efectos antiangiogénicos limitados [10, 11].

Otras terapias para el tratamiento de la NVC es la fotocoagulación con láser; esto puede obliterar los vasos eferentes de la córnea, pero es menos eficaz para los vasos aferentes, que son más delgados, profundos y tienen un flujo sanguíneo más rápido; por lo que en una NVC extensa, es ineficaz [12].

Otra alternativa para tratar la NVC y que resulta de menos costo que la fotocoagulación, es la diatermia con aguja fina; este procedimiento ha demostrado en su mayoría complicaciones

transitorias y reversibles [13] pero una limitación potencial es que podría tener consecuencias a largo plazo debido a la liberación de factores proangiogénicos que podrían estimular los neovasos corneales [14], además de generar contracción y cicatrización del tejido corneal.

2. Factores angiogénicos como blancos terapéuticos

La neovascularización en general se caracteriza por un desequilibrio de los factores anti y pro angiogénicos, el aumento de mediadores como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento fibroblastos ácido (a-FGF) [15], básico (b-FGF) [16], factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) [17], factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), angiopoyetinas, [18] interleucina 8 (IL-8)[19] y el factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF), este último fue conocido al inicio como factor de permeabilidad vascular [20] y la disminución de factores antiangiogénicos como endostatina, factor de crecimiento derivado de epitelio pigmentado (PEDF), trombospondina (TSP) y la angiostatina entre otros. El VEGF pertenece a una familia donde se encuentran distintas isoformas, como son VEGF-A, VEGF-B, factor de crecimiento placentario (PIG), VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E [21]. Dentro de esta familia los más importantes asociados a la mayoría de los efectos angiogénicos son VEGF-A₁₆₅ y el VEGF-A₁₂₁; mientras que la forma VEGF-A es el mediador principal en la NVC.[22]

Debido a la gran variedad de factores angiogénicos que participan en la generación de neovascularización, las terapias antiangiogénicas se dirigen a bloquear los derivados de la familia del VEGF [22]. Por lo que se ha aprobado terapias dirigidas contra VEGF al igual que su receptor (VEGFR) para uso clínico [23]. Actualmente hay 7 inhibidores de moléculas pequeñas aprobados dirigidos al VEGF y su receptor. Aunque ninguno ha sido aprobado para su uso en padecimientos oculares (tabla 1).

Tabla 1 .-Fármacos inhibidores de la angiogénesis

Molécula	Blanco terapéutico	Usos	Desventajas	Referencia
Sorafenib	Inhibidores de RKT . Bloquea RAF cinasas y cinasas asociadas a VEGFR1 , 2 , 3	Cáncer hepático, renal, inhibición de la proliferación y la angiogénesis	Anorexia, dolor abdominal, Disfunción ventricular izquierda y reacción cutánea	[24, 25]
Sunitinib	Inhibidores RKT. Bloquea cinasas asociadas a PDGFR α y β , VEGFR 1,2,3, CSFR,Flt3	Carcinoma de células renales, tumores gastrointestinales inhibe la proliferación y angiogénesis	Sangrado, arritmias, dolor abdominal, trombocitopenia y embolia pulmonar	[26, 27]
Pazopanib	Inhibidores RKT. Bloquea cinasas asociadas a VEGFR1,2,3, PDGFR y c-kit	Carcinoma renal, sarcomas de tejido blando, cáncer de mama. Disminución de la angiogénesis	Insuficiencia cardíaca, mala cicatrización, hemorragias, hipertensión	[26, 28]

Axitinib	Inhibidor de las cinasas asociadas a VEGFR 1,2,3	Carcinoma de células renales, inhibidor de la angiogénesis	Hipertensión, disminución de la función renal, anemia hipotiroidismo	[29, 30]
Regorafenib	Inhibidores RKT. Bloquea las cinasas asociadas a VEGFR 1,2,3 y EGFR	Carcinoma hepatocelular, cáncer colorectal, tumores de estroma gastrointestinal, cánceres que no son extirpables, disminuye la angiogénesis	Trombocitopenia, hipertensión, disfunción hepática, anemia	[31, 32]
Nintedanib	Inhibidores RKT. Bloquea cinasas asociadas a VEGFR1,2,3. FGFR y PDGFR.	Tratamiento para fibrosis pulmonar idiopática, cáncer de pulmón	Disfunción hepática, hipertensión, diarrea, dolor abdominal.	[33, 34]
Lenvatinib	Inhibidores RKT. Bloquea cinasas asociadas a VEGFR1,2,3, FGFR, PDGFR, c-kit	Carcinoma diferenciado de tiroides (metastático local), carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales. Inhibición de la angiogénesis y proliferación celular	Estomatitis, proteinuria, hipertensión, hemorragias, infecciones dentales y bucales, infecciones de tracto urinario.	[35, 36]

RKT(Receptores tirocin cinasa). Receptor del factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGFR). Receptor factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), c-kit (CD117). Receptor del factor de crecimiento estimulante de colonias 1 (CSFR). Tirocin cinasa 3 similar a Fms (Flt3). Receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR). Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR).

Aunque la diversidad de tratamientos permite tener un espectro amplio de opciones para el tipo de padecimiento, los efectos secundarios de bloquear la señalización del VEGF, pueden desencadenar en tumores más invasivos y metastásicos [37].

Debido al gran número de efectos secundarios en las terapias antiangiogénicas, se ha desarrollado terapias alternativas contra el VEGF, las faboterapias, que son anticuerpos o quimeras enfocadas al reconocimiento, secuestro de VEGF. Dentro de estas alternativas se encuentran anticuerpos como el bevacizumab (Avastin, Genentech/Roche) que tiene los fragmentos Fab y Fc (149 kDa), ranibizumab (Lucentis, Genentech/Roche) que solo tiene Fab (48 kDa) y el aflibercept (Eylea, Regeneron Pharmaceuticals Inc) que es una proteína de fusión recombinante con porciones de unión extracelular de VEGFR-1 y VEGFR-2 fusionadas a una porción Fc [38]. Los fármacos como bevacizumab están aprobados en combinación con quimioterapia para diversos tipos de cáncer como tratamiento intravenoso [39]. Aunque no existen faboterapias contra la NVC, se han realizado ensayos de la efectividad de bevacizumab a través de la administración intravítrea para tratar la degeneración macular asociado a la edad (AMD) [40], con ranibizumab en 2006 [41] y aflibercept en 2011. [42]. Además, se han usado combinación de tratamientos, como la doxiciclina, pero siempre acompañado de un anti-VEGF, presentando mejor inhibición [43]. Pero también se encuentran presentes efectos indeseados en estos tratamientos; se ha visto que el ranibizumab, aumenta la atrofia del epitelio pigmentario de la retina (EPR) [42]. Además, la administración repetida de anti-VEGF intravítrea, genera elevación de la presión intraocular en algunos pacientes [44-46]. En consecuencia a la reducida efectividad de los tratamientos y la severidad de efectos secundarios [47], se ha propuesto evaluar biomarcadores genéticos o moleculares para la respuesta contra VEGFR, los cuales

funcionen para identificar posibles pacientes y adaptar la terapia antiangiogénica eficaz, pero aún no se dispone de un sistema concretamente establecido [48].

3. Nucleolina y la neovascularización

Recientemente se ha descrito potenciales proteínas implicadas en la neovascularización como la nucleolina (NCL) de membrana, aún más interesante se ha caracterizado su presencia y participación en la NVC en un modelo de ratón [49].

La NCL es una de las proteínas más abundantes del núcleo, fue descrita por primera vez en 1973 en el hígado de rata [50], es una proteína de células eucariotas muy conservada durante la evolución, ya que podemos encontrarla desde vegetales [51, 52] hasta el humano [53]. La NCL de humano se encuentra codificada en el cromosoma 2, la secuencia nucleotídica es de aproximadamente 11 kb y está organizada en 14 exones y 13 intrones [54]. La región promotora del gen de la NCL de humano consta de 1069 pb, el sitio de inicio de la transcripción se encuentra en la posición 1,070, mientras que el sitio de término se encuentra en la posición 10,499. La secuencia promotora consenso CCATT y la caja TATA, no se encuentran en las posiciones usuales -75 y -25 respectivamente, ya que así como con otros genes involucrados en el crecimiento celular o genes housekeeping, la NCL carece de la secuencia consenso tradicional, sin embargo se ha descrito a la secuencia GTTACTG en el sitio -49. La señal de localización nuclear está codificada en el exón 5. Las cuatro regiones ácidas del dominio terminal están codificadas entre los exones 2 a 4. La proteína NCL posee cuatro dominios de unión a RNA y están codificados por 2 exones consecutivos e independientes que además se ubican en posiciones idénticas; cuya organización genómica es muy conservada en humano, ratón y otros roedores. Finalmente, en el extremo 3' el exón 13 contiene la información de dos tercios de la región rica en glicina y el exón 14 codifica para la porción restante [54]. Otra característica importante del gen de la NCL, es que los intrones 11 y 5 codifican para los snoRNAs (ARN pequeños nucleolares) U20 y U82 respectivamente [55, 56].

El gen de la NCL codifica a un RNA mensajero (RNAm) de 2406 nt con regiones 5' y 3' UTR (por su siglas en inglés, *UnTranslated Regions*), de 114 y 332 nucleotidos respectivamente, además de una cola poly-A de alrededor de 200 nucleotidos [57]. El codón de inicio ATG se encuentra en la posición 1069 y tiene una secuencia Kozak conservada. La región 3' UTR incluye una señal de poliadenilación TATAAA en la posición 2424, la cual es ligeramente distinta en ratón. Finalmente, el codón de paro se encuentra en la posición 10214 [54]. Al igual que a nivel transcripcional, se sabe muy poco sobre la regulación a nivel posttranscripcional. Se ha reportado que la proteína HuR es un regulador positivo de la expresión de la NCL en algunos cánceres de mama y células no malignas, mientras que los microRNAs miR-194 y miR-206 son reclutados a la región 3' UTR del RNAm de la NCL para regularla negativamente [58].

El marco de lectura abierta de la NCL de humano, codifica para una proteína con una longitud de 707 aminoácidos, cuya región codificante es 84% y 81% idéntica a la de hámster y ratón respectivamente, la cual corresponde a un peso molecular *in silico* de 77 KDa, contiene 3 dominios, la zona amino terminal se encuentra la región ácido-base con un alto contenido de aminoácidos ácidos de glutamato/aspartato, separados por aminoácidos básicos variables; se ha sugerido que esta región ácido-base es responsable de la migración electroforética en el rango de 100-110 kDa en condiciones desnaturalizantes. Una región central RBD (*RNA-Binding Domain*, por sus siglas en inglés) que puede presentar entre 1-4 dominios dependiendo del organismo. Y una región carboxilo terminal con secuencias GAR (*Glycine-Arginine-Rich*, por sus siglas en inglés) repetidas [59]. Es una proteína vital para el desarrollo, diferenciación y supervivencia celular. Contiene una señal de localización nuclear (Pro-Gly-Lys-Arg-Lys-Lys) que hace se encuentre en núcleo y nucléolo. Donde desempeña funciones en la regulación de estructura y función de la cromatina, especialmente para la transcripción de genes de DNA ribosómico por la RNA polimerasa I [60], en la síntesis del pre-RNA ribosomal (RNAr) [61]. También se encuentra presente en citoplasma posterior a su fosforilación y participa en la regulación de la traducción, en el ensamble de ribosomas y el tráfico del núcleo al citoplasma [62]. Además, regula parte de las modificaciones postranscripcionales, estabilizando la presencia de mRNA [63]. Sin embargo, en procesos de proliferación logra expresarse en superficie en distintos tipos celulares [64, 65] como en células tumorales y en células endoteliales de vasos sanguíneos de tumores. La expresión de NCL de superficie determina su función como receptor de diversas moléculas y cada respuesta que desencadena, es dependiente de sus ligandos [66-68]. En linfomas de linfocitos B (Linfoma de Burkitt) inhibe la apoptosis por unión con Fas [69]. En cáncer de tiroides se asocia con CXCR4 [70] y en carcinoma hepatocelular con CCR6 [71] en ambos sistemas promueve el crecimiento, migración y angiogénesis; mientras que en células endoteliales de la microvasculatura humana (HMEC) funciona como receptor de VEGF estimulando la angiogénesis [72].

Debido a que la NCL no posee una secuencia líder amino-terminal [73] que la dirija hacia la membrana y no tiene un dominio transmembranal hidrófobo para el anclaje en la membrana plasmática, el mecanismo de su translocación a membrana es aún incierto, pero se ha descrito que la hiperfosforilación y glicosilación juegan un papel fundamental para su localización en citoplasma y superficie celular, mientras que la proteína fosforilada en baja cantidad permite se encuentre en núcleo [74]. La NCL de superficie regula la diferenciación, la adhesión, la proliferación y la angiogénesis al facilitar la captación, el tráfico o la señalización de varios factores [75], la interacción con la laminina-1 genera diferenciación de neuronas primarias [76], con HGF funciona como proteína reguladora entre la comunicación del estroma y el epitelio en la próstata [77], la interacción con P-selectina forma un complejo de señalización que contiene NCL / PI3K / p38 que regula la adhesión de células de carcinoma de colon [78]. Además de que interactuando con VEGF promueve angiogénesis; también ocasiona migración de células endoteliales [79]. Se sabe que NCL se traslada a superficie celular en respuesta al VEGF y media la angiogénesis en distintos modelos [72].

Como consecuencia de la enorme participación de NCL con distintos ligandos, han tomado importancia en los últimos años como un posible blanco terapéutico. Se han probado fármacos experimentales dirigidos contra la NCL en estudios preclínicos y clínicos con el objetivo de inhibir la proliferación celular o la neoangiogénesis aberrante [80].

4. Aptámeros como terapia contra la neovascularización

Dentro de los tratamientos para tratar la neovascularización anormal se ha propuesto moléculas como los aptámeros, que son oligonucleótidos monocatenarios cortos (de entre 15 a 50 bases) [81] que forman estructuras definidas debido a su complementariedad entre los nucleótidos. Pueden plegarse en varias estructuras secundarias (por ejemplo, tallo, bucle, pseudonudo, G-quadruplex y horquilla) [82]. Las estructuras tridimensionales únicas son capaces de reconocimiento molecular específico de sus objetivos afines. Estas interacciones tridimensionales dependen de fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, complementariedad de formas y bases que son esenciales para la afinidad y especificidad de unión de los aptámeros. Similar a la forma en que los anticuerpos se unen a los antígenos, la interacción tridimensional favorece la formación de complejos receptor/ligando. Esta complejidad confiere especificidad de unión comparables, e incluso ventajas superiores sobre los anticuerpos. Los aptámeros son capaces de distinguir estrechamente entre moléculas relacionadas, como isómeros [83], objetivos que contienen diferentes grupos funcionales [84] o incluso una mutación de aminoácidos [85]. Se ha demostrado que los aptámeros tienen una afinidad más específica y alta que otros ligandos, generalmente proporcionan una mayor sensibilidad para reconocer sus objetivos, ya que ofrecen el potencial para el diseño de ensayos de diagnóstico significativamente más sensibles, con mejor valor de pronóstico y diagnóstico temprano, en comparación con los anticuerpos, los aptámeros ofrecen poca o ninguna inmunogenicidad; eliminación rápida a través de la orina y degradación natural después de un cierto período de tiempo. Además, en el caso de las terapias contra el cáncer, ofrecen una mejor penetración tumoral, lo que a menudo es un problema con sus homólogos de anticuerpos [86].

Sin embargo, el desarrollo de aptámeros terapéuticos clínicamente eficaces se ha quedado rezagado por detrás de los anticuerpos terapéuticos, que aún dominan el mercado mundial de la medicina. Por ejemplo, pegaptanib (Macugen; Pfizer), que está dirigido contra VEGF es el único fármaco aptámero aprobado para el tratamiento de la AMD [87], ha sido reemplazado por anticuerpos como el ranibizumab y aflibercept.

Dentro del repertorio de aptámeros que existen, se encuentra el AS1411, es una molécula de 26 oligonucleótidos de DNA rico en guaninas que se une a NCL [88]. AS1411 puede funcionar como un agente dirigido a tumores y como un agente anticanceroso [89]. Se ha reportado que redujo el cáncer en varios modelos preclínicos, incluido el cáncer de mama, renal y de pulmón [88]. En 2009, un ensayo de fase II evaluó la eficacia y seguridad de AS1411 combinado con citarabina, un fármaco de quimioterapia contra el cáncer, para el

tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) primaria refractaria o recidivante, donde se reportó tolerancia la medicamento y signos prometedores en pacientes con LMA [90]. Además, debido a su pequeño tamaño y facilidad de síntesis, ha recibido atención como acarreador para una variedad de compuestos. Los estudios en xenoinjertos de glioma de rata demostraron que los conjugados se distribuían en el torrente sanguíneo rápidamente y se dirigían específicamente a las células tumorales y, por lo tanto, podían usarse para imágenes y terapia *in vivo* [91]. Se administraron nanopartículas de albúmina cargadas con paclitaxel/AS1411 y demostró que inhiben el crecimiento de xenoinjertos de glioma en ratones [92]. AS1411 se ha conjugado directamente con doxorubicina y se ha administrado por vía intravenosa en ratones que tenían xenoinjertos de cáncer hepatocelular, lo que resultó en la inhibición del crecimiento tumoral [93]. También ha sido probado en padecimientos como AMD disminuyendo la neovascularización en un modelo murino [94].

5. Nucleolina, miRNA y la neovascularización

Se sabe que NCL interactúa con cientos de otras moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, péptidos, nucleótidos y carbohidratos) y se ha reportado como regulador de un número igualmente alto de procesos celulares, incluida la biogénesis de ribosomas, la replicación del ADN, la transcripción, traducción, remodelación de la cromatina, apoptosis, citocinesis, tráfico de proteínas y mantenimiento de telómeros. Esto ocasiona que el mecanismo de acción de AS1411 aún no es completamente claro, por las distintas interacciones, aunque se ha descrito la asociación con algunas proteínas como NEMO (también llamada IKK γ), proteína fundamental en la señalización de NF- κ B, vía que está estrechamente relacionada con la quimiorresistencia de las células cancerosas [95], se demostró que la actividad del complejo IKK que contiene NEMO se inhibió notablemente en células tratadas con AS1411 [96]. También se ha propuesto a PRMT5 (proteína arginina metiltransferasa 5) un oncogén que funciona metilando las argininas de histonas, lo que conduce a la represión transcripcional de varios genes supresores de tumores [97]. Se confirmó que en células DU145 la administración de AS1411 estaba asociado con niveles reducidos de PRMT5 [98]. Además, se ha demostrado que la presencia de AS1411 logra disminuir los niveles de transcrito de mRNA de Bcl-2 [99] con lo que se ha propuesto que NCL podría estar implicada en la regulación de distintos tipos de RNA.

Los distintos estudios sobre RNA no codificantes (ncRNA) que representan alrededor del 98,5% de las transcripciones del genoma humano [100]; como el RNA de transferencia (tRNA), RNA ribosómico (rRNA) y mRNA, exhiben funciones relativamente claras, los ncRNA reguladores que incluyen RNA largos no codificantes (lncRNA), microRNA (miRNA) y RNA circulares (circRNA), no esta completamente definida su función, pero se sabe que participan en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos, por lo que se han convertido en objetivos atractivos para conocer y tratar enfermedades humanas. Entre estos ncRNA reguladores, los miRNA son posiblemente los más estudiados. Identificados

por primera vez en 1993 [101], son una clase de ncRNA que varían en tamaño de 19 a 25 nucleótidos, cuya función principal es regular la expresión génica a nivel postranscripcional [102]. En el genoma humano, la expresión de hasta el 60% de los genes que codifican proteínas puede estar regulada por los miRNA, lo que indica su papel en múltiples procesos biológicos como la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y el desarrollo. Es importante destacar que el cambio en la expresión de miRNA está involucrada en muchas enfermedades, como cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos. Diversos estudios se han enfocado en el análisis de los miRNA que controlan los mecanismos asociados a la angiogénesis fisiológica y patológica (AngiomiRs). Incluso se han descrito miRNAs asociados de manera específica a la NVC, como miR21, 31, 126, 122, 132, 221, 222, 205, 146, entre otros [103].

Se demostró que la inhibición de NCL de superficie anula la biogénesis de los miRNA dependientes de NCL, en líneas celulares de cáncer de mama y carcinoma hepatocelular, pero no en células de mama MCF-10a de tipo normal. Anteriormente se describió que AS1411 disminuyen la expresión de miR-21 y miR-221 en un modelo de cáncer de mama [104], además, estos miRNA son inductores angiogénicos [105, 106] por lo que se sugirió que AS1411 puede ejercer efectos antiangiogénicos a través de la regulación a la baja de estos miRNA que reconocen mRNA y ocasionando su degradación.

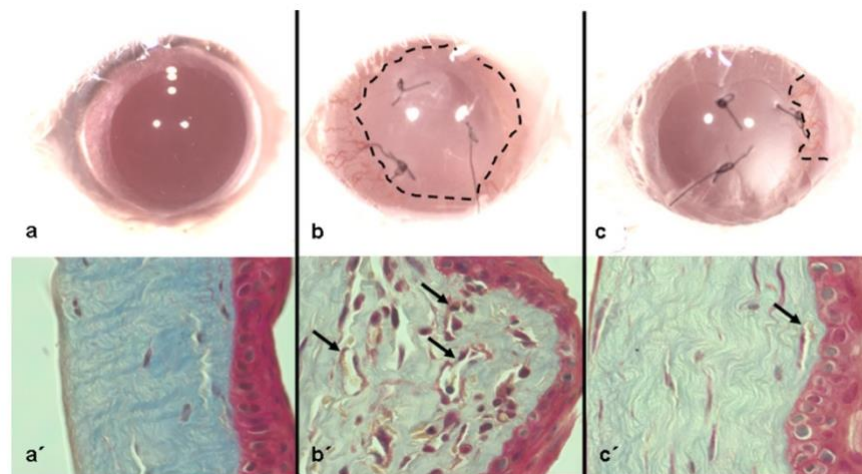


Figura 1.- Modelo murino de neovascularización por sutura, parte superior: a) control sano, b) grupo con sutura y c) grupo con sutura y tratamiento con bevacizumab. Tomado de Quiroz-Mercado y cols. 2016.

En nuestro grupo de trabajo se ha descrito que NCL se colocaliza con el CD31 y la isolectina B4 (IsoB4) ambos marcadores de neovascularización, que se encuentran en un modelo de neovascularización corneal inducido por sutura, sugiriendo que esta proteína se encuentra en estas neo-estructuras; de la misma forma, se ha determinado que el proceso de neovascularización corneal ocasiona la redistribución de NCL en superficie celular, efecto que se ve disminuido con la administración de anti-VEGF (Figura 1), que bloquea su translocación hacia la membrana celular [49].

Planteamiento del problema

La córnea es un tejido avascular, sin embargo, cuando sufre una lesión grave, puede desarrollar neovascularización corneal y pérdida de la transparencia corneal. Los tratamientos contra la NVC enfocados en VEGF ocasionan efectos adversos que complican su uso. La búsqueda de nuevos blancos terapéuticos es necesaria para desarrollar mejores tratamientos. Se ha descrito que la NCL, proteína que regula múltiples funciones a nivel de núcleo, citoplasma, se expresa en superficie de neovasos y el bloqueo con AS1411 causa la reducción de la angiogénesis en modelos de neoplasias sólidas. Por lo tanto, el bloqueo de NCL con AS1411 contribuirá a describir el efecto en los mecanismos de regulación transcripcional de NCL en un modelo de NVC inducido por VEGF.

Hipótesis

El bloqueo de la NCL de superficie estimulada por VEGF mediante el uso de AS1411, disminuye la NVC en un modelo murino y reduce la proliferación, migración y formación de túbulos en células estromales del limbo esclerocorneal humanas.

Objetivo General

Determinar el efecto en la neoangiogénesis mediante el bloqueo de NCL de superficie con el aptámero AS1411 en un modelo de NVC *in vivo* y un modelo de angiogénesis *in vitro*

Objetivos particulares:

- a) Desarrollar un modelo murino de NVC generado por VEGF.
- b) Identificar la presencia de NCL en neovasos corneales.
- c) Determinar el efecto del tratamiento tópico de AS1411 sobre la NVC.
- d) Establecer un modelo de angiogénesis *in vitro* y describir la presencia de NCL de superficie en HLSC estimuladas con VEGF
- e) Identificar los efectos de AS1411 sobre la proliferación, migración y formación de túbulos en HLSC estimuladas con VEGF
- f) Describir los efectos que tiene AS1411 sobre los niveles de expresión de miR21 y miR221 en HLSC estimuladas con VEGF

Metodología

1. Modelo de neovascularización corneal de ratón.

1.1 Producción de pellets.-Para la generación del modelo de neovascularización corneal se modificó la metodología de Tang y cols., 2011 [107]. Se prepararon *pellets* con VEGF mezclando 12,5 μ L sucralfato (Sigma-Aldrich., St. Louis, MO, USA) al 10% en amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH 7.2, 2.5 μ L de Poly-HEMA (Sigma-Aldrich., St. Louis, MO, USA) al 12% en etanol y 4 μ L de rhVEGF (R&D System, Minesota, USA) 500 μ g/ml. Otros se prepararon con 12,5 μ L sucralfato al 10% en PBS, 2.5 μ L de Poly-HEMA al 12% en etanol y 4 μ L de HCL 4 mM estéril. Se mezclaron suavemente, posteriormente en una caja Petri con una pieza de parafilm estéril. Se agregó 0.4 μ L de la mezcla y se dejó secar por 2 h a temperatura ambiente. Una vez secos se retiraron suavemente y se guardaron en microtubos a -70 °C, hasta su uso

1.2 Inserción de pellets. - Los animales de experimentación se manejaron 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 utilizaron ratones machos Balb-c de 4 a 8 semanas, de 25 g de peso en promedio, sin daños o signos de enfermedad. Cada ratón se anestesió con Sevoflurano (SEVOrane, Abbvie, USA); mezclado con oxígeno a razón de 1:4 por inhalación, se agregó anestesia tópica con tetracaína (Ponti, Sophia, México), después de 5 min, se inmovilizó el ojo izquierdo bajo un microscopio de disección. Para el desarrollo de la inserción del pellet se siguió la metodología de Tang y cols 2011: Se realizó un corte horizontal sobre la córnea a una distancia de 1.5 mm del limbo esclerocorneal de la zona nasal. levantando el epitelio y exponiendo parte del estroma (imagen 1). Una vez dentro, se formó una pequeña bolsa, con ayuda de pinzas se insertó el *pellet*. Después de la cirugía se cubrió el ojo con hipromelosa 0.5% (Meticel, Sophia, México) y al animal se le colocó en un lugar caliente y seco, hasta que fue capaz de mantener postura erguida y luego devuelto a su jaula. Se aplicó polimixina B, neomicina y gramicidina tópicos (Polixín, Sophia, México) dos veces al día, durante 3 días posterior a la cirugía. Los ojos se examinaron diariamente bajo un microscopio a partir del día 1 hasta el día 7. Para la evaluación de los ojos, los ratones se anestesiaron como se describió previamente, se agregó anestesia tópica, se fijó el ojo izquierdo y se aplicó de manera tópica tropicamida y fenilefrina como agente midriático (T-P ofteno, Sophia, México) e hipromelosa para evitar la deshidratación. Se tomaron fotos de la zona con donde se insertó el *pellet*. Para el análisis de la NVC se utilizó el programa Angiotool, de acuerdo a lo descrito previamente [108] donde el programa realizó un análisis de las estructuras vasculares, creando valores cuantificables para el porcentaje por área, la longitud de vasos por área y la lacunaridad un valor adimensional, que representa la organización y complejidad de la vascularización. El valor es inversamente proporcional, es decir, a menor lacunaridad mayor organización y complejidad en las redes vasculares.

