



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

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

**REPARACIÓN Y REGENERACIÓN CORNEAL MEDIANTE EL  
USO DE UN PÉPTIDO ANGIOSTÁTICO DERIVADO DE LA  
COLÁGENA Y EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
P R E S E N T A  
AYTZEÉ ELOÍSA PIÑÓN CABRERA**

**TUTOR: DC GUSTAVO ADOLFO GARCÍA SÁNCHEZ**

**COMITÉ TUTORAL:**

**PhD Esther Ivonne López Bayghen Patiño  
DVM ACVIM Neal Mauldin.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## ***COMITÉ TUTORAL***

**DC Gustavo Adolfo García Sánchez.**

**Oftalmología Veterinaria**

**Práctica Privada**

**Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño.**

**Departamento de Genética y Biología Molecular**

**CINVESTAV-IPN**

**Dr. Guy Neal Mauldin.**

**Molecular Oncology Department**

**School of Veterinary Medicine, LSU**

Historias de caballos y jinetes han existido muchas, el caballo y los humanos están unidos por una relación singular, hoy quiero hablar de la nuestra, de nuestra relación evidente e inquebrantable, puede que un caballo no siempre cumpla las expectativas deportivas, pero nunca defrauda como amigo y compañero, esto es infinitamente mas de lo que cualquiera pudiera pedir, tu amistad auténtica y confiada, con nada ni con nadie en este mundo cambiaría nuestros instantes, volamos sin alas, tu eres y serás siempre mi inspiración, vives en mi corazón, gracias por tanto mi adorado cómplice, mi amigo, mi confidente, mi hermano, mi hijo, el cuidador de mi alma, en pocas palabras: mi caballo...gracias MI Boster Brown

PD.- En mis próximas vidas vuelve a ser mi caballo...

## ***DEDICATORIAS***

A mis queridos pacientes, todos hermosos caballos, gracias por su dulzura y agradecimiento que expresan sin necesidad de palabras, hubiera deseado no haber tenido equivocaciones nunca, mi esfuerzo siempre será por aprender más rápido para sanarlos a todos...

A mi hermoso Jorge Antonio, yo era polvo estelar hasta que apareciste; gracias hijo por darme la fuerza y ser mi luz, esperando que un día te sientas orgulloso de tu madre...te amo...

## **AGRADECIMIENTOS**

A Jesús, rey de reyes, por enseñarme el camino y llevarme de la mano...

Al Ing. Nelson Piñón y a la Miss Martha Cabrera, mis queridos padres, por toda su ayuda siempre

A quien le debo lo que soy profesionalmente, mi ángel guardián, mi amigo y maestro el Dr. Adolfo García por enseñarme incondicionalmente, por ayudarme siempre y en todo, por haberme dado las alas y enseñarme a volar, mi agradecimiento y cariño eternos.

A la Dra. Esther López Bayghen por haberme aceptado y ayudado desinteresadamente permitiéndome entrar a su maravilloso mundo de ciencia e investigación, estaré eternamente agradecida.

Dr. Neal Mauldin thank you very much for all your help and for being my friend, I appreciate.

A mis amigos del laboratorio Marisol, Irma, Maty, Miriam y Balam, gracias por que hicieron mi estancia maravillosa al ayudarme tanto y haberme aceptado como amiga, los quiero mucho.

Al Dr. Jaime Ortega y la MC Lucero Ramón por su ayuda para purificar, al MVZ Daniel Cortés por ayudarme tanto con los conejos y a la MC Rita Villanueva y a la Dra. Marisol Sandoval por su valiosa colaboración en los ensayos celulares.

A la FMVZ-UNAM por ser mi alma mater, por formarme profesionalmente, por los amigos y vivencias que tuve ahí y por darme el orgullo de ser universitaria.

Al CINVESTAV-IPN por la infraestructura del laboratorio 5 del Departamento de Genética y Biología Molecular y del CICUAL para la realización de este trabajo.

A CONACYT y PAPITT por la ayuda otorgada para la realización de este proyecto

**Este trabajo fue realizado en el  
Laboratorio de Oncología de la Escuela  
de Veterinaria de la Universidad de Louisiana  
bajo la dirección del Dr. Neal Mauldin y en el  
Laboratorio de Regulación Transcripcional en  
Eucariontes del Departamento de  
Genética y Biología Molecular  
del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional bajo  
la dirección de la Dra. Esther  
López-Bayghen Patiño.**

**DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO LA  
AUTORA FUE BECARIA  
DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
(NO. DE REGISTRO 165545)**

**ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO GRACIAS:**

**AL APOYO  
CONCEDIDO POR PAPITT (PROYECTO Ix216704)  
OBTENIDO POR EL DOCTOR  
GUSTAVO ADOLFO GARCÍA SÁNCHEZ**

**Y AL APOYO ECONÓMICO OTORGADO POR CONACYT  
A LA DRA. ESTHER IVONNE LÓPEZ-BAYGHEN (41273-  
A Y 50414)**

**Los resultados del presente trabajo fueron expuestos en el siguiente foro:**

**Cuarto Congreso de Posgrado.**

**Piñon Cabrera, A., G.A. García Sánchez, and E. López Bayghen.**

***Inducción de reparación y regeneración corneal en caballos mediante el***

***uso del factor de crecimiento epidermal y un péptido angiostático***

***derivado***

***de la colágena.***

***Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la***

***Producción y de la Salud Animal.***

**Agosto 23-25, 2006. UNAM, México DF**

## **INDICE**

COMITÉ TUTORAL.....	ii
DEDICATORIAS .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
INDICE .....	1
RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
1.1 ESTRUCTURA CORNEAL .....	6
1.1.1 Epitelio.....	6
1.1.2 Estroma .....	9
1.1.3 Membrana de Descemet.....	11
1.1.4 Endotelio.....	12
1.1.5 Transparencia corneal .....	13
1.1.6 Película precorneal .....	14
1.2 REPARACIÓN CORNEAL.....	15
1.2.1 Citocinas .....	16
1.2.2 Migración epitelial .....	20
1.2.4 Metaloproteinasas.....	21
1.3 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF).....	23
1.4 ANGIOGÉNESIS .....	25
1.4.1 Tumstatina .....	27
JUSTIFICACIÓN .....	29
HIPÓTESIS .....	33
OBJETIVOS .....	34
OBJETIVO GENERAL.....	34
OBJETIVOS PARTICULARES .....	34
ESQUEMA EXPERIMENTAL.....	35
METODOLOGÍA.....	37

5.1 CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL eTum5 .....	37
5.1.1 Aislamiento del RNA .....	37
5.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR)...	39
5.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	39
5.1.4 Purificación del DNA .....	40
5.1.5 Clonación en el vector reportero pCR 2.1.....	42
5.2 EXPRESIÓN DEL eTUM5 .....	43
5.2.1 Preparación de células competentes .....	43
5.2.3 Preparación de MINIPREPS y del mapa de restricción del plásmido .....	44
5.3 INDUCCIÓN A PEQUEÑA ESCALA DE LA PROTEÍNA .....	48
5.3.1 Inducción de la proteína en bacterias .....	48
5.4 PURIFICACIÓN DEL ETUM5 .....	49
5.4.1 Análisis de solubilidad.....	49
5.4.2 Purificación en condiciones de desnaturalización.....	50
5.5 MODELO ANIMAL DE DAÑO CORNEAL .....	51
5.5.1 Medición de la cicatrización corneal .....	54
5.6 CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR (MTT) .....	57
5.6.1 MTT en Células HeLa .....	57
5.6.2 MTT en Fibroblastos corneales .....	58
5.6.3 MTT en Células BUVEC .....	59
5.7 ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS .....	60
RESULTADOS.....	61
6.1 Clonación y expresión de eTum5: .....	61
6.2 Purificación del eTum5 .....	64
6.3 Análisis de citotoxicidad.....	65
6.4 Medición de la angiogénesis en el modelo animal.....	66
6.5 Angiogénesis: evaluación in vivo .....	66
6.6 Comparación entre los diferentes tratamientos .....	67
6.7 Histologías .....	67
DISCUSIÓN .....	70
CONCLUSIONES.....	79

FIGURAS Y LEYENDAS.....	81
FIGURA 1. Clonación del eTum5 .....	81
FIGURA 2. Mapa del vector de expresión pET32/Tum5.....	83
FIGURA 3. Electroforesis de la comprobación de la inserción del eTum5 con la enzima de restricción PstI.....	84
FIGURA 4. Electroforesis de la comprobación de la inserción del eTum5 con la enzima de restricción PvuII.....	85
FIGURA 5. Electroforesis de la comprobación de la inserción del eTum5 con las enzimas de restricción EcoRV y HindIII .....	86
FIGURA 6. Electroforesis de la comprobación de la transformación del eTum5 con la enzima de restricción PvuII. ....	87
FIGURA 7. Electroforesis del eTum5 inducido con IPTG .....	88
FIGURA 8. Análisis de solubilidad del eTum5 .....	90
FIGURA 9. Análisis de los Cuerpos de inclusión .....	91
FIGURA 10. Purificación del eTum5.....	92
FIGURA 11. Gráfica de la citotoxicidad del eTum5 purificado en células epiteliales HeLa. ....	93
FIGURA 12. Gráfica de la citotoxicidad del eTum5 purificado en células epiteliales corneales de conejo.....	94
FIGURA 13. Sobrevivencia celular endotelial mediante ensayos de MTT.....	95
FIGURA 14. Gráfica para la estandarización del modelo experimental animal. ....	97
FIGURA 15. Fotografías seriadas en el modelo animal del día dos al siete de un conejo del grupo tratado con la aplicación del eTum5 purificado evaluando la angiogénesis.....	98
FIGURA 16. Angiogénesis con los diferentes tratamientos aplicados en el modelo animal. ....	99
FIGURA 17. Histologías.....	101
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	100
MEDIOS Y REACTIVOS .....	102
BIBLIOGRAFIA .....	105

## **RESUMEN**

En el ojo procesos degenerativos o inflamación excesiva producen un aumento en la angiogénesis debido a la elevación del factor de crecimiento endotelial vascular, ocasionando con esto pérdida de la visión. El mayor riesgo para el rechazo de un trasplante corneal es la neovascularización, antes y después de la cirugía, la prevención en contra de esta es el paso principal para evitar la falla de los mismos.

El equine tum 5 recombinante (eTum5) fue clonado, expresado y probado *in vitro* utilizando ensayos de viabilidad celular e *in vivo* usando un modelo animal con daño corneal. La angiogénesis fue evaluada durante siete días mediante fotografías seriales diarias y tinción con fluoresceína para evaluar la curación corneal. Utilizamos cuatro grupos diferentes de cuatro conejos cada uno, a los que se les realizó una herida corneal; el grupo uno fue el control, el grupo dos fue tratado con el etum5 purificado, el grupo tres se trató con la combinación del factor de crecimiento epidermal (FCE) y el etum5 purificado y el grupo cuatro fue tratado con el FCE.

Nuestros resultados demuestran que los conejos tratados con el péptido eTum5 purificado tuvieron menor tiempo de disminución de la angiogénesis y los tratados con el eTum5 purificado en combinación con el FCE mostraron una recuperación corneal completa, permitiendo que las cicatrices fueran menos opacas y de menor tamaño en comparación con animales no tratados. Nosotros proponemos que el etum5 purificado puede ser usado como un tratamiento complementario para mejorar los resultados de trasplantes de córnea y mandiles conjuntivales usados para prevenir perforaciones y licuefacción corneal, pues permitirá que además de la funcionalidad tectónica, conserven la funcionalidad visual.

Palabras clave: curación corneal, angiogénesis corneal, tumstatina, etum5, colágeno

## **ABSTRACT**

In the eye, degenerative processes or excessive inflammation produce an increased angiogenesis (vascular endothelial growth) causing loss of vision. The major risk factor for a corneal graft rejection is the neovascularization before or after surgery. This why, prevention against this angiogenesis is the principal step to avoid the graft failure.

Recombinant equine Tum5 (eTum5) was cloned, expressed and tested *in vitro* using cell viability assays and *in vivo* using an animal model of corneal injury. Angiogenesis after corneal injury was evaluated over seven days with daily imaging and fluorescein staining to assess corneal healing. We used four different groups of rabbits, the group one were four rabbits with a corneal injure used as control, group two were four rabbits with a corneal injure treated with purified etum5, group three were four rabbits with a corneal injure treated with a combination of purified etum5 and epidermal growth factor (EGF) and group four were four rabbits with a corneal injure treated with EGF.

Our results showed that rabbits treated with purified eTum5 had a minor time of decrease of neovascularization, and the group treated with purified eTum5 in combination with EGF showed a complete corneal recovery, allowing corneal scars to be less opaque and of a minor size compared to untreated animals. We proposed that eTum5 can be used as a complementary treatment for improving the results of keratoplasties with corneal grafts and conjunctival flaps used for the prevention of iris prolapses and corneal liquefaction, allowing them to conservate the visual and tectonic functions.