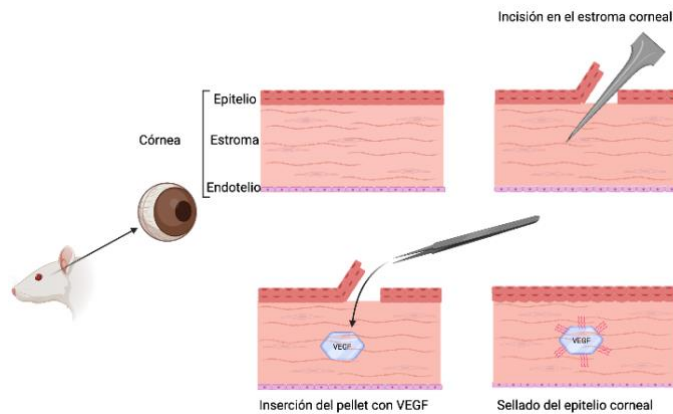


Imagen 1. Modelo de NVC murino por inserción del pellet en estroma corneal. Realizado con Biorender.com

1.3 Tinción de neovasos con azul de Evans (EBD). - Después de 7 días de evaluación, a cada ratón se administró azul de Evans a una dosis de 40 mg/kg peso (Sigma Aldrich., St. Louis, MO. USA) por vía intraperitoneal, después de 4 h de la administración del azul de Evans los ratones se sacrificaron y los ojos se enuclearon. Se fijaron en paraformaldehído (PFA) (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) al 4% durante 24 horas. Después, bajo un microscopio de disección se realizó una queratectomía de espesor completo, la córnea se lavó con PBS durante 30 s, se cortó para permitir extender su forma de media esfera a plana. Posteriormente se colocó en un portaobjetos se cubrió con glicerol al 50% y se colocó un cubreobjetos sellando con barniz. Se observó en microscopio de fluorescencia ApoTome II (Carl Zeiss, Jena, Alemania), donde se tomaron fotos en un aumento 10X y se realizó una construcción de la superficie corneal mediante Adobe Photoshop CS6 (13.0, Creative cloud, California, USA).

2.-Inhibición de la neovascularización corneal en un modelo murino

2.1 Tratamiento con aptámeros.- Para determinar el efecto de AS1411 en la neovascularización, se utilizaron 5 grupos de animales con 6 especímenes en cada grupo: el grupo 1 control SHAM, que consistió en la formación de *pocket* sin rhVEGF en estroma; el grupo 2 VEGF, al que se insertó un *pellet* con rhVEGF en la zona intraestromal; el grupo 3 AS1411, en el cual se insertó rhVEGF en *pellet* intraestromal y se le administró tratamiento con aptámero AS1411, 5'-dGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3'; el grupo 4 CRO, de la misma manera se insertó *pellet* con rhVEGF intraestromal y se le aplicó tratamiento con aptámero CRO, oligonucleótido sin actividad, 5'dCCTCCTCCTCCTTCTCCTCCTCCTCC-3' (AS1411 y CRO fueron sintetizados por IDT(Coralville, IA, USA) y el grupo 5 BEVA al cual se insertó *pellet* con rhVEGF intraestromal y administró tratamiento con bevacizumab (Roche, Basilea, Suiza). Cada tratamiento se aplicó de manera tópica, se adicionó 1 nmol de AS1411, 1 nmol de CRO [94] y 50 µg de bevacizumab [49]; todas las soluciones se mantuvieron en contacto con la superficie corneal por 30 s, el tratamiento se administró cada

12 h durante siete días. Durante el tratamiento los animales fueron revisados diariamente evaluando la neovascularización. Al día 7 se tomaron fotografías de zonas con neovascularización y se realizó un análisis con AngioTool para determinar diferencias en la inhibición de la neovascularización entre los tratamientos.

2.2 *Análisis histológico del modelo de inhibición de la neovascularización.*- Después de los 7 días del inicio de los tratamientos, a los animales se les aplicó eutanasia, se realizó enucleación y los ojos fueron colocados en PFA al 4% durante 1 h a 4°C; se lavaron con PBS en agitación constante durante 10 min, posteriormente se deshidrataron gradualmente en un gradiente de alcohol-xilol; las muestras se parafinaron y se incluyeron en moldes con una orientación transversal, se enfriaron a temperatura ambiente (TA) hasta su uso. Los bloques de parafina se montaron en un micrótopo (Ecoshel, Denver, CO) y se realizaron cortes de 5 µm de espesor, se colocaron en portaobjetos precargados (Globe Scientific, Mahwah, NJ). Los cortes histológicos se rehidrataron, posteriormente se realizó la tinción de hematoxilina y eosina (HE) (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA), colocándoles un cubreobjetos y sellando con resina. Las laminillas se analizaron bajo microscopio óptico (ApoTome II). Se observó el ojo completo y localizó al nervio óptico, a partir de ahí en sentido opuesto secuencialmente: la retina, el vítreo, cristalino la cámara anterior y la córnea; delimitada de ambos lados por la esclera en la parte externa cerca del epitelio corneal y el cuerpo ciliar en la interna cerca del endotelio corneal. Desde el cuerpo ciliar o la esclera, se midió una distancia de 1 mm hacia el centro de la córnea de ambos lados, para evitar contar los vasos que se encuentren en el limbo corneal, que se encuentran de manera normal en esa zona. Los conteos de los distintos neovasos en las regiones establecidas fueron considerados de fotos de 3 zonas distintas.

2.3. *Inmunolocalización de nucleolina en córneas con neovascularización y tratamiento.* Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia a los cortes de cada tratamiento; para ello, los cortes en parafina se rehidrataron. Posteriormente se realizó una recuperación antigénica, mediante una solución de citratos (citrato de sodio, 0.01 M, pH 6.0) durante 10 min en baño maría; enseguida, los cortes se cubrieron con solución de bloqueo (albumina sérica bovina 5%, triton X100 0.3%, en PBS) durante 1 h a TA; el anticuerpo primario conejo anti nucleolina de ratón (Abcam, Cambridge, Reino Unido), y la isolectina B4-conjugada al fluorocromo Dy light 594 (Vector laboratories, Burlingame CA) esta lectina nos permitió identificar selectivamente para los residuos α -D-galactosilo terminales, que se encuentra en las células endoteliales que recubren los neovasos [109, 110]. Anticuerpo y lectina se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda, cubierto de la luz. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con solución de lavado (PBS-0.3% de Tween-20) (Meyer, Mexicali, México); enseguida se colocó el anticuerpo secundario burro anti-conejo conjugado a Alexa fluor 488 (Life Technologies, Eugene, OR, USA) por 2 h a TA, en cámara húmeda cubierto de la luz, después se realizaron 3 lavados de 10 min con solución de lavado. Después se adicionó DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) para la tinción de núcleos, durante 10 min, se lavó con PBS; se colocó glicerol al 50%

y un cubreobjetos, sellando con barniz. Se analizó en microscopio de fluorescencia ApoTome II. Para el análisis de las inmunofluorescencias, se observó el ojo completo, se identificó la retina, a partir de esta posición cerca del nervio óptico, en la parte opuesta se encuentra la córnea. Delimitando a la córnea se encuentra el cuerpo ciliar, a partir de aquí se midió una distancia de 1 mm hacia la parte central de la córnea de ambos lados, para evitar contar los vasos que se encuentren el limbo corneal. Los conteos de los distintos neovasos en las regiones establecidas fueron considerados de fotos de 3 zonas distintas en los 3 canales para cada marca, se tomaron fotos a distintos aumentos.

3.-Obtención de células estromales del limbo humano

3.1 Purificación de células estromales del limbo humano. Para la obtención de células estromales del limbo humano (HLSC, por sus siglas en inglés) se utilizó la metodología de Domínguez-López y cols. 2014 [111, 112]. Las HLSC fueron obtenidas a partir de anillos esclerocorneales de donantes cadavéricos. El procedimiento se realizó en campana de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad. Al tejido se le retiró mecánicamente parte del iris con ayuda de pinzas, posteriormente se incubó con dispasa II a 1.7 IU/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 1 h a 37°C. Enseguida, se retiró cuidadosamente con ayuda de un bisturí, el epitelio, la membrana de Descemet y el epitelio posterior o endotelio corneal. Se lavó con PBS estéril, después se incubó con colagenasa II a 0.75 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 18 h a 37°C. Después de la digestión, se centrifugó a 200 x g por 5 min a 4°C, el botón celular se obtuvo y se retiró el sobrenadante. Se determinó la viabilidad mediante el método de exclusión de azul tripan (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA). El botón obtenido de células fue transferido a una botella de cultivo de 25 cm², con medio de cultivo DMEM/F12 (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Gibco, CA, USA) al 10% y antibióticos (Penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml) (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) a 37°C, con un ambiente de humedad al 95% y CO₂ al 5%. Se realizó cambio de medio diario y se observaron en microscopio para analizar la morfología y organización celular. Para los siguientes ensayos se utilizaron los pases entre 2-5.

4.-Determinación de la presencia de nucleolina en células del limbo humano por estímulo de rhVEGF

4.1 Cuantificación del efecto de rhVEGF en la proliferación de HLSC. Después de la obtención y caracterización de las HLSC, se decidió establecer las condiciones necesarias para poder cuantificar la respuesta; se cuantificó la proliferación celular por acción de rhVEGF. Para ello, las células en 90% de confluencia fueron tratadas con tripsina 0.25%-EDTA 0.5% durante 5 min a 37°C, la suspensión celular, se transfirió a un tubo falcón de 15 ml, se adicionó medio y SFB al 10%, se centrifugaron a 200 x g por 10 min a 4°C, se

determinó viabilidad, después fueron transferidas en placas de cultivo de 96 pozos (Corning, NY, USA). Para determinar la concentración de rhVEGF, tiempo, densidad celular y condiciones del medio de cultivo; se organizó de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 2.-Organización de las condiciones para el cultivo de HLSC

		SFB 10%		SFB 2 %	
		24 h	48 h	24 h	48 h
		rhVEGF (ng/ml)		rhVEGF (ng/ml)	
4x10³ células		0	0	0	0
		1	1	1	1
		10	10	10	10
		100	100	100	100

		SFB 10%		SFB 2 %	
		24 h	48 h	24 h	48 h
		rhVEGF (ng/ml)		rhVEGF (ng/ml)	
8x10³ células		0	0	0	0
		1	1	1	1
		10	10	10	10
		100	100	100	100

La placa con las células en las cantidades propuestas (tabla 2), se incubaron con DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% y antibióticos, a 37°C, humedad al 95% y CO₂ al 5% durante 12 h para permitir la adhesión a la placa de cultivo. Posteriormente se realizó un cambio de medio al 2% de SFB por 12 h para sincronizar metabólicamente al cultivo celular. Posteriormente pasado el tiempo se adicionó rhVEGF a 1, 10 y 100 ng/ml, DMEM/F12 con SFB al 10 y al 2% de acuerdo con la tabla 2. Para determinar el cambio en la proliferación, se utilizó la cuantificación por oxidación de sales de tetrazolio y generación de formazán. Después de los tiempos establecidos, a las células se les retiró el medio de cultivo y adicionó 20 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) a una concentración de 5 mg/ml, se dejó incubar por 4 h, después se retiró el exceso y se adicionó 150 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA), para poder disolver los cristales insolubles. Después se evaluó la densidad óptica (D.O) con un espectrofotómetro (Multiskan, Ascent, LabX, ON, Canadá) a una longitud de onda de 590 nm. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

4.2 Inmunolocalización de NCL en HeLa. Para validar si AS1411 pudiese reconocer NCL de manera similar al anticuerpo anti-NCL y se buscó analizar las tinciones mediante anticuerpo y aptámeros en la misma muestra. Para ello se utilizaron células humanas de carcinoma de cérvix (HeLa, ATCC[®] CCL-2[™]) que tienen una alta presencia de NCL en superficie [113].

Las células HeLa fueron cultivadas en monocapas en placas con medio de cultivo DMEM (Gibco, CA) suplementada con antibióticos y SFB al 10%. Para determinar la presencia de NCL de membrana, las células fueron tratadas con tripsina al 0.25%-EDTA 0.5%, durante 5 min a 37°C, la suspensión celular, se transfirió a un tubo cónico, se adicionó medio de cultivo con SFB 10% para reducir la actividad de la tripsina, se centrifugó a 200 x g por 10 min a 4°C. el botón celular se resuspendió en DMEM con SFB al 10%, se determinó viabilidad y fueron cuantificadas, se colocaron en placas de 24 pozos (Corning, NY, USA) con cubreobjetos de vidrio cargados con poli-L-lisina (Sigma, St Louis, MO, USA). Se dejaron adherir a los cubreobjetos durante 12 h a 37°C, humedad al 95% y CO₂ al 5%. Después de la incubación se dejaron 12 h en ausencia de SFB. Para la inmunofluorescencia se usaron soluciones sin detergentes, que afectaran la integridad de la membrana. Pasado el tiempo, se colocaron a 4°C por 5 min, se retiró el medio de cultivo y se agregó BSA al 5% durante 15 min a 4°C, enseguida se adicionó el anticuerpo conejo anti-NCL (Abcam, Cambridge, Reino Unido) por 15 min a 4°C, después aptámero AS1411 conjugado a FITC (AS1411-F) (IDT, Coralville, IA, USA) por 8 min a 4°C. En otro pozo se colocó anti-NCL 15 min y CRO conjugado a FITC (CRO-FITC) (IDT, Coralville, IA, USA) por 8 min, a 4°C en obscuridad, después, se retiró la solución y se fijaron con PFA al 2% por 5 min a TA. Posteriormente se adicionó el anticuerpo cabra anti-conejo conjugado a alexa 594 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA), se lavaron con PBS 5 min, se agregó DAPI por 10 min, se lavaron nuevamente con PBS y se agregó glicerol:PBS, se colocaron en portaobjetos y se sellaron con barniz. Se realizó la evaluación de las muestras bajo microscopio ApoTome II a distintos aumentos y canales.

4.3 Fluorescencia con AS1411-F en HLSC estimuladas con con rhVEGF. Posterior a la determinación de la concentración en donde se genera un incremento en la proliferación en las HLSC, se analizó la presencia de NCL en superficie por estímulo con rhVEGF. Para ello, las células con 90% de confluencia, fueron obtenidas en suspensión (descrito previamente), después fueron transferidas en placas de cultivo de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio cargados con poli-L-lisina, a razón de 3×10^4 células/pozo. Posteriormente se dejaron adherir por 12 h con DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% y antibióticos, a 37°C, humedad al 95% y CO₂ al 5%. Después se realizó cambio por DMEM/F12 suplementado con 2% de SFB por 12 h. Una vez concluido el tiempo se adicionó 1 ng/ml de rhVEGF a unos pozos y a otros se adicionó solo DMEM/F12 y SFB al 2%. Se dejaron por 12 h a 37°C, humedad al 95% y CO₂ al 5%. Una vez finalizado el tiempo de incubación las células se colocaron a 4°C por 5 min, se retiró el medio y adicionó solución de bloqueo (BSA al 5%, PBS) a 4°C por 15 min, después a los pozos estimulados con rhVEGF se agregó AS1411-FITC y a otros CRO-FITC, además a los pozos sin estímulo se les colocó AS1411-FITC, todos en solución de bloqueo. Se dejaron 8 min a 4°C en obscuridad, después se retiró la solución y se fijaron con PFA al 2% por 5 min a TA. Posteriormente se lavaron con PBS, se agregó DAPI por 10 min, se lavaron nuevamente con PBS, se agregó glicerol:PBS, se colocaron en portaobjetos y sellaron con barniz. Se realizó la evaluación de las muestras bajo microscopio ApoTome II a distintos aumentos.

4.4. Microscopía de transmisión electrónica en HLSC tratadas con rhVEGF. Después de determinar la presencia de NCL en superficie de las HLSC por estímulo de rhVEGF, se decidió evaluar de manera más detallada la presencia de NCL en superficie. Para ello se realizó microscopía de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés). Se cultivaron 1×10^6 células en botellas de 75 cm^3 (Corning, NY, USA), se dejaron adherir por 12 h con DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% y antibióticos, a 37°C , humedad al 95% y CO_2 al 5%. Después se realizó cambio de medio por DMEM/F12 suplementado con 2% de SFB por 12 h. Posteriormente se adicionó 1 ng/ml de rhVEGF a una botella, a otra se adicionó solo DMEM/F12 sin factor de crecimiento. Se dejaron por 12 h a 37°C . Posteriormente se trataron con tripsina 0.25%-EDTA 0.5%, durante 5 min a 37°C , la suspensión celular, se transfirió a un tubo cónico, se adicionó medio de cultivo con SFB al 10% para reducir la actividad de la tripsina, se centrifugó a $200 \times g$ por 10 min a 4°C . El botón celular se lavó con PBS, se centrifugó a $200 \times g$ por 10 min, se adicionó 0.2% de glutaraldehído en cacodilato de sodio 0.2 M (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) durante 7 min a 4°C en agitación constante. Después, las células fueron lavadas con PBS y enseguida bloqueadas con solución de BSA al 1% en PBS durante 45 min a 4°C en agitación. Posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo conejo anti-NCL por 1 h a TA. Las células fueron lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado a oro de 18 nm (Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, PA, USA). Subsecuentemente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 1% de OsO_4 en 0.2 M de amortiguador de cacodilato (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) a pH 7.4 por 45 min a 4°C , enseguida se deshidrataron gradualmente en alcoholes, hasta llegar a óxido de propileno (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) y fueron tratadas en medio de inclusión epoxi (EPOXI 812, Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) de la siguiente forma: para permitir una infiltración de resina adecuada, las células se colocaron en el fondo de una cápsula de Beem en presencia de resina epoxi durante la noche a TA, esto fue seguido calentando la cápsula de Beem a 55°C durante 48 h para permitir una polimerización adecuada. Se montaron secciones ultrafinas en rejillas de níquel recubiertas con formvar (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) y se contrastaron con acetato de uranilo acuoso al 2% y citrato de plomo al 2% (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA); se observaron en un microscopio electrónico Zeiss STEM, Crossbeam 550 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). Se analizaron seis células por rejilla de cada condición para identificar la marca de oro en la superficie celular.

5.- Efecto de AS1411 en HLSC estimuladas con rhVEGF

Posteriormente de validar la expresión de NCL en superficie por estímulo de rhVEGF, se determinó el efecto de AS1411 sobre mecanismos en donde participa VEGF, como la remodelación y formación de neovasos; donde está implicada, la proliferación, migración y formación de túbulos. Para poder medir el cambio en estos procesos, se establecieron las concentraciones óptimas de los aptámeros para bloquear la actividad ejercida por VEGF.

5.1. Inhibición de la proliferación de HLSC mediante aptámeros. Se utilizaron células con 90% de confluencia, se trataron con tripsina 0.25%-EDTA 0.5% durante 5 min a 37°C, la suspensión celular, se transfirió a un tubo de 15 ml, se adicionó medio y SFB al 10%, se centrifugaron a 200 x g por 10 min a 4°C, se determinó viabilidad, después fueron transferidas 8×10^3 células/pozo en placas de cultivo de 96 pozos. La placa se dejó con DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% y antibióticos, a 37°C, humedad al 95% y CO₂ al 5% durante 12 h para permitir la adhesión, después se realizó un cambio de medio al 2% de SFB por 12 h para sincronizar el cultivo. Pasado el tiempo se organizaron 5 condiciones; a una se adicionó rhVEGF a 1 ng/ml en presencia de ASI411 (1, 10 y 100 nM), a otro se agregó rhVEGF 1ng/ml y adicionalmente CRO (1, 10 y 100 nM), a otra con rhVEGF 1ng/ml y bevacizumab (10, 100 y 500 ng/ml), otro grupo con rhVEGF 1ng/ml solamente y finalmente una condición con solo medio de cultivo Después de 48 h, las células se les retiró el medio de cultivo y adicionó 20 µl de MTT a una concentración de 5 mg/ml, se dejó incubar por 4 h, después se retiró el exceso y se adicionó 150 µL de DMSO, se evaluó la densidad óptica con espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

5.2 Inhibición de la migración con ASI411 en HLSC estimuladas con rhVEGF. Para el ensayo de migración se modificó la metodología de Liang y cols., 2007 [114]. Se utilizaron células con 90% de confluencia, fueron transferidas 2×10^4 células/pozo en placas de cultivo de 24 pozos. La placa se dejó con DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% y antibióticos, a 37°C, humedad al 95% y CO₂ al 5% durante 12 h para permitir la adhesión, se dejaron crecer hasta cubrir el 80% del área, después se realizó un cambio de medio al 2% de SFB por 12 h para sincronizar el cultivo. Para marcar el área de migración se realizó una rasgadura sobre la monocapa de células con una punta estéril p1000 para micropipeta para retirar las células adheridas, Se lavó con PBS para quitar las células desprendidas, enseguida se prepararon 5 grupos: a uno se adicionó rhVEGF a 1ng/ml además de ASI411 (100 nM), a otro con rhVEGF (1 ng/ml) y CRO (100 nM), otro con rhVEGF (1 ng/ml) y bevacizumab (500 ng/ml), otro grupo solamente rhVEGF (1 ng/ml) y otra condición con solo medio de cultivo. Después de 48 h, a las células se les retiró el medio de cultivo, se colocó metanol frío (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) al 100% y se tiñeron con cristal violeta (Sigma Aldrich., St. Louis, MO; USA) al 0.4%. Posteriormente se observaron en microscopio invertido y se tomaron fotos a distintos aumentos. Para el análisis de la migración se tomó el área total generada en la rasgadura al inicio, posteriormente se analizó el área cubierta por células en cada grupo, el análisis se realizó con el programa Fiji (Image J) [115]. Los ensayos se realizaron por triplicado.

5.3 Inhibición de la formación de túbulos con ASI411 en HLSC estimuladas con rhVEGF. Para la formación de túbulos se utilizaron células con 90% de confluencia, fueron tratadas con tripsina 0.25%-EDTA 0.5% durante 5 min a 37°C, se transfirió a un tubo de 15 ml, se adicionó medio y SFB al 10%, se centrifugaron a 200 x g por 10 min a 4°C, fueron

transferidas 1×10^4 células/pozo en placas de cultivo de 96 pozos previamente recubiertas con Matrigel (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) con bajo contenido de factores de crecimiento. La placa se dejó en DMEM/F12 suplementado con 2% de SFB, se formaron 5 condiciones, a una concentración de VEGF 1ng/ml con AS1411 (100 nM), a otro con rhVEGF (1 ng/ml) y CRO (100 nM), uno con rhVEGF (1 ng/ml) y bevacizumab (500 ng/ml), a otro grupo con rhVEGF (1 ng/ml) solamente y otra condición con solo medio de cultivo. Posteriormente se observaron en microscopio invertido y se tomaron fotos a distintos aumentos. Para el análisis de la formación de túbulos se tomó el área total y se analizó los nodos generados al interaccionar al menos 3 células en una matriz tridimensional, para cada grupo se analizó con el programa Fiji y el paquete de datos Angiogenesis analyzer (Image J) [115]. Los ensayos se realizaron por triplicado.

6.- Niveles de expresión de NCL en presencia de AS1411 en HLSC

Después de caracterizar los efectos en la proliferación, migración y la formación de túbulos, se midió los cambios a nivel proteico y transcritos de NCL posterior al estímulo con rhVEGF y la presencia de aptámeros.

6.1 Cuantificación de los transcritos de NCL en HLSC por estímulo de rhVEGF. Se cultivaron 1×10^6 células en botellas de 75 cm² (Corning, NY, USA), se dejaron adherir por 12 h con DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% y antibióticos, a 37°C, humedad al 95% y CO₂ al 5%. Después se realizó cambio de medio por DMEM/F12 suplementado con 2% de SFB por 12 h. Posteriormente se formaron 4 condiciones; a uno con 1 ng/ml de rhVEGF, a otro 1 ng/ml de rhVEGF más AS1411 a 1000 nM, a otra 1 ng/ml de rhVEGF con CRO a 1000 nM. Mientras a otro solo DMEM/F12 y SFB al 2%. Se dejaron por 12 h a 37°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se trataron con tripsina 0.25%-EDTA 0.5%, durante 5 min a 37°C, la suspensión celular, se transfirió a un tubo, se adicionó medio de cultivo con SFB 10%, se centrifugó a 200 x g por 10 min a 4°C. El botón celular se lavó con PBS y fue tratado con amortiguador de lisis RIPA (150mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS y 50 mM Tris, pH 8.0); se agitó vigorosamente a 4°C por 30 min. Pasado el tiempo de lisis se centrifugó a 15000 rpm por 30 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante con cuidado, se determinó concentración de proteínas mediante el kit DC Assay protein (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) utilizando como estándar a BSA a 1 mg/ml.

De cada muestra se colocó 15 µg, se diluyeron con amortiguador de muestra (Tris-HCl 75 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0.001%, pH 8.8) y se realizó una corrida electroforética en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se aplicó un voltaje constante de 100 V, 100 mA por 75 min. Después de la electroforesis, el gel y papel de nitrocelulosa (Bio-Rad, Richmond, CA) se incubaron en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%) durante 30 min. La transferencia se realizó según Towbin y cols., [116] en sistema semihúmedo (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) a 25 V por 1 h. Después de la transferencia se revelaron las proteínas con rojo Ponceau (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA). **Western**

blot. Se adicionó solución de bloqueo (leche baja en grasa al 5% en PBS-Tween 0.3%) durante 1 h a TA. Después de la incubación se dejó con el anticuerpo primario anti-nucleolina toda la noche en agitación constante a 4°C. Posterior al tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con TBS-T (50 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 7.6) con 0.3% de Tween 20 por 10 min cada uno, se incubó con anticuerpo cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa en solución de bloqueo por 2 h en agitación a TA. Se trató con TBS-T por 10 min 3 veces. Se reveló con el kit de SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA), en placas Kodak Biomax MS film (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA). De los ensayos por triplicado se realizó la medición de los valores de densitometría de cada banda revelada del western-blot con el programa Fiji.

Para determinar los niveles de proteína se utilizó un control de carga para normalizar los valores. Después de revelar con anti-nucleolina, la membrana se colocó en solución de *stripping* (20 ml SDS 10%, 12.5 ml de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 67.5 ml de agua destilada, 0.8 ml de β -mercaptoetanol) se calentó a 50°C por 45 min. Se lavó con agua durante 15 min y 45 min con TBS-T. Posteriormente, se bloqueó por 1 h a TA, se incubó con anticuerpo anti-tubulina (Abcam Cambridge, Reino Unido) toda la noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente se trató 3 veces con TBS-T por 10 min y se le agregó anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa durante 2 h a TA en agitación, pasado el tiempo se trató 3 veces con TBS-T por 10 min. De los ensayos por triplicado se reveló con el kit de SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate en placas Kodak Biomax MS film.

6.2 Determinación del transcrito de RNA de NCL por estímulo de rhVEGF. Del cultivo celular se tomaron 1×10^6 células tratadas con rhVEGF, rhVEGF más AS1411 y rhVEGF más CRO, se lisaron con TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA), durante 5 min a TA, posteriormente se agregó cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 seg y por 3 min a TA. Se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4 °C. Se obtuvieron 3 fases, la fase superior (acuosa) que contiene el RNA fue transferida a otro tubo y adicionó isopropanol (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) se dejó por 10 min a TA. Enseguida se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó con etanol al 75% se centrifugó a 7500 x g por 5 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y con 50 μ L de agua libre de RNAsas se dejó a 56°C por 10 min. **qRT-PCR.** - Para la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real, se tomaron 10 ng de RNA total de cada condición; para detectar los RNA mensajeros (ARNm) se utilizaron los *primers*: para *Ncl* forward (CGGAAGAAGGAGATGACCAA) y reverse (CTGACATCCACAACAGCAAGA), control de carga β 2-microglobulina (β 2mg) forward (CACCCCCCACTGAAAAAGATG) y reverse (ATATTAAAAAGCAAGCAAGCA). Se utilizó el kit KAPA SYBR® One Step (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) y se utilizó en termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemania) con las condiciones: Hold 5 min 42°C/Hold 3 min 95°C/ (3 segundos 95°C, 20 seg 60°C) x 40 ciclos. Para la evaluación de la amplificación de los ensayos, fue por triplicado y calculada con los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

6.2 Cuantificación de miRNA221 y miRNA21 en HLSC estimuladas con rhVEGF en presencia de AS1411. Con la metodología antes descrita se obtuvo RNA total de las condiciones de SFB, rhVEGF, rhVEGF más AS1411 y rhVEGF con CRO. Se tomaron 100 ng de RNA de cada una de las distintas condiciones y se utilizó el sistema TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). En donde se realizó una primera fase con *primers* de tipo horquilla, para miRNA221 (miR221) (AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC) y para miRNA 21 (miR-21) (CAACACCAGUCGAUGGGCUGU) (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). Enseguida se realizó la retro-transcripción de punto final para obtener el cDNA, en el termociclador se establecieron las siguientes condiciones: Hold 16°C, 30 min/Hold 42°C, 30 min/ Hold 85°C, 5 min/ Hold 25°C, 1 min. Posteriormente se realizó la qPCR en tiempo real en las siguientes condiciones del termociclador: Hold 50°C, 2 min/ Hold 95°C, 10 min/ (Hold 95°C, 15 seg/ Hold 60°C, 1 min) x 40 ciclos. La normalización de los datos se realizó con RNA pequeño nuclear RNU44 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA). (CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGACTGAACATGAAGGTCTTAATTAGCTCTA ACTGAC) los ensayos fueron por triplicado y se cuantificó por calculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada condicion fueron comparadas contra el grupo control, en el modelo de inhibición de la NVC, el control fue el grupo Sham, mientras que en el modelo celular fue con células en presencia de SFB solamente, ambos grupos de datos fueron analizados mediante pruebas U de Mann-Witney para determinar las diferencias entre grupos. Se estableció una $p < 0.05$ para considerar una diferencia estadística significativa entre grupos. El programa utilizado para el análisis fue GraphPad Prism software (GraphPad, La Jolla CA, USA).

Resultados

1. El rhVEGF insertado intraestromal estimula la neovascularización corneal en un modelo murino.

Los ratones se examinaron bajo microscopio, se descartó la presencia de infecciones, opacidad y desepitelización corneal, que pudieran impedir la evaluación de la córnea. Durante el primer día después de la cirugía se visualizó la presencia de neovasos emergentes del limbo esclerocorneal invadiendo la córnea en ratones con rhVEGF, el crecimiento se mantuvo hasta el día 7 (Figura 1A). El grupo control con vehículo no presentó neovasos, ni daño sobre la córnea, desde el primer día y al finalizar el ensayo. Analizando los tratamientos, existe diferencia en el porcentaje y longitud de vasos con rhVEGF al compararlo contra el vehículo al día 1, 4 y 7. Por otro lado, la lacunaridad está disminuida, incrementando su organización y distribución espacial con el tratamiento de rhVEGF, mientras que en el grupo tratado con el vehículo no se observaron cambios (Figura 1B). El análisis entre los días muestra que el tratamiento con rhVEGF incrementó la presencia de neovasos y organización espacial hasta el día 7, los ratones tratados con el vehículo no muestran ningún cambio entre los días de tratamiento.

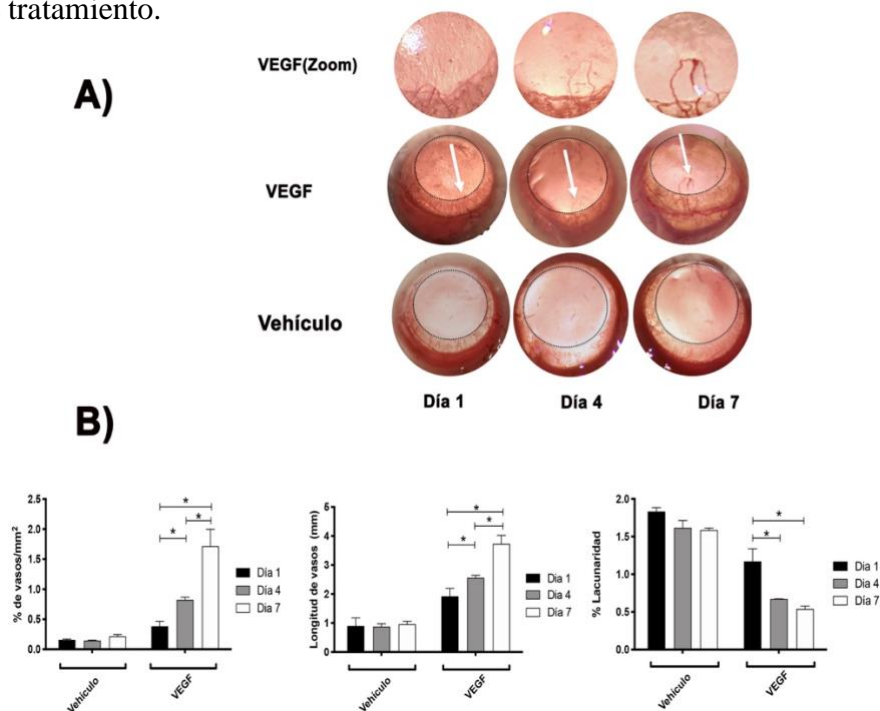


Figura 1. La neovascularización corneal es generada por rhVEGF. - A) Parte superior fotos de ojos a los días 1, 4 y 7 tratados con rhVEGF, las flechas indican la presencia de neovasos invadiendo la córnea delimitada por una línea punteada; parte inferior fotos de ojos tratados con vehículo sin presencia de neovasos. Arriba con zoom de las zonas con neovascularización, imágenes representativas de los distintos grupos. B) Gráficos de los datos generados por AngioTool; en la gráfica de la izquierda se muestra que hay un incremento en el porcentaje de vasos del día 1 hasta el 7. En la gráfica central muestra la longitud de vasos, que aumenta de manera constante hasta el día 7. En la gráfica de la derecha la complejidad y organización de los neovasos aumenta, esto se denota con la disminución

del valor de lacunaridad, en todos los ojos tratados con rhVEGF. Los tratados sin VEGF no muestran ningún cambio significativo. Las barras representan la media (\pm ES) de 6 ensayos independientes entre sí. * $p < 0.05$.

2. Los neovasos corneales generados por rhVEGF se tiñen con azul de Evans

Para evidenciar los neovasos que se desarrollaron sobre la córnea, que no pudieron ser visualizados de manera clínica, se utilizó EBD, colorante que se une a albumina, permitiendo su transporte sanguíneo y migrando a los capilares. Debido a sus propiedades de fluorescencia, con emisión a 590 nm permitió evaluarlo por microscopía de fluorescencia [117]. Se realizó una reconstrucción de las zonas donde se observó la presencia de neovasos nacientes del limbo invadiendo la córnea (I); estos vasos se capturaron con aumento mayor, demostrando que los neovasos que invaden la córnea provienen del limbo (III), la córnea tratada con el vehículo no presentó neovasos o marca del azul de Evans (II, IV).

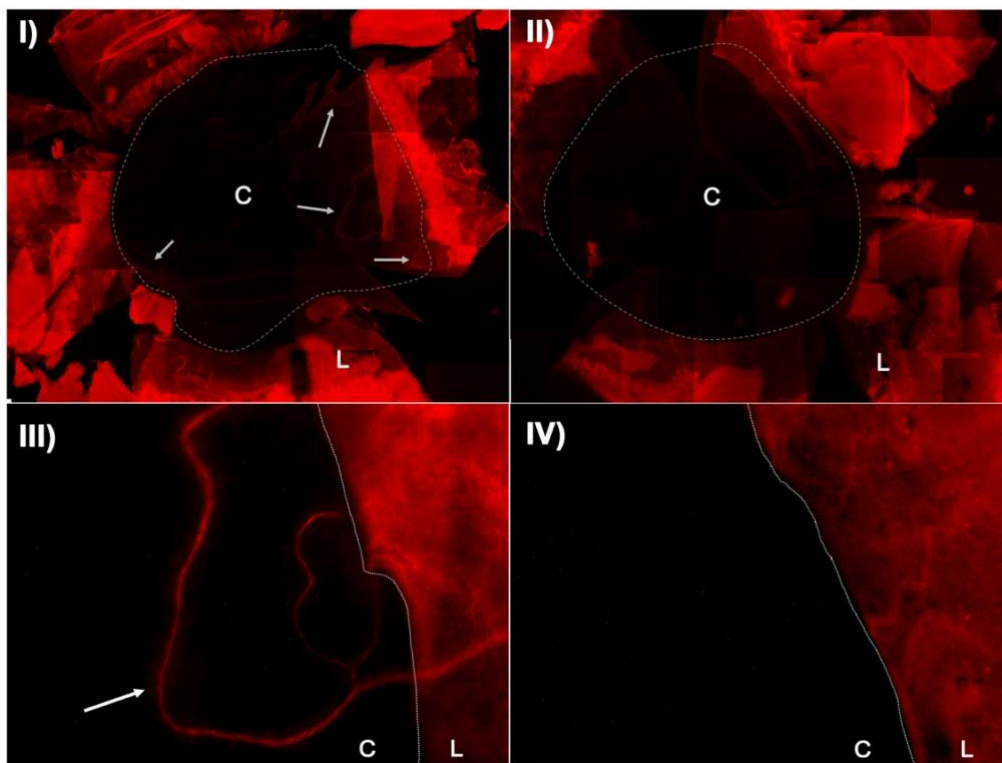


Figura 2. Tinción de neovasos con azul de Evans. – I) Reconstrucción de córnea tratada con rhVEGF, la zona oscura delimitada por la línea punteada representa la córnea, las flechas indican la presencia de neovasos corneales. III) Ampliación 10X de neovasos nacientes del limbo esclerocorneal hacia la córnea marcados con una flecha y teñidos de rojo. II) Reconstrucción de córnea tratada con vehículo que no presenta vasos. IV) Ampliación 10X de la zona corneal con ausencia de neovasos. Córnea (C), Limbo esclerocorneal (L). Imágenes representativas de cada grupo.

3.-El tratamiento tópico con AS1411 disminuye la neovascularización corneal más eficazmente que bevacizumab

Una vez establecido el modelo de neovascularización corneal por rhVEGF, se diseñó el tratamiento con AS1411 para medir el efecto en la formación de neovasos. La figura 3A muestra las fotografías representativas de los tratamientos después de siete días posterior a la cirugía. Como se comprobó, el grupo de SHAM no mostró neovasos, mientras que los demás grupos presentaron neovascularización por efecto de rhVEGF.

Se determinó, que la administración tópica de AS1411 disminuyó el porcentaje de vasos respecto al grupo de VEGF al día siete posterior a la intervención. De la misma manera, se observó que la longitud de neovasos se redujo con AS141 cuando se compararon contra el grupo de VEGF ($p < 0.05$). Asimismo, el tratamiento con CRO no mostró diferencia en el porcentaje y longitud de vasos al compararlo con el grupo de VEGF; no obstante, al comparar los tratamientos de los aptámeros, el análisis indicó que la actividad inhibitoria se presentó solamente en AS1411 ($P < 0.05$).

Cuando se analizó el grupo de VEGF contra BEVA, se observó una disminución en la presencia y longitud de neovasos en córnea. De igual forma, en la comparación entre AS1411 y BEVA, se encontró que, ambos ocasionan la disminución de la neovascularización; sin embargo, AS1411 es más eficaz en la inhibición de la NVC ($p < 0.05$). Analizando los valores de lacunaridad entre AS1411 y BEVA, no se encontró diferencia significativa, es decir la organización y complejidad entre ellos no presentó diferencia.

Por otro lado, el grupo de VEGF Y CRO presentaron baja lacunaridad, indicándonos que hubo un aumento en cantidad y longitud de neovasos, y que la presencia de esta neovascularización se organizó de manera compleja, comparándolo contra los tratamientos de inhibición como AS1411 y BEVA (Figura 3D).

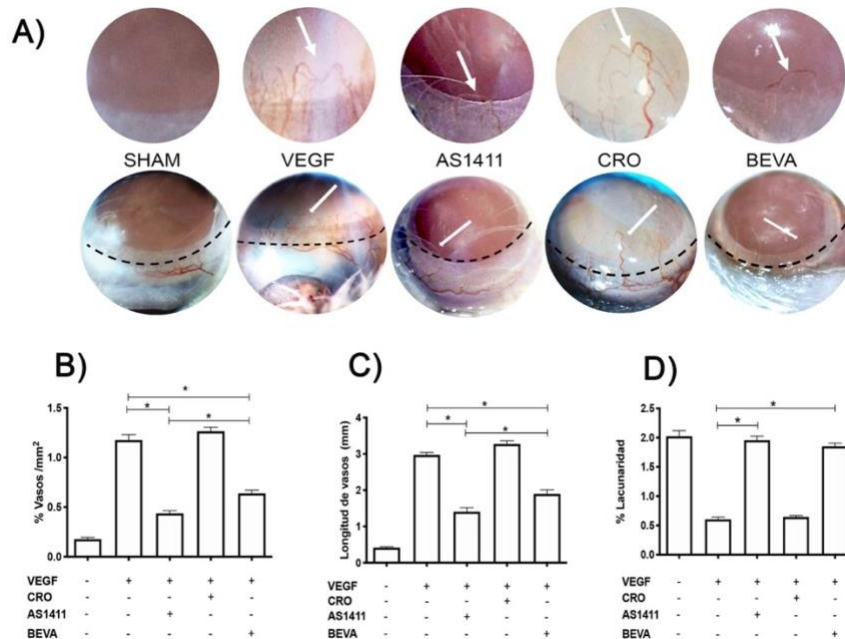


Figura 3. AS1411 disminuye la NVC generada por rhVEGF. A) Fotos de ojos al día 7 después de la intervención. Grupo SHAM solo presenta daño por cirugía, el grupo VEGF presenta pellet con rhVEGF sin tratamiento, grupo AS1411 contiene pellet con rhVEGF y tratamiento con AS1411, grupo CRO se insertó pellet con rhVEGF y tratamiento con CRO y el grupo BEVA presenta pellet con rhVEGF y tratamiento con bevacizumab. Las flechas indican la presencia de neovascularización, en el grupo de AS1411 y de BEVA hay presencia mínima de neovasos, mientras que los demás grupos tratados con rhVEGF presentan neovascularización, imágenes representativas de cada grupo. B) Existe una disminución en el porcentaje de vasos por milímetro cuadrado al igual que en la longitud de vasos (C). En la lacunaridad se encuentra disminuida en VEGF y CRO por la falta de inhibición de neovascularización y los tratamientos de AS1411 y BEVA presentaron alta lacunaridad, por disminuida presencia de neovasos (D). Las barras representan la media (\pm ES) de 6 ensayos independientes entre sí. * $p < 0.05$.

4. El aptámero AS1411 disminuye la presencia de neovasos en estroma corneal.

Para determinar la presencia, localización y estructura de los neovasos, en los diferentes tratamientos, se realizó la tinción de HE. En el grupo SHAM, que solo recibió daño; presentó morfología normal sin cambios en su estructura, donde el epitelio corneal se identificó como un conjunto de células estratificadas compuestas de entre 3 a 4 capas, las células más superficiales de forma aplanada con espacios entre ellas, mientras la capa central con morfología menos aplanada, con espacios reducidos, la capa más interna con morfología redonda muy cercanas, sin espacios entre ellas, todas las capas presentaron coloración púrpura que identifica a núcleos. Debajo del epitelio, se localizó el estroma corneal teñido de color rosa pálido por la alta presencia de colágeno; también se encontraron células de forma alargada correspondientes a los queratocitos, que presentaron tinción púrpura en núcleo. Después del estroma se encontró una monocapa basal de células que es el endotelio o epitelio posterior, que se distribuye de manera continua; también presentó núcleos color púrpura, esta es la zona más profunda y delimita la córnea de la cámara anterior.

Analizando los distintos grupos que se les introdujo pellet con rhVEGF, se encontraron estructuras similares a neovasos en el estroma corneal. En el grupo de VEGF se observó que las capas del epitelio normales con su forma estratificada, aunque con disminución en la presencia de células de la capa superficial, la capa central e interna se mantuvieron; sin embargo, en el estroma se encontraron neovasos; estructuras circulares, rodeadas de células endoteliales con núcleos color púrpura, además en el lumen de algunos neovasos se observaron eritrocitos. La localización de los neovasos se encontró principalmente en estroma, de manera más específica subepitelial, y un incremento de queratocitos. El epitelio posterior con pérdida de su continuidad presentando espacios entre células a lo largo de la córnea.

Interesantemente, el grupo de AS1411 presentó su epitelio corneal con estratificación, sin pérdida de estructura ni capas; en el estroma, la cantidad de queratocitos se mantuvo similar a SHAM, con ausencia de neovasos en estroma, se encontraron algunas estructuras circulares, que no presentan células endoteliales y carecen de eritrocitos en el lumen; su epitelio

posterior se mantuvo íntegro. No obstante, aunque en el grupo de BEVA, se observó que el epitelio corneal conservó su estratificación y capas; el estroma presentó neovasos rodeados de células endoteliales con eritrocitos en su lumen, la cantidad de queratocitos fue similar al grupo SHAM; mientras que su epitelio posterior perdió su continuidad, deformando su estructura.

Por otra parte, el grupo de CRO presentó similitud histológica al grupo de VEGF, aunque el epitelio corneal mantuvo su estratificación y las capas, zonas del epitelio fue deformado. La modificación del epitelio fue provocada por la presencia de neovasos subepiteliales, rodeados de células endoteliales con presencia de eritrocitos en su lumen y queratocitos cercanos a ellos. El endotelio también sufrió daño. (Figura 4)

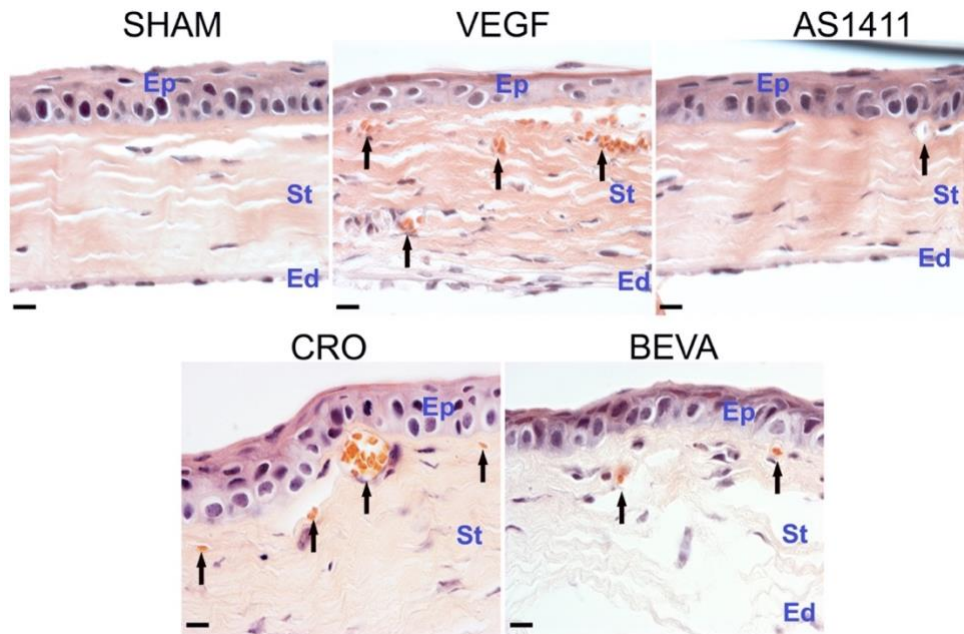


Figura 4. La administración de AS1411 disminuye la presencia de neovasos subepiteliales generados por rhVEGF. Fotomicrografías de segmentos de córneas teñidas con HE. El grupo SHAM presenta epitelio, células estratificadas de entre 3 a 4 capas, teñidas de color púrpura en el núcleo; el estroma con tonalidad rosa pálido, con presencia de queratocitos teñidos color púrpura. Presenta epitelio posterior en monocapa con núcleos color púrpura. El grupo VEGF presenta epitelio estratificado con pérdida de células superficiales, estroma de rosa pálido, con presencia de neovasos de entre 12 y 20 μm de diámetro (marcados con flechas negras), rodeados de células endoteliales, en el lumen hay presencia de eritrocitos, además con aumento en la presencia de queratocitos; el epitelio posterior presentó daño, con ausencia de células de la monocapa. El grupo AS1411 mostró epitelio estratificado de 3 a 4 capas con núcleos púrpura sin daño, el estroma corneal rosa pálido, con una estructura circular que carece de células endoteliales y eritrocitos; el epitelio posterior mantuvo su estructura y continuidad de la monocapa. El grupo de CRO el epitelio presentó estratificación, el estroma corneal presentó neovasos de 10 a 25 μm de diámetro, con células endoteliales y eritrocitos en su lumen. El epitelio posterior perdió su continuidad y presencia de la monocapa. En el grupo de BEVA se encontró el epitelio estratificado de 3 a 4 capas, mientras que el estroma corneal presentó neovasos de 10 a 15 μm de diámetro rodeado de células endoteliales, con presencia de eritrocitos en su lumen, el endotelio perdió integridad y deforme su continuidad. Fotomicrografía representativa de 6 ensayos independientes. Epitelio (Ep), estroma (St) y endotelio (Ed). Barra 20 μm .

5.- Los neovasos del estroma corneal generados por rhVEGF presentan marca para NCL.

Se confirmó la presencia de neovasos mediante la identificación de carbohidratos presentes en endotelios vasculares; además de inmunolocalizar la expresión de NCL en el modelo de NVC.

Una vez establecidas las condiciones de normalidad en el tejido con el grupo SHAM, se analizó la inmunofluorescencia; en donde se encontró un epitelio estratificado de 3 a 4 capas que presentó marca para DAPI (núcleos de color azul), con una capa superficial de núcleos alargados y las capas centrales e inferiores redondas, el estroma presentó marca para DAPI en los queratocitos, mientras que el epitelio posterior fue positivo a DAPI, además de presentar marca a isolectina B4 en la periferia del citoplasma.

La inmunofluorescencia del grupo VEGF, presentó epitelio estratificado con reducción en células de la capa más superficial, en los neovasos del estroma corneal, se observaron células endoteliales marcadas con DAPI y positivas para isolectina B4, la marca se encuentra en la periferia del citoplasma que rodea al neovaso, en el lumen se encontró presencia de eritrocitos (autofluorescencia, rojo/verde), las células endoteliales de los neovasos también presentaron marca positiva a NCL (verde) en zonas periféricas del citoplasma. Algunas de las células endoteliales de los neovasos marcadas con isolectina B4, también presentaron marca para NCL (amarillo) lo que sugiere que las células endoteliales de neovasos expresan NCL y se distribuye en el perímetro de la célula (Figura 5. VEGF). Los queratocitos no presentaron marca de isolectina B4, pero sí de NCL. Así mismo el grupo de CRO, se comportó similar al grupo de VEGF, presentó epitelio corneal estratificado, con pérdida de células en la zona más superficial, en el estroma corneal se encontraron neovasos con células endoteliales marcadas en la periferia con isolectina B4 rodeando a los neovasos; al igual que el grupo de VEGF, células endoteliales de los neovasos que fueron positivas a isolectina B4 expresaron NCL en la periferia. Algunos queratocitos presentaron marca para NCL en la periferia citoplasmática, pero fueron negativos para isolectina B4; además, algunos contenían eritrocitos en la luz del neovaso. Su epitelio posterior con algunas células presentes marcadas con isolectina B4 y sin continuidad con múltiples espacios.

Por otro lado, el grupo de AS1411 presentó un epitelio estratificado con 3 a 4 capas íntegras, en el estroma solo se tiñeron los núcleos de queratocitos, que fueron negativos para isolectina B4, similar a lo encontrado en el grupo SHAM y en la inmunofluorescencia no se observó ninguna organización similar a neovasos o marca a isolectina B4 como en los grupos de VEGF o CRO; el epitelio posterior mantuvo su integridad, marcando para DAPI e isolectina B4. Sin embargo, aunque en el grupo BEVA, se encontró con la presencia de un epitelio íntegro estratificado, el estroma corneal presentó neovasos rodeados de células endoteliales positivas a isolectina B4 con eritrocitos en el lumen, las células endoteliales positivas a isolectina B4 también presentaron marca para NCL, sin embargo, no estaba distribuida en la periferia, solo en algunas zonas de las células endoteliales, los queratocitos fueron negativos para isolectina B4 y para NCL. El epitelio posterior presentó marca para isolectina B4, al igual que DAPI, en algunas células presentes, pero con espacios entre ella y ausencia de la continuidad.

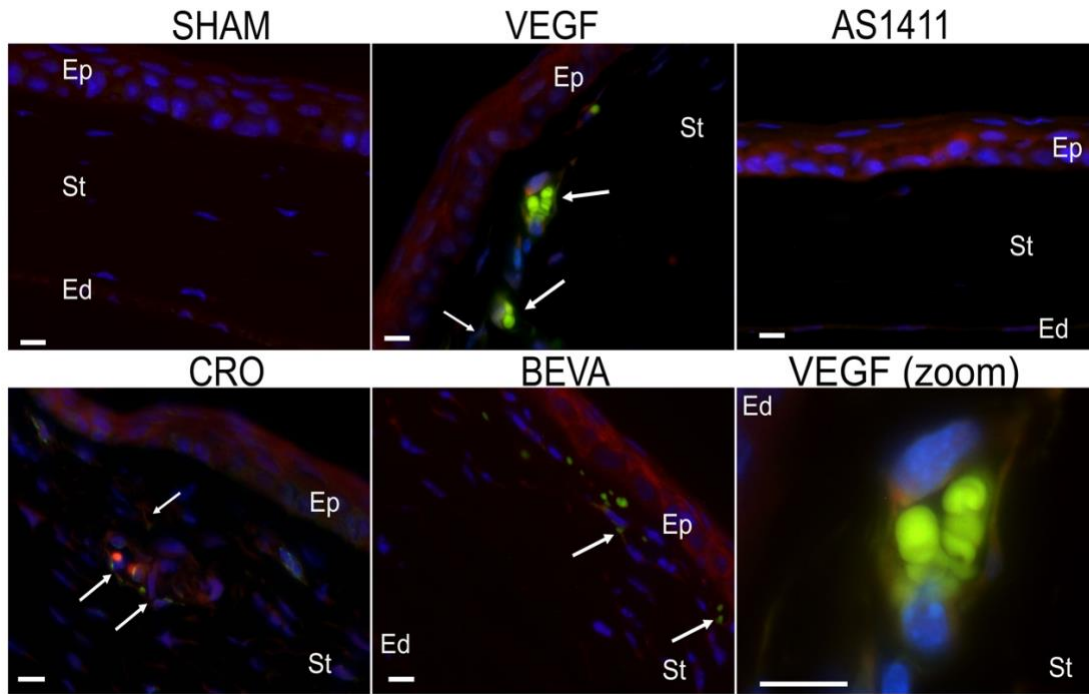


Figura 5.- NCL se expresa en neovasos generados por rhVEGF. Inmunofluorescencia en el modelo de neovascularización. Grupo SHAM, muestra la presencia de núcleos con DAPI, en un epitelio estratificado de 3 a 4 capas, en el estroma marcados con DAPI en los núcleos (azul) de los queratocitos, en el epitelio posterior se presentaron células en monocapa y con marca para DAPI y con la periferia citoplasmática, marca positiva para isolectina B4 (rojo). El grupo de VEGF, presentó epitelio estratificado de 2 a 3 capas, con pérdida en la capa más superficial, el estroma presentó neovasos (flechas blancas), rodeados de células endoteliales con marca positiva a isolectina B4 y a NCL (amarillo) en la periferia, además de eritrocitos en su lumen. Algunos queratocitos presentaron marca para NCL y negativos para isolectina B4, mientras el epitelio posterior no se logró identificar. En el grupo AS1411 fue identificado el epitelio corneal estratificado de 3 a 4 capas sin presencia de daño, el estroma presentó queratocitos y en su epitelio posterior, una monocapa de células positivas para isolectina B4 y DAPI. La inmunofluorescencia del grupo de CRO mostró marca del epitelio estratificado de 2 a 3 capas con disminución de células de la capa superficial, en el estroma hay presencia de neovasos, con células endoteliales positivas a NCL y a isolectina B4, rodeando al neovaso y distribuido en la periferia. Los queratocitos fueron positivos solo a NCL; el epitelio posterior no fue posible identificarlo. En el grupo de BEVA presentó epitelio estratificado de 2 a 3 capas, con presencia disminuida de la capa superficial. El estroma con neovasos con células endoteliales positivos para isolectina B4 y en la periferia y con marca reducida para NCL, el epitelio posterior solo presentó marca para DAPI y no para isolectina B4, además de estar casi ausente. La microfotografía de VEGF (zoom), es un aumento de un neovaso del grupo de VEGF, el cual presentó células endoteliales rodeándolo con marca positiva a isolectina B4 y NCL (Amarillo) la marca se extiende en la periferia del citoplasma. En el lumen del neovaso se muestran eritrocitos. DAPI (azul), isolectina B4 (Rojo), NCL (Verde). Flechas blancas indican la presencia de neovasos. Fotomicrografías representativas de cada grupo de 6 ensayos independientes. Epitelio (Ep), estroma (St) y endotelio (Ed). Barra 20 μ m.