Key words: corneal healing, corneal angiogenesis, tumstatin, etum5, collagen

# **INTRODUCCIÓN**

El ojo es el órgano de la visión, comprende al globo ocular, al nervio óptico y ciertas estructuras asociados al mismo como la fascia orbitaria, los músculos, los párpados, la conjuntiva y el aparato lagrimal. El ojo consta de tres túnicas concéntricas en cuyo interior se encuentran el humor acuoso y el humor vítreo, ambos son medios refringentes; la túnica nerviosa es la retina, la túnica vascular está formada por el iris, la coroides y cuerpo ciliar y la túnica fibrosa está compuesta por la esclera y la córnea. [1]

## **1.1 ESTRUCTURA CORNEAL**

La córnea es la parte anterior transparente de la túnica fibrosa del globo ocular. En los animales domésticos es una elipse horizontal de 0.8 a 2 mm de espesor según la especie. Las funciones primarias de la córnea son mantener la estructura del ojo y los contenidos intraoculares, la refracción de la luz (por su curvatura) y la transmisión de la luz (por su transparencia). La córnea está compuesta por un epitelio, estroma, membrana de Descemet y endotelio. [2]

### **1.1.1 Epitelio**

Mantiene la humedad y la claridad de la superficie corneal y la conserva libre de debridados, previene la penetración de contaminantes bacterianos, fúngicos o virales al estroma y actúa como una barrera que previene que los fluidos de las lágrimas entren al estroma. El epitelio anterior tiene una arquitectura típica de epitelio estratificado escamoso compuesto por células superficiales aplanadas, 2 o 3 capas de células intermedias y una capa basal de células columnares y cambia cada 7 días mediante mitosis. [3]

Las células basales se diferencian entre células planas o alares mientras se mueven; son más activas metabólicamente que los otros tres tipos de células

epiteliales, la proliferación celular por mitosis ocurre dentro de las células basales columnares para proveer una fuente para reemplazar a las células de las capas epiteliales más superficiales. Las células intermedias son células transicionales entre las células basales y las células aplanadas superficiales. Las células superficiales forman dos capas de células planas cuyas uniones estrechas crean una membrana semipermeable de alta resistencia; las células se mantienen comunicadas mediante uniones estrechas. Estas células epiteliales superficiales están cubiertas por microvellosidades que interdigitan con el glicocálix de la película lagrimal, lo que les permite unir las lágrimas al tejido estable de la córnea y el transporte de nutrientes. [4]

El oxígeno es requerido para el metabolismo normal del epitelio, el cual consume aproximadamente  $2-4 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{hr}$ . El oxígeno atmosférico es usado cuando los párpados se abren, mientras que el oxígeno difuso en los vasos sanguíneos limbales se emplea cuando los ojos están cerrados. La glucosa y el glucógeno son los substratos primarios para la producción de energía. Los líquidos (a través del estroma) suplementan el 90% de la glucosa necesaria para el metabolismo energético, el 10% restante proviene de las lágrimas y vasos sanguíneos limbales. Existe una gran reserva de glucógeno en el epitelio para condiciones anaeróbicas o en respuesta de trauma cuando aumentan las demandas de energía. La mayoría de la glucosa es metabolizada vía glicolítica en piruvato y éste es empleado para la producción de ATP a través del ciclo de Krebs. Durante condiciones anaeróbicas (cuando los párpados están cerrados) el piruvato es convertido en lactato. La acumulación excesiva de lactato puede resultar en hidratación corneal (e inflamación) debido a presión osmótica. La vía de la pentosa fosfato produce NADPH y se ha encontrado que funciona en el epitelio pero provee solo una mínima parte del metabolismo. El NADPH producido es importante en el control de radicales libres pero no se le ha encontrado ningún otro papel en la salud de la córnea. [5]

La inervación corneal es vía la rama oftálmica del nervio trigémino. Los nervios entran al estroma medio por fibras mielinizadas originadas en el limbo, pero a medida que se mueven a través de la córnea la mielina se pierde. Los nervios viajan dentro de la porción central de la córnea en un patrón cruzado y terminan en un plexo nervioso, justo por debajo del epitelio y esta es la razón por la que las abrasiones epiteliales superficiales pueden resultar más dolorosas que las heridas profundas. [6]

La estimulación de las fibras nerviosas corneales produce el parpadeo del ojo por el reflejo corneal (V y VII), mientras que una gran irritación del nervio corneal ocasiona aumento de lagrimeo. Se ha demostrado que una irritación de la conjuntiva puede aumentar la producción de mucina por las células de goblet. [7] El reflejo axonal producido por la estimulación del nervio corneal ocasiona una respuesta humoral, donde se produce liberación de prostaglandinas, histamina y acetilcolina; lo que a su vez, ocasiona miosis, hiperemia e hipotensión (signos conocidos clínicamente como uveítis). [8]

Cuando el epitelio sufre una abrasión, la respuesta inicial es la retracción de los extremos de la herida, después de 4 horas comienza la migración celular, en la cual participa el citoesqueleto de actina. La velocidad de la migración puede ir de 8-30  $\mu\text{m}/\text{hora}$  (aproximadamente 0.9-2 mm/día) y este proceso llenará el vacío celular. La división celular activa servirá para completar todas las capas celulares, siendo indispensable la vía glicolítica para la producción de energía. Así, el epitelio regenerado deberá estar firme para unirse a la membrana basal; la curación tardará más cuando la membrana basal se encuentre destruida. [9]

Un epitelio corneal intacto es esencial para que la córnea funcione adecuadamente, por lo que todas las lesiones en el epitelio deben de regenerarse en un periodo de tiempo razonablemente corto para que exista rehabilitación visual. Las heridas epiteliales que no cicatrizan permiten la existencia de complicaciones mayores como ulceración del estroma y perforación corneal. [10]

### **1.1.2 Estroma**

El estroma es la sustancia propia y ocupa aproximadamente el 90% de la cornea; es una estructura con múltiples capas compuesta por fibras de colágeno paralelas arregladas para llenar por completo el diámetro de la córnea. El estroma está compuesto 75-80% de agua y 20-25% de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. El colágeno forma el 71% del peso seco de la córnea y es una proteína estructural que tiene glicina en su cadena polipeptídica y produce estructuras hexagonales mediante la asociación de las cadenas helicoidales que se unen a través de enlaces covalentes formando macromoléculas con gran tensión, generalmente se encuentran 3 cadenas unidas. La producción y mantenimiento de las fibras de colágeno se realiza mediante fibroblastos especializados llamados queratocitos o corneocitos que se distribuyen por todo el estroma y producen nuevas fibras de colágeno. [11]

Se han definido diferentes tipos de colágeno dependiendo del tipo de cadenas polipeptídicas. Cada tipo de colágeno se basa en la composición de tres cadenas alfa que pueden ser iguales o diferentes, diferenciándose por sus secuencias de aminoácidos y sus propiedades fisicoquímicas como la unión entre sus cadenas. Existen 14 diferentes formas de colágeno reconocidos en el cuerpo y también la cantidad y tipo de colágeno varía de acuerdo a la especie. El colágeno en el estroma corneal contiene al menos 5 tipos diferentes, el tipo I es el más común y forma las fibras pequeñas estriadas, el tipo VI se asocia con la matriz interfibrilar, formando una red alrededor de las fibras lo cual es importante durante la reparación y curación corneal. El colágeno tipo V es responsable de la formación de las fibras pequeñas de diámetro uniforme (25 nm). Los tipos III y XII son importantes en el desarrollo. [12] En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de los tipos de colágeno y donde son encontrados en la córnea.

**Tabla 1: Localización de los glicanos y de los diferentes tipos de colágeno en la córnea**

Localización	Tipo de colágeno	Glicanos
Epitelio anterior/ membrana basal	IV, VI y VII	Laminina, fibronectina, hialuronatos
Estroma anterior	I, III, V y VI	Heparán sulfato
Estroma	I, III, V, VI y XII	Condroitin 6 y 4 sulfatos, dermatan sulfatos
Membrana de Descemet	I, III, IV, V, VI y VIII	Laminina, fibronectina, componente P y heparán sulfato

Las células que componen al estroma son fibrocitos (queratocitos) que se distribuyen por todo el estroma y producen nuevas fibras de colágeno. Las glicoproteínas son proteínas que contienen azúcares simples y en la córnea se han encontrado laminina en las membranas basales y fibronectina en la membrana basal y en el suero. Los proteoglicanos son proteínas que contienen una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs). La mayoría de los proteoglicanos en el estroma son queratan sulfato (65%) y dermatan/condroitín sulfato (30%). El condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato y el dermatan sulfato se encuentran en el estroma; mientras que el hialuronidato se encuentra embriológicamente y en cicatrices y el heparan sulfato se encuentra en la membrana de Descemet. Las células nucleadas, los queratocitos y los precursores de fibroblastos son distribuidos por toda el área a través del estroma con una gran densidad. [13]

Las fibras de colágeno junto con los proteoglicanos y sus GAGs asociados conforman el 15-25% del estroma y actúan como el principal soporte de la córnea;

estas fibras de colágeno forman la matriz con una población especializada de proteoglicanos dentro del estroma corneal. La córnea está formada por agua en un 75-80% y está relativamente deshidratada en comparación con otros tejidos, este estado de deshidratación se conoce como desturgencia y es en parte la función del epitelio y el endotelio. Estas células mueven agua activamente afuera del estroma mediante bombas dependientes de energía  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . La presencia de ciertos GAGs permite aumentar la efectividad de la bomba, por lo que algún cambio en la población de estos, algún daño significativo en el epitelio o endotelio o alguna presión externa en la córnea pueden causar un cambio en la organización perfecta de colágeno provocando opacidad en la córnea. Existen otros mecanismos para producir desturgencia como el intercambiador de bicarbonato empleado por la anhidrasa carbónica en donde el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  que se localizan extracelularmente se meten al humor acuoso y a las lágrimas. [14]

En humanos y primates, el estroma más anterior tiene una zona delgada libre de células correspondiente en su localización a la membrana limitante interna también conocida como membrana de Bowman. Las fibras de colágeno en esta zona están dispersas y son más pequeñas en su diámetro. Esta membrana no se ve en la mayoría de los animales, en aves y en humanos se considera como parte del estroma y de grosor mide 10-15  $\mu\text{m}$  y es relativamente acelular compuesta por fibras de colágeno de varios tipos. [15]

### ***1.1.3 Membrana de Descemet***

Es la membrana basal del endotelio, esta membrana limitante posterior es un paquete denso homogéneo arreglado de fibras de colágeno en una sustancia de glicoproteínas presentando muchas de las propiedades de las membranas basales convencionales en las que se incluyen la elasticidad y la resistencia a la hidrólisis enzimática y química; siendo resistente a las enzimas que desnaturalizan al estroma y es una barrera significativa en contra de las úlceras profundas con riesgo a perforarse. La membrana está siempre bajo cierta tensión por lo que cuando es cortada se rompe o se enrolla. En la periferia se divide en tres series de fibras, las fibras anteriores se unen a la esclerótica, las centrales dan inserción

al músculo ciliar y las posteriores pasan al interior del iris formando el ligamento pectíneo del iris. Esta membrana termina en el ápice de la red trabecular en la región limbal. [16]

#### **1.1.4 Endotelio**

Está compuesto por una capa delgada simple de células escamosas poligonales cuya cara interna está humectada por el humor acuoso y su función es aumentar la no turgencia de la córnea; presenta uniones gap entre sus células y de esta manera se permite que entre líquido al estroma. El número de células endoteliales disminuye con la edad pero las células tienen gran capacidad de reserva. Sus células escamosas tienen núcleos alargados, mientras que los márgenes laterales de estas células se interdigitan extensivamente, además su citoplasma contiene muchas mitocondrias. [17]

El transporte de iones a través de la membrana celular de las células endoteliales permite el cambio de presión osmótica. La Na<sup>+</sup>/K ATPasa es una proteína integral de membrana y se localiza en el endotelio lateral de la membrana celular. La bomba de Na<sup>+</sup>/K produce un transporte neto de sodio y de iones de bicarbonato desde el estroma hacia el humor acuoso. El gradiente osmótico generado por el transporte activo de estos iones saca agua del estroma y lo lleva dentro del humor acuoso. La Na<sup>+</sup>/K ATPasa se localiza en la parte lateral de la membrana celular endotelial. La glucosa y el oxígeno suplementados por el humor acuoso son necesarios para que funcione correctamente la Na<sup>+</sup>/K ATPasa. [18]

Durante la reparación del epitelio corneal ocurren dos procesos principalmente: la migración celular hacia el área afectada y la actividad mitótica para reconstruir el número normal de células epiteliales. Esta migración ocurre casi inmediatamente después de una abrasión en la córnea y la división celular intenta regresar al epitelio a su grosor normal; aunque pequeños defectos epiteliales se pueden reparar por completo sin multiplicación celular, simplemente

mediante migración celular dentro de las primeras 24 horas. Cuando es necesario el reemplazo de una porción considerable del epitelio anterior, este mismo o el limbo se convierten en la fuente primaria para la producción de nuevas células. Desafortunadamente, las células endoteliales no responden a la pérdida de células tan rápido como las epiteliales; las células endoteliales son incapaces de mantener una capa funcional cuando existe distrofia o algún otro daño causado por trauma, cirugía, glaucoma, luxación de cristalino, etc., observándose edema que puede ser progresivo y ocasionar una enfermedad corneal crónica o descompensación.[19]

Una peculiaridad del endotelio corneal es su tendencia a presentar metaplasia fibroblástica, en la cual el endotelio adquiere una capacidad proliferativa y migratoria de células endoteliales que crean el fenómeno de producción de una membrana fibrosa retrocorneal que delinea la córnea posterior y que puede migrar a través del ángulo de filtración o sobre el iris atravesando la pupila, lo que ocasiona lamentables consecuencias en el ojo. Sin embargo, es difícil determinar cuáles de estas células fibroblásticas realmente derivan del endotelio corneal o si también representan la migración de fibroblastos del estroma corneal a través de un defecto en la membrana de Descemet; aunque en la mayoría de las ocasiones ambas poblaciones de células contribuyen. De cualquier forma el endotelio corneal metaplásico continúa produciendo al menos un poco de colágeno con configuración de membrana basal. [20]