6.- Las HLSC proliferan por estímulo de rhVEGF

A partir de los ensayos con MTT, se observó que las condiciones de cultivo afectaron la proliferación. En principio, una baja densidad celular (4×10^3) con SFB al 10% no incrementa la proliferación celular a 24 y 48 h de estimulación con rhVEGF, sin embargo, la concentración de 100 ng/ml de rhVEGF disminuyó la proliferación a 24 h. Cuando se aumentó la cantidad de células (8×10^3), no presentó ningún cambio en la proliferación, ni a 24 y 48 h de estímulo (Figura 6A).

Posteriormente se analizó las condiciones con SFB al 2%, partiendo con 4×10^3 células, las densidades ópticas a 24 h de estímulo, no mostró ningún cambio en la proliferación, aún con distintas concentraciones de rhVEGF; mismo resultado a las 48 h donde aumento la proliferación, pero no cambio entre las distintas concentraciones. Al cuantificar con 8×10^3 células a 24 h de estímulo, la concentración de 10 ng/ml promovió la proliferación, mientras que en 1 y 100 ng/ml, no presentó cambios significativos. Sin embargo, a 48 h hay un incremento en la proliferación respecto al control sin rhVEGF, el aumento en la proliferación se observó a bajas concentraciones de rhVEGF (1 ng/ml). El incremento en la proliferación fue comparándolo con el grupo sin rhVEGF ($p < 0.05$); sin embargo, al analizar el comportamiento entre las concentraciones, la proliferación fue similar en concentraciones 10 y 100 ng/mL, se determinó que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de rhVEGF. Por lo que se decidió utilizar la concentración de 1 ng/ml para posteriores ensayos.

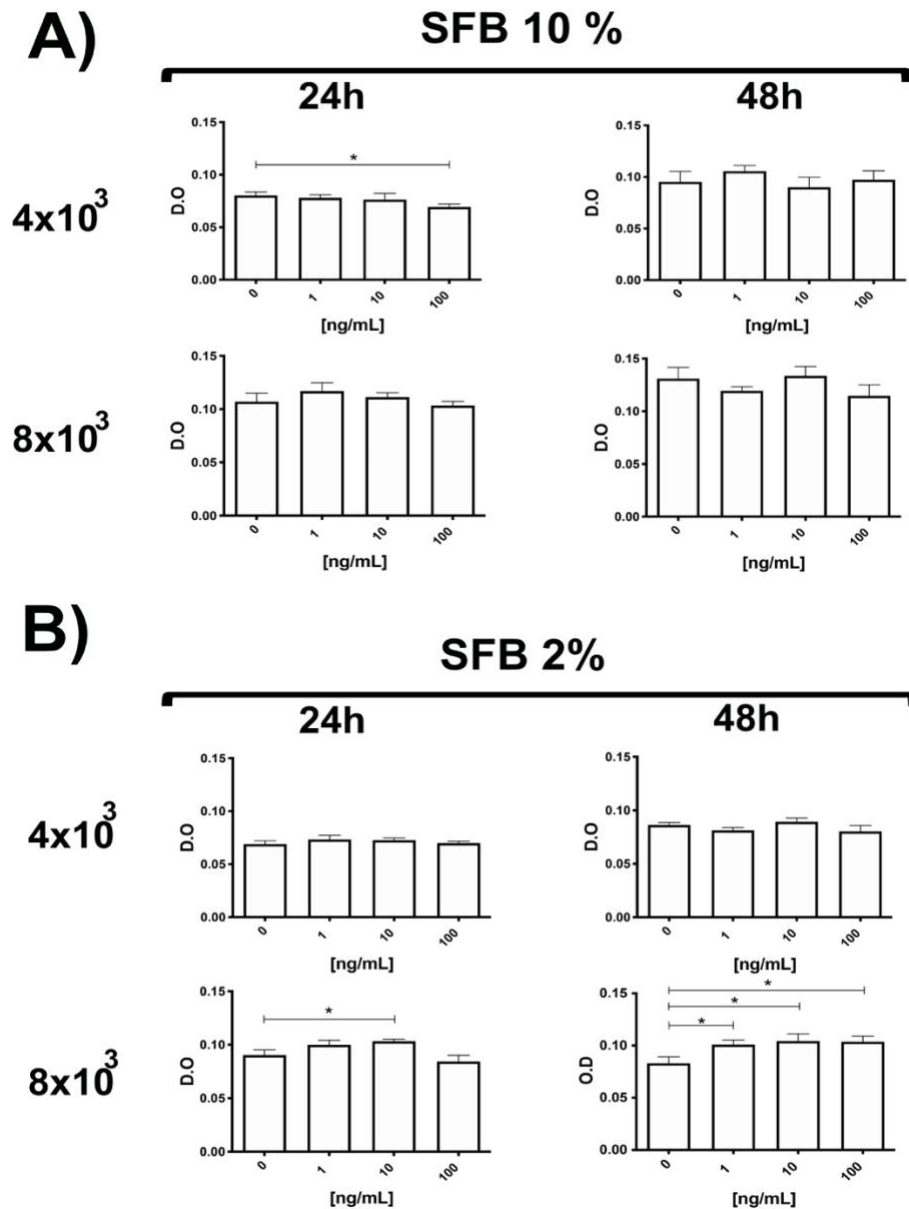


Figura 6. Aumento de la proliferación de HLSC por estímulo de rhVEGF. Representación gráfica de las densidades ópticas obtenidas a partir los ensayos de MTT de los grupos: estimulación de 4×10^3 células, SFB 10% y rhVEGF a 1, 10 y 100ng/ml a 24 y 48 h, solo presentó reducción en la proliferación a 24 horas con 100 ng/ml de rhVEGF. Con 8×10^3 células la proliferación a 24 y 48 h entre los distintos estímulos no presentó diferencia estadística ($p < 0.05$) (A). Estimulación de 4×10^3 células, SFB 2% y rhVEGF a 1, 10 y 100ng/ml a 24 y 48 h, se muestra que a 24 h el tiempo es insuficiente para observar cambios en la proliferación en las distintas concentraciones de rhVEGF. A 48 h se mostró una diferencia estadística al incrementar la proliferación en todas las concentraciones de rhVEGF, el aumento no es dosis dependiente. ($p < 0.05$) (B). Medición de formazan a 590 nm. Las barras representan la media (\pm ES) de 3 ensayos independientes entre sí. * $p < 0.05$.

7.- AS1411 y anti-NCL muestran un patrón anular de NCL en superficie de HeLa.

Para comprobar la hipótesis de que el anticuerpo y aptámero reconocen a la NCL de superficie, se optó por utilizar el anticuerpo policlonal de conejo contra NCL y el aptámero AS1411-F, ambas herramientas reconocen a NCL, pero de manera distinta. Por lo cual se analizó si el reconocimiento de NCL en superficie celular, podría ser determinado con el aptámero de igual manera que con el anticuerpo.

Se utilizó la línea de cáncer de cérvix HeLa, en la cual se ha reportado que expresa NCL de manera abundante en superficie [113]. Las células HeLa fueron teñidas con anticuerpos anti-NCL y aptámeros acoplados a FITC (AS1411-F/CRO-F), el tratamiento para la inmunolocalización se realizó en condiciones sin detergentes que afectaran la permeabilidad de la membrana plasmática, además de mantener el ensayo a 4°C. Las células tratadas con anti-NCL (rojo) y AS1411-F (verde) mostraron marca en la periferia celular, tanto para anti-NCL como para AS1411-F, sin embargo, la tinción con AS1411-F presentó tinción en la superficie y con continuidad en la marca, mientras que la tinción con anti-NCL marco la superficie, pero de manera discontinua. Cuando se realizó el empalme de los distintos marcajes, los núcleos teñidos con DAPI (azul) que nos confirman la presencia de células y descarta posibles artefactos, además de identificar que la doble tinción fue anular para AS1411 y anti-NCL, las zonas donde se empalmaron presentaron color amarillo (figura 7A), lo que sugiere que anti-NCL y AS1411-F reconocen a NCL en superficie. Al evaluar la tinción con anti-NCL y CRO-F, el anticuerpo mostró reconocimiento en la periferia, de manera discontinua, mientras que el CRO-F no presentó reconocimiento (figura 7B).

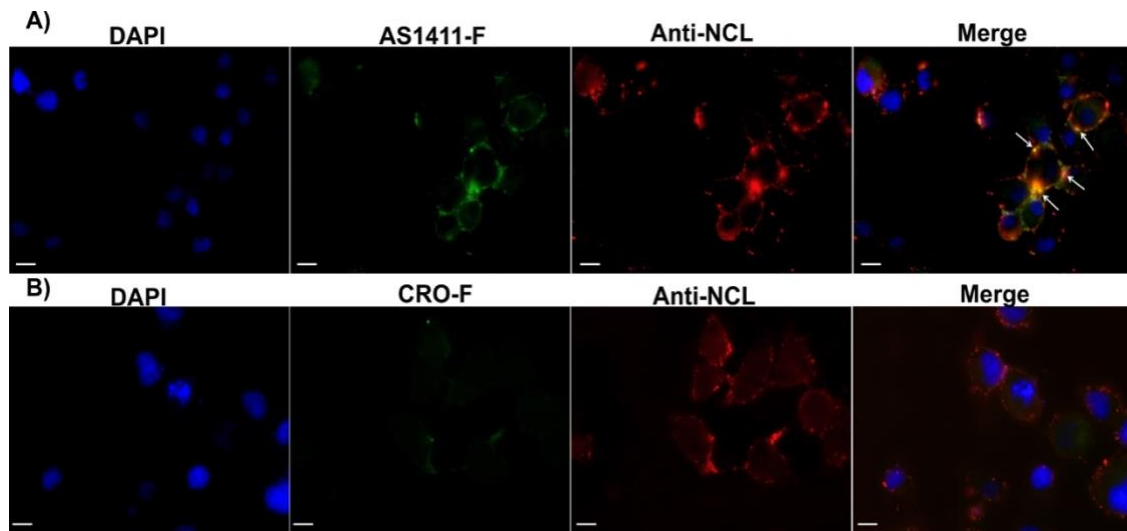


Figura 7. Co-localización de anti-NCL y AS1411-F. A) Tinción en células HeLa con anti-NCL, tinción en la periferia celular, la marca con AS1411-F, es periférica y continua, el empalme de las imágenes genera regiones con colocalización al reconocimiento de NCL (flechas blancas). B) Tinción con anti-NCL, el reconocimiento positivo del anticuerpo se localizó en superficie, sin marca de CRO-F. Anti-NCL (rojo), AS1411-F (verde), CRO-F (verde) y DAPI (azul). Fotomicrografías representativas de cada grupo de 3 ensayos independientes. Barra 10 μm .

8.-Las HLSC expresan NCL en superficie por acción de rhVEGF.

Después de caracterizar el incremento en la proliferación de HLSC y comprobar el reconocimiento de manera indistinta de NCL en superficie, se determinó si el estímulo de rhVEGF ocasionaba la relocalización de NCL y su posterior expresión en superficie. Para poder comprobar esta hipótesis, se realizó marcaje con aptámeros acoplados a FITC; en células estimuladas con rhVEGF.

Se encontró que la tinción de AS1411-F fue positiva para las HLSC en presencia de rhVEGF; el marcaje sugiere que la localización es extracitoplasmática, específicamente en superficie, la marca de AS1411 (verde) se encuentra separada del núcleo (azul) y del citoplasma, se estableció al visualizar el empalme con el campo brillante, la fotomicrografía mostró que la marca se aísla del núcleo y del citoplasma. Mientras que, el control CRO-F, no presentó marca, indicándonos que el reconocimiento por parte de AS1411 hacia NCL en superficie. La presencia de NCL en superficie, es reforzado por la tinción realizada en células en ausencia de rhVEGF y tratadas con AS1411-F, la cual no presentó tinción (figura 8B), con lo que confirmamos que la presencia de NCL en membrana de las HLSC está condicionada a la presencia de rhVEGF.

Para reforzar la hipótesis de la presencia de NCL en superficie, se realizó microscopia de transmisión electrónica que, por su gran capacidad de resolución, permitió identificar la presencia de NCL en superficie con mayor detalle. Las HLSC tratadas con rhVEGF mostraron cambios morfológicos. La formación de cisternas de retículo endoplásmico, algunas cisternas dilatadas, además de presentar pseudópodos delgados y extendidos desde la superficie. El inmunomarcaje con anti-NCL se encontró en pseudópodos, la marca de NCL se identifica como puntos negros que corresponden a inmunomarcaje con oro coloidal (flechas negras), la marca de NCL también se encuentra en algunas zonas de la membrana plasmática. Mientras que las HLSC sin estímulo, presentaron un tamaño similar a las tratadas con rhVEGF, en su organización celular se observó la disminución en la formación de cisternas del retículo endoplásmico, el núcleo con menor tamaño, aunque también presentó pseudópodos, pero el inmunomarcaje fue negativo, en ninguna zona de la membrana presentó marca para NCL. Lo que nos confirma que la presencia de NCL en las HLSC es generada por el rhVEGF (figura 8A).

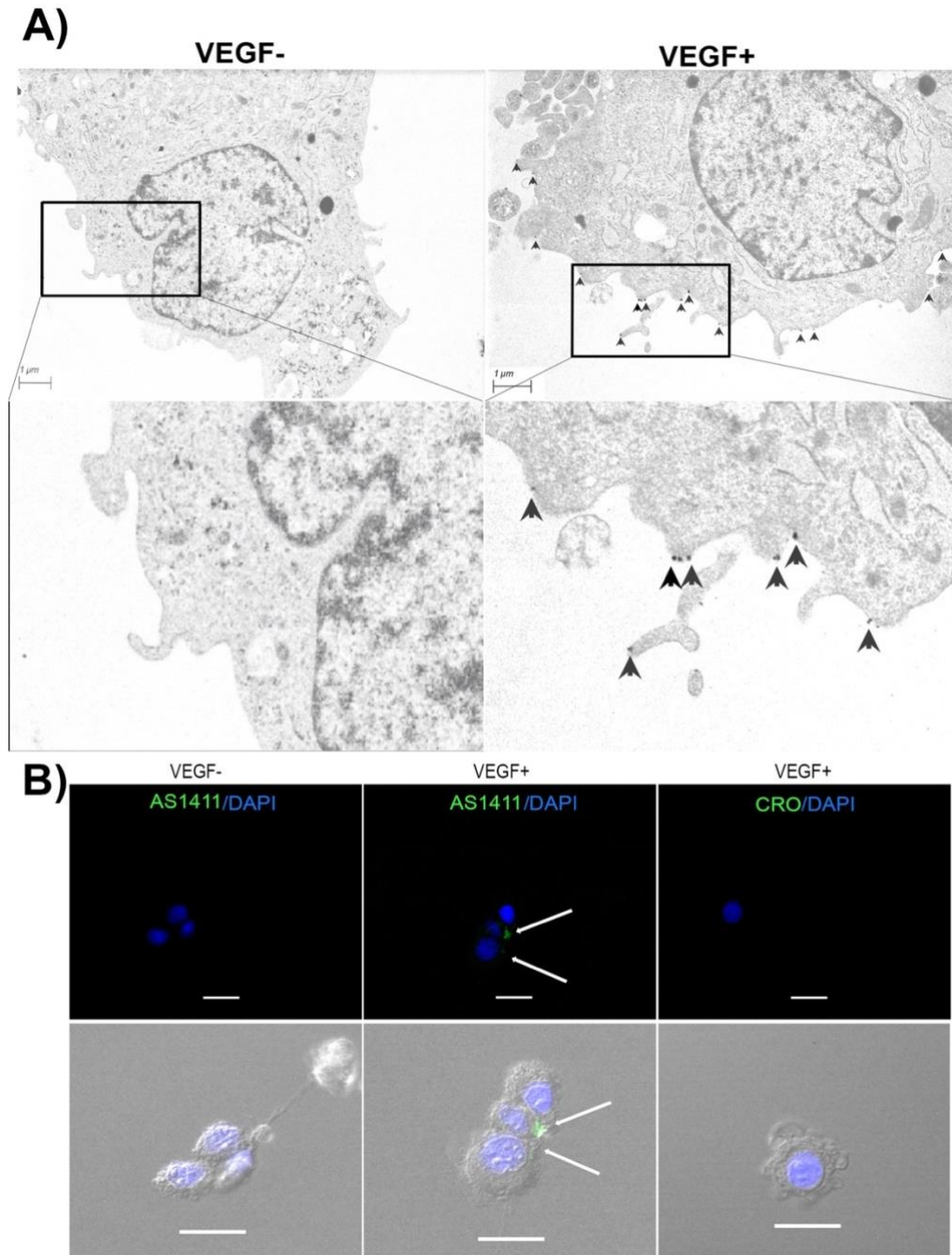


Figura 8. Relocalización de NCL en HLSC estimuladas con rhVEGF. A) Microscopía de transmisión electrónica en HLSC tratadas con rhVEGF, a la derecha se observa formación de cisternas del retículo endoplásmico y formación de pseudópodos, la marca de NCL teñida con oro (flechas negras) se presenta en la membrana plasmática. A la izquierda HLSC sin estímulo; disminución de cisternas del retículo endoplásmico y reducida formación de pseudópodos, con ausencia de marca para NCL. B) Fluorescencia con aptámero izquierda células sin estímulo marcadas con AS1411-F, sin presencia de NCL en superficie; centro, células estimuladas con rhVEGF, con marca de NCL en superficie (flechas blancas); derecha células estimuladas con rhVEGF marcadas con CRO-F, ausencia de reconocimiento inespecífico. AS144-F (verde), DAPI (azul), CRO-F (verde). Fotomicrografías representativas de cada grupo de 3 ensayos independientes. Barra 20 μm

9.- La proliferación de HLSC por rhVEGF, disminuye en presencia de AS1411.

Una vez identificada la presencia de NCL en superficie de HLSC generada por rhVEGF, se determinó el efecto en la proliferación en presencia del aptámero AS1411. Para ello se realizó la cuantificación de sales de formazan, el estímulo de HLSC con rhVEGF y en presencia de diferentes concentraciones de AS1411, se encontró que a partir de 100 nM y hasta 1000 nM la proliferación disminuyó, es importante mencionar que la reducción fue similar entre las distintas concentraciones de AS1411, con lo cual se descartó que fuera dosis dependiente. Por otra parte, la especificidad al reconocimiento de NCL e inhibición, fue apoyada por el grupo de CRO, aptámero control de secuencia carente actividad no presentó ningún efecto en la proliferación en las distintas concentraciones ($p < 0.05$) en que se administró. Además, el grupo de BEVA presentó similitud con AS1411, disminuyendo la proliferación en concentraciones de 10 a 500 ng/ml, a tampoco mostró dosis dependencia al momento de la inhibición (figura 9). Con base a los resultados se manejaron concentraciones de 1000 nM para los aptámeros y 500 ng/ml para bevacizumab para ensayos posteriores.

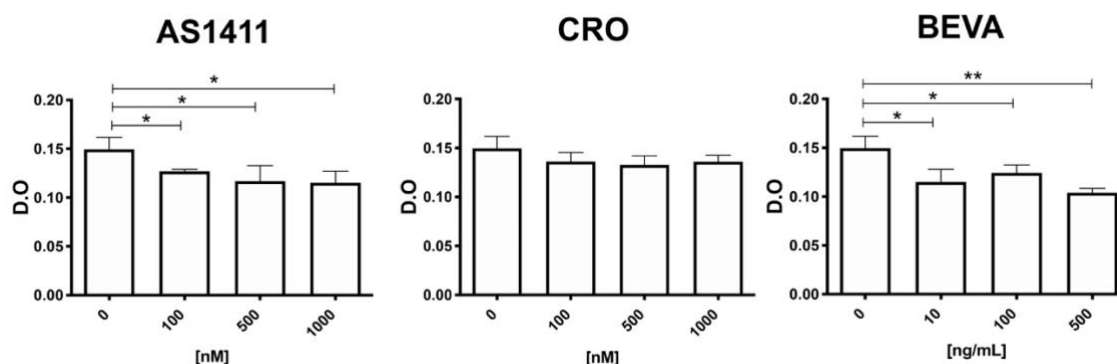


Figura 9.- AS1411 disminuye la proliferación en células estimuladas con rhVEGF. Representación gráfica de las densidades ópticas (D.O) obtenidas de ensayos de proliferación por MTT. La inhibición se presentó en AS1411 en concentraciones de 100, 500 y 1000 nM, el grupo de CRO no hubo cambios en la proliferación en las mismas concentraciones. El grupo de BEVA inhibió la proliferación desde 10 hasta 500 ng/ml. Las barras representan la media (\pm ES) de 3 ensayos independientes entre sí. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$

10.-AS1411 inhibe la migración con mayor eficiencia que bevacizumab

Se estableció que el incremento en la proliferación de HLSC por acción de rhVEGF se reducía en presencia de AS1411, se decidió analizar el posible efecto en la migración celular. Para determinar si afectaba la presencia AS1411, se diseñó el modelo de rasgadura (*wound healing*) en monocapa de células. En donde se observó que la presencia de rhVEGF, generó aumento de la migración, el incremento se determinó comparándolo con el control SFB, que tuvo baja presencia de células en la zona generada por la rasgadura, lo que se traduce a una baja migración; sin embargo, el grupo estimulado con rhVEGF y en presencia de AS1411, la migración disminuyó en comparación con el grupo de VEGF ($p < 0.05$) está diferencia se muestra visualmente con la tinción con cristal violeta (figura 10A) y la reducida cantidad de

células en el área delimitada por las líneas punteadas. Para corroborar que la inhibición de la migración era por la actividad de AS1411, se analizó el grupo control de secuencia CRO, donde se estimuló con rhVEGF y se mantuvo en presencia de CRO; encontrándose que la migración no se modificó a 48 h de ensayo. Además, el grupo de BEVA presentó disminución en la migración, pero al comparar la inhibición contra el grupo de AS1411, se encontró que AS1411 tiene mayor eficiencia inhibiendo la migración, que bevacizumab ($p < 0.05$).

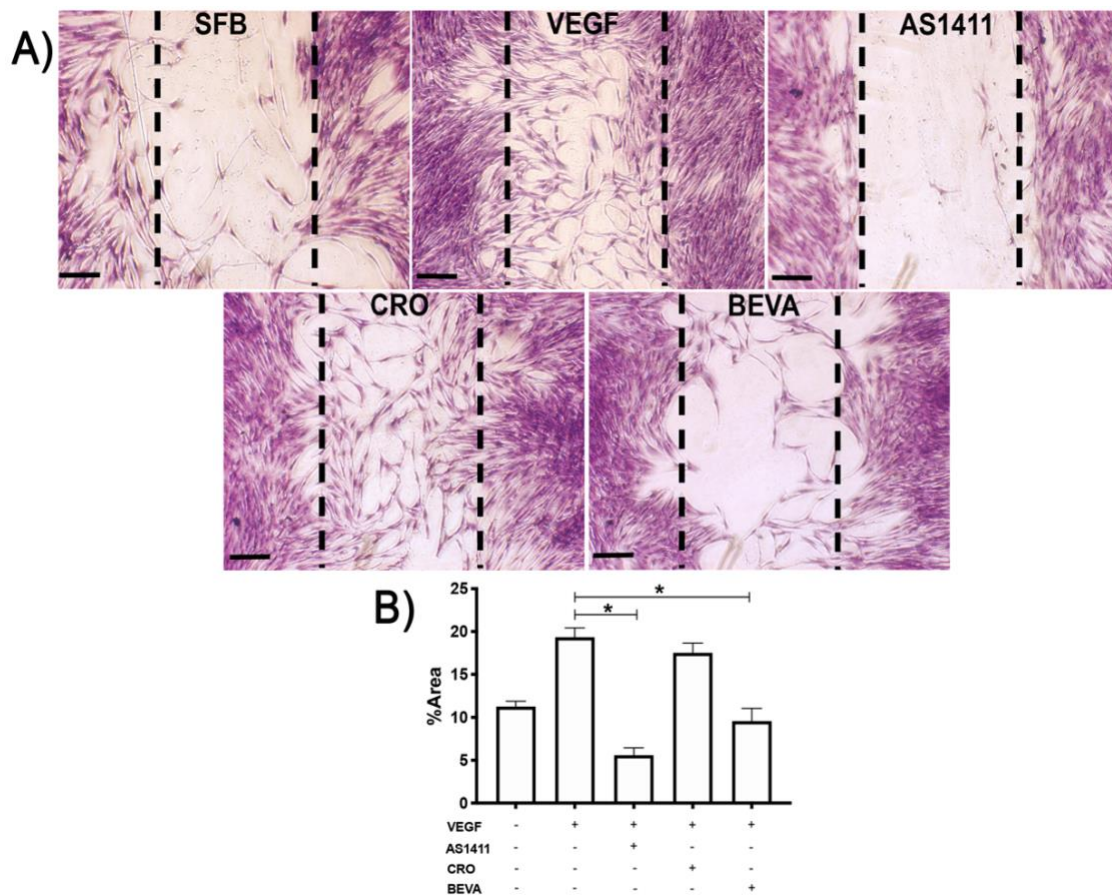


Figura 10. La migración de HLSC es inhibida por AS1411. A) Fotomicrografías representativas de cada grupo de HLSC teñidas con cristal violeta. Grupo SFB grupo control en ausencia de rhVEGF la presencia de células es mínima. El grupo de VEGF presenta aumento en la migración comparándolo con el control de SFB. El grupo de AS1411 presentó disminución en la migración celular aun en presencia de rhVEGF. El grupo con el control de secuencia CRO, permitió la migración de las HLSC. Mientras el grupo de BEVA la migración también fue disminuida, pero en menor medida a comparación de AS1411 La zona punteada delimita el área de la rasgadura. B) Representación grafica de los análisis del área de cada grupo a 48 h del ensayo. Las barras representan la media (\pm ES) de 3 ensayos independientes entre sí. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$. Barra $50\mu\text{m}$

11.- Las interacciones celulares entre las HLSC estimuladas con rhVEGF disminuyeron en presencia de AS1411.

Con los datos obtenidos se estableció que HLSC en presencia de rhVEGF aumenta la proliferación y migración, además que AS1411 inhibe estos efectos.

Para complementar los mecanismos que participan en la remodelación y formación de neovasos se midió la respuesta de las HLSC en una matriz tridimensional en presencia de rhVEGF y AS1411. Para ello se colocaron células en matrigel, la presencia de la matriz generó cambios en las HLSC, las modificaciones en la estructura se mostraron en el grupo control de SFB, que presentó células alargadas y redondas con pocas interacciones, en la mayoría encontrándose aisladas, sin formación de cúmulos o agregados celulares, con ausencia de túbulos y nodos. Mientras el grupo de VEGF, mostró células de forma fusiforme con aumento en las interacciones y la formación de nodos, con presencia de redes celulares en forma de túbulos, con baja presencia de células redondas y aisladas.

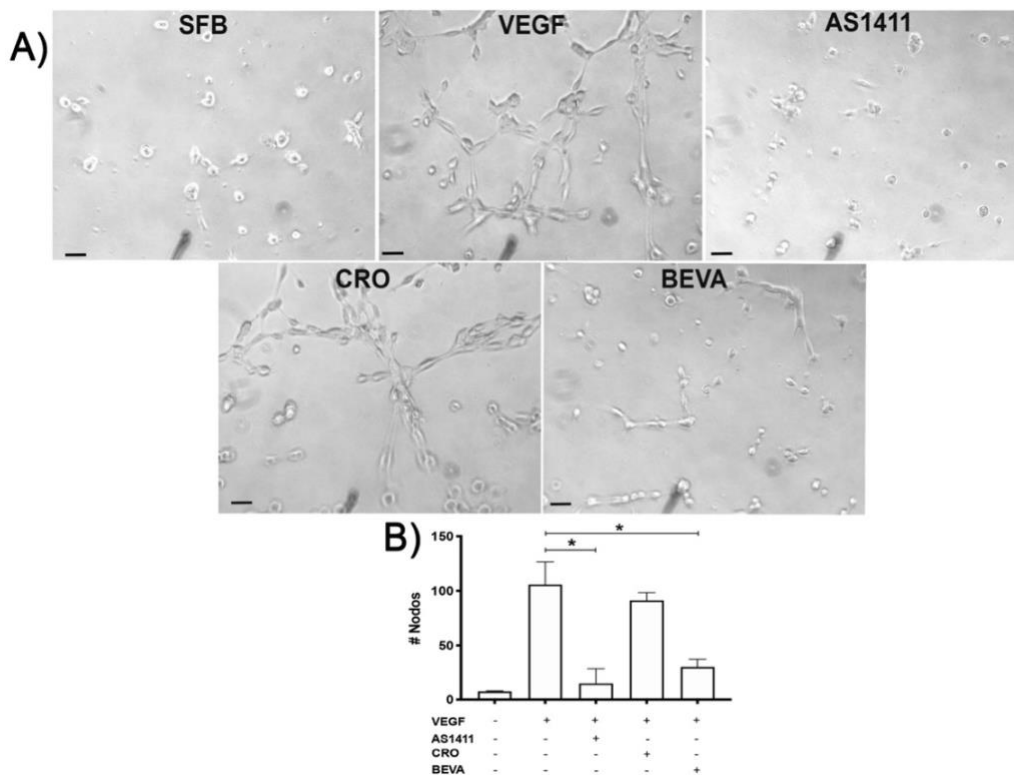


Figura 11.- La formación de túbulos es bloqueada por AS1411.- Fotomicrografías representativas de cada grupo, ensayos de formación de túbulos en matrigel. A) Grupo de SFB presentó células redondas y aisladas sin interacción. En presencia de VEGF las células se encontraron con forma fusiforme, presencia de interacciones celulares en forma de túbulo y aumento en las uniones (nodos) generando redes celulares. En presencia de rhVEGF y AS1411 las interacciones se bloquearon completamente, con presencia de células redondas y aisladas. El aptámero sin actividad CRO, permitió la formación de redes, túbulos y aumento en la formación de nodos similar al grupo VEGF, además de células fusiformes y algunas redondas. El grupo de BEVA permitió la generación de algunos túbulos, pero con menor capacidad de formar nodos y redes celulares. Las barras representan la media (\pm ES) de 3 ensayos independientes entre sí. * $p < 0.05$. Barra 20 μ m

Sin embargo, adicionando AS1411 la cantidad de túbulos se vio disminuida, la formación de nodos se redujo, con aumento de células redondas y aisladas. Algunas con estructura fusiforme, pero sin lograr interaccionar con otras, la reducción por AS1411 se comprobó con el grupo control de secuencia CRO, en donde la actividad de rhVEGF no fue inhibida, encontrándose células fusiformes con interacción entre ellas, se incrementó la formación de túbulos y redes celulares, además de baja cantidad de células redondas, similar al grupo de VEGF (Figura 11A).

Al evaluar la capacidad de inhibición del grupo de BEVA, se encontró que la formación de túbulos disminuyó de manera considerable, aunque la presencia de redes celulares se bloqueó, la cantidad de células fusiformes fue mayor en comparación con el grupo de AS1411, además de la formación de nodos se incrementó ($p < 0.05$).

12.- VEGF disminuye la cantidad mRNA de NCL aun en presencia de AS1411, pero no modifica los niveles de proteína.

Se determinó si los niveles del transcrito de mRNA de NCL se modificaban en presencia de rhVEGF y AS1411 y si éste tendría alguna consecuencia en los niveles de proteína.

Para ello se tomaron HLSC, se activaron con rhVEGF en presencia de aptámeros. Se obtuvo el extracto total de proteína y RNA total. Para determinar la cantidad de mRNA de NCL se realizó la determinación de los transcritos mediante la cuantificación de $2^{-\Delta\Delta CT}$, en donde se observó que la cantidad del transcrito de *ncl* disminuyó al menos 5 veces ($p < 0.05$) en presencia de rhVEGF en comparación con el control de SFB. interesantemente la disminución del transcrito de *ncl* por rhVEGF no se modificó en presencia de AS1411, es decir la disminución ocasionada por el rhVEGF se sostuvo. Al estimular con rhVEGF y colocar el aptámero control CRO, no afectó la reducción del transcrito de *ncl*. Con lo que la disminución en los niveles de *ncl* no son afectados por presencia de AS1411 y solamente depende de rhVEGF. Los valores cuantificados fueron normalizados con los niveles de expresión de $\beta 2mg$.

Para comparar los niveles de expresión de proteína, en el western blot se verificó la presencia de una banda alrededor de 100 kDa, el grupo control de SFB y los grupos con VEGF, VEGF+AS1411 y VEGF+CRO presentaron bandas de tamaño similar entre ellas, al momento de evaluar por densitometría cada banda y normalizar los valores, con la relación de NCL (100 kDa) y el control de carga β -tubulina (50 kDa), se determinó que la cantidad de NCL, no presentó diferencia estadística entre las condiciones basales y las estimuladas ($p < 0.05$). En contraste con los niveles de mRNA, la presencia de proteína no se encontró modificada por ninguna condición, es decir, la cantidad de NCL a nivel de proteína no se modifica con rhVEGF ni en presencia de aptámeros.

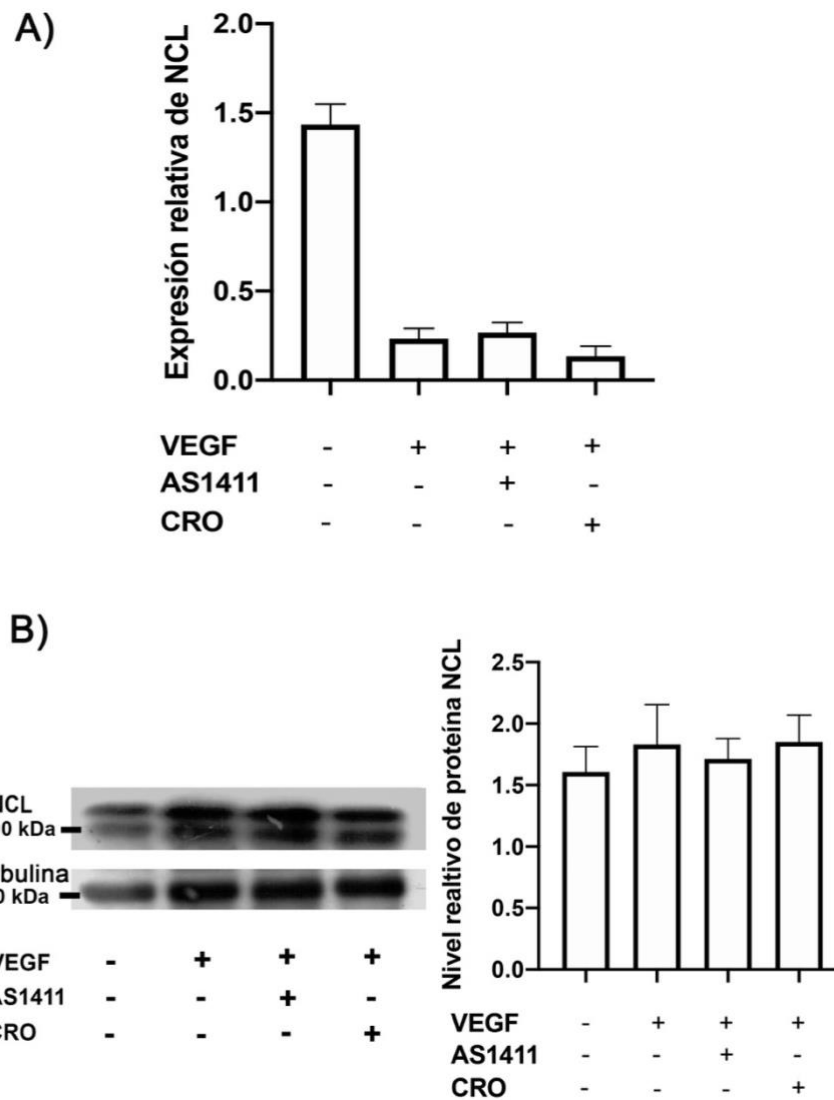


Figura 12. La presencia de VEGF provoca la disminución del transcrito de NCL sin afectar los niveles de proteína. A) Cuantificación de los niveles de transcritos de NCL disminuyen en presencia de rhVEGF, en comparación con los niveles basales que se expresa al menos 5 veces más. Los grupos de AS1411 y CRO no presentan diferencia estadística respecto al tratado con VEGF, la disminución de los transcritos de NCL solo depende de VEGF y no es afectada por los aptámeros. La detección de los mRNA fue por qRT-PCR y la cuantificación fue por $2^{-\Delta\Delta CT}$. B) Imagen representativa del western-blot contra NCL y β -tubulina de los distintos grupos. Determinación por densitometría de los niveles de proteína de NCL, en donde el estímulo de rhVEGF no afecta la presencia de NCL en las HLSC, de la misma manera el tratamiento con rhVEGF y AS1411 no cambia los niveles proteína. Las barras representan la media (\pm ES) de 3 ensayos independientes entre sí. * $p < 0.05$

13.-EL aptámero AS1411 disminuye la expresión de miR21 y miR221 generada por rhVEGF.

Se comprobó que la cantidad de transcritos de NCL se reducen en presencia de VEGF y que AS1411 no afecta esta disminución, con lo que se analizó la relación en la expresión de miRNAs asociados a la NVC como miR221 y miR21.

El análisis entre las condiciones fue con los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ y la normalización de RNU44. Se determinó que los niveles de expresión de miR21 se incrementaron después del tratamiento con rhVEGF, estos valores indican que al menos existen 4 veces mas miR21 respecto al control sin VEGF ($p < 0.05$); no obstante, al momento de estimular con rhVEGF y adicionar AS1411 la cantidad de miR21 se ve disminuida a niveles cercanos al basal lo que indica un control negativo por parte de AS1411. Mientras que al estimular con rhVEGF y adicionar al aptámero control CRO, la cantidad de miR21 se incrementa, similar al mostrado por rhVEGF (Figura 13A). Cuando se analiza el comportamiento del transcrito de miR221 mostro el mismo comportamiento de miR21, al momento de estimular con rhVEGF el incremento de transcritos de miR221 se elevaron al menos 5 veces, pero al momento de colocar AS1411 la cantidad de transcritos se reduce a nivel basal. La inhibición de AS1411 se comprobó al momento de agregar rhVEGF y CRO donde el aptámero sin especificidad no afecta el incremento de la expresión de miR221.

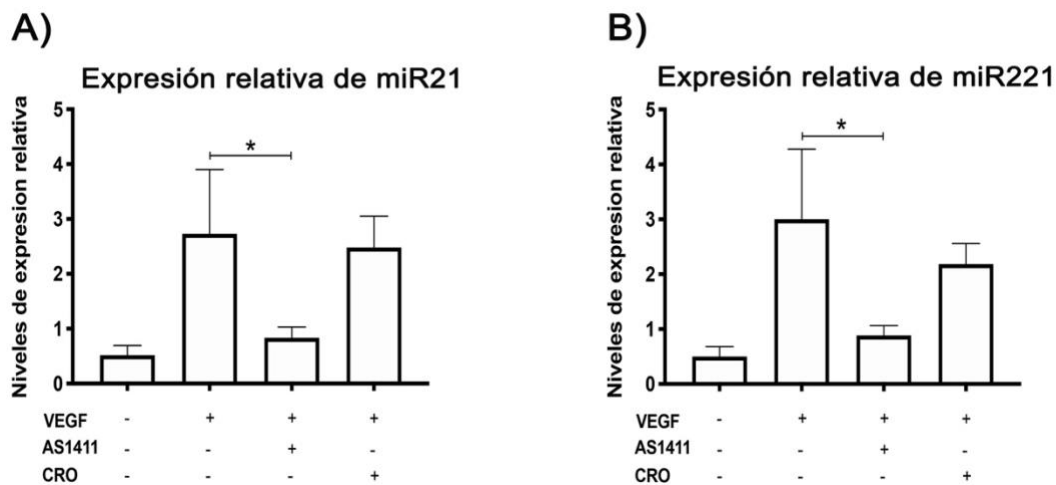


Figura 13. Los transcritos de miR21 y miR221 disminuyen por acción de AS1411. Representación grafica de los valores calculados de $2^{-\Delta\Delta CT}$, medición de miR21(A) y miR221(B), el estímulo de rhVEGF genera el incremento, mientras que al colocar AS1411 la presencia del transcrito disminuye, al momento de colocar el control de secuencia CRO, la presencia de miR21 se ve aumentada con respecto al basal con ausencia de rhVEGF. Los valores fueron normalizados con el control de carga RNAsn (RNU44). Las barras representan la media (\pm ES) de 3 ensayos independientes entre sí. * $p < 0.05$

Discusión

La córnea es un tejido transparente avascular, que sirve como barrera mecánica y superficie refractiva del ojo. No obstante, la presencia de factores locales y enfermedades sistémicas, repercuten la transparencia corneal, afectando el equilibrio y provocando NVC [8]. En el presente trabajo encontramos que la NVC estimulada por rhVEGF se ve disminuida por la presencia del aptámero AS1411, molécula que reconoce a la NCL de superficie implicada en la NVC. AS1411 actúa reduciendo la presencia, longitud de neovasos y evitando la organización de estructuras vasculares aberrantes encontrados de manera clínica e histológica y una reducción de marcadores para neovasos y NCL, la reducción de NVC presentó mejor efecto con AS1411 que con un anti-angiogénico como el bevacizumab. Además, el AS1411 reduce la proliferación, migración y formación de estructuras tubulares en HLSC. La disminución por parte de AS1411 no modifica los niveles del transcrito y de proteína NCL; en contraste con, los miRNAs asociados angiogénesis como miR21 y 221, que se elevan por efecto de VEGF y son disminuidos en presencia de AS1411.

El modelo que desarrollamos se basó en generar un espacio intraestromal y posterior inserción de rhVEGF en pequeños fragmentos llamados pellets, se encontró que la NVC ocasionada es independiente del daño causado por la cirugía, se descartó que los componentes primarios (vehículo) pudieran afectar. Es importante mencionar que la NVC se cuantificó con el porcentaje de vasos, la longitud y la lacunaridad. Esta última característica nos indicó la complejidad de la red vascular. En nuestro modelo la presencia de neovasos invadiendo la córnea desde el día 1, posterior a la cirugía, con un pico máximo alrededor del séptimo día posterior a la cirugía, similar a lo reportado por Quiroz-Mercado y cols en 2016 [49] donde las suturas generaron una cantidad considerable de NVC en la superficie, aunque nuestra NVC fue menor, tiene la ventaja de ser ocasionada solo por el VEGF, dejando de lado la gran cantidad de factores involucrados en un daño por sutura. El porcentaje y la longitud de neovasos aumentó hasta el día 7, la lacunaridad, se detuvo al cuarto día, permaneciendo constante hasta el día 7; esto puede ser debido a la disminución de VEGF, ocasionando que se estimularan los requerimientos metabólicos de la proliferación y migración [118], disminuyendo el desarrollo de la complejidad. Además, se descartó presencia de microvasculatura que no se pudiera observar clínicamente, con azul de Evans.

La NVC que ocasionó el VEGF, disminuyó en cuanto se administró AS1411 de manera tópica, similar a lo demostrado por Leaderer y cols. 2015 donde se redujo la neovascularización coroidal, en un modelo de AMD [94]. Sin embargo, aunque el bevacizumab tuvo efecto de inhibición en la NVC; AS1411 demostró ser mejor que bevacizumab ($p < 0.05$). Analizando la NVC por VEGF se confirmó la presencia de endotelio vascular y generó la expresión de NCL en endotelios marcados con IsoB4, encontrándose en la periferia celular, coincide al reportado por Christian y cols. 2003 [75], donde la expresión NCL se encuentra en la periferia de células endoteliales de vasos marcados con CD31.

Además, la presencia de neovasos y distintos tratamientos no cambiaron la estructura de la córnea.

Se encontró que células endoteliales de los neovasos expresaron NCL de superficie dependiente de VEGF. Esto sugiere la relación entre VEGF y la expresión de NCL en superficie. Si bien la mayoría de reportes sobre la expresión de NCL de superficie están realizados en células cancerígenas, donde se ha encontrado como molécula asociada a receptores como CCR6 en carcinoma hepatocelular [71] y a CXCR4 en cáncer papilar de tiroides [70], incrementando la angiogénesis, proliferación o resistencia a apoptosis. También se ha reportado en superficie de células endoteliales de vasos sanguíneos [75], ahí funciona como receptor de factores de crecimiento, como pleiotrofina [119] o el propio VEGF [72], promoviendo la migración y supervivencia de estas células. Además, la presencia de NCL en membrana no solo puede incrementar la angiogénesis o promover la proliferación, se ha encontrado que puede interactuar con moléculas implicadas en disminuir la angiogénesis, como la endostatina, donde se ha propuesto que al unirse con NCL ocasiona su translocación a núcleo evitando su acción reguladora [120], por lo que al disminuir la presencia de endostatina por secuestro de NCL la actividad anti-angiogénica de la endostatina se reduce, es posible que el bloqueo de NCL con AS411 evite la interacción con endostatina manteniendo la regulación de la angiogénesis, como lo observamos en nuestro modelo. Además, la unión de NCL/endostatina puede inhibir la fosforilación de NCL por CK2 [121] proceso importante en la proliferación celular. Lo que nos sugiere que AS1411 no solo bloquea la interacción con moléculas de superficie, si no la propia señalización que implica a NCL.

Se ha establecido la participación de NCL en la angiogénesis, promoviendo la formación de neovasos; también se ha encontrado en otras extirpes celulares, entre ellas las HLSC, asociadas a la formación de nicho vascular y la cicatrización de heridas [122]. Por lo que las HLSC funcionan como modelo de angiogénesis, comprobamos que VEGF estimula la proliferación reportada anteriormente por Garfias y cols. 2012 [112]. La activación es debida en gran parte a la capacidad de VEGF de actuar en distintos tipos celulares [123], en nuestro modelo incremento la proliferación de HLSC como demostramos en el presente trabajo. Al evaluar la expresión de NCL mediante el AS1411-F en células no permeabilizadas, se encontró presencia de NCL en superficie lo que nos indicó que se relocalizó en presencia de VEGF, la expresión de NCL es similar a lo reportado por Huang y cols. 2006 [72], donde la presencia de VEGF en células HMECs promueve la expresión de NCL en superficie y que la translocación depende de factores asociados al citoesqueleto como la actina.

La localización de NCL en superficie fue complementada con células HeLa, donde la presencia de NCL en superficie [113] es constitutiva y en alta concentración. Lo que nos permitió encontrar marca de NCL en la periferia, similar a lo encontrado por Nisole y cols. 1999 donde la expresión en membrana se comprobó por microscopía y citometría [124]; nosotros realizamos una doble tinción con anti-NCL y AS1411-F, comprobando reconocimiento indistinto del anticuerpo y AS1411. Es importante mencionar que en ausencia de VEGF, HLSC no expresaron NCL de superficie. De igual manera nos apoyamos en la microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde encontramos depósitos

electrodensos de oro coloidal, comprobando la presencia de NCL en superficie de HLSC estimuladas con VEGF, los depósitos de NCL en superficie, en HLSC es similar al descrito por Hovanessian y cols [113], en el 2000, donde demuestran la expresión de NCL en superficie de células HeLa mediante microscopia electrónica.

Aunque la presencia de NCL en superficie depende de VEGF, es importante destacar que su relocalización aun no es completamente dilucidado el mecanismo de translocación; se han caracterizado que algunas modificaciones postraduccionales en NCL afectan su localización, y se ha mostrado singular interés a la fosforilación, que se describe como una condición necesaria para su expresión en superficie [125], además se demostró por Huang y cols. 2006 que proteínas asociadas al citoesqueleto como MyH9 y actina, son necesarias para la relocalización de NCL a superficie por acción de VEGF en células endoteliales. También se ha reportado que en HUVECs, que la interacción de Hsc70 con NCL es necesaria para la translocación de NCL a superficie [126], debido a que Hsc70 puede participar en distintos mecanismos asociados, como la endocitosis dependiente de clatrina [127], promover la translocación de receptores [128] o ayudando a estabilizar proteínas [129]. Se ha sugerido que la translocación de NCL depende de factores asociados ala estabilización de proteínas y proteínas del citoesqueleto. Por lo que aún queda por dilucidar el mecanismo y componentes necesarios para la expresión de NCL en superficie. Además, las modificaciones postraduccionales también juegan un papel fundamental, como la fosforilación que es necesaria para la expresión en superficie, es decir al aumentar NCL fosforilada aumenta su expresión en membrana y por ende los efectos pro-angiogénicos [130], de tal forma que un proceso de fosforilación de la propia NCL inducido por VEGF, no se descartaría.

La presencia de NCL de superficie depende de varios mecanismos y modificaciones postraduccionales aun por demostrar, nosotros nos enfocamos en determinar el cambio en otros efectos asociados en la NVC como la migración celular. Se demostró que VEGF en HLSC incrementa la migración; sin embargo, en presencia de AS1411 se reduce casi en su totalidad; comportamiento que fue observado por Cheng y cols. 2016 [131], en donde AS1411 disminuyo la migración e invasión de células de glioma humano U87, pero los astrocitos normales humanos no se vieron afectados, lo que indica la especificidad de AS1411 por NCL de superficie. En nuestro caso al analizar el control de secuencia CRO, la migración continua sin ser afectada al igual que en U87 [131], dejando que el efecto de VEGF promueva la migración. Mientras que bevacizumab aunque disminuyo la migración, lo hizo en menor medida que AS1411, el efecto reducido de bevacizumab radica en el secuestro de VEGF, al parecer la inhibición no es completa ya que existe una parte que permite a las HLSC poder reconocerlo, el efecto inhibitorio de la migración en células limboconiales humanas con bevacizumab está reportado por Berthaut y cols. 2009 [132], donde demuestran que bevacizuman puede inhibir la migración ocasionada por las isoformas de VEGF [132]. Los ensayos nos indican que los efectos de AS1411 como inhibidor de la angiogénesis resulta mejor que el anti-angiogénico utilizado. Lo que sugiere que el efecto angiostático de AS1411 es más eficaz que el del antiangiogénico canónico.

Para complementar se decidió enfocarse en la formación de estructuras tubulares que se desarrollan en la angiogénesis, los ensayos se realizaron en una matriz extracelular artificial.

Donde la formación de túbulos aumentaron en presencia de VEGF descrito anteriormente por Garfias y cols. 2012 [112], las similitudes radican en la formación de estructuras tridimensionales similares a redes; es importante mencionar el efecto de AS1411 se muestran en la disminución de la interacción entre células en la matriz extracelular, al igual que Leaderer y cols. 2015 donde reportaron que células endoteliales HUVECs en presencia de AS1411 disminuía las uniones y formación de túbulos, por acción de AS1411, que se comprobó con CRO el cual no tuvo efecto alguno [94]. Esto nos permite plantear, que posiblemente el bloqueo de NCL mediante AS1411 tenga consecuencias importantes en algunas modificaciones postraduccionales como la fosforilación, donde la inhibición de la fosforilación de NCL, evita su fosforilación y reduciendo su translocación a superficie y como consecuencia la disminución en la migración [133];.

En general los mecanismos implicados en la angiogénesis por VEGF, disminuyeron en presencia de AS1411, debido al reconocimiento de NCL de superficie. Aunque no es completamente claro el mecanismo de acción que ejerce AS1411 al interactuar con NCL. Por ello para comprender como se modifica la presencia de NCL, se analizó el transcrito de NCL y su producto como proteína, al estimular con VEGF y en presencia de AS1411. Encontrando que el mensajero de NCL disminuyó con VEGF, interesantemente, la disminución del transcrito no cambió en presencia de aptámeros, similar fenómeno se observó en las distintas condiciones con VEGF. Este resultado contrasta con los niveles de proteína que no se afectan en ninguna condición. Lo que nos indica que debería existir una relación entre la presencia de la proteína con el transcrito, aunque no es condicionado. Se ha propuesto que la transcripción de proteínas que contribuyen a la estructura de una célula pueden ofrecer un valor predictivo [134]. La diferencia entre los niveles de transcripción y expresión de proteínas puede deberse a las tasas diferenciales de transcripción/traducción y degradación de proteínas [135]. Además, es más adecuado considerar la transcripción y expresión de proteínas como dos fenómenos celulares separados [136]. Algunas proteínas presentan multifuncionalidad en la actividad celular, entre ellas NCL que participa en las distintas funciones celulares, los mecanismos de traducción y de transcripción son dos eventos que se encuentran altamente regulados de manera diferencial [62], al respecto, no es raro encontrar discrepancias en los niveles de mRNA y proteína, indicándonos que la regulación a nivel del transcrito de NCL [137].