### ***1.1.5 Transparencia corneal***

Los factores anatómicos que contribuyen a la transparencia corneal son:

1. ausencia de vasos sanguíneos
2. epitelio no queratinizado mantenido por una película precorneal
3. falta de pigmentación
4. tamaño y organización de las fibras de colágeno del estroma [21]

La teoría de la transparencia corneal fue propuesta en 1957 por Maurice y se basa en que las fibras de colágeno son regulares en colocación y en tamaño y este arreglo permite el paso de luz por la córnea sin obstrucciones, cuando la córnea presenta edema el arreglo regular de las fibras se rompe y se pierden también proteoglicanos. El estroma posterior contiene mayor cantidad de queratan que de dermatan sulfato; este queratan sulfato es capaz de absorber agua más fácilmente y prevenir la acumulación de fluido. Cuando la córnea se inflama los GAGs no pueden absorber el fluido y son empujados hacia fuera lo que ocasiona mayor acumulación de líquidos. Por otra parte, cuando ocurre un daño al epitelio o endotelio, el fluido se mete dentro del estroma separando las fibras de colágeno y dando a la córnea una coloración azul. [22]

#### ***1.1.6 Película precorneal***

La córnea cuenta con una película precorneal que la cubre y la provee de nutrientes y se compone de tres capas; su capa externa o superficial está compuesta de una sustancia aceitosa, principalmente colesterol proveniente de las glándulas de Meibomio y su función es retardar la evaporación y estabilizar la superficie lagrimal. La capa media es el componente acuoso producido por las glándulas lagrimales orbitaria y nictitante conteniendo alrededor de 70 componentes diferentes como proteínas, sales inorgánicas, glucosa, urea, vitaminas y factores de crecimiento, su función es proveer oxígeno, nutrientes y lubricación a la córnea. La capa interna o profunda está compuesta por una sustancia mucosa (mucina) que es secretada por las células caliciformes de la conjuntiva y sirve para unir las lágrimas acuosas al epitelio corneal que es hidrófobo. [23]

## ***1.2 REPARACIÓN CORNEAL***

Tradicionalmente la reparación de una herida corneal se divide en los daños que afectan solo al epitelio y los que resultan en una pérdida substancial del estroma. Aunque no existe una profundidad de daño específica que se considere como crítica, de cualquier manera existe una gran diferencia en la manera de curación de la córnea dependiendo de la naturaleza del daño y la cantidad de inflamación que este ocasione. [24]

El ojo es un sitio inmunológicamente privilegiado y por eso no hay linfocitos residentes, ni células procesadoras de antígenos o drenaje linfático, el rompimiento de la barrera sangre-ojo resulta en la liberación de antígenos libres y células del sistema inmune entre los tejidos oculares y extraoculares. Las secuelas de la inflamación incluyen la formación de adherencias, membranas fibrinopupilares y atrofia. La presencia de fibrina a lo largo de las estructuras de las cámaras anterior y posterior ocasiona la formación de adhesiones iridocorneales (sinequias anteriores) o iridolenticulares (sinequias posteriores). Si la sinequia posterior causa algún bloqueo pupilar, obstrucción o salida de humor acuoso a través de la pupila ocasionando abultamiento del iris anterior (iris bombé) que a su vez puede formar sinequias anteriores periféricas y compresión del proceso ciliar produciendo glaucoma secundario. [25]

Los tipos de infiltrados celulares son útiles para determinar la causa de la inflamación ya que existen diferencias regionales entre las reacciones en el segmento anterior comparadas con las reacciones del segmento posterior. El tipo de reacción y células inflamatorias se clasifica como neutrofílica o linfocítica-plasmática supurativa y granulomatosa o piogranulomatosa. La inflamación neutrofílica se caracteriza por la presencia de neutrófilos y tejido necrótico, es una respuesta aguda y por lo general se produce en respuesta a infecciones bacterianas o septicemia. [26]

La curación corneal involucra la transformación de fibroblastos, la señalización intracelular (entre células epiteliales y del estroma a través de citocinas, neuropéptidos y factores de crecimiento), la acción de las metaloproteinasas de la matriz y la protección del tejido al daño por radicales libres. [27]

Existen dos fases en el proceso de curación corneal, una fase inicial que involucra al epitelio y al endotelio y una fase tardía secundaria que ocasiona el rompimiento de éstas dos capas. El proceso de curación del estroma está relacionado con el estadio de curación del endotelio y del epitelio, después de la fase corta de curación inicial que termina 48 horas después del daño, la fase tardía es más lenta mostrando una acentuada apariencia patológica entre las 3 y 4 semanas después del trauma. [25]

El epitelio normal corneal cambia cada 7 días con un aumento en la población residente dentro de las células basales del epitelio. La población celular en replicación permanente se encuentra en la unión del epitelio corneal y conjuntival cerca del limbo. Cuando se produce un daño, la reacción inmediata (una hora) en la córnea es el aplanamiento y deslizamiento de células viables adyacentes, posteriormente mediante células basales los defectos se cubren en 72 horas siempre y cuando la lámina basal esté intacta. Después de una herida simple, la actividad mitótica alcanza su máximo a los 10 días, disminuyendo rápidamente después de ese lapso. [28]

### ***1.2.1 Citocinas***

La curación de un defecto corneal envuelve una interacción compleja entre los tejidos afectados con células inflamatorias y está modulado por citocinas específicas que incluyen al factor de crecimiento epidérmico, a la interleucina 1 y factores de crecimiento para fibroblastos. En adición, las células inflamatorias juegan un papel integral en el proceso de curación normal corneal, pues existe un

infiltrado central corneal de neutrófilos pocos minutos después de ocurrido el daño a la córnea y los macrófagos participan en las fases tardías de curación. La ruta primaria por la cual estas células alcanzan el sitio de la herida es por vía de la película lagrimal precorneal y la actividad de estas células está regulada por una interacción compleja de citocinas que incluyen a las ya mencionadas y al factor estimulador de la colonización de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Además, los productos secretados extracelularmente por los macrófagos regulan la síntesis de colágeno y la angiogénesis en la córnea. La migración de células endoteliales y la proliferación y modificación de la matriz extracelular son las encargadas de la angiogénesis. [29]

A nivel molecular, la curación de una herida es regulada por una variedad de citocinas producidas localmente, las más importantes son el factor de crecimiento fibroblástico básico ( $\beta$ FGF), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor beta de crecimiento transformador ( $TGF\beta$ ), factor de crecimiento derivador de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Las acciones de cada uno están influenciadas por el contexto del lugar en donde ocurran, pero las acciones usuales se presentan en la siguiente tabla: [30]

**Tabla 2: Citocinas involucradas en la curación de una herida corneal**

Factor	Principales fuentes	Principales blancos	Principales funciones
EGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Película lagrimal</li> <li>- Células epiteliales</li> <li>- Plaquetas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Epitelio</li> <li>- Queratocitos</li> <li>- Epitelio iridociliar</li> <li>- Endotelio corneal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- FGF vía activador del plasminógeno</li> <li>- Síntesis de fibronectina</li> <li>- Células mitógenas si el contacto es prolongado</li> </ul>
$\beta$ FGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inactivo en matriz, lámina basal</li> <li>- RPE (epitelio pigmentado de la retina)</li> <li>- Bastones</li> <li>- Endotelio corneal</li> <li>- Macrófagos</li> </ul>	<p>Virtualmente todas las células tienen receptores</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Angiogénesis</li> <li>- Fibroplasia</li> <li>- Mitógeno para el RPE, células de Müller</li> </ul>
TGF $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acuoso</li> <li>- Vítreo</li> <li>- Neuronas retinales</li> <li>- Macrófagos</li> <li>- Plaquetas</li> </ul>	<p>Virtualmente todas las células tienen receptores</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibe mitosis epitelial y endotelial</li> <li>- Fibroplasia</li> <li>- Mitógeno vascular endotelial</li> <li>- Supresor de linfocitos</li> <li>- Inhibe plasminógeno</li> </ul>
PDGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Macrófagos</li> <li>- Plaquetas</li> </ul>	<p>Todas las células, especialmente mesenquimatosas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Síntesis de colágeno, maduración</li> <li>- Mitosis glial</li> </ul>
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retina</li> <li>- Neoplasmas</li> </ul>	<p>Endotelio vascular</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Angiogénesis</li> <li>- Aumento de la permeabilidad</li> </ul>

Algunas heridas producen la metaplasia fibroblástica del endotelio corneal, ocasionando algunas veces membranas fibrosas retrocorneales. La adhesión al estroma desnudo es en un inicio mediante la vía de fibronectina y laminina producidas por los fibroblastos reactivos del estroma, absorbidos por leucocitos y por el mismo epitelio. En 3 días el epitelio habrá producido una nueva membrana basal, aún en los casos en los que la membrana basal original esté presente, la regeneración epitelial espera la reconstrucción del tejido del estroma, que ocurre mediante fibroplasia y angiogénesis. El estroma corneal necesita reclutar angioblastos del limbo y por eso el proceso completo de la reparación del estroma corneal es muy tardado comparado con los tejidos vascularizados. Por lo general, los angioblastos comienzan a moverse de las vénulas al limbo en las siguientes 24 horas después de un daño corneal, éstos vasos migran en un patrón laminar dentro del estroma moviéndose aproximadamente 1 mm por día. [31]

El tejido de granulación verdadero se forma solo después de que los vasos sanguíneos han migrado desde el limbo hasta el sitio del daño estromal, debajo del tejido de granulación, el epitelio migrará, proliferará y se adherirá. Como en todas las heridas los fibroblastos producen una secuencia de tipos de matrices de colágeno y pro colágeno que eventualmente se normalizan dentro del estroma, los vasos fantasmas pueden persistir como marcas de atrofia de vascularización. La falta de una nutrición adecuada es un factor importante para la curación corneal, la córnea es nutrida por absorción de la película lagrimal y de la cámara anterior y difusión de la red vascular del limbo [32]

El pronóstico para cualquier actividad angiogénica dentro del estroma es reservado. La presencia de vasos sanguíneos en la córnea más centrales que en el limbo son indicativos de enfermedad corneal y las condiciones para producir la vascularización pueden ser locales o generalizadas. [33]

### ***1.2.2 Migración epitelial***

La reparación del epitelio se regula mediante la formación de una matriz extracelular provisional, las células del estroma se multiplican mediante mitosis y migración de los queratocitos remanentes, algunos de los cuales son activados para ser transformados en miofibroblastos. La mitosis y la migración de los queratocitos son mediadas por citocinas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, liberado por células epiteliales corneales. [34]

Las células que persisten después de un daño al epitelio y/o el estroma son los fibroblastos y los miofibroblastos corneales, los cuales participan en la remodelación del estroma a través de la producción y reabsorción de colágeno y la producción de glicosaminoglicanos. La matriz provisional corneal rica en fibronectina y condroitin sulfato promueve la migración de fibroblastos dentro de la herida. La expresión de la  $\alpha$ -actina de músculo liso (SMA), una proteína específica de músculo liso se ha usado como un marcador químico de la transformación de miofibroblastos. Se sabe que en la curación de heridas por incisiones los queratocitos corneales adyacentes se transforman en miofibroblastos con fenotipo de músculo liso en respuesta al daño corneal. Las heridas que dañan la membrana basal, resultan en la generación de mayor número de miofibroblastos que en las heridas en donde no se daña la membrana. El inicio de la contracción de una herida se correlaciona con la formación de filamentos de actina organizados intracelulares (f-actina) y de fibronectina extracelular que se vuelve organizada a través de planos lamelares paralelos durante el proceso de contracción de la herida. [35]

La reparación fibrótica en la córnea es mediada por interacciones entre el epitelio y el estroma. El mayor mediador es el Factor de crecimiento transformador (TGF- $\beta$ 2). El epitelio corneal es el responsable de controlar la activación fibrótica; cuando se pierde el epitelio pero se preserva la membrana basal, las células estromales en la región de la herida experimentan apoptosis, mientras que los queratocitos periféricos se vuelven activos y entran al ciclo de la

célula. Más que el estroma hiper celular y la acumulación de la matriz extracelular que se desarrollan durante la reparación fibrótica, el resultado es la regeneración mitótica con el mantenimiento de la transparencia corneal. En contraste con la reparación fibrótica corneal, el TGF- $\beta$ 2 permanece localizado en epitelio y nunca se detecta en el estroma durante la parte regenerativa de la curación de una herida cuando la membrana basal es preservada; la falta de este factor en el estroma explica la falla de las células estromales para expresar SMA después de la pérdida epitelial. [36]

Otro mediador de la reparación corneal es la interleucina 1 (Il-1), liberada desde el epitelio ante un daño e induce suicidio autócrino en los queratocitos al estimular la producción del mediador de la apoptosis el ligando de Fas y los queratocitos al mismo tiempo, transmiten esta señal a otros queratocitos a través de interconexiones en el estroma.