Hasta el momento se ha encontrado que VEGF favorece la translocación de NCL a superficie y posteriormente la proliferación, formación de estructuras tubulares y mecanismos presentes en la angiogénesis como observamos en el modelo animal, además que AS1411 reduce los efectos ocasionados por VEGF, comprobando lo que otros autores describen que al bloquear NCL se inhibe la angiogénesis [75] pero la presencia de NCL como proteína no es afectada por el tratamiento de VEGF o AS1411. Lo que sigue que la regulación podría estar enfocada a nivel de transcripción. Los miRNAs son moléculas que regulan las tasas de transcripción; secuencias de RNA no codificantes de entre 21-25 nucleótidos que bloquean u ocasionan degradación del mRNA. Se han descrito al menos 1000 miRNAs [138] de los cuales al menos 200 participan en la angiogénesis. Entre ellos se encuentran miR-21

implicado en la angiogénesis mediante la activación de AKT y ERK, posterior activación de HIF-1 α y generación de VEGF [106]. Mientras que miR221 asociado a la proliferación, migración y señalización de VEGF [139]. Además, se ha descrito que miR21 se encuentra incrementado en un modelo de NVC por quemadura con álcali y que al utilizar un inhibidor de miR21 (antagomir-21), la NVC se ve disminuida [140]. En este sentido se ha reportado que NCL tiene relación en la maduración de distintos miRNAs, como el incremento de miR-21 y 221 [141, 142]. Por otro lado, también se ha descrito que el tratamiento con AS1411 ocasiona una disminución de RNA de vida corta que eran estabilizados por NCL [143]. Como el descrito por Pichiorri y cols, donde identifican que el decremento en la maduración de miR21 y 221 por la disminución en los pre-miRNAs después del tratamiento de AS1411, ocasionando una disminución en los procesos en que participa NCL [104]. En nuestro estudio el incremento de miR21 y 221 en HLSC fue debido al tratamiento con VEGF similar a lo reportado anteriormente [106, 139, 140]. Mientras que fue inhibido en presencia de AS1411 en HLSC estimuladas con VEGF. Lo que nos indica que el bloqueo de NCL disminuye en gran medida de los mecanismos de regulación de la maduración de RNA donde participa. Se ha propuesto como factor importante en la biogénesis de miRNA [144], esto debido a las propiedades estructurales internas [145] que le dan la habilidad de interactuar con distintas estructuras a base de nucleótidos. Como consecuencia de la interacción selectiva por parte de AS1411 y NCL de superficie y el bloqueo de sus funciones nos permite proponer el uso de aptámeros como herramientas de tratamiento en la NVC al generar un mecanismo nuevo en la actividad de AS1411 en la biogénesis de miRNAs. Estos aptámeros, moléculas que tiene ventajas sobre algunos otros tratamientos, el bajo peso molecular, lo que le confiere baja inmunogenicidad, los bajos costos de producción, estabilidad a cambios de temperatura y la alta especificidad, hacen una excelente molécula con aplicaciones terapéuticas [146, 147].

Conclusión

La translocación de NCL a superficie es generada por VEGF, incrementado la CNV y en HLSC el aumento de los mecanismos de la angiogénesis y en presencia de AS1411 reduce los efectos de VEGF y la disminución se debe a la baja cantidad de transcritos de angiomiRs 21 y 221, implicados en la angiogenesis y regulados por NCL.

La relocalización de NCL depende distintos factores y mecanismos aun no descritos completamente, algunos como la fosforilación y la glicosilación regulan multiples procesos celulares. Por ello se pretende caracterizar las modificaciones postraduccionales de NCL y su participación en la angiogenesis.

Perspectivas

Se identificará las modificaciones postraduccionales de la nucleolina para su translocación a superficie y su participación en la angiogénesis en un modelo *in vitro*

Referencias bibliograficas

1. Chang, J.H., et al., *Corneal neovascularization*. Curr Opin Ophthalmol, 2001. **12**(4): p. 242-9.
2. Isner, J.M. and T. Asahara, *Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1231-6.
3. Beck Jr., L. and P.A. D'Amore, *Vascular development: cellular and molecular regulation*. The FASEB Journal, 1997. **11**(5): p. 365-373.
4. Mauriz, J.L., et al., *Tratamiento antiangiogénico del cáncer*. Cirugía Española, 2005. **78**(1): p. 3-11.
5. Blackburn, B.J., et al., *A Review of Structural and Biomechanical Changes in the Cornea in Aging, Disease, and Photochemical Crosslinking*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019. **7**(66).
6. Han, K.Y., et al., *MT1-MMP modulates bFGF-induced VEGF-A expression in corneal fibroblasts*. Protein Pept Lett, 2012. **19**(12): p. 1334-9.
7. Maddala, S., et al., *Horizons in therapy for corneal angiogenesis*. Ophthalmology, 2011. **118**(3): p. 591-9.
8. Zhong, W., et al., *Angiogenesis and lymphangiogenesis in corneal transplantation—A review*. Survey of Ophthalmology, 2018. **63**(4): p. 453-479.
9. Lee, P., C.C. Wang, and A.P. Adamis, *Ocular neovascularization: an epidemiologic review*. Surv Ophthalmol, 1998. **43**(3): p. 245-69.
10. Rzehinejad, M.R., J.S. Myers, and L.J. Katz, *Iatrogenic glaucoma secondary to medications*. Am J Med, 2011. **124**(1): p. 20-5.
11. Rhen, T. and J.A. Cidlowski, *Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1711-23.
12. Baer, J.C. and C.S. Foster, *Corneal laser photocoagulation for treatment of neovascularization. Efficacy of 577 nm yellow dye laser*. Ophthalmology, 1992. **99**(2): p. 173-9.
13. Faraj, L.A., et al., *Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels*. Br J Ophthalmol, 2014. **98**(9): p. 1287-90.
14. Junghans, B.M. and H.B. Collin, *The limbal vascular response to corneal injury. An autoradiographic study*. Cornea, 1989. **8**(2): p. 141-9.
15. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 10931-4.
16. Friesel, R.E. and T. Maciag, *Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction*. The FASEB Journal, 1995. **9**(10): p. 919-925.
17. Yang, E.Y. and H.L. Moses, *Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane*. The Journal of Cell Biology, 1990. **111**(2): p. 731-741.
18. Suri, C., et al., *Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1171-1180.
19. Yancopoulos, G.D.D., Samuel Gale, Nicholas W. Rudge, John S. Wiegand, Stanley J. Holash, Jocelyn, *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**: p. 242.
20. Senger, D., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): p. 983-985.
21. Ferrara, N., *Binding to the Extracellular Matrix and Proteolytic Processing: Two Key Mechanisms Regulating Vascular Endothelial Growth Factor Action*. Molecular Biology of the Cell, 2010. **21**(5): p. 687-690.
22. NEUFELD, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. The FASEB Journal, 1999. **13**(1): p. 9-22.

23. Crawford, Y. and N. Ferrara, *VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies*. Cell and Tissue Research, 2009. **335**(1): p. 261-269.
24. Keating, G.M. and A. Santoro, *Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma*. Drugs, 2009. **69**(2): p. 223-40.
25. Choueiri, T.K., et al., *Risk of Arterial Thromboembolic Events With Sunitinib and Sorafenib: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(13): p. 2280-2285.
26. Que, Y., et al., *Treatment-related adverse effects with pazopanib, sorafenib and sunitinib in patients with advanced soft tissue sarcoma: a pooled analysis*. Cancer management and research, 2018. **10**: p. 2141-2150.
27. Randrup Hansen, C., et al., *Effects and Side Effects of Using Sorafenib and Sunitinib in the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(2): p. 461.
28. Keisner, S.V. and S.R. Shah, *Pazopanib*. Drugs, 2011. **71**(4): p. 443-454.
29. Gunnarsson, O., et al., *Evaluating the safety and efficacy of axitinib in the treatment of advanced renal cell carcinoma*. Cancer management and research, 2015. **7**: p. 65-73.
30. Rini, B.I., et al., *Diastolic Blood Pressure as a Biomarker of Axitinib Efficacy in Solid Tumors*. Clinical Cancer Research, 2011. **17**(11): p. 3841-3849.
31. Krishnamoorthy, S.K., et al., *Management of regorafenib-related toxicities: a review*. Therapeutic Advances in Gastroenterology, 2015. **8**(5): p. 285-297.
32. De Wit, M., et al., *Prevention and management of adverse events related to regorafenib*. Supportive Care in Cancer, 2014. **22**(3): p. 837-846.
33. Kato, M., et al., *Gastrointestinal adverse effects of nintedanib and the associated risk factors in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 12062.
34. Galli, J.A., et al., *Pirfenidone and nintedanib for pulmonary fibrosis in clinical practice: Tolerability and adverse drug reactions*. Respiriology, 2017. **22**(6): p. 1171-1178.
35. Cabanillas, M.E. and S. Takahashi, *Managing the adverse events associated with lenvatinib therapy in radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer*. Seminars in Oncology, 2019. **46**(1): p. 57-64.
36. Shimose, S., et al., *Clinical Significance of Adverse Events for Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma Treated with Lenvatinib: A Multicenter Retrospective Study*. Cancers, 2020. **12**(7): p. 1867.
37. Ebos, J.M.L. and R.S. Kerbel, *Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis*. Nature reviews. Clinical oncology, 2011. **8**(4): p. 210-221.
38. Paulus, Y.M. and A. Sodhi, *Anti-angiogenic Therapy for Retinal Disease*. Handbook of experimental pharmacology, 2017. **242**: p. 271-307.
39. Michels, S., et al., *Systemic Bevacizumab (Avastin) Therapy for Neovascular Age-Related Macular Degeneration*. Ophthalmology, 2005. **112**(6): p. 1035-1047.e9.
40. Avery, R.L., et al., *Intravitreal Bevacizumab (Avastin) for Neovascular Age-Related Macular Degeneration*. Ophthalmology, 2006. **113**(3): p. 363-372.e5.
41. Ferrara, N., et al., *Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration.D*. Retina, 2006. **26**(8): p. 859-870.
42. Grunwald, J.E., et al., *Risk of Geographic Atrophy in the Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials*. Ophthalmology, 2014. **121**(1): p. 150-161.
43. Aydin, E., et al., *Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by various doses of doxycycline and combination of triamcinolone acetonide with low-molecular-weight heparin and doxycycline*. Cornea, 2008. **27**(4): p. 446-53.

44. Bakri, S.J., et al., *Persistent ocular hypertension following intravitreal ranibizumab*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2008. **246**(7): p. 955-958.
45. Pershing S, B.S., Moshfeghi D *Ocular Hypertension and Intraocular Pressure Asymmetry After Intravitreal Injection of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Agents*. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retin, 2013. **44**: p. 460-464.
46. Dedania, V.S. and S.J. Bakri, *Sustained elevation of intraocular pressure after intravitreal anti-vegf agents: What is the evidence*. Retina, 2015. **35**(5): p. 841-858.
47. Feizi, S., A.A. Azari, and S. Safapour *Therapeutic approaches for corneal neovascularization*. Eye and vision (London, England), 2017. **4**, 28 DOI: 10.1186/s40662-017-0094-6.
48. Jain, R.K., et al., *Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy*. Nature reviews. Clinical oncology, 2009. **6**(6): p. 327-338.
49. Quiroz-Mercado, J., et al., *Tissue and cellular characterisation of nucleolin in a murine model of corneal angiogenesis*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2016. **254**(9): p. 1753-1763.
50. Orrick, L.R., M.O. Olson, and H. Busch, *Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(5): p. 1316-20.
51. Tong, C.G., et al., *Light Regulation of the Abundance of mRNA Encoding a Nucleolin-Like Protein Localized in the Nucleoli of Pea Nuclei*. Plant Physiology, 1997. **114**(2): p. 643-652.
52. de Cárcer, G., A. Cerdido, and F.J. Medina, *NopA64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin*. Planta, 1997. **201**(4): p. 487-495.
53. Srivastava, M., et al., *Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA*. FEBS Letters, 1989. **250**(1): p. 99-105.
54. Srivastava, M., et al., *Genomic organization and chromosomal localization of the human nucleolin gene*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(25): p. 14922-14931.
55. Rebane, A. and A. Metspalu, *U82, a novel snoRNA identified from the fifth intron of human and mouse nucleolin gene* *The human and mouse U82 have been deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ databases under the accession numbers AJ011568 and AJ011569, respectively*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 1999. **1446**(3): p. 426-430.
56. Nicoloso, M., et al., *U20, a novel small nucleolar RNA, is encoded in an intron of the nucleolin gene in mammals*. Molecular and Cellular Biology, 1994. **14**(9): p. 5766-5776.
57. Bourbon, H.M., B. Lapeyre, and F. Amalric, *Structure of the mouse nucleolin gene. The complete sequence reveals that each RNA binding domain is encoded by two independent exons*. J Mol Biol, 1988. **200**(4): p. 627-38.
58. Bose, S., et al., *Regulation of nucleolin expression by miR-194, miR-206, and HuR*. Mol Cell Biochem, 2016. **417**(1-2): p. 141-53.
59. Alvarado Hernández, B., Vivanco Rojas, Óscar, Quiroz Mercado, Joaquín³ Garfias Becerra, Yonathan Oma, *La nucleolina como potencial blanco terapéutico en la neovascularización aberrante* Mensaje Bioquímico 2017. **41**: p. 37-48.
60. Rickards, B., et al., *Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 937-48.
61. Ginisty H, A.F., Bouvet P, *Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing*. The EMBO Journal, 1998. **17**(5): p. 1476-1486.
62. Bicknell, K., et al., *Nucleolin is regulated both at the level of transcription and translation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(3): p. 817-22.
63. Abdelmohsen, K., et al., *Enhanced translation by Nucleolin via G-rich elements in coding and non-coding regions of target mRNAs*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(19): p. 8513-30.

64. Chen, X., et al., *Cell surface nucleolin serves as receptor for DNA nanoparticles composed of pegylated polylysine and DNA*. Mol Ther, 2008. **16**(2): p. 333-42.
65. Hovanessian, A.G., et al., *The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton*. Exp Cell Res, 2000. **261**(2): p. 312-28.
66. Destouches, D., et al., *Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2518.
67. Fogal, V., et al., *Cell surface nucleolin antagonist causes endothelial cell apoptosis and normalization of tumor vasculature*. Angiogenesis, 2009. **12**(1): p. 91-100.
68. Krust, B., et al., *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, 2011. **11**: p. 333.
69. Wise, J.F., et al., *Nucleolin inhibits Fas ligand binding and suppresses Fas-mediated apoptosis in vivo via a surface nucleolin-Fas complex*. Blood, 2013. **121**(23): p. 4729-39.
70. Niu, H., et al., *Cell surface nucleolin interacts with CXCR4 receptor via the 212 c-terminal portion*. Tumor Biology, 2015. **36**(2): p. 1099-1104.
71. Qiu, W., et al., *The involvement of cell surface nucleolin in the initiation of CCR6 signaling in human hepatocellular carcinoma*. Medical Oncology, 2015. **32**(3): p. 75.
72. Huang, Y., et al., *The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin*. Blood, 2006. **107**.
73. Lapeyre, B., H. Bourbon, and F. Amalric, *Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(6): p. 1472-6.
74. Losfeld, M.-E., et al., *The cell surface expressed nucleolin is a glycoprotein that triggers calcium entry into mammalian cells*. Experimental Cell Research, 2009. **315**(2): p. 357-369.
75. Christian, S., et al., *Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels*. J Cell Biol, 2003. **163**(4): p. 871-8.
76. Kleinman, H.K., et al., *Identification of a 110-kDa nonintegrin cell surface laminin-binding protein which recognizes an A chain neurite-promoting peptide*. Arch Biochem Biophys, 1991. **290**(2): p. 320-5.
77. Tate, A., et al., *Met-Independent Hepatocyte Growth Factor-mediated regulation of cell adhesion in human prostate cancer cells*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 197.
78. Reyes-Reyes, E.M. and S.K. Akiyama, *Cell-surface nucleolin is a signal transducing P-selectin binding protein for human colon carcinoma cells*. Experimental Cell Research, 2008. **314**(11-12): p. 2212-2223.
79. Koutsoumpa, M., et al., *Interplay between $\alpha v\beta 3$ integrin and nucleolin regulates human endothelial and glioma cell migration*. J Biol Chem, 2013. **288**.
80. Koutsoumpa, M. and E. Papadimitriou, *Cell surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2014. **9**.
81. Khan, H.a.M., *Sotiris Aptamers in oncology: a diagnostic perspective*. Gene Therapy and Molecular Biology,, 2008. **12**: p. 111-128.
82. Mayer, G., *The chemical biology of aptamers*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(15): p. 2672-89.
83. Geiger, A., et al., *RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(6): p. 1029-36.
84. Jenison, R.D., et al., *High-resolution molecular discrimination by RNA*. Science, 1994. **263**(5152): p. 1425-9.
85. Chen, L., et al., *The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(32): p. 10002-10007.

86. Makwana, V., S. Simmons, and S. Missailidis, *Aptamers as Anticancer Agents*, in *Anticancer Therapeutics*. 2008. p. 331-345.
87. Siddiqui, M.A. and G.M. Keating, *Pegaptanib: in exudative age-related macular degeneration*. *Drugs*, 2005. **65**(11): p. 1571-7; discussion 1578-9.
88. Bates, P.J., et al., *Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer*. *Exp Mol Pathol*, 2009. **86**(3): p. 151-64.
89. Mongelard, F. and P. Bouvet, *AS-1411, a guanosine-rich oligonucleotide aptamer targeting nucleolin for the potential treatment of cancer, including acute myeloid leukemia*. *Curr Opin Mol Ther*, 2010. **12**(1): p. 107-14.
90. Research, A. *An Open Label Randomized Controlled Dose Escalating Phase II Study of AS1411 Combined With Cytarabine in the Treatment of Patients With Primary Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia*. 2009; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00512083?term=NCT00512083&rank=1>.
91. Hwang, D.W., et al., *A nucleolin-targeted multimodal nanoparticle imaging probe for tracking cancer cells using an aptamer*. *J Nucl Med*, 2010. **51**(1): p. 98-105.
92. Guo, J., et al., *Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery*. *Biomaterials*, 2011. **32**(31): p. 8010-20.
93. Trinh, T.L., et al., *A Synthetic Aptamer-Drug Adduct for Targeted Liver Cancer Therapy*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0136673.
94. Leaderer, D., S.M. Cashman, and R. Kumar-Singh, *Topical Application of a G-Quartet Aptamer Targeting Nucleolin Attenuates Choroidal Neovascularization in a Model of Age-Related Macular Degeneration*. *Experimental eye research*, 2015. **140**: p. 171-178.
95. Nakanishi, C. and M. Toi, *Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(4): p. 297-309.
96. Girvan, A.C., et al., *AGRO100 inhibits activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by forming a complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin*. *Molecular cancer therapeutics*, 2006. **5**(7): p. 1790-1799.
97. Pal, S., et al., *Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(21): p. 9630-45.
98. Teng, Y., et al., *AS1411 alters the localization of a complex containing protein arginine methyltransferase 5 and nucleolin*. *Cancer Res*, 2007. **67**(21): p. 10491-500.
99. Soundararajan, S., et al., *The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2008. **68**(7): p. 2358-65.
100. International Human Genome Sequencing, C., *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. *Nature*, 2004. **431**(7011): p. 931-945.
101. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
102. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. *Nature Reviews Genetics*, 2004. **5**(7): p. 522-531.
103. Mukwaya, A., et al., *MicroRNAs in the cornea: Role and implications for treatment of corneal neovascularization*. *Ocul Surf*, 2019. **17**(3): p. 400-411.
104. Pichiorri, F., et al., *In vivo NCL targeting affects breast cancer aggressiveness through miRNA regulation*. *Journal of Experimental Medicine*, 2013. **210**(5): p. 951-968.
105. Xu, C.H., et al., *Silencing microRNA-221/222 cluster suppresses glioblastoma angiogenesis by suppressor of cytokine signaling-3-dependent JAK/STAT pathway*. *J Cell Physiol*, 2019. **234**(12): p. 22272-22284.
106. Liu, L.-Z., et al., *MiR-21 Induced Angiogenesis through AKT and ERK Activation and HIF-1 α Expression*. *PLOS ONE*, 2011. **6**(4): p. e19139.

107. Tang, Z., et al., *A Mouse Model of the Cornea Pocket Assay for Angiogenesis Study*. 2011(54): p. e3077.
108. Zudaire, E., et al., *A Computational Tool for Quantitative Analysis of Vascular Networks*. PLOS ONE, 2011. **6**(11): p. e27385.
109. Laitinen, L., *Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues*. The Histochemical Journal, 1987. **19**(4): p. 225-234.
110. Peters, B.P. and I.J. Goldstein, *The use of fluorescein-conjugated Bandeiraea simplicifolia B4-isolectin as a histochemical reagent for the detection of α -D-galactopyranosyl groups: Their occurrence in basement membranes*. Experimental Cell Research, 1979. **120**(2): p. 321-334.
111. Domínguez-López, A., et al., *Amniotic membrane modulates innate immune response inhibiting PRRs expression and NF- κ B nuclear translocation on limbal myofibroblasts*. Experimental Eye Research, 2014. **127**: p. 215-223.
112. Garfias, Y., et al., *Stem cells isolated from the human stromal limbus possess immunosuppressant properties*. Molecular vision, 2012. **18**: p. 2087-2095.
113. Hovanesian, A.G., et al., *The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton*. Exp Cell Res, 2000. **261**.
114. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 329-33.
115. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 676-682.
116. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979. **76**(9): p. 4350-4354.
117. Matsuda, R., A. Nishikawa, and H. Tanaka, *Visualization of Dystrophic Muscle Fibers in Mdx Mouse by Vital Staining with Evans Blue: Evidence of Apoptosis in Dystrophin-Deficient Muscle1*. The Journal of Biochemistry, 1995. **118**(5): p. 959-963.
118. Michael, P. and C. Peter, *The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism*. 2017. **79**(1): p. 43-66.
119. Koutsoumpa, M., et al., *Pleiotrophin expression and role in physiological angiogenesis in vivo: potential involvement of nucleolin*. Vasc Cell, 2012. **4**: p. 4.
120. Song, N., et al., *The nuclear translocation of endostatin is mediated by its receptor nucleolin in endothelial cells*. Angiogenesis, 2012. **15**(4): p. 697-711.
121. Shi, H., et al., *Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin*. Blood, 2007. **110**(8): p. 2899-2906.
122. Li, G.-G., et al., *Angiogenesis potential of human limbal stromal niche cells*. Investigative ophthalmology & visual science, 2012. **53**(7): p. 3357-3367.
123. Notara, M.L., A.; Clahsen, T.; Behboudifard, S.; Braun, G.; Cursiefen, C. o. 5, *Bevacizumab Induces Upregulation of Keratin 3 and VEGFA in Human Limbal Epithelial Cells in Vitro*. Journal of clinical Medicine. , 2019. **8**(192).
124. Nisole, S., et al., *The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface-expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27875-84.
125. Wu, D.M., et al., *Phosphorylation and changes in the distribution of nucleolin promote tumor metastasis via the PI3K/Akt pathway in colorectal carcinoma*. FEBS Lett, 2014. **588**.
126. Ding, Y., et al., *Heat Shock Cognate 70 Regulates the Translocation and Angiogenic Function of Nucleolin*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2012. **32**(9): p. e126-e134.
127. Eisenberg, E. and L.E. Greene, *Multiple roles of auxilin and hsc70 in clathrin-mediated endocytosis*. Traffic, 2007. **8**(6): p. 640-6.

128. Meimaridou, E., et al., *The Cytosolic Chaperone Hsc70 Promotes Traffic to the Cell Surface of Intracellular Retained Melanocortin-4 Receptor Mutants*. *Molecular Endocrinology*, 2011. **25**(9): p. 1650-1660.
129. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein*. *Science*, 2002. **295**(5561): p. 1852.
130. Xiao, S., et al., *Induced Expression of Nucleolin Phosphorylation-Deficient Mutant Confers Dominant-Negative Effect on Cell Proliferation*. *PLOS ONE*, 2014. **9**(10): p. e109858.
131. Cheng, Y., et al., *AS1411-Induced Growth Inhibition of Glioma Cells by Up-Regulation of p53 and Down-Regulation of Bcl-2 and Akt1 via Nucleolin*. *PLOS ONE*, 2016. **11**(12): p. e0167094.
132. Berthaut, A., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) expression in human corneal fibroblast decreased with age*. *Mol Vis*, 2009. **15**: p. 1997-2007.
133. Huang, F., et al., *Phosphorylation of nucleolin is indispensable to its involvement in the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells*. *Oncol Rep*, 2019. **41**(1): p. 590-598.
134. Guo, Y., et al., *How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2008. **40**(5): p. 426-436.
135. Wu, L., et al., *Variation and genetic control of protein abundance in humans*. *Nature*, 2013. **499**(7456): p. 79-82.
136. Bauernfeind, A.L. and C.C. Babbitt, *The predictive nature of transcript expression levels on protein expression in adult human brain*. *BMC Genomics*, 2017. **18**(1): p. 322.
137. Tominaga, K., et al., *Competitive Regulation of Nucleolin Expression by HuR and miR-494*. *Molecular and Cellular Biology*, 2011. **31**(20): p. 4219-4231.
138. Bartel, D.P., *MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions*. *Cell*, 2009. **136**(2): p. 215-233.
139. Nicoli, S., et al., *miR-221 Is Required for Endothelial Tip Cell Behaviors during Vascular Development*. *Developmental Cell*, 2012. **22**(2): p. 418-429.
140. Zhang, Y., et al., *Subconjunctival injection of antagomir-21 alleviates corneal neovascularization in a mouse model of alkali-burned cornea*. 2016. **8**(7).
141. Lyu, Q.-L., et al., *MicroRNA Profiling of Transgenic Mice with Myocardial Overexpression of Nucleolin*. *Chinese medical journal*, 2018. **131**(3): p. 339-346.
142. Deng, R., et al., *Targeting epigenetic pathway with gold nanoparticles for acute myeloid leukemia therapy*. *Biomaterials*, 2018. **167**: p. 80-90.
143. Ishimaru, D., et al., *Mechanism of regulation of bcl-2 mRNA by nucleolin and A+U-rich element-binding factor 1 (AUF1)*. *The Journal of biological chemistry*, 2010. **285**(35): p. 27182-27191.
144. Pickering, B.F., D. Yu, and M.W. Van Dyke, *Nucleolin protein interacts with microprocessor complex to affect biogenesis of microRNAs 15a and 16*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(51): p. 44095-44103.
145. Allain, F.H., et al., *Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin*. *Embo j*, 2000. **19**(24): p. 6870-81.
146. Bates, P.J., et al., *G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017. **1861**(5 Pt B): p. 1414-1428.
147. Nimjee, S.M., et al., *Aptamers as Therapeutics*. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2017. **57**: p. 61-79.

Anexo



Corneal neovascularization is inhibited with nucleolin-binding aptamer, AS1411

Oscar Vivanco-Rojas^{a,b}, Mariana Y. García-Bermúdez^{a,b}, Emilio Iturriaga-Goyon^{a,b}, Wolfgang Rebollo^{a,b}, Beatriz Buentello-Volante^b, Fátima S. Magaña-Guerrero^b, Paula Bates^c, Armando Pérez-Torres^d, Yonathan Garfias^{a,b,*}

^a Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, 04510, Mexico City, Mexico

^b Cell and Tissue Biology, Research Unit, Institute of Ophthalmology, Conde de Valenciana, Chimalpopoca 14, 06800, Mexico City, Mexico

^c Department of Medicine and James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville, Louisville, KY 40202, USA

^d Department of Cell and Tissue Biology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, 04510, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

AS1411
Corneal neovascularization
miRNA

ABSTRACT

Corneal neovascularization (CNV) is a common sight-threatening pathology that can be induced by a variety of inflammatory and angiogenic stimuli. Current CNV treatments include anti-inflammatory drugs and antibody-based inhibitors of vascular endothelial growth factor (VEGF). However, these are not always effective and novel therapeutic approaches are needed. Previous work has indicated a role for nucleolin (NCL) in VEGF-mediated neoangiogenesis in a suture-induced CNV model. The major goal for this current study is to test the effect of AS1411, a NCL-binding DNA aptamer that has reached human clinical trials, on neovascularization in a murine model of VEGF-mediated CNV. Our results show that topical administration of AS1411 can significantly inhibit corneal neovascularization in this model. Mechanistic studies indicate that AS1411 reduces the VEGF-stimulated proliferation, migration, and tube formation of primary cells obtained from human limbus stroma (HLSC). AS1411 treatment also significantly reduced VEGF-stimulated induction of miR-21 and miR-221 in HLSC, suggesting a role for these pro-angiogenic miRNAs in mediating the effects of AS1411 in this system. In sum, this new research further supports a role for NCL in the molecular etiology of CNV and identifies AS1411 as a potential anti-angiogenic CNV treatment that works by a novel mechanism of action.

1. Introduction

The cornea is an avascular and transparent tissue. This angiogenic privilege is in part due to the absence of blood vessels, which is the result of a very complex and regulated system of pro-angiogenic and anti-angiogenic molecules. However, local factors and systemic diseases can affect corneal transparency and may induce corneal neovascularization (CNV), which leads to tissue scarring, edema, lipid deposition, and reduction of visual acuity, and, in many cases, causes blindness (Zhong et al., 2018). Currently, there are different approaches to treat CNV. Inflammation is a decisive event to induce CNV and therefore immunomodulation with topical steroids is widely used; however, long-term treatment with steroids can produce glaucoma, ocular superinfections and cataract formation. Moreover, while steroids are often efficacious in the context of incipient neovessels, they have limited anti-angiogenic effects in pre-existing corneal vessels (Razeghinejad et al.,

2011; Rhen and Cidlowski, 2005). Another approach to CNV treatment is laser photocoagulation; this can obliterate corneal efferent vessels, but it is less effective at obliterating afferent vessels, which are thinner and deeper and have faster blood flow than efferent vessels. Hence, in the case of extensive CNV, laser photocoagulation is ineffective (Baer and Foster, 1992). Another alternative to treat CNV (and less expensive than laser photocoagulation) is fine needle diathermy; this procedure has demonstrated mostly transient and reversible complications (Faraj et al., 2014), but a potential limitation is that it could have long term consequences due to release of proangiogenic factors that could stimulate corneal neovessels (Junghans and Collin, 1989). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family of proteins, especially VEGF-A, are major mediators of angiogenesis and have been implicated in CNV pathology (Neufeld et al., 1999). Therefore, therapy that employs biological agents targeting the VEGF pathway is currently used to treat CNV; however, this therapy is only partially effective and may lead to

* Corresponding author. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, 04510, Mexico City, Mexico.

E-mail addresses: ygarfias@bq.unam.mx, ygarfias@institutodeoftalmologia.org (Y. Garfias).

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.107977>

Received 17 August 2019; Received in revised form 21 January 2020; Accepted 14 February 2020

Available online 17 February 2020

0014-4835/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

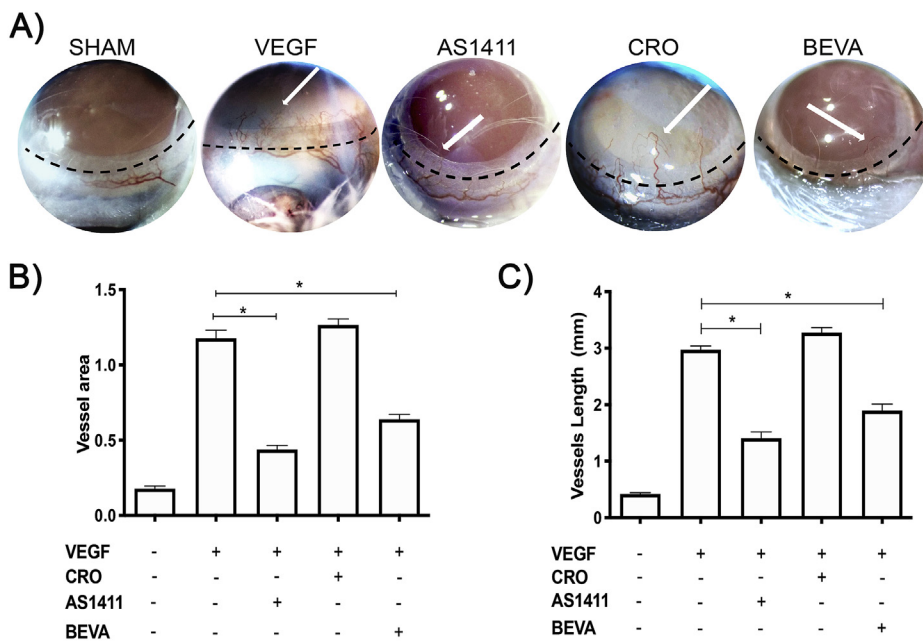


Fig. 1. AS1411 inhibited *in vivo* CNV. *In vivo* photographs of CNV with different treatments. The sham group did not present any apparent neovascularization signs, although there was engorgement of the pre-existing limbal plexus (SHAM). The *rh*VEGF-treated group presented obvious signs of CNV, such as the presence of vessels in the peripheral cornea (VEGF); while, the *rh*VEGF-treated group that was exposed to AS1411 drops (AS1411) displayed significant CNV inhibition; in contrast the *rh*VEGF-treated group that was exposed to CRO drops (CRO) developed noticeable CNV; and, finally the *rh*VEGF-treated group that was exposed to topical bevacizumab (BEVA) showed CNV inhibition, though with small and short vessels still present in the cornea. White arrows show the presence of corneal neovessels. The top panel shows representative photographs from four independent assays; dotted lines denote the sclerocorneal limbus. The bottom panels are graphical representations demonstrating that both AS1411 and bevacizumab topical treatments were able to significantly diminish the percentage and length of corneal neovessels, measured with the AngioTool software as previously described (Zudaire et al., 2011). The bars represent the mean ± SE of four independent assays. Asterisks denote $p < 0.05$.

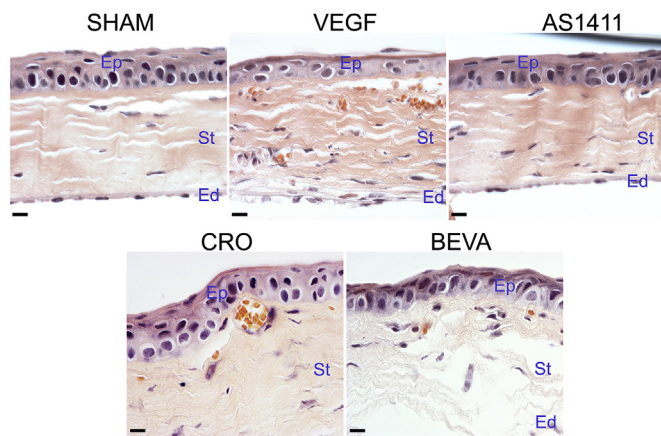


Fig. 2. AS1411 inhibited corneal neovessels formation in *rh*VEGF-stimulated corneas.

SHAM group did not present any observable stromal vessels; however, *rh*VEGF was able to induce neovessels in the stromal cornea (VEGF) in comparison with the SHAM group. AS1411 aptamer topical administration completely inhibited the formation of corneal neovessels (AS1411), and recovered histological structures in *rh*VEGF-exposed corneas. The inactive oligonucleotide CRO treatment failed to reduce corneal neovessels (CRO) in *rh*VEGF-exposed corneas; while bevacizumab topical administration reduced the presence of corneal neovessels, and presented only small subepithelial vessels (BEVA) in *rh*VEGF-exposed corneas. Representative micrographs of four independent assays. Ep, St, and Ed stand for epithelium, stroma, and endothelium, respectively. Bars, 20 μm.

anti-migratory and tube formation inhibition of the aptamer. Bevacizumab and CRO were used as positive and negative controls, respectively. **Proliferation evaluation:** The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed. Briefly, at the end of the cell culture, the cells were treated with 20 μL of MTT solution (5 mg/ml). Then, after further incubation for 4 h, the medium was removed and replaced with 150 μL of DMSO; when the water-insoluble formazan crystals were fully dissolved, optical density (OD) values were measured with an automatic spectrophotometer (Multiskan Ascent, LabX, ON, Canada) at a wavelength of 590 nm. These assays

were performed in triplicate. **Cell migration evaluation:** Scratch wound healing assays were performed as previously described with modifications (Liang et al., 2007). Briefly, HLSC (2×10^4) were seeded in 24-well cell culture plates. Shaped wounds were performed with a sterile p200 pipet tip across each well, creating a cell free area; to remove loose cells, each well was gently rinsed with FBS-free medium. The cell culture conditions were previously described. The cells were fixed with 100% ice-cold methanol and stained with 0.4% crystal violet. Five images of scraped area were captured using a phase contrast microscopy. The remaining wounded area and the scratch width at five different points per image were measured. Three independent experiments were performed, using four wells for each condition. **Tube formation:** HLSC (1×10^4) were seeded on 96 well microplates previously coated with low reduced growth factors Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) and incubated with different stimuli as previously described. Cell cultures were observed in an inverted microscope, and cell-cell contacts, as well as tubular reticulum formation were counted, defined as # of Nodes. The assays were performed in triplicate.

2.5. Nucleolin immunoblotting

We isolated total proteins from HLSC as described previously with modifications (Reyes-Reyes et al., 2010). Briefly, HLSC in the aforementioned conditions were harvested and washed with ice-cold PBS. Total proteins were obtained using RIPA buffer and quantified by the BCA method using a protein quantification assay kit (BioRad, Hercules, CA). Similar quantity of total proteins of each condition was used. Samples were resolved by 10% SDS-Tris polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred onto nitrocellulose membrane, 0.45 μm (BioRad, Hercules, CA) in Tris-glycine buffer containing 20% methanol. Proteins were detected by immunoblotting. Membranes were reprobated as described in the corresponding figure legend.

2.6. Histological studies

Mice were ethically euthanised and eye specimens were carefully obtained under a stereoscopic microscope (Leica, Heerburgg, Switzerland). The tissues were fixed with 10% formalin overnight and processed for paraffin embedding. Sections were cut 5 μm from the

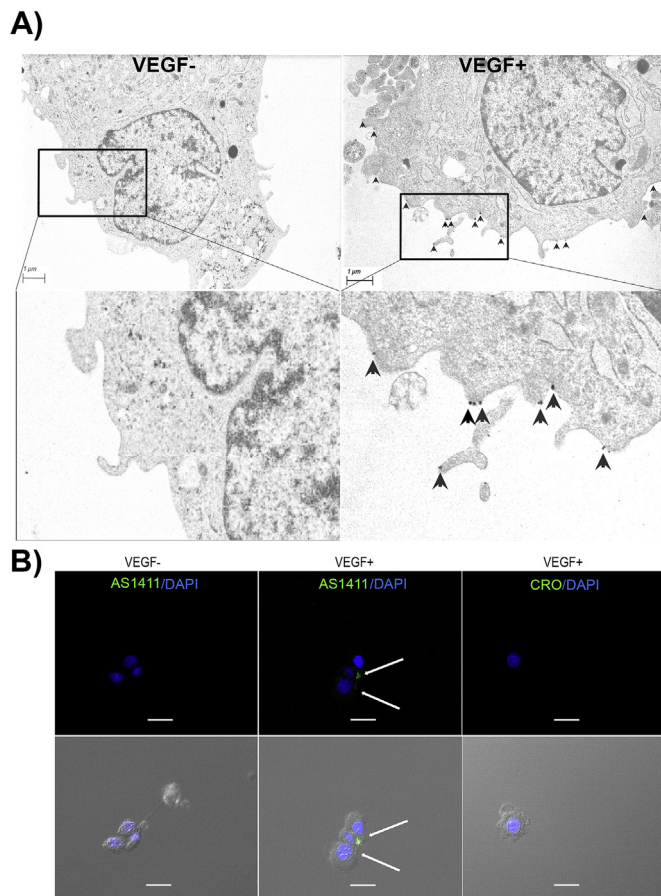


Fig. 3. Nucleolin is expressed on cell surface of *rh*VEGF-stimulated HLSC. HLSC were stimulated or not with *rh*VEGF for 12 h. A) Ultrastructural immunolabelling of nucleolin expressed on cell surface of HLSC. HLSC were processed for a pre-embedding immunogold labelling after incubation with 2% FBS (left panels) or *rh*VEGF (right panels). Note that gold particles were found on the cell membrane, and concentrated at the surface of microvilli of *rh*VEGF-stimulated HLSC. In contrast, the label was negligible in non-stimulated HLSC. Lower panels are zoom of the inserted rectangles of the images from the upper panels. Six cells by grid of each experimental condition were analysed to identify the gold tag. Ultrathin sections were observed with a scanning transmission electron microscope (Crossbeam STEM, Zeiss). Bars, 1 μ m. B) The non-stimulated HLSC were stained with FITC-AS1411 (upper and lower left panels); meanwhile, the *rh*VEGF-stimulated HLSC, were also stained with FITC-AS1411 (upper and lower middle panels), and stained with FITC-CRO (upper and lower right panels). Nuclei were stained with DAPI (blue). Bars, 20 μ m.

central cornea to the periphery and mounted on positively charged slides (Bio SB, Goleta, CA). All slides were deparaffinised and rehydrated with a gradient of xylene/ethanol concentrations. Hematoxylin and eosin staining was performed on each corneal tissue specimen. The samples were observed in an ApoTome II microscope. (Carl Zeiss, Jena Germany).

2.7. Cell culture and immunocytochemistry

To corroborate that AS1411 was capable of binding to the cell membrane of *rh*VEGF-stimulated HLSC, the cells were cultured in complete 10% FBS supplemented DMEM/F12 medium until they reached 90% of confluence; after cell adhesion on poly-L-lysine charged coverslips; the cells were FBS starved for 12 h. After the synchronising period, the cells were blocked with 5% of BSA for 15 min at 4 $^{\circ}$ C, and immediately, the cells were incubated with F-AS1411 or F-CRO during 8 min at 4 $^{\circ}$ C. The cells were then fixed with 2% of *p*-formaldehyde for 5 min at room temperature. The cells were washed; finally, the cells

were mounted with VectaShield-DAPI and observed with an ApoTome II microscope. HeLa cells were used as positive controls (Lee et al., 2010).

2.8. Transmission electron microscopy (TEM)

After *rh*VEGF-stimulation or not, the HLSC were harvested and incubated with 0.2% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate for 5–7 min at 4 $^{\circ}$ C. The cells were washed with PBS and blocked with 1% BSA for 45 min at 4 $^{\circ}$ C; afterwards, the cells were incubated with rabbit anti-human nucleolin for 1 h at RT; the cells were washed and incubated with goat anti-rabbit 18 nm gold-conjugated antibody for 1 h at RT. Subsequently, the cells were post fixed with 1% OsO₄ in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 45 min at 4 $^{\circ}$ C, gradually dehydrated with increasing ethanol concentrations, until complete propylene oxide and embedded in EPON 812 embedding medium as follows: in order to allow a suitable resin infiltration, the cells were located at the bottom of a Beem capsule in the presence of epoxy resin (EPON 812) overnight at RT, this was followed by heating the Beem capsule at 55 $^{\circ}$ C for 48 h to allow proper polymerization. Ultrathin sections were mounted on nickel grids coated with formvar and were contrasted with 2% aqueous uranyl acetate and 2% plumber citrate and observed in a Zeiss STEM electron microscope, Crossbeam 550. Six cells by grid of each condition were analysed to identify the gold tag over the cell surface.

2.9. Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from HLSC that were treated or not with *rh*VEGF, alone or in the presence of AS1411 or CRO using TRIzol reagent as indicated by the manufacturer. One hundred ng of total RNA were reverse transcribed, and then, quantitative real-time PCR assays were performed. The relative expression of nucleolin normalized to that of β 2 μ globulin was calculated and presented by values of $2^{-\Delta\Delta CT}$. Meanwhile, the relative expression of miR-21 and miR-221 normalized to that of snRNA U6 was calculated and presented by values of $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.10. Statistical analysis

All data were collected and Mann-Whitney *U* tests were used to determine differences between groups, taking $p < 0.05$ as statistically significant, using GraphPad Prism software (GraphPad, La Jolla CA, USA).

3. Results

3.1. Topical nucleolin-binding aptamer, AS1411 inhibited corneal neovascularization

The mouse cornea micro-pocket assay has been used for studying the inhibitory effects of diverse antiangiogenic molecules. As expected, corneal neovessels were induced in a time dependent manner when *rh*VEGF-pellets were intrastromally inserted, in comparison with the sham group, with a peak at day 7 after *rh*VEGF-pellet insertion. Interestingly, topical instillation of AS1411 or bevacizumab was able to significantly ($p < 0.05$) diminish the length and percentage of corneal neovessels when compared with both, *rh*VEGF-treated group and *rh*VEGF-treated group plus topical instillation of inactive oligonucleotide CRO. Additionally, the effect of AS1411 was more effective ($p < 0.05$) on diminishing CNV compared to bevacizumab. Finally, corneal epithelial side effects and conjunctival necrosis were not observed in any group (Fig. 1). Histologically, *rh*VEGF induced corneal stromal neovessels. Subepithelial small corneal neovessels were still found when bevacizumab was topically administered. Interestingly, AS1411 topically administrated inhibited corneal stromal neovessels. Contrariwise, the inactive oligonucleotide CRO administration failed to inhibit corneal stromal neovessels. Moreover, AS1411 administration

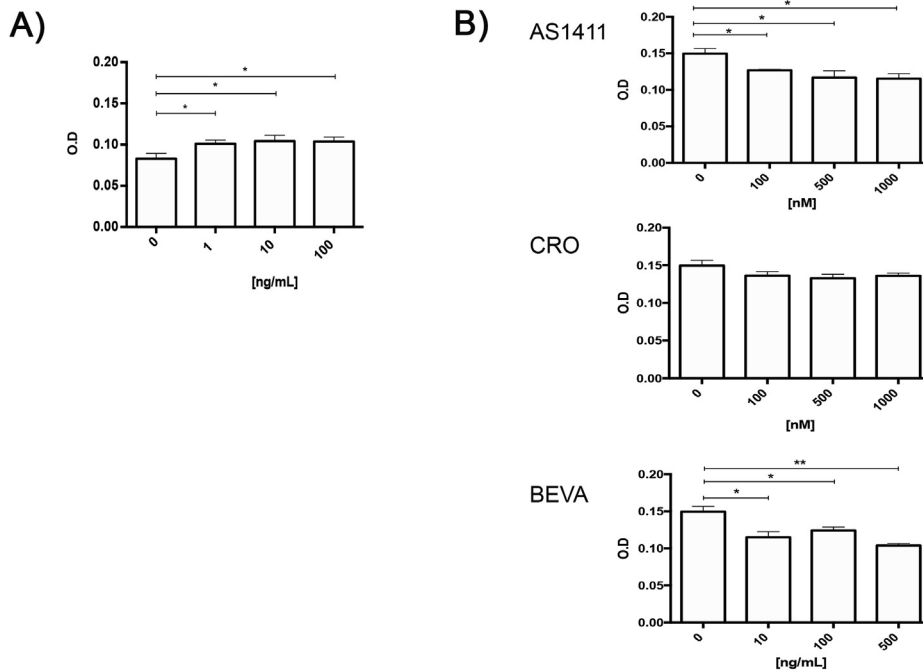


Fig. 4. AS1411 reduced proliferation of rhVEGF-stimulated HLSC. rhVEGF was able to significantly induce HLSC proliferation at 48 h of stimulation; the cell proliferation was augmented beginning with 1 ng/ml and maintained at 100 ng/ml of rhVEGF. (A) AS1411 at different concentrations (100–1000 nM) significantly reduced the proliferation of HLSC stimulated with 1 ng/ml of rhVEGF; similarly, bevacizumab significantly reduced the proliferation of rhVEGF-stimulated HLSC, beginning with 10 ng/ml and maintained at 500 ng/ml of rhVEGF; in contrast, the inactive oligonucleotide CRO, failed to inhibit proliferation of rhVEGF-stimulated HLSC. (B) The bars symbolize the mean (\pm SE) of four independent assays. *p < 0.05 and **p < 0.001.

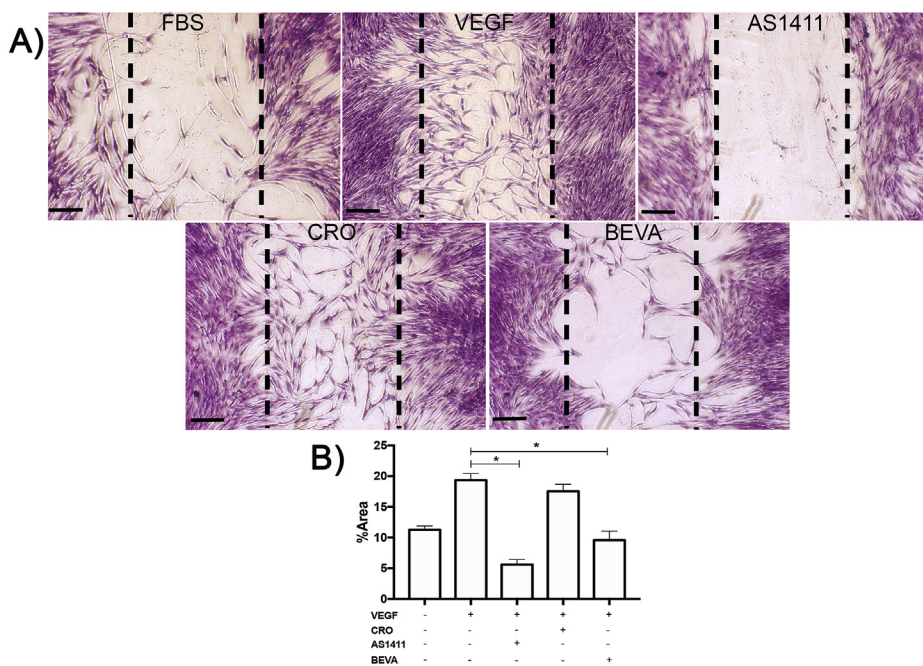


Fig. 5. AS1411 inhibited cell migration of rhVEGF-stimulated HLSC. Analysis of HLSC migration by *in vitro* scratch assay. rhVEGF was able to significantly induce HLSC migration (upper-middle panel) in comparison with the non-rhVEGF stimulated HLSC (upper-left panel). In contrast, AS1411 aptamer was able to significantly reduce HLSC migration induced by rhVEGF (upper-right panel); similarly, bevacizumab was able to significantly reduce rhHLSC migration induced by rhVEGF (lower-right panel). In contrast, oligonucleotide CRO was not able to reduce HLSC migration stimulated by rhVEGF (lower-left panel). (A) Images are representative of four independent assays, cells were stained with crystal violet. Graphical representation demonstrating that both AS1411 and bevacizumab were able to significantly diminish the rhVEGF-induced migration of HLSC; while CRO inactive aptamers failed to inhibit rhVEGF-induced migration of HLSC. (B) The bars symbolize the mean (\pm SE) of four independent assays. *p < 0.05 and **p < 0.001. Bars, 50 μ m.

recovered all histological structures (Fig. 2).

3.2. Nucleolin is expressed on cell surface of rhVEGF-stimulated HLSC

HLSC without rhVEGF stimulation expressed negligible cell surface nucleolin; meanwhile, when the cells were rhVEGF-stimulated for 12 h, nucleolin was significantly located at the cell membrane, confirmed with pre-embedding immunogold TEM as shown in Fig. 3A. Interestingly, rhVEGF-stimulated HLSC showed more evident and dilated cisternae of the rough endoplasmic reticulum, microfolds and numerous thin veils extended from their surfaces, frequently immunolabelled with nucleolin (Supplementary Fig. S1). Also, non-permeabilized rhVEGF-stimulated HLSC presented a positive staining for F-AS1411, while HLSC without rhVEGF stimulus were negative for F-AS1411, suggesting

that AS1411 aptamer may be recognizing cell surface nucleolin in rhVEGF-stimulated HLSC (Fig. 3B).

3.3. AS1411 aptamer reduced cell proliferation on rhVEGF-stimulated HLSC

After stimulation for 48 h, the rhVEGF was able to significantly induce proliferation of HLSC in comparison to the non-stimulated HLSC; proliferation of HLSC was observed beginning with 1 ng/ml and maintained for 100 ng/ml of rhVEGF (Fig. 4A). Interestingly, AS1411 at different concentrations (100–1000 nM) was capable of reducing proliferation of HLSC stimulated with 1 ng/ml of rhVEGF; similarly, bevacizumab inhibited rhVEGF-stimulated HLSC proliferation. In contrast, inactive oligonucleotide CRO did not reduce proliferation in rhVEGF-

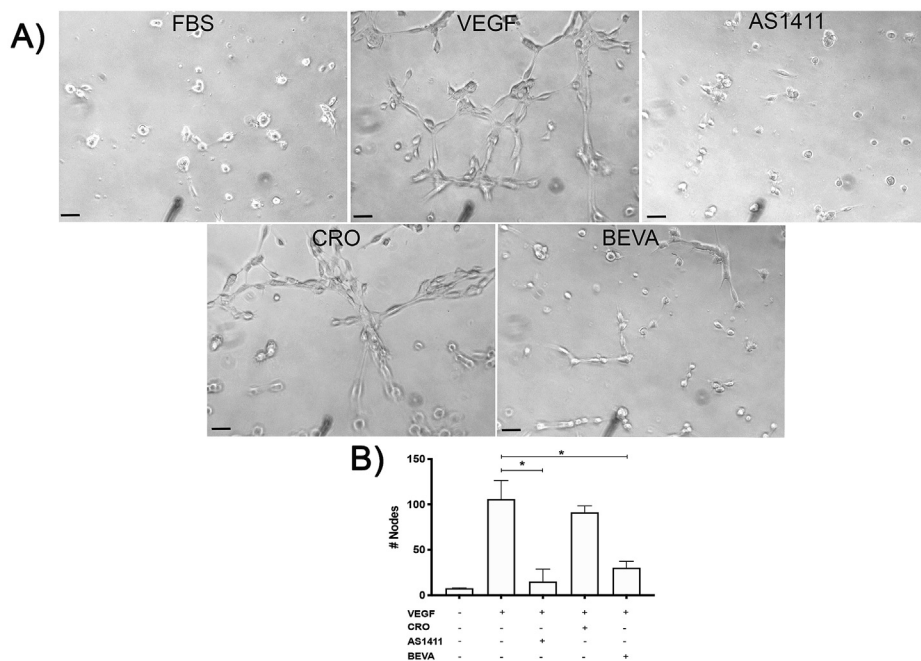


Fig. 6. AS1411 inhibited tube formation of *rhVEGF*-stimulated HLSC.

rhVEGF significantly induced tube formation on HLSC (upper-middle panel) in comparison with the non *rhVEGF*-stimulated HLSC (upper-left panel). AS1411 aptamer was able to significantly inhibit (upper-right panel) tube formation of *rhVEGF*-stimulated HLSC; similarly, bevacizumab was able to significantly inhibit (lower-right panel) tube formation of *rhVEGF*-stimulated HLSC. In contrast, CRO inactive aptamers were not able to inhibit tube formation on HLSC stimulated by *rhVEGF* (lower-left panel). (A) Graphical representation demonstrating that both AS1411 and bevacizumab were able to significantly diminish the *rhVEGF*-induced tube formation of HLSC; while CRO inactive aptamers failed to inhibit *rhVEGF*-induced tube formation of HLSC. (B) The bars symbolize the mean (\pm SE) of four independent assays. * $p < 0.05$. Bars, 20 μ m.

stimulated HLSC (Fig. 4B).

3.4. AS1411 aptamer reduced cell migration on *rhVEGF*-stimulated HLSC

The *rhVEGF* significantly induced HLSC migration in comparison with the HLSC cultured only with 2% FBS. Interestingly, AS1411 was able to significantly inhibit HLSC migration stimulated by *rhVEGF*. Similarly, the HLSC migration stimulated by *rhVEGF* was significantly reduced with bevacizumab. In contrast, inactive oligonucleotide CRO was not able to reduce the migration of HLSC induced with *rhVEGF* (Fig. 5).