Las interacciones célula-célula mejor caracterizadas involucradas en la homeostasis corneal son las interacciones epitelio-estroma mediadas por los sistemas de receptores del factor de crecimiento de hepatocitos y de receptores del factor de crecimiento queratinocítico. Estos mediadores en la córnea se expresan en los queratocitos y no en el epitelio; ellos regulan la diferenciación celular epitelial, la proliferación y la movilidad y son expresados y secretados por los queratocitos en bajos niveles para mantener la homeostasis. [37]

#### ***1.2.4 Metaloproteinasas***

La salud de la córnea se ve influenciada por el humor acuoso, la presión intraocular, los párpados y la película lagrimal. La película precorneal contiene proteínas que contribuyen a la salud de la córnea o aumentan los mecanismos de defensa. Estas proteínas incluyen a las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y proteinasas séricas como la elastasa neutrófila, así como inhibidores de las proteinasas como los inhibidores de tejidos de MMPs (TIMPs),  $\alpha$ 1-inhibidor de

proteínasa,  $\alpha$ 2-macroglobulina, factores de crecimiento y citocinas (interleucina-1 e interleucina-8). La capa acuosa de la película lagrimal también proporciona nutrientes (agua, glucosa y electrolitos) a la córnea avascular y facilita la transferencia de oxígeno atmosférico. [38]

Las metaloproteinasas de la matriz son una familia de enzimas proteolíticas dependientes del calcio y del zinc incluyendo gelatinasas, elastasas y estromalinas que degradan componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal, demostrando actividad en contra del colágeno tipo IV, V y VII, son secretadas predominantemente por los fibroblastos del estroma corneal y por las células epiteliales y leucocitos polimorfonucleares (PMN). Las MMPs se clasifican en base a su sustrato y se cree que tienen una función de sobrevivencia en la córnea normal, catalizando la degradación de moléculas de colágeno que ocasionalmente se dañan. [39]

La elastasa neutrófila es la proteínasa sérica más abundante y es secretada por leucocitos PMN, demuestra actividad en contra del colágeno nativo tipo III y IV y de componentes de la matriz extracelular del estroma corneal como laminina, fibronectina y heparan sulfato. La actividad de las enzimas proteolíticas (MMPs y EN) está normalmente balanceada por factores inhibitorios de proteasas como la  $\alpha$ -1 antitripsina y la  $\alpha$ -2 macroglobulina que sirven para prevenir la excesiva degradación del tejido normal sano. Las cantidades excesivas de proteasas crean un desbalance entre las proteasas y sus inhibidores causando degradación patológica de colágeno y de proteoglicanos en la córnea. Los microorganismos, las células inflamatorias, células epiteliales corneales y fibroblastos producen y liberan enzimas proteolíticas. [40]

La expresión de las MMPs es activada durante la inflamación en respuesta a citocinas, hormonas, factores de crecimiento y oncógenos. Existen dos importantes familias de MMPs que afectan a la córnea, las MMPs-2 y las MMPs-9, importantes para la remodelación y degradación del colágeno del estroma corneal.

El normalizar la actividad proteolítica en la película lagrimal debe ser un objetivo importante en el tratamiento de úlceras corneales, por lo que se recomienda el empleo de inhibidores para reducir la progresión, acelerar la curación epitelial y minimizar las cicatrices. [38]

Las alteraciones en el proceso de curación normal después de una herida corneal pueden tener un pronóstico indeseable como una perforación corneal. También los lípidos tienen un papel importante en el proceso inflamatorio complejo que ocurre después de una herida corneal. Mientras que algunos lípidos son mediadores como la lipoxigenasa que se deriva del ácido araquidónico y el ácido 12-hidroxiicosatetranoico (12[S]-HETE y 15[S]-HETE), que actúa como un segundo mensajero para promover la proliferación celular y se involucra en la síntesis de otras moléculas que suprimen la inflamación; otros como el factor activador de plaquetas (PAF), tiene acción a través de receptores específicos, teniendo un papel importante durante la inflamación corneal crónica o sostenida (como en quemaduras químicas), y contribuye a la destrucción celular y neovascularización, además de que es un potente inductor de las MMP que degradan a la matriz extracelular. [35]

### ***1.3 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF)***

El EGF es una proteína de señalización (citomoduladora) descrita por Cohen en 1962 a partir de la glándula submaxilar del ratón, se conoce también con el nombre de urogastrona y contiene 53 aminoácidos.[41] Tiene acción mitogénica sobre células epiteliales y fibroblastos, las células dianas del EGF las constituyen aquellas derivadas del ectodermo, como la córnea, epidermis, hígado y páncreas. Su efecto biológico consiste en la modulación de la proliferación celular por medio de la activación del receptor tirosina cinasa del EGF y la proteína cinasa C. [42]

La curación de las heridas es un proceso localizado que involucra inflamación, migración y mitosis de la célula, neovascularización y regeneración de la matriz extracelular. Las acciones de las células del área herida pueden estar reguladas por la producción local de factores de crecimiento peptídicos, los cuales influyen a dichas células mediante un mecanismo autócrino y parácrino. El EGF es muy importante en la curación de heridas corneales, donde los receptores a este polipéptido son expresados por muchos tipos de células como fibroblastos, queratocitos, células endoteliales vasculares y epiteliales y es sintetizado en células involucradas en la curación de heridas, incluyendo plaquetas, queratocitos y macrófagos activados. [43]

Las capas que forman a un epitelio intacto son esenciales para que la córnea funcione adecuadamente y los daños producidos a este epitelio deben de regenerarse adecuadamente en un periodo razonable de tiempo para permitir la rehabilitación visual. Las heridas del epitelio corneal que no se curan pueden permitir complicaciones mayores como ulceración del estroma o perforación corneal. Existen pocas opciones para tratar a los pacientes que no presentan una adecuada curación corneal con terapias convencionales, se puede aplicar vitamina A o factores de unión celular como la fibronectina. [44] La presencia de receptores específicos del EGF en células epiteliales sugiere que este factor mitogénico puede tener un papel importante en la curación de heridas del epitelio normal. El efecto en los queratocitos no se conoce, pero éstos han demostrado receptores para EGF y responden mitogénicamente. El EGF ha demostrado que estimula también la síntesis de fibronectina mediante células epiteliales, por ello, la combinación del EGF con fibronectina provee un tratamiento efectivo para daños epiteliales severos que involucran daño a la matriz extracelular. [45]

Se ha demostrado que el EGF promueve la regeneración del epitelio en heridas corneales en modelos de queratectomías ya que induce hiperplasia y proliferación celular para restablecer el estroma corneal desnudo y

desnaturalizado. Una combinación del EGF con fibronectina promueve el cierre de defectos epiteliales después de quemaduras corneales por álcalis. [46]

El EGF se ha utilizado para promover la reparación de heridas corneales *in vivo* e *in vitro* en el modelo animal del conejo sobre todo en heridas ocasionadas por quemaduras, estos experimentos incluyen la cuantificación paralela de la curación del epitelio, el estroma y el endotelio corneal. Después del proceso de curación inicial comienza una cicatrización mas lenta mostrando la mayor cantidad de cambios patológicos entre las 3 y 4 semanas posteriores al trauma. [47]

#### **1.4 ANGIOGÉNESIS**

La matriz extracelular es una red compleja de proteínas fibrosas, proteoglicanos y macromoléculas interconectadas dando soporte a las células y tejidos, contiene también láminas epiteliales y vasos sanguíneos en la membrana basal, la cual está compuesta predominantemente de colágeno tipo IV, laminina, enactina y proteoglicanos; esta estructura compleja juega un papel importante en la regulación de la proliferación celular, adhesión, migración, expresión genética y diferenciación. Proteínas específicas funcionales dentro de la membrana basal como la fibronectina y laminina regulan la angiogénesis. [48]

El colágeno tipo IV está organizado en dominios funcionales, el dominio 7S en el extremo amino terminal regula la asociación del colágeno con moléculas dentro de un tetrámero, el dominio NC1 en el extremo carboxilo promueve la selección individual de cadenas, asociación lateral y dimerización durante el ensamblaje de la matriz, regula la neovascularización promoviendo las interacciones integrina/células endoteliales y dirige el ensamblaje de la matriz de colágeno tipo IV dentro de la membrana basal subendotelial; por último la región central de tripe hélice del colágeno tipo IV promueve las interacciones celulares mediante la unión con integrinas  $\beta_1$ . [49]

Las integrinas son una familia de receptores de la superficie celular, la mayoría de estas regulan la adhesión célula/sustrato mediante su unión con proteínas de la matriz extracelular (MEC); las integrinas  $\beta_1$  regulan las interacciones entre células y la MEC, las integrinas  $\beta_2$  están restringidas a los leucocitos y las de tipo 3 son exclusivamente expresadas en plaquetas. Las integrinas actúan promoviendo el crecimiento y retardan la muerte celular, incluyendo células tumorales. En cooperación con los factores de crecimiento, inducen la proliferación mediante la transcripción de ciclinas. La integrina  $\alpha_5\beta_3$  está asociada con células vasculares angiogénicas y promueve la sobrevivencia celular endotelial. [50]

La angiogénesis o crecimiento de nuevos vasos sanguíneos tiene un papel importante en procesos como el desarrollo, la reparación de heridas y la inflamación. Sin embargo, la angiogénesis también contribuye a condiciones patológicas, como en el caso del ojo, en el que en ojos normales no existe angiogénesis, por lo que cuando esta prolifera manifestándose como neovascularización corneal, es una condición asociada con inflamación o infecciones severas en la superficie ocular originándose cuando se alcanza un equilibrio entre los factores angiogénicos (factor de crecimiento fibroblástico y factor de crecimiento vascular endotelial) y las moléculas antiangiogénicas (angiostatina, endostatina) en la córnea. La angiogénesis está caracterizada por la invasión, migración y proliferación de músculo liso y células endoteliales. [51]

En el ojo los procesos degenerativos o la inflamación excesiva producen la formación de una excesiva y acelerada angiogénesis por elevación del factor de crecimiento endotelial vascular ocasionando con esto pérdida de la visión, por lo que en este trabajo se busca bloquear la formación de nuevos vasos sanguíneos sin afectar los vasos ya establecidos. [52]

### **1.4.1 Tumstatina**

Diversas estrategias diferentes, incluidas el bloqueo de los receptores del factor de crecimiento endotelial, la aplicación de drogas activadas dentro de compuestos citotóxicos mediante condiciones de hipoxia y la aplicación de moléculas locales y sistémicas angiostáticas, han sido sugeridas para inhibir el proceso de angiogénesis. Los componentes de la membrana basal se ven involucrados en regular la angiogénesis, que es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos necesaria para el crecimiento de tumores y metástasis, estos eventos son mediados por agentes pro-angiogénicos, recientes estudios han demostrado que inhibidores endógenos de la angiogénesis pueden regular sistemáticamente esta expansión. [53]

Diferentes pequeñas moléculas, han demostrado tener potentes propiedades angiostáticas; tales como la endostatina (un componente del cartílago tipo XVIII de mamíferos) y la angiostatina (un fragmento interno de 38 kDa del plasminógeno) han demostrado actividad angiostática *in vitro* y en modelos de xenotransplantes en ratones. Recientemente, una familia de moléculas angiostáticas derivadas de las subunidades  $\alpha$  del colágeno tipo IV de los mamíferos como la canstatina, la tumstatina y el arresteno han demostrado propiedades angiostáticas similares a la endostatina y la angiostatina. [54]

La tumstatina es una pequeña proteína formada por la unión de la subunidad  $\alpha$ -3 del colágeno tipo IV y ha demostrado tener potentes efectos angiostáticos siendo un potente iniciador de la apoptosis en células endoteliales sin efectos en no endoteliales, inhibiendo la proliferación y migración de células endoteliales vasculares. La tumstatina posee un extremo N-terminal antiangiogénico (aminoácidos 54-132) y un extremo C-terminal con actividad anti tumoral (aminoácidos 185-203). [55]

Un fragmento de la tumstatina llamado Tum5 localizada dentro de la secuencia de los aminoácidos 54-132 ha demostrado propiedades angiostáticas,

el péptido Tum5 interactúa con el receptor de la integrina  $\alpha V\beta 3$  localizada en las células endoteliales, la cual tiene un papel crítico en la angiogénesis y la supervivencia celular vascular. Tum5 que es la expresión de la proteína recombinante, inhibe la angiogénesis a través de su interacción con la integrina  $\alpha V\beta 3$  en células endoteliales de la misma manera que la tumstatina de cadena completa, predominantemente se une a la subunidad  $\beta 3$  de la integrina, su función como inhibidor de la angiogénesis es por regulación negativa de esta integrina en células endoteliales. [56]

## **JUSTIFICACIÓN**

La queratitis ulcerativa es una enfermedad común en el caballo, con un alto potencial para causar ceguera, ya que es capaz de progresar a perforación corneal en tan solo 24 horas, esta degeneración rápida del estroma es mediada por proteinasas endógenas y exógenas. La predisposición de los caballos a sufrir de úlceras corneales se debe a la posición lateral de los ojos en la cabeza, a las actividades físicas que realizan que se pueden considerar como agresivas, al medio ambiente que los rodea y a la microflora bacteriana. Esta última en condiciones de infección y de inflamación varía disminuyendo las bacterias Gram (+) y aumentando las Gram (-) además también frecuentemente se presenta la colonización por hongos que forman parte de la microflora conjuntival normal. [57]

Adicional a los factores mencionados, en la película precorneal de los caballos sanos existen metaloproteinasa de la matriz (MMP) que como se explicó anteriormente, son una familia de enzimas dependientes del zinc y del calcio demostrando actividad en contra del colágeno tipo IV, V y VII, secretadas por los fibroblastos del estroma corneal y por las células epiteliales y leucocitos polimorfonucleares (PMN). La elastasa neutrófila es la proteinasa sérica más abundante y es secretada por leucocitos PMN, presenta actividad en contra del colágeno nativo tipo III y IV y de componentes de la matriz extracelular del estroma corneal. En condiciones normales, las proteinasas endógenas están en equilibrio con sus factores inhibitorios como la  $\alpha$ -1 antitripsina y la  $\alpha$ -2 macroglobulina que sirven para prevenir la excesiva degradación del tejido normal sano, sin embargo en procesos patológicos como en la queratitis ulcerativa niveles excesivos de ciertas proteinasas permiten la rápida degradación del colágeno y de otros componentes de la matriz extracelular. [58]

Cuando las úlceras corneales se complican, pueden infectarse o formar abscesos profundos del estroma, produciéndose rápida degradación del estroma corneal ocasionando descemetocele y prolapsos de iris. El tratamiento contra

estas alteraciones incluye controlar la infección y tratar de disminuir las complicaciones intraoculares y la inflamación secundaria; cuando el tratamiento médico es insuficiente, se recomienda implementar métodos quirúrgicos como la colocación de un mandil conjuntival o un transplante de córnea, para intentar preservar el globo ocular y evitar la salida de los componentes intraoculares, provocando con esto también la llegada de nuevos vasos sanguíneos para lograr así que la córnea cicatrice. [33]

Las finalidades para realizar un transplante de córnea incluyen:

- 1) Función óptica con el propósito primario de restaurar la visión
- 2) Terapéutica con el propósito de controlar médicamente la enfermedad corneal refractaria
- 3) Tectónica para reestablecer la integridad estructural del ojo
- 4) Cosmética [57]

El propósito de realizar los mandiles conjuntivales y los transplantes de córnea (TPK- therapeutic penetrating keratoplasty) es reconstruir la integridad corneal perdida, remover y reemplazar el tejido necrótico que es la causa principal de uveítis, disminuir la colagenolisis y proveer tejido fibroso para soportar a la córnea desvitalizada. En ambos casos, se observa un aumento de vascularización durante la cicatrización corneal, produciendo cicatrices corneales muy grandes y opacas que pueden obstruir el eje pupilar interfiriendo así con la visión. [59]

La calidad óptica de la córnea con neovascularización (NV) se ve reducida a causa de los siguientes mecanismos:

- 1) Opacidad causada por las células sanguíneas que circulan en los canales vasculares
- 2) Arquitectura irregular de las paredes vasculares induciendo aberraciones
- 3) Alteraciones entre el espacio del colágeno del estroma y los vasos sanguíneos

- 4) Flama acuosa (infiltrados celulares), edema y depósitos de lípidos en el tejido permeable que rodea a los vasos sanguíneos
- 5) En el caso de pannus superficial, irregularidades en la superficie de la córnea [60]

La curación corneal de los injertos colocados contra procesos infecciosos en caballos requiere de alguna vascularización para que la infección pueda ser controlada. La vascularización da a la herida la fuerza y el soporte para llevar los antibióticos a la lesión, una cornea donada en la mayoría de los caballos tiene un papel más tectónico que óptico. [61]

La opacidad del trasplante observada en algunos casos exitosos de TPK puede ser una manifestación clínica de rechazo parcial del trasplante corneal. La presencia y el grado de vascularización y el tamaño y la localización de los trasplantes, pueden influenciar el rechazo de los mismos; esto se debe en parte a un privilegio inmunológico único que tiene la córnea; con vascularización corneal, los vasos linfáticos se infiltran con los vasos corneales, dando a los antígenos acceso directo a las ramas aferentes del sistema inmune. La presencia y el grado de vascularización corneal visto en caballos pueden estar asociados con el grado de opacificación después de TPKs. La córnea del caballo presenta una respuesta de curación fibrovascular muy pronunciada y posee propiedades de regeneración únicas como una excesiva vascularización y gran capacidad de fibrosis que parecen ser específicas de especie. [62]

En relación a la terapia angiostática, ésta requiere de una administración a largo plazo para proveer el control sobre la excesiva NV corneal y la cicatrización en la córnea equina, una vez que los abscesos e infecciones corneales han sido curados. Idealmente, la terapia debe de incluir la administración de una proteína recombinante para minimizar los riesgos de formación de anticuerpos neutralizadores en el suero después de una administración crónica. [63]

Uno de los mayores problemas en los ojos de los caballos como ya se mencionó, además de las infecciones tan severas que manifiestan es la curación corneal que deja unas cicatrices muy extensas y opacas que en la mayoría de los casos obstruyen el eje pupilar interfiriendo con la visión. El mayor factor de riesgo para un rechazo de trasplante de córnea es la vascularización corneal prequirúrgica. La prevención contra la neovascularización corneal es el paso principal para evitar falla en el trasplante. [59]

En este trabajo proponemos que el péptido recombinante equine Tum5 (eTum5) puede ser aplicado para mejorar el proceso de regeneración corneal, particularmente después de trasplantes corneales. Debido a sus propiedades anti-angiogénicas, puede contribuir a una regeneración corneal más transparente. El péptido recombinante equine Tum5 (eTum5) fue clonado, producido, purificado y probado *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente, proponemos su combinación con el FCE, el cual ha sido usado en cirugías de trasplantes corneales para evitar rechazos de los mismos por lo que junto con el eTum5 que bloqueará la excesiva neovascularización se favorecerá que los injertos corneales conserven sus propiedades tectónicas y la funcionalidad visual.

Aunque nuestra investigación va encaminada hacia ser utilizada en trasplantes de córnea en caballos, para estandarizar el procedimiento, decidimos emplear como modelo al conejo ya que es una especie de fácil manejo y gran accesibilidad en nuestro lugar de trabajo y los experimentos podían ser reproducibles todas las veces que necesitáramos, además de que en la secuenciación del colágeno tipo IV entre conejos y caballos presentaron una identidad del 98% variando solo en un aminoácido.

Decidimos también utilizar al conejo por que es la primera vez que se utilizará en un experimento la combinación del FCE y del equine tum5, además el modelo experimental del conejo ya ha sido descrito en estudios anteriores y se sabe que presentan una cicatrización rápida y homogénea, mucha inflamación y

alta incidencia en rechazos de transplantes de córnea por la excesiva vascularización.

- Los conejos han sido utilizados en experimentos para disminuir la angiogénesis tratados con un antagonista  $\alpha\beta 3$  aumentando la apoptosis de los vasos sanguíneos angiogénicos.
- En dicho experimento, se utilizaron tres tipos de células corneales de conejos (queratocitos, células epiteliales y células endoteliales), fueron cultivados y se promovieron su crecimiento y sus efectos mediante el FCE. Se encontró que la sensibilidad de las células epiteliales al FCE fue la más alta. [64]

## ***HIPÓTESIS***

La aplicación de una combinación del factor de crecimiento epidermal y del péptido inhibidor de la angiogénesis equine Tum5 evitará la cicatrización opaca y agresiva en la córnea ya que el EGF estimulará a los queratocitos permitiendo una cicatrización en menor tiempo y el eTum5 debido a sus propiedades anti-angiogénicas, disminuirá la excesiva formación de vasos sanguíneos manteniendo así también la funcionalidad visual de la córnea.