3.5. AS1411 aptamer inhibited tube formation on *rhVEGF*-stimulated HLSC

HLSC cultured in 2% FBS medium did not possess the ability to form tubes on growth factors reduced Matrigel; in contrast, *rhVEGF*-stimulated HLSC were able to significantly form tubes on growth factors reduced Matrigel. Interestingly, AS1411 was able to significantly inhibit tube formation on *rhVEGF*-stimulated HLSC. As expected, tube formation of *rhVEGF*-stimulated HLSC was significantly reduced in the presence of bevacizumab. In contrast, inactive oligonucleotide CRO was not able to inhibit tube formation on *rhVEGF*-stimulated HLSC (Fig. 6).

3.6. AS1411 aptamer diminished miR-21 and miR-221 on *rhVEGF*-stimulated HLSC

rhVEGF was able to positively induce miR-21 expression on HLSC; interestingly, the incubation with AS1411 significantly reduced miR-21 expression in *rhVEGF*-stimulated HLSC; in contrast, there was no significant change on the relative expression of miR-21 when *rhVEGF*-stimulated HLSC were exposed to inactive oligonucleotide CRO. Similar results were obtained with miR-221, in which there was an upregulation of miR-221 with *rhVEGF* in HLSC. AS1411 was able to reduce miR-221 expression in *rhVEGF*-stimulated HLSC; in contrast, inactive oligonucleotide CRO did not reduce miR-221 expression in *rhVEGF*-stimulated HLSC (Fig. 7).

3.7. AS1411 aptamer did not affect nucleolin expression at transcript and protein levels on *rhVEGF*-stimulated HLSC

Transcript levels of nucleolin in *rhVEGF*-stimulated HLSC alone or treated with AS1411 or CRO in comparison with non-stimulated HLSC were significantly reduced in comparison with HLSC cultured in 2% FBS (Fig. 8A). In contrast, and interestingly total nucleolin protein levels were similar in all of the aforementioned conditions (Fig. 8B).

4. Discussion

In the present study we have described that topical AS1411 aptamer was able to inhibit clinical CNV. In addition, *rhVEGF* was able to induce cell surface nucleolin localization in HLSC. Also, AS1411 was able to inhibit proliferation, migration, tube formation and miR-21 and miR-221 expression on *rhVEGF*-stimulated HLSC.

We have previously shown that there is a cell surface localization of nucleolin in angiogenic cells in a suture-induced CNV model, and we hypothesized that cell surface nucleolin would be a target to treat CNV (Quiroz-Mercado et al., 2016). To test our hypothesis, we developed an *in vivo* *rhVEGF*-induced CNV assay. This micropocket assay is a robust and quantitative *in vivo* method for evaluating VEGF-specific angiogenesis and it allowed us to test specifically AS1411 as an angiogenesis inhibitor (Birsner et al., 2014). As expected, corneal neovessels were successfully generated at 7 days after *rhVEGF*-pellet implantation; and interestingly, there was a significant reduction of CNV when AS1411 was topically used, comparable to the neovessels reduction obtained with the topical administration of bevacizumab (Quiroz-Mercado et al., 2016). Our results are consistent with a previous study where intravitreal injection or topical application of AS1411 ameliorated choroidal neovascularization in a model of age-related macular degeneration (Leaderer et al., 2015). These results suggest a central role of cell surface nucleolin in the development of neovessel-mediated pathological disorders in the eye. In an attempt to elucidate the possible mechanisms by which AS1411 aptamer possesses antiangiogenic properties, we used cells obtained from human limbus stroma (HLSC). In this context, we have previously described that human limbal cells responded to *rhVEGF*, generating tubes in Matrigel (Garfias et al., 2012). In the present study, HLSC cultured in supplemented medium without *rhVEGF* did not express cell surface nucleolin; however, *rhVEGF* was

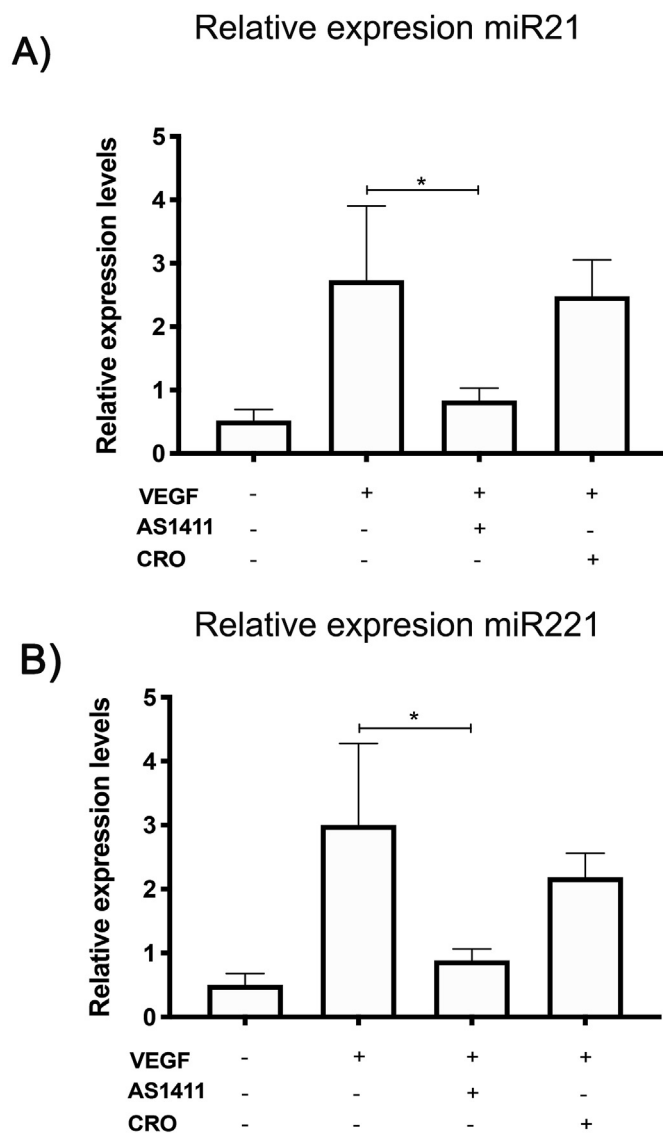


Fig. 7. AS1411 diminished miR-21 and miR-221 expression on *rh*VEGF-stimulated HLSC.

*rh*VEGF was able to induce the expression of miR-21 (A) and miR-221 (B) in *rh*VEGF-stimulated HLSC. AS1411 aptamers reduced the expression of both miR-21 (A) and miR-221 (B) in *rh*VEGF-stimulated HLSC. In contrast, CRO inactive aptamers did not exert any significant change in the expression of miR-21 (A) and miR-221 (B) on *rh*VEGF-stimulated HLSC. The bars symbolize the mean (\pm SE) of three independent assays. * $p < 0.05$.

able to induce cell surface nucleolin expression on HLSC. Consistently, *rh*VEGF was able to induce F-AS1411 recognition on non-permeabilized HLSC, in contrast with F-CRO which was not able to recognize non-permeable non-stimulated HLSC. It has previously demonstrated the presence of cell surface nucleolin in HeLa cells by electron microscopy, showing the presence of gold particles (recognizing nucleolin) on the external side of the plasma membrane (Hovanessian et al., 2000). Similarly, we have found gold particles on the plasma membrane of HLSC after stimulation with *rh*VEGF; whether cell surface localization of nucleolin in *rh*VEGF-stimulated HLSC is due to an active process like exocytosis (Hovanessian et al., 2000), is still under study. Moreover, it has been described that besides *rh*VEGF, nonmuscle myosin heavy chain 9 (MyH9) association to nucleolin is necessary to induce nucleolin translocation from nucleus towards the cell surface of endothelial cells (Huang et al., 2006). Therefore, *rh*VEGF is acting on HLSC in similar way as it has been described in endothelial cells.

Likewise, *rh*VEGF induced HLSC proliferation, which indicates that VEGF is functioning not only as an activation molecule, but also, as a proliferating agent in these cells. These results reinforce the stimulating and proliferating actions of VEGF in different cell types, including cells obtained from limbus (Notara et al., 2019).

Interestingly, the HLSC proliferation induced with *rh*VEGF was significantly inhibited by AS1411, but not with the inactive oligonucleotide CRO, suggesting that the *rh*VEGF-induced HLSC proliferation was specifically inhibited through cell-surface nucleolin. These results are in accordance with other studies describing that aptamers that bind to cell surface nucleolin inhibit cell proliferation (Bates et al., 1999; Scaggiante et al., 2006); whether this cell proliferation inhibition is due to the aptamers binding to the nuclear-associated eEF1A protein in HLSC, as it has been reported previously (Scaggiante et al., 2006), is still matter of futures studies.

Cell migration is a multistep process for diverse physiological and pathological conditions, such as corneal angiogenesis; thus, we sought to determine the effect of AS1411 on cell migration. Similar to bevacizumab, AS1411 aptamer inhibited *rh*VEGF-induced HLSC migration, indicating that AS1411 function is at inhibiting *rh*VEGF-stimulated cell movement. It has been described that phosphorylation process of nucleolin is associated with the cell surface location of nucleolin (Wu et al., 2014) and downregulating nucleolin phosphorylation significantly inhibits cell migration (Huang et al., 2019), consequently AS1411 activities in cell migration shown in the present study could be due to the inhibition of this post-translational modification. *rh*VEGF significantly diminished nucleolin transcription process and this transcription inhibition was similar in both AS1411- and CRO-treated *rh*VEGF-stimulated HLSC, suggesting that *rh*VEGF is the responsible molecule that inhibits nucleolin transcription process. In contrast, total nucleolin protein levels were similar in all tested conditions; in this context, it has recently been demonstrated that transcript expression levels have a low predictive value on protein expression, and it may be practical to consider transcript and protein expression as two separate aspects of molecular phenotype, each with its own contribution to biological function (Bauernfeind and Babbitt, 2017). Also, it has been shown that transcription and translation of nucleolin are differentially regulated in developing cardiomyocytes (Bicknell et al., 2005). Therefore, differential nucleolin transcript and protein rates and stabilities cannot be ruled out in our system. Additionally, AS1411 inhibited *rh*VEGF-induced tube formation of HLSC. It has been described that cell surface nucleolin is capable of driving the angiogenesis process (Christian et al., 2003; Huang et al., 2006), therefore, inhibiting cell surface nucleolin with AS1411 inhibits nucleolin-dependent angiogenesis. miRNAs are small non-coding RNAs of 21–25 nucleotides, which function as negative regulators of gene expression. It has recently been described about 200 miRNAs related to angiogenesis. For instance, miR-21 has been implicated in the induction of angiogenesis through AKT and ERK activation, meanwhile miR-221 can control the expression of multiple targets to modulate VEGF signaling output (Liu et al., 2011; Nicoli et al., 2012). Moreover, it has recently been reported that miR-21 is significantly up-regulated in a mouse model of alkali burned cornea, and that its specific inhibition using antagomir-21 ameliorates corneal neovascularization (Zhang et al., 2017). Nucleolin promotes the maturation of a specific set of miRNAs, such as miR-21 and -221, among others (Di Leva et al., 2010; Farazi et al., 2011; Iliopoulos et al., 2010; Martello et al., 2010); besides, it has been reported that the aptamer AS1411 binds with high affinity on the cell surface nucleolin, and after internalization acts as a molecular decoy, blocking and shortening the half-life of nucleolin-regulated RNAs (Ishimaru et al., 2010). Furthermore, Pichiorri et al., identified a decrease in expression of mature miR-21 and miR-221 as well as an up-regulation of their respective pri-miRNAs after AS1411 treatment, affecting the ability of nucleolin to interact with the microprocessor complex (Pichiorri et al., 2013). In the present study, *rh*VEGF was able to induce the expression of both miR-21 and miR-221 on HLSC, which is in accordance with previous studies (Liu

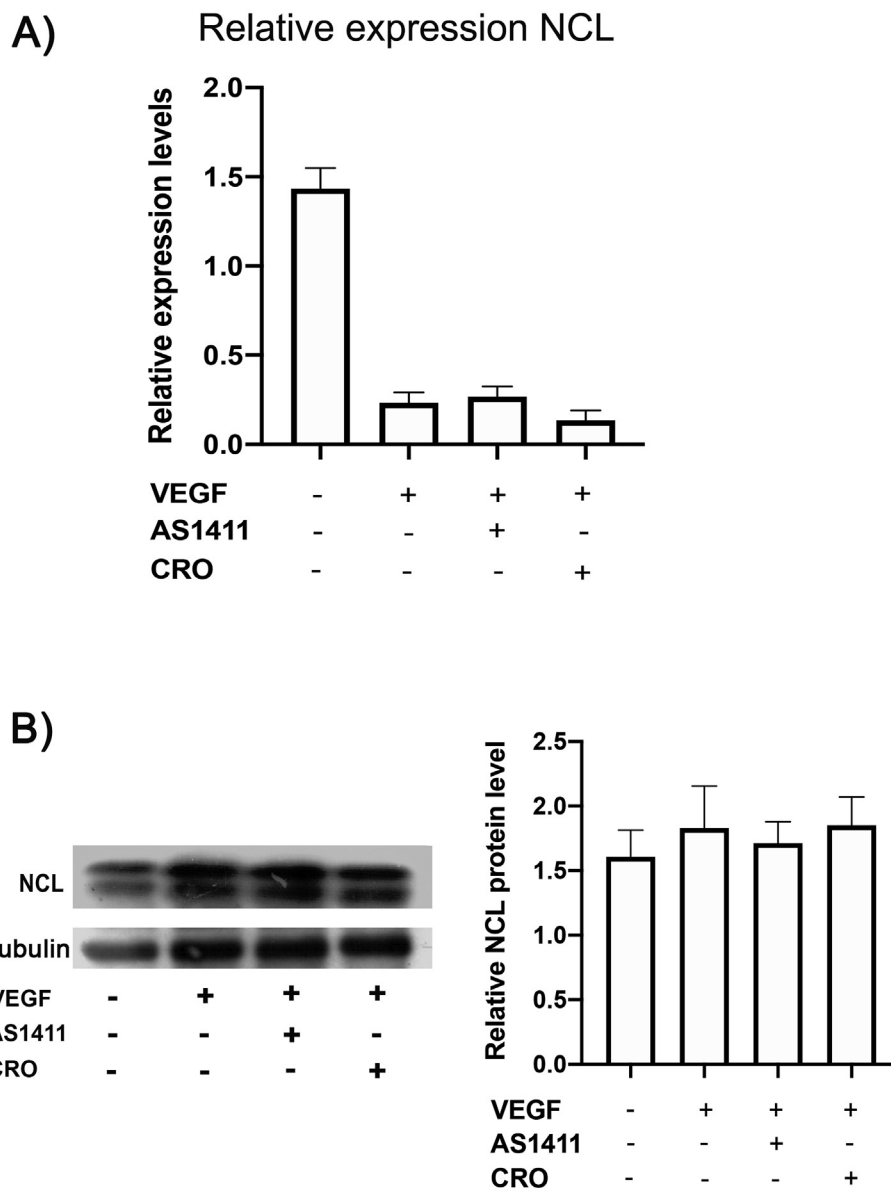


Fig. 8. Effect of *rh*VEGF in nucleolin expression at transcription and protein levels.

Nucleolin transcription is constitutively present in 2% FBS cultured-HLSC; however, *rh*VEGF-stimulated HLSC with or without AS1411 or CRO treatment significantly reduced nucleolin transcript levels. The bars symbolize the mean (± SE) of three independent assays, *p < 0.05 (A). Total nucleolin protein levels are similar in all aforementioned conditions; tubulin was used as a loading control. The bars symbolize the mean (± SE) of three independent assays.

et al., 2011; Nicoli et al., 2012; Zhang et al., 2017) Interestingly, AS1411 aptamer was able to inhibit the increase of mir-21 and -221 on *rh*VEGF-stimulated HLSC. Whether AS1411 was able to affect the ability of nucleolin to interact with microprocessor complex (Pichiorri et al., 2013), downregulating mir-21 and -221 in *rh*VEGF-stimulated HLSC is still unknown. However, these findings suggest a novel mechanism by which AS1411 diminish angiogenesis in eye disease. Aptamers are single-stranded DNA or RNA molecules that bind to protein by folding into a three-dimensional conformation, similar to antibodies. Aptamers possess high binding affinity and specificity; they have a relative low-cost production, with low batch-to batch variation, and they are not immunogenic. All these properties provide potential for therapeutic applications of aptamers (Ali et al., 2019; Nimjee et al., 2017). In this study we have shown that the topical use of AS1411 inhibit CNV, and that this route of administration generates no adverse effects on the cornea; hence, the use of this aptamer opens new perspectives to treat CNV in humans.

Declaration of competing interest

The authors declare that no competing interests exist.

Acknowledgements

This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT Problemas Nacionales 0311; Ciencia Básica: 167438; Sectorial en Salud 273349; DGAPA-PAPIIT-UNAM: IN215617, and Conde de Valenciana Foundation. The present research is part of the Doctoral thesis of Oscar Vivanco-Rojas MSc, who is a student of the Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas; he was supported by CONACYT doctoral scholarship CVU: 545374. We thank Dr. Mohamed A. Pereyra Morales for his technical support. We thank Margarita González Pliego and Elsa Aguirre from the Embriology department, and Elba Carrasco Ramírez from the Microscopy Unit of Faculty of Medicine UNAM.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.107977>.

References

- Ali, M.H., Elsherbiny, M.E., Emara, M., 2019. 'Updates on aptamer research. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Baer, J.C., Foster, C.S., 1992. 'Corneal laser photocoagulation for treatment of neovascularization. Efficacy of 577 nm yellow dye laser. *Ophthalmology* 99, 173–179.
- Bates, P.J., Kahlon, J.B., Thomas, S.D., Trent, J.O., Miller, D.M., 1999. 'Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *J. Biol. Chem.* 274, 26369–26377.
- Bates, P.J., Laber, D.A., Miller, D.M., Thomas, S.D., Trent, J.O., 2009. 'Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp. Mol. Pathol.* 86, 151–164.
- Bauernfeind, A.L., Babbitt, C.C., 2017. 'The predictive nature of transcript expression levels on protein expression in adult human brain. *BMC Genom.* 18, 322.
- Bicknell, K., Brooks, G., Kaiser, P., Chen, H., Dove, B.K., Hiscox, J.A., 2005. Nucleolin is regulated both at the level of transcription and translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 817–822.
- Birsner, A.E., Benny, O., D'Amato, R.J., 2014. The corneal micropocket assay: a model of angiogenesis in the mouse eye. *JoVE* 16 (90). <https://doi.org/10.3791/51375>.
- Christian, S., Pilch, J., Akerman, M.E., Porkka, K., Laakkonen, P., Ruoslahti, E., 2003. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J. Cell Biol.* 163 (4), 871–878.
- Di Leva, G., Gasparini, P., Piovan, C., Ngankou, A., Garofalo, M., Taccioli, C., Iorio, M.V., Li, M., Volinia, S., Alder, H., Nakamura, T., Nuovo, G., Liu, Y., Nephew, K.P., Croce, C.M., 2010. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 102 (10), 706–721.
- Dominguez-Lopez, A., Bautista-de Lucio, V.M., Serafin-Lopez, J., Robles-Sanchez, E., Garfias, Y., 2014. Amniotic membrane modulates innate immune response inhibiting PRRs expression and NF-kappaB nuclear translocation on limbal myofibroblasts. *Exp. Eye Res.* 127, 215–223.
- Faraj, L.A., Elalfy, M.S., Said, D.G., Dua, H.S., 2014. 'Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Br. J. Ophthalmol.* 98, 1287–1290.
- Farazi, T.A., Horlings, H.M., Ten Hoeve, J.J., Mihailovic, A., Halfwerk, H., Morozov, P., Brown, M., Hafner, M., Reyat, F., van Kouwenhove, M., Kreike, B., Sie, D., Hovestadt, V., Wessels, L.F., van de Vijver, M.J., Tuschl, T., 2011. MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Canc. Res.* 71, 4443–4453.
- Feizi, S., Azari, A.A., Safapour, S., 2017. 'Therapeutic approaches for corneal neovascularization. *Eye Vis (Lond)* 4, 28.
- Garfias, Y., Nieves-Hernandez, J., Garcia-Mejia, M., Estrada-Reyes, C., Jimenez-Martinez, M.C., 2012. Stem cells isolated from the human stromal limbus possess immunosuppressant properties. *Mol. Vis.* 18, 2087–2095.
- Hovanessian, A.G., Puvion-Dutilleul, F., Nisole, S., Svab, J., Perret, E., Deng, J.S., Krust, B., 2000. The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 261, 312–328.
- Huang, F., Wu, Y., Tan, H., Guo, T., Zhang, K., Li, D., Tong, Z., 2019. Phosphorylation of nucleolin is indispensable to its involvement in the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells. *Oncol. Rep.* 41, 590–598.
- Huang, Y., Shi, H., Zhou, H., Song, X., Yuan, S., Luo, Y., 2006. The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin. *Blood* 107, 3564–3571.
- Iliopoulos, D., Jaeger, S.A., Hirsch, H.A., Bulky, M.L., Struhl, K., 2010. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol. Cell.* 39, 493–506.
- Ishimaru, D., Zuraw, L., Ramalingam, S., Sengupta, T.K., Bandyopadhyay, S., Reuben, A., Fernandes, D.J., Spicer, E.K., 2010. Mechanism of regulation of bcl-2 mRNA by nucleolin and A + U-rich element-binding factor 1 (AUF1). *J. Biol. Chem.* 285, 27182–27191.
- Junghans, B.M., Collin, H.B., 1989. The limbal vascular response to corneal injury. An autoradiographic study. *Cornea* 8, 141–149.
- Koutsoumpa, M., Papadimitriou, E., 2014. 'Cell surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.* 9, 137–152.
- Leaderer, D., Cashman, S.M., Kumar-Singh, R., 2015. 'Topical application of a G-Quartet aptamer targeting nucleolin attenuates choroidal neovascularization in a model of age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 140, 171–178.
- Lee, K.Y., Kang, H., Ryu, S.H., Lee, D.S., Lee, J.H., Kim, S., 2010. 'Bioimaging of nucleolin aptamer-containing 5-(N-benzylcarboxamide)-2'-deoxyuridine more capable of specific binding to targets in cancer cells'. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 168306.
- Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L., 2007. 'In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2, 329–333.
- Liu, L.Z., Li, C., Chen, Q., Jing, Y., Carpenter, R., Jiang, Y., Kung, H.F., Lai, L., Jiang, B.H., 2011. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1alpha expression. *PLoS One* 6, e19139.
- Losfeld, M.E., Khoury, D.E., Mariot, P., Carpentier, M., Krust, B., Briand, J.P., Mazurier, J., Hovanessian, A.G., Legrand, D., 2009. The cell surface expressed nucleolin is a glycoprotein that triggers calcium entry into mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 315, 357–369.
- Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., Parenti, A.R., Daidone, M.G., Biccato, S., Piccolo, S., 2010. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 141, 1195–1207.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Paltorak, Z., 1999. 'Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13, 9–22.
- Nicoli, S., Knyphausen, C.P., Zhu, L.J., Lakshmanan, A., Lawson, N.D., 2012. miR-221 is required for endothelial tip cell behaviors during vascular development. *Dev. Cell* 22, 418–429.
- Nimjee, S.M., White, R.R., Becker, R.C., Sullenger, B.A., 2017. 'Aptamers as therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 57, 61–79.
- Notara, M., Lentzsch, A., Clahsen, T., Behboudifard, S., Braun, G., Cursiefen, C., 2019. 'Bevacizumab induces upregulation of Keratin 3 and VEGFA in human limbal epithelial cells in vitro. *J. Clin. Med.* 8.
- Ochs, R., Lischwe, M., O'Leary, P., Busch, H., 1983. 'Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. *Exp. Cell Res.* 146, 139–149.
- Oliveira, H.B., Sakimoto, T., Javier, J.A., Azar, D.T., Wiegand, S.J., Jain, S., Chang, J.H., 2010. VEGF Trap(R1R2) suppresses experimental corneal angiogenesis. *Eur. J. Ophthalmol.* 20, 48–54.
- Pichiorri, F., Palmieri, D., De Luca, L., Consiglio, J., You, J., Rocci, A., Talabere, T., Piovan, C., Lagana, A., Cascione, L., Guan, J., Gasparini, P., Balatti, V., Nuovo, G., Coppola, V., Hofmeister, C.C., Marcucci, G., Byrd, J.C., Volinia, S., Shapiro, C.L., Freitas, M.A., Croce, C.M., 2013. In vivo NCL targeting affects breast cancer aggressiveness through miRNA regulation. *J. Exp. Med.* 210, 951–968.
- Quiroz-Mercado, J., Ramirez-Velazquez, N., Partido, G., Zenteno, E., Chavez, R., Agundis-Mata, C., Jimenez-Martinez, M.C., Garfias, Y., 2016. Tissue and cellular characterization of nucleolin in a murine model of corneal angiogenesis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 254, 1753–1763.
- Razeghinejad, M.R., Myers, J.S., Katz, L.J., 2011. 'Iatrogenic glaucoma secondary to medications. *Am. J. Med.* 124, 20–25.
- Reyes-Reyes, E.M., Teng, Y., Bates, P.J., 2010. 'A new paradigm for aptamer therapeutic AS1411 action: uptake by macropinocytosis and its stimulation by a nucleolin-dependent mechanism. *Canc. Res.* 70, 8617–8629.
- Rhen, T., Cidlowski, J.A., 2005. 'Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* 353, 1711–1723.
- Rosenberg, J.E., Bambury, R.M., Van Allen, E.M., Drabkin, H.A., Lara Jr., P.N., Harzstark, A.L., Wagle, N., Figlin, R.A., Smith, G.W., Garraway, L.A., Choueiri, T., Erlandsson, F., Laber, D.A., 2014. A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma. *Invest. N. Drugs* 32, 178–187.
- Scaggiante, B., Dapas, B., Grassi, G., Manzini, G., 2006. Interaction of G-rich GT oligonucleotides with nuclear-associated eF1A is correlated with their antiproliferative effect in haematopoietic human cancer cell lines. *FEBS J.* 273, 1350–1361.
- Shi, H., Huang, Y., Zhou, H., Song, X., Yuan, S., Fu, Y., Luo, Y., 2007. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. *Blood* 110, 2899–2906.
- Tang, Z., Zhang, F., Li, Y., Arjunan, P., Kumar, A., Lee, C., Li, X., 2011. A mouse model of the cornea pocket assay for angiogenesis study. *JoVE* 18 (54). <https://doi.org/10.3791/3077>.
- Wu, D.M., Zhang, P., Liu, R.Y., Sang, Y.X., Zhou, C., Xu, G.C., Yang, J.L., Tong, A.P., Wang, C.T., 2014. Phosphorylation and changes in the distribution of nucleolin promote tumor metastasis via the PI3K/Akt pathway in colorectal carcinoma. *FEBS Lett.* 588, 1921–1929.
- Xu, C.H., Liu, Y., Xiao, L.M., Chen, L.K., Zheng, S.Y., Zeng, E.M., Li, D.H., Li, Y.P., 2019. Silencing microRNA-221/222 cluster suppresses glioblastoma angiogenesis by suppressor of cytokine signaling-3-dependent JAK/STAT pathway. *J. Cell. Physiol.* 234 (12), 22272–22284.
- Zhang, Y., Zhang, T., Ma, X., Zou, J., 2017. 'Subconjunctival injection of antagomir-21 alleviates corneal neovascularization in a mouse model of alkali-burned cornea. *Oncotarget* 8, 11797–11808.
- Zhong, W., Montana, M., Santosa, S.M., Isjwara, I.D., Huang, Y.H., Han, K.Y., O'Neil, C., Wang, A., Cortina, M.S., de la Cruz, J., Zhou, Q., Rosenblatt, M.I., Chang, J.H., Azar, D.T., 2018. Angiogenesis and lymphangiogenesis in corneal transplantation—a review. *Surv. Ophthalmol.* 63 (4), 453–479.
- Zudaire, E., Gambardella, L., Kurcz, C., Vermeren, S., 2011. 'A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS One* 6, e27385.