# **OBJETIVOS**

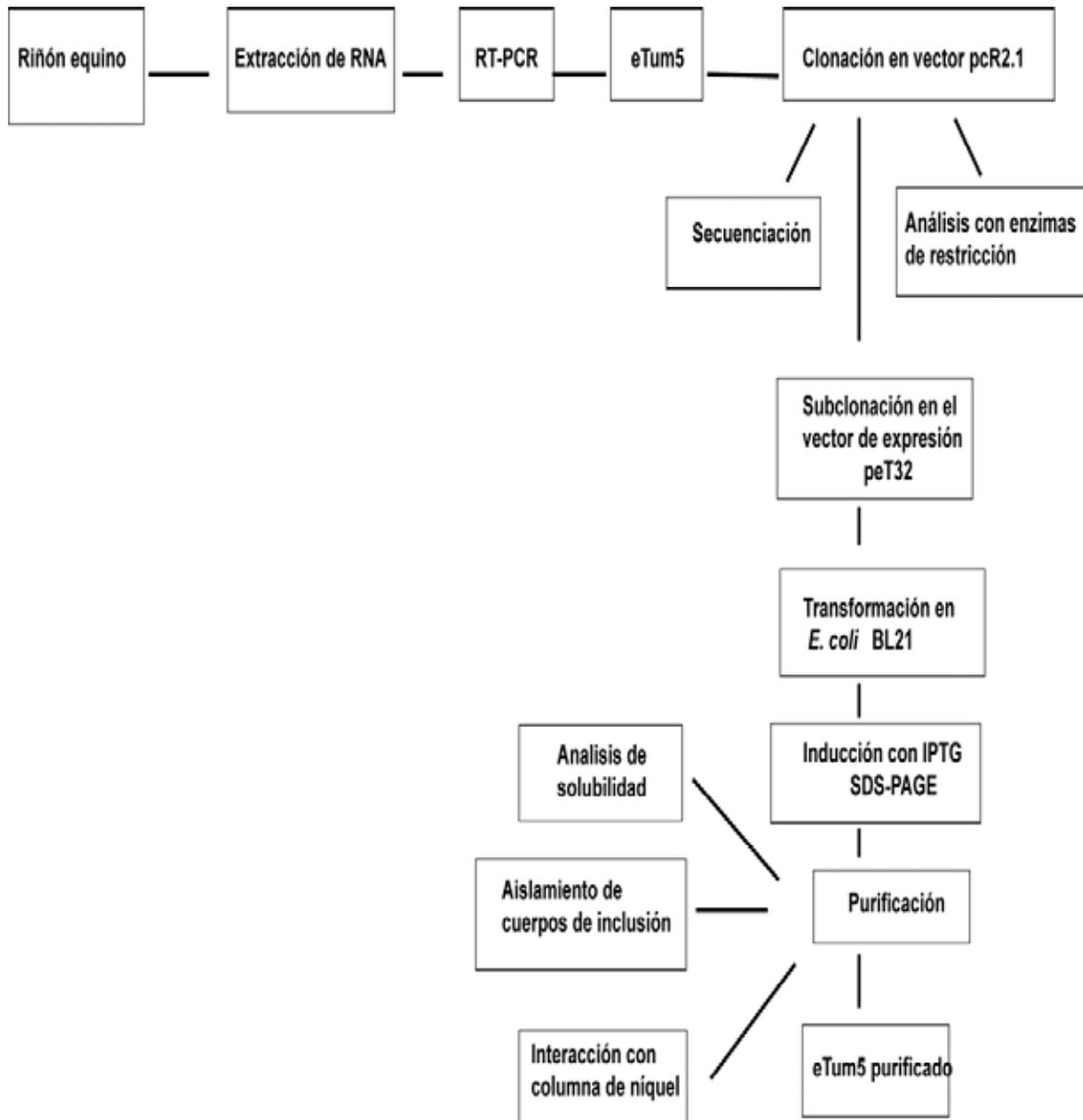
## OBJETIVO GENERAL

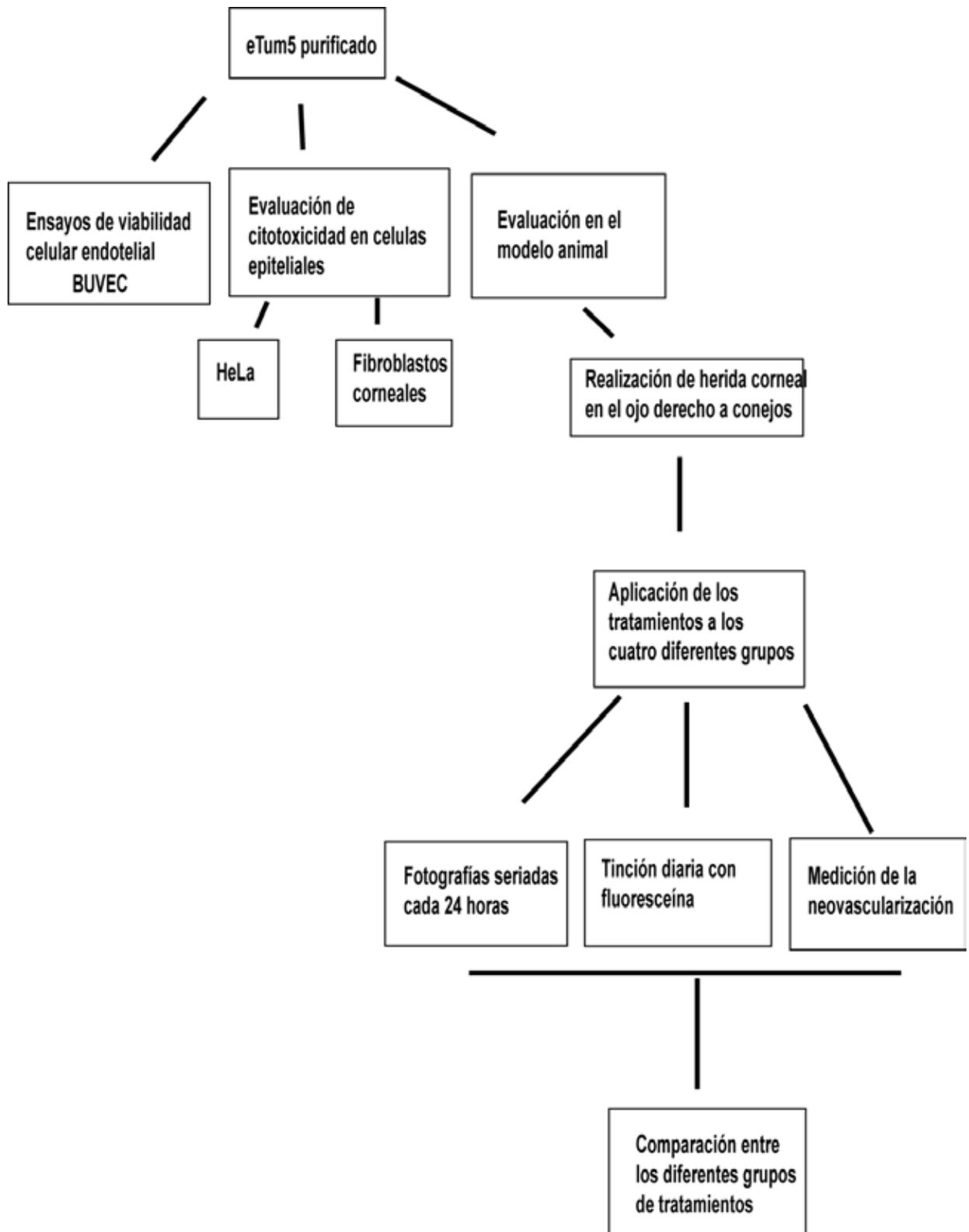
Utilizar el factor de crecimiento epidermal (EGF) para estimular la curación corneal de heridas epiteliales al acelerar significativamente la regeneración epitelial y combinarlo con el péptido angiostático equine tum5 originado de un pequeño fragmento de colágena tipo IV que tiene potentes efectos para inhibir la angiogénesis corneal para lograr con ello que la cicatrización sea menos agresiva y los tratamientos empleados contra la licuefacción corneal e infecciones corneales muy severas como los mandiles conjuntivales y los transplantes de córnea además de cumplir con una función tectónica para conservar el ojo puedan cicatrizar sin opacarse, conservando así también una funcionalidad visual.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Producción y purificación del péptido recombinante equine Tum5 (eTum5)
- Determinar la citotoxicidad del eTum5 mediante ensayos de sobrevivencia celular epitelial
- Probar las capacidades anti-angiogénicas del eTum5 mediante ensayos de viabilidad celular endotelial (MTT)
- Establecer un modelo animal de lesión corneal usando como al conejo para evaluar las capacidades anti-angiogénicas del eTum5 purificado y la regeneración corneal producida por el EGF
- Evaluar en este modelo animal la aplicación sola del eTum5 purificado y en combinación con el EGF y comparar los resultados de los diferentes grupos
- Realizar el análisis histológico de las córneas de los diferentes grupos del experimento del modelo animal

## ESQUEMA EXPERIMENTAL





# **METODOLOGÍA**

## **5.1 CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL *eTum5***

Los plásmidos son moléculas extracromosomales de DNA circular que varían en su tamaño de 1 kb hasta 200 kb con doble hélice, poseen enlaces covalentes cerrados y pueden ser aislados de células bacterianas de forma helicoidal. Se encuentran en gran variedad de especies bacterianas como accesorios genéticos que se pueden replicar y ser heredados conteniendo genes que codifican para enzimas que ayudan al huésped bacteriano. Entre los fenotipos conferidos están la resistencia hacia antibióticos y la producción de enterotoxinas.

La purificación de plásmidos bacterianos se puede llevar a cabo mediante:

- Crecimiento del cultivo bacteriano
- Cosechamiento y lisis de la bacteria
- Purificación del DNA del plásmido

El laboratorio de Oncología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Estatal de Louisiana, Baton Rouge, USA brindó el apoyo de su infraestructura necesaria para la obtención del plásmido que expresa el péptido angiostático equine tum5, que se realizó de la siguiente manera:

El equine tum5 se obtuvo de células de riñón equino línea k293 y se unió a una línea celular de *E.coli* utilizándola como vector para que el equine Tum5 pudiera expresarse.

### **5.1.1 Aislamiento del RNA**

Todo el equipo y el material que se utilizó fue estéril incluyendo el aluminio especial solo para cultivo celular. Se obtuvo el riñón fresco de un caballo recién sacrificado y se cortó en pedazos para guardarlo en hielo seco para su transporte,

al llegar al laboratorio se guardó en nitrógeno líquido (-210° C) para que se congelara y se procedió con la extracción del RNA; para esto se utilizó el equipo de extracción Tri-Reagent-kit que se basa en la extracción del RNA mediante trizol (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) [65] y se obtuvo:

- DNA que fue desechado porque tiene intrones y exones y si el tum5 está ahí los intrones no se pueden leer y pueden ser miles de pares
- RNA que es el que se utiliza porque solo tiene DNA exónico
- Proteínas celulares

Descripción de la técnica utilizada:

#### 1.- Homogenización

Las muestras de tejido congelado (50-100 mg) se rompen con un martillo y hasta que quedan hechas polvo se homogenizan en 1.5 ml de trizol durante 2 minutos. El material insoluble es eliminado mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 10 min a 2-8° C (cuarto frío). El sobrenadante es transferido a un tubo limpio y se procede a la adición de cloroformo.

#### 2.- Fase de separación

La muestra se transfiere a un tubo Eppendorf y se adicionan 0.3 ml de cloroformo (CH<sub>3</sub>Cl) y se agita cada 5 segundos durante 2-3 minutos. Al término de este tiempo se centrifuga durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio.

#### 3.- Precipitación del RNA

Se agregan 600 µl de cloroformo al sobrenadante obtenido y se mezcla, la muestra se centrifuga 10 minutos.

Del sobrenadante obtenido se colocan 0.75 ml en un tubo de 2 ml y se mezclan con Isopropanol durante toda la noche a -20° C.

Al otro día, la muestra se centrifuga 15 minutos a 4° C y se desecha el sobrenadante y se conserva la pastilla.

#### 4.- Lavado del RNA

Se lava la pastilla con alcohol etílico al 75%, se mezcla en un mezclador vórtex y se deja que el alcohol se evapore con el aire.

Centrifugar 5 minutos a 2-8° C para obtener una pastilla

5.- Redisolver el RNA

La pastilla se calienta por 10 minutos a 55° C para disolverse y se conserva el RNA a -80° C para esto se puede usar incubadora o termociclador a 37° C

En un espectrofotómetro se cuantificó el RNA cuya concentración fue de 1.790 µg, la cual se considera como buena. [65]

### ***5.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR)***

Se realizó utilizando el paquete RNAqueous-4PCR (Ambion, Austin, Tx, USA) para romper las membranas celulares e inactivar a las ribonucleasas de acuerdo a las recomendaciones publicadas. Las muestras se agregaron a un filtro que selectivamente une mRNA. Finalmente se utilizó el equipo Ready To Go-You-Prime First-Strand (Amersham Pharmacia, Piscatawy, NJ, USA) que genera moléculas de cDNA de cadena completa arriba de 7.5 kb desde un molde de RNA usando diferentes primers. El cDNA que se generó se utilizó como el molde para realizar la PCR. [66]

### ***5.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

Las muestras de cDNA obtenido se usaron como molde para la PCR (Gene Amp PCR System 9700, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). Los primers que se utilizaron para la amplificación fueron SVM48 y SVM49 en 5 µmol.

Secuenciación de los primers:

SVM48:

5' GATATC AAT GAA CAA GCC CAT GGA CA 3'

ECORV

SVM49:

5' AAGCTT GGC AAT CGT AGG ACC TTC AC 3'

Hind IV

La PCR se realizó utilizando el paquete comercial de alta fidelidad PCR Master Mix (Roche Molecular Biochemicals, IN, USA). Cada reacción de 50  $\mu$ l contenía 1  $\mu$ l del molde de DNA, 4  $\mu$ M de cada primer, 22  $\mu$ l de agua estéril para PCR y 25  $\mu$ l del PCR Master Mix. La muestra se incubó en el termociclador 2 minutos a 94° C, seguida de 15 ciclos que consistían en la desnaturalización a 94° C por 30s, alineamiento a 62° C por 30s y extensión a 72° C por 90s. Después de los 15 ciclos iniciales, se realizaron 25 ciclos adicionales de desnaturalización a 94° C por 30s, alineamiento a 62° C por 30s y extensión a 72° C. Sólo la primera extensión de los 25 ciclos adicionales fue durante 90s, agregando 5 segundos para cada ciclo consecutivo. Finalmente se realizó una amplificación de 10 minutos a 72° C después de completar los 40 ciclos.

La muestra amplificada fue corrida en un gel de agarosa con 1% de Tris-acetato-etilendiamintetraacidoacético (EDTA) y se tiñó con bromuro de etidio (Amresco, Solon, OH, USA) para medir el tamaño de la banda del producto amplificado de la PCR que fue de 390 pb. [67]

#### ***5.1.4 Purificación del DNA***

Se utilizó un bisturí estéril para cortar la banda amplificada de 390 pb para extraer el DNA y purificarla mediante el protocolo del equipo comercial “QIA quick gel extraction” (QIAquick Spin Handbook, Qiagen Inc., USA) de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. Este protocolo está designado para extraer y purificar DNA de 70 bp a 10 kb en geles de agarosa con amortiguador TAE o TBE.

Todas las centrifugaciones del procedimiento fueron realizadas a 13,000 rpm empleando una microcentrifuga convencional.

Descripción de la técnica:

1. Pesar la rebanada del gel en un tubo transparente. Agregar 3 volúmenes del amortiguador QG a 1 volumen de gel. En este caso el tubo pesó 0.4

2. Incubar a 50° C durante 10 minutos (o hasta que el gel se haya disuelto completamente). Para ayudar a que el gel se disuelva más rápido se puede mezclar el tubo cada 2-3 minutos durante la incubación
3. Después de que el gel se haya disuelto completamente, verificar que el color de la mezcla sea amarillo (la adsorción de DNA por la membrana del QIAquick es eficiente solo a un pH < 7.5. El amortiguador QG contiene un indicador de pH que es amarillo a pH < 7.5 y naranja o violeta a un pH mayor, permitiendo la determinación rápida del pH óptimo para el acoplamiento a la columna de purificación del DNA)
4. Agregar 1 volumen de isopropanol a la muestra y mezclar
5. Colocar la columna mezcladora QIAquick en un tubo de 2 ml para colección
6. Para unir el DNA, colocar la muestra en la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto
7. Eliminar el sobrenadante y colocar en el mismo tubo colector la columna QIAquick
8. Agregar 0.5 ml de amortiguador QG a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto
9. Para lavar, agregar 0.75 ml de amortiguador PE a la columna QIAquick, dejarla reposando 2-5 minutos y centrifugar durante 1 minuto
10. Eliminar el sobrenadante y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto a 13,000 rpm
11. Colocar la columna QIAquick dentro de un tubo limpio de 1.5 ml para microcentrifuga
12. Para despegar el DNA purificado, agregar 30 µl de amortiguador de elusión en el centro de la membrana QIAquick y dejarla reposar durante 1 minuto, después centrifugar durante 1 minuto

El gel purificado de DNA se envió al Laboratorio de Genética de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Estatal de Louisiana, USA para su secuenciación.

### **5.1.5 Clonación en el vector reportero pCR 2.1**

El eTum5 purificado se insertó dentro del vector de transporte pCR 2.1 mediante el equipo comercial TA clonando con pCR 2.1, éste equipo es una estrategia rápida para la inserción directa del producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dentro de un plásmido vector.

Descripción de la técnica:

- 1.- Centrifugar un vial de pCR 2.1 para colectar todo el líquido en el fondo del vial
- 2.- Marcar la fecha en que se comienza a usar y si quedan restos de cualquier vector después del experimento se deben guardar a -20 o -80°C
- 3.- Preparar la reacción de ligación a 10 µl como sigue:

Producto de PCR fresco	3 µl
Buffer de ligación 10X	1 µl
Vector pCR 2.1	2 µl
Agua estéril	3.5 µl
Enzima DNA ligasa T4	0.5 µl
Volumen total	10 µl

- 4.- Incubar la reacción de inserción a 14° C por lo menos 4 horas (de preferencia toda la noche). Proceder a la transformación en bacterias.

Se obtuvo el molde para el plásmido con las siguientes características:

Nombre: LSU 120

Vector de transporte para el plasmido: pCR 2.1

Marca Invitrogen

Resistente a ampicilina/kanamicina

Enzimas útiles y tamaño de las bandas:

ECORV/ Hind IV: 3.9 kb + 236 bp

El eTum5 se removió del LSU 120 en los sitios de corte de las enzimas ECORV y HindIII y se ligó dentro de ECORV y HindIII de pET32 que es el vector de expresión.

Como el producto del PCR puede ligarse dentro del vector en cualquier orientación, los plásmidos recombinantes deben de analizarse con un mapa de restricción para determinar su orientación. (Resultados y Figura 2b)

## **5.2 EXPRESIÓN DEL *eTUM5***

La bacteria de expresión del DNA del gen para el eTum5 utilizada fue BL21 DE3 plysS (Amp/cloranfeni) de Invitrogen. El medio empleado fue Luria Bertani (LB) con 50-100 µg/ml de ampicilina o 34 µg/ml de cloranfenicol

El plasmido obtenido en el Laboratorio de Oncología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Estatal de Louisiana, Baton Rouge, USA fue traído a México y en los laboratorios del CINVESTAV-IPN se llevaron a cabo los siguientes procedimientos, necesarios para poder replicarlo y aplicarlo en las córneas:

### **5.2.1 Preparación de células competentes**

- 1) Crecer la bacteria en 5 ml de medio LB sin ampicilina toda la noche a 37° C y agitación constante
- 2) A un matraz con 50 ml de LB sin ampicilina se le agregan 500 µl del cultivo celular y se incuba a 37° C con agitación aproximadamente 2-3 horas o hasta que la densidad óptica se encuentre entre 0.5 y 0.7, la lectura se realiza en un espectrofotómetro a 550 nm, en este caso fue de 0.6952
- 3) Transferir el medio a dos tubos falcon estériles y mantenerlo en hielo (4°C) durante 10 minutos
- 4) Centrifugar el cultivo a 2500 rpm durante 12 minutos a 4° C
- 5) Eliminar el sobrenadante y escurrir bien los tubos manteniendo condiciones de esterilidad

- 6) Resuspender la pastilla en 16 ml de RF1 e incubar 15 minutos en hielo
- 7) Centrifugar a 2500 rpm durante 12 minutos a 4° C.
- 8) Eliminar el sobrenadante
- 9) Resuspender la pastilla en 4 ml de RF2 e incubar 15 minutos en hielo
- 10) Distribuir en alícuotas de 200 µl puestas a enfriar previamente
- 11) Congelar a -80° C

### ***5.2.2 Transformación:***

- 1) Se toman 100 µl de muestra de DNA
- 2) Se sacan células competentes BL21 DE3 plyS de -80° C y se colocan en hielo
- 3) Bajo condiciones de esterilidad se inocula 1 µl de DNA en 50 µl de células competentes
- 4) Se deja 20 minutos en hielo
- 5) Se dejan 45 segundos a 42° C en baño maría
- 6) Se dejan 2 minutos en hielo.
- 7) Se siembran las células en 800 µl de LB sin ampicilina a temperatura ambiente (TA)
- 8) Se incuba una hora a 37° C en agitación constante
- 9) Se centrifuga 5 minutos a 4° C para que se forme una pastilla
- 10) Se siembra en una caja de cultivo con medio LB/ampicilina

### ***5.2.3 Preparación de MINIPREPS y del mapa de restricción del plásmido***

Los minipreps se utilizan para preparar DNA a partir de las colonias bacterianas transformadas. Se siguió la siguiente metodología:

- 1) Se siembra en medio líquido un cultivo de 6 ml dividido en 4 tubos de 1.5 ml con medio LB/amp
- 2) Se dejan toda la noche incubando a 37° C y en agitación constante
- 3) Se vacían los cultivos a tubos eppendorf para centrifugar 2 minutos a TA
- 4) Se elimina el sobrenadante por aspiración

- 5) Se coloca la pastilla en hielo
- 6) Se agregan 200  $\mu$ l de TS (El TS es un amortiguador de fuerza iónica alta, por lo que rompe la pared celular mediante presión osmótica)
- 7) Mezclar las células con vórtex durante 2 minutos para romper las células
- 8) Se agregan 200  $\mu$ l de ELT (lisa y aísla membranas de proteínas y así se libera DNA cromosomal)
- 9) Se dejan 5 minutos a temperatura ambiente
- 10) Se dejan 10 minutos a 70° C
- 11) Se centrifugan 15 minutos TA
- 12) Se saca la sustancia viscosa del fondo de los tubos
- 13) Se agregan 400  $\mu$ l de PEG (se acopla a las proteínas y precipita el DNA)
- 14) Agitar por inversión
- 15) Se dejan 20 minutos sin mover a TA
- 16) Se centrifugan 3 minutos TA
- 17) Se aspira el sobrenadante y se guarda la pastilla
- 18) Resuspender la pastilla en 30  $\mu$ l de agua estéril
- 19) Se guardan en el congelador a -20° C hasta su tratamiento con enzimas de restricción

La calidad del DNA obtenido puede ser analizada mediante electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis es la migración en una solución de moléculas cargadas en respuesta a un campo eléctrico. El rango de su migración depende de la fuerza del campo, de la carga y del tamaño y forma de las moléculas además de la fuerza iónica, la viscosidad y la temperatura del medio en el que las moléculas se mueven. Es una herramienta analítica simple, rápida y altamente sensitiva. Los geles de agarosa y poliacrilamida separan las moléculas por tamaño ya que son geles porosos permitiendo que solo moléculas pequeñas pasen libremente y obstruyendo el movimiento de las grandes.

Preparación del gel como se utilizó:

- 1) Pesar 0.8 g de agarosa y resuspenderlos en 100 ml de amortiguador TBE 1X
- 2) Se calienta durante 1 minuto para que se disuelva bien la agarosa y se deja que solidifique

Las enzimas de restricción se usan para comprobar que el DNA estaba viable en las minipreps que se hicieron; el DNA obtenido se trató con las siguientes enzimas de restricción:

**Enzima Pst1:**

DNA	5µl
Amortiguador 2 según tabla GIBCO (BRL React buffer chart)	1 µl
Enzima	1 µl
Agua	4 µl
Total	10 µl

Se dejan incubando en baño maría toda la noche

El gel de agarosa se prepara al 8% y se corre a 70 volts aproximadamente 1 hora. Para correr la muestra se tomaron 2 µl de colorante azul de bromofenol con xileno cianol al 0.25% y 10 µl de muestra dando un volumen total de 12 µl.

En el primer pozo se colocan 2 µl de marcador de 1 kb (Cambrex 100 bp ext ladder). Al gel se le agrega también una muestra de DNA no cortado para poder comparar.

Se esperan bandas de 4507, 1422 y otra de 93 kb

**Enzima PVUII:**

DNA	5 µl
Buffer # 6	1 µl
Enzima	1 µl
Agua	4 µl

Total 10  $\mu$ l

Se corre en gel de agarosa al 8% a 67 voltios durante 1 hora aproximadamente

Espero bandas de 2960, 2129, 999 y 93

Se agregan al gel el marcador y el DNA no cortado

### **Enzimas HindIII y ECORV:**

Reacción

DNA 20  $\mu$ l

Enzima HindIII 1  $\mu$ l

Enzima ECORV 1  $\mu$ l

Buffer # 2 3  $\mu$ l

Agua 7  $\mu$ l

Total 30  $\mu$ l

Resultado favorable se esperaban bandas de 5867 y 314

Después de transformar se vuelve a tratar con PVUII para comprobar que el DNA quedó viable.

Se esperan bandas de 2960, 2129, 999 y 93

### **5.3 INDUCCIÓN A PEQUEÑA ESCALA DE LA PROTEÍNA**

La inducción es necesaria para expresar la proteína y se realizó de la siguiente manera:

Se obtiene un gel con proteínas para confirmar que se obtiene un producto puro de equine tum5 con 31 kd

- 1.- Inocular una sola colonia dentro de 6 ml de medio LB conteniendo ampicilina/cloranfenicol.
- 2.- Incubar y mezclar a 37° C hasta que OD600 (densidad óptica) alcance 0.6-1.0.
- 3.- Dividir las células dentro de dos tubos (uno será el control y el otro es para la inducción).
- 4.- Agregar IPTG (isopropil beta D logalactosida – es el inductor del operon de la lactosa para determinar plásmidos e inducir la expresión de genes clonados) a uno de los tubos para obtener una concentración final de 1 mM. Continuar con la incubación durante 2-3 horas.
- 5.- Tomar una muestra de 1 ml del cultivo bien mezclado y centrifugar durante 30 segundos. Remover y eliminar el sobrenadante.
- 6.- Resuspender la pastilla completamente y mezclarla en 100 ul de 1X PBS (Buffer salino de fosfatos).
- 7.- Agregar 100 µl del buffer 2X SDS.
- 8.- Guardar a -20° C para el análisis SDS-PAGE.
- 9.- Cargar 10 µl de muestra en gel SDS-poliacrilamida al 12% y correr a 120 V durante hora y media.
- 10.- Teñir el gel con azul de Coomassie. El Tum5 en el vector pET32 produce una fusión de proteínas de 31 KD. (Figura 7)

#### **5.3.1 Inducción de la proteína en bacterias**

Inocular 100 µl de glicerol bacterial guardado dentro de 3 ml de medio LB más antibióticos. Incubar y mezclar a 37° C durante 1 día entero, guardar a 4° C. Colectar las células mediante centrifugación (30s). Resuspender en medio fresco

y agregar 100 ml. Agitar a 37° C hasta que OD600 alcance 0.6-1 (3-5 horas). Agregar IPTG de 1 nM. Continuar con la incubación durante 2 horas. Cosechar las células mediante centrifugación a 5000g durante 10 minutos a 4° C. Guardar el pellet a -20° C para la purificación de la proteína.

## **5.4 PURIFICACIÓN DEL ETUM5**

### **5.4.1 Análisis de solubilidad**

Para el análisis de solubilidad, el cultivo centrifugado se resuspendió en 2.5 ml/50 ml de cultivo del amortiguador de lisis y se rompió con lisozima (100 µg/ml) incubando a 30° C por 15 minutos. Posteriormente se sonicó en frío con un sonicador de punta por 3 ciclos de 20 segundos, el lisado celular se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 minutos a 30° C para separar la fracción soluble de la insoluble. Para el análisis electroforético se tomaron 70 µl de la fracción soluble más 30 µl de amortiguador de muestra 2X, 5 µl de β-mercaptoetanol y 5 µl de azul de bromofenol. De la misma forma se preparó una muestra de la fracción insoluble adicionando 100 µl de amortiguador de muestra 2X para permitir la solubilización de la muestra.

El eTum5 se encontró en la parte no soluble por lo que se aisló de los cuerpos de inclusión resuspendiendo la pasta celular de 100 ml de cultivo en 4 ml de buffer de resuspensión, se sonicó en hielo mediante 4 ciclos por 10 segundos y se centrifugó; la pastilla que se obtuvo se resuspendió en 3 ml de buffer de aislamiento frío y se volvió a sonicar y centrifugar para volver a resuspender en buffer de aislamiento, finalmente se resuspendió el pellet en 5 ml de buffer de solubilización y se centrifugó removiendo las partículas la muestra por un filtro de 0.45 µm, después se dejó interaccionando durante 24 horas con la columna de níquel, se realizaron 3 lavados y eTum5 se obtuvo purificado en 3 eluciones diferentes.

La muestra fue eluída en una columna de níquel del sistema de purificación Probond (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) designado para la purificación de proteínas recombinantes que contienen una secuencia de polihistidina (6xHis). Este sistema utiliza una columna de níquel con una resina quelante y está suplementado con buffers nativos y desnaturizantes para la purificación eficiente de proteínas recombinantes bajo diferentes condiciones. Antes de comenzar hay que ajustar el pH de los buffers dado que los buffers desnaturizantes contienen urea que los volverá más básicos conforme pase el tiempo.

Preparación de la columna:

- 1.- Resuspender la resina ProBond invirtiéndola, pipetear 2 ml de la resina dentro de la columna de 10-ml. Permitir que la resina se asiente completamente por gravedad o mediante centrifugación a baja velocidad (1 minuto a 800 x g). Aspirar gentilmente el sobrenadante.
- 2.- Agregar 6 ml de agua y resuspender la resina. Dejar que se forme un pellet de la resina y aspirar el sobrenadante.
- 3.- Agregar 6 ml de buffer desnaturizante de unión y resuspender la resina. Cuando se forme el pellet de la resina, aspirar el sobrenadante.
- 4.- Repetir el paso 3

#### ***5.4.2 Purificación en condiciones de desnaturización***

- 1.- Agregar 8 ml del lisado celular en la columna preparada. Rotar durante 15-30 minutos a temperatura ambiente. Asentar la resina por gravedad o mediante centrifugación de baja velocidad (800 x g) y aspirar el sobrenadante.
- 2.- Resuspender en 4 ml de Buffer desnaturizante de unión y mover durante dos minutos. Aspirar el sobrenadante.
- 3.- Repetir el paso 2
- 4.- Resuspender en 4 ml de Buffer desnaturizante de lavado (pH de 6.0) y mover de un lado a otro durante dos minutos. Cuando se forme la pastilla aspirar el sobrenadante.

- 5.- Repetir el paso 4
- 6.- Resuspender en 4 ml de Buffer de lavado desnaturante (pH de 5.3) y rock durante dos minutos. Dejar que se forme la pastilla y aspirar el sobrenadante.
- 7.- Repetir el paso 6
- 8.- Quitar la tapa y la parte de debajo de la columna. Eluir la proteína mediante la adición de 5 ml de buffer desnaturante de elusión. Eliminar el primer ml y coleccionar los 4 ml de elusión. Guardar a -80° C.
- 9.- Finalmente se realizó otra electroforesis en gel de agarosa para comprobar la purificación del producto.

### ***5.5 MODELO ANIMAL DE DAÑO CORNEAL***

A continuación se muestra la comparación entre las secuencias del colágeno tipo IV entre conejos y caballos presentando una identidad del 98% variando solo en un aminoácido:

rabbit1

NEQAHGQDLGALGSC LQRFTTMPFLFCNINNV CNFASRNDYSYWLSTPALMPMDMAPITG

60

equine:31

NEQAHGQDLGTLGSC LQRFTTMPFLFCNINNV CNFASRNDYSYWLSTPALMPMDMAPITG 90

rabbit: 61 RALEPYISRCTVCEGPTIA 79

equine 91 RALEPYISRCTVCEGPTIA 109

Para saber si el uso del péptido purificado equine Tum5 y la combinación del mismo con el FCE producen cambios favorables en la cicatrización corneal y disminuyen la angiogénesis, en nuestro experimento se utilizaron 4 grupos de 4 conejos cada uno, los conejos fueron todos raza Nueva Zelanda de la misma

edad, del mismo peso y todos machos, tratándose bajo los criterios para el uso de animales del ARVO (Ophthalmic and vision research) y del CICUAL (Comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio del Cinvestav-IPN).

Los grupos se clasificaron de la siguiente manera:

### **Grupo 1**

Comprendió 4 conejos a los cuales se les realizó una herida con un trépano corneal simulando un transplante de córnea mal suturado en el ojo izquierdo para producir inflamación y con esto la llegada de nuevos vasos sanguíneos al sitio de la herida. La herida fue hecha bajo condiciones de anestesia general siendo de 5 mm de diámetro y 0.4 mm de profundidad y éstos conejos fueron el grupo control por lo que no se les aplicó ningún tratamiento por un periodo de 7 días.

### **Grupo 2**

Formado por 4 conejos a los cuales se les realizó una herida con un trépano corneal simulando un transplante de córnea mal suturado en el ojo izquierdo bajo condiciones de anestesia general de 5 mm de diámetro y 0.4 mm de profundidad y se les adicionó la aplicación del péptido angiostático purificado equine Tum5 durante 7 días.

### **Grupo 3**

Compuesto por 4 conejos a los cuales se les realizó una herida con un trépano corneal simulando un transplante corneal mal suturado en el ojo izquierdo bajo condiciones de anestesia general de 5 mm de diámetro y 0.4 mm de profundidad y fueron tratados con la aplicación de una combinación del equine tum5 purificado y el factor de crecimiento epidermal resuspendido en lágrima artificial durante 7 días.

#### **Grupo 4**

Constaba de 4 conejos a los cuales con un trépano corneal se les realizó una herida simulando un trasplante de córnea mal suturado en el ojo izquierdo bajo condiciones de anestesia general de 5 mm de diámetro y 0.4 mm de profundidad y se les aplicó el FCE resuspendido en lágrima artificial durante 7 días.

La anestesia general fue inducida a los conejos con un tranquilizante (xylazina a dosis de 5 mg/kg IM) y mantenida mediante una máscara específica para esa especie e isoflurano. Se instilaron sobre la córnea 3 gotas de tetracaína como anestesia tópica. Un trépano corneal de tamaño apropiado (7 mm de diámetro) fue colocado sobre el centro de la córnea del ojo izquierdo y rotado mediante mínima presión para obtener una incisión de una sola intención, si se aplica demasiada presión al centro de la córnea, se ocasiona que las orillas de la lesión se retraigan y no se pueda evaluar la profundidad del corte. [61] Se instilaron 2 gotas de fluoresceína para observar la zona del defecto epitelial corneal y se tomaron fotografías.

En todos los casos el ojo derecho sirvió también como control porque se conservaron sanos y sin tratamiento alguno. Los procesos cicatriciales fueron evaluados macroscópicamente mediante el método de fotografía seriada y microscópicamente con ayuda de una fuente de magnificación (lámpara de hendidura) y el método de cuadrantes y en el laboratorio de Patología de la Asociación para Evitar la Ceguera en México se realizaron los análisis histológicos de las córneas de todos los animales después de los 7 días de tratamiento en cada uno de los casos.

#### **Factor de crecimiento epidermal (EGF):**

El EGF que se utilizó se compró a BD Biosciences (Bedford MA, USA) y fue resuspendido en Solución Salina Fisiológica y mezclado con una solución de

lágrima artificial quedando a una dosis de 50 ng/ml para su aplicación oftálmica y se aplicó para diferenciar si ayuda o retrasa la cicatrización durante siete días, dado que las células requieren varias horas de exposición continua al EGF para comenzar a presentar mitosis.

Para el tratamiento con EGF se consideraron dos factores importantes:

- a) el EGF en formulaciones líquidas es rápidamente perdido por la película lagrimal
- b) debe ser expuesto continuamente a las células por más de 6 horas para inducir mitosis.

Se utilizó una dosis relativamente baja del EGF de 50 ng/ml para acelerar la curación corneal estimulando los queratocitos y disminuir la inflamación no produciendo una respuesta inmunológica en contra del EGF. Esta dosis en estudios anteriores ha demostrado ser eficaz para estimular a las células epiteliales de la córnea equina. [30].

### ***5.5.1 Medición de la cicatrización corneal***

1) Se llevó a cabo la evaluación del progreso y la cicatrización de la herida corneal documentándose fotográficamente cada 24 horas (fotografías seriales) utilizando una cámara fotográfica Yashica Eye-Dental III durante 10 días. Los animales recibieron también una gota con fluoresceína de sodio para evaluar defectos epiteliales y se fue marcando en un diagrama los segmentos en los que se encontraba retención de fluoresceína.

La fluoresceína de sodio es un compuesto fluorescente soluble en agua y de fácil observación (con un oftalmoscopio que provea luz con un filtro de azul de cobalto). La fluoresceína de sodio es un agente que es fácilmente impregnado en tiras de papel estériles individuales, estas tiras no deben tocar directamente a la

córnea durante su aplicación oftálmica sino que se debe humedecer previamente la tira con alguna solución que sea lubricante (hidroxipropilmetilcelulosa) y se colocan estas gotas que caen con fluoresceína en el saco conjuntival ventral y la fluoresceína se transfiere a la película precorneal; entonces se permite que al parpadear el animal se distribuya la fluoresceína sobre la superficie corneal completa. Debido a que el epitelio corneal es selectivo a lípidos y en condiciones normales previene una penetración corneal apreciable por la fluoresceína; en presencia de un defecto del epitelio de la córnea, la tinción difunde rápidamente al estroma corneal pues este es hidrofílico.

2) Se midió el crecimiento de los vasos sanguíneos hacia la córnea (neovascularización) utilizando una lámpara de hendidura que consiste en una fuente de luz que provee iluminación difusa y un microscopio binocular que provee magnificación y se dividió el ojo en segmentos como las horas del reloj. La neovascularización corneal fue cuantificada en milímetros calculando el área del crecimiento de los vasos mediante la siguiente fórmula:

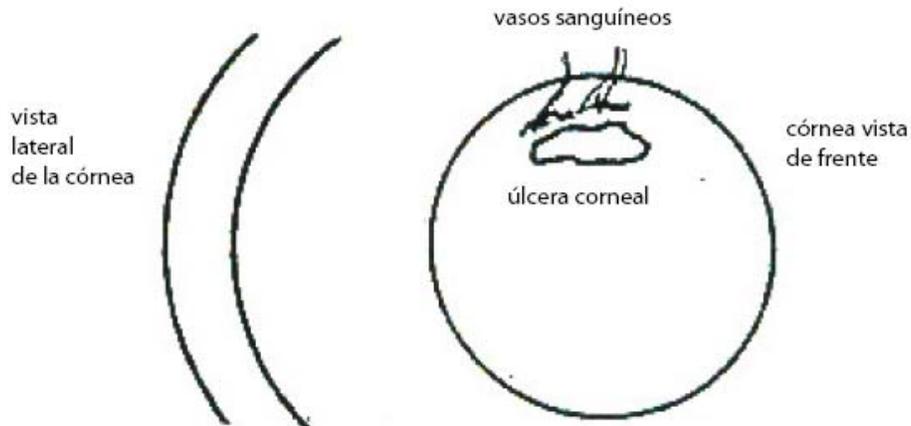
$$A = (\text{horas del reloj afectadas}/12) (\pi (R^2 - R_2^2))$$

Donde:

R = el radio total

R<sub>2</sub> = es el radio del centro al borde del crecimiento de los vasos. [36]

Además de las fotografías seriadas, se realizó un diagrama diario para evaluar y marcar el crecimiento de los vasos sanguíneos y la superficie de vascularización, este diagrama está ejemplificado a continuación:



3) Se evaluó el tiempo de cicatrización en días anotando a partir de que día apareció la vascularización en cada animal y a partir de que día ya no hubo retención de fluoresceína en ningún segmento del ojo.[68]

Para el análisis estadístico de este estudio se utilizó estadística no paramétrica utilizando estadística descriptiva mediante el siguiente algoritmo:

- 1) Ordenamiento de la base de datos
- 2) Análisis exploratorio de los datos: gráfico y numérico mediante obtención de estimadores, promedios, tamaños de grupos, variabilidad, máximos, mínimos.

## **5.6 CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)**

Todos los ensayos celulares se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio 5 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, mismo laboratorio que suplementó las células HeLa. Los fibroblastos corneales fueron donados por el Departamento de Biología Celular de la misma institución, mientras que las células BUVEC fueron donadas por el Centro de Neurobiología de la UNAM campus Querétaro.

### **5.6.1 MTT en Células HeLa**

Se usaron cultivos primarios de células con línea celular continua HeLa que es una línea celular inmortalizada derivada de carcinoma de cérvix humano. Estas células proliferan demasiado rápido aún comparadas con otras células cancerosas; tienen una telomerasa activa durante la división celular, presentando un aumento del acortamiento de los telómeros que se ven implicados en el envejecimiento y en la eventual muerte celular. [69]

Se evaluó el efecto citotóxico del equine Tum5 midiendo la viabilidad celular usando el método de reducción del MTT (3-4,(5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolium bromide). Se usaron cultivos primarios de células con línea celular continua HeLa y se crecieron en medio Dulbecco con modificación Eagle (DMEM, Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) + NaHCO<sub>3</sub> + 15 mM HEPES + 4.5 gL<sup>-1</sup> de medio glucosa suplementado con suero fetal de carnero al 10% manteniéndose a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. [70] Las células fueron equilibradas durante 24 horas, después se reemplazó el medio de crecimiento con medio conteniendo el eTum5 purificado a concentraciones de 0, 0.38, 1.52, 2.28 y 3.04 µg mL<sup>-1</sup> y se les dejó durante 24 horas y 48 horas; después de incubar las células con el reactivo (MTT 1mg/ml) durante 4 horas, se agregó una solución de isopropanol:HCl para lisar las células y solubilizar los cristales de color. Las muestras se analizaron determinando la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. La cantidad de luz

absorbida por las células control no expuestas al eTum5 se usará para definir el 100% de sobrevivencia. [71]

Como control negativo se utilizó un producto análogo de la heparina, llamado GAG-hed5, que es un glicosaminoglicano que inhibe el crecimiento de células tumorales y la actividad transcripcional de AP1. Fue aislado de mucosa intestinal porcina y se probó previamente en células HeLa inhibiendo su crecimiento.[72]

### **5.6.2 MTT en Fibroblastos corneales**

La citotoxicidad del eTum5 purificado fue evaluada también en la línea celular RC1 de células epiteliales corneales de conejo. Se eligieron estas células primero, porque tienen propiedades de crecimiento similares a los cultivos primarios de queratocitos y segundo, porque al alcanzar la confluencia son capaces de organizarse en un epitelio estratificado de tres a cinco capas con las propiedades morfológicas del epitelio corneal. [73]

Se usaron cultivos primarios de la línea celular RCE1 establecidas de células epiteliales corneales y se crecieron en medio DMEM y F12-Ham (3:1, v/v) como medio nutriente y se suplementaron con suero fetal de bovino al 5%, suero de carnero al 5%, 5 mg/ml de insulina, 5 mg/ml de transferrina, 0.4 µg/ml de hidrocortisona y  $2 \times 10^{-9}$  M de triodotironina, el medio fue diariamente manteniéndose a 37° C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células fueron equilibradas durante 24 horas, después se reemplazó el medio de crecimiento con medio conteniendo el eTum5 purificado a concentraciones de 0, 0.38, 1.52, 2.28 y 3.04 µg mL<sup>-1</sup> y se les dejó durante 24 horas y 48 horas; después de incubar las células con el reactivo (MTT 1mg/ml) durante 4 horas se siguió con el mismo protocolo explicado en el punto anterior.

### **5.6.3 MTT en Células BUVEC**

Las células endoteliales se ven involucradas en varios aspectos de la biología vascular como son la vasoconstricción y vasodilatación, la coagulación, la inflamación y la angiogénesis. Las células endoteliales de venas aisladas de cordones umbilicales son comúnmente usadas para estudiar el endotelio vascular, pero los cultivos primarios de estas células tienen una capacidad limitada de proliferación y vida por lo que necesitan cuidados muy especiales para sobrevivir. [74]

Las células endoteliales de venas umbilicales bovinas (BUVEC) se aíslan de cordones umbilicales bovinos frescos, la vena umbilical es canulada y lavada con solución salina de Hank y llenada con solución al 0.05% de tripsina-EDTA-solución salina Hank. Estas células mantienen las propiedades de las células endoteliales como la acetilación de lipoproteína de baja densidad, la expresión de la proteína von Willebrand, la unión a lectinas específicas y la proliferación de respuestas al mitógeno de células endoteliales específico, el factor de crecimiento vascular.[75]

Después de la incubación de las células durante 15 minutos a 37° C, la suspensión celular se centrifugó y el pellet celular se resuspendió en medio de cultivo (medio F12K suplementado con suero fetal bovino al 10% y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina). Las células se cultivaron en cajas de plástico de 100 mm y el medio se cambió cada día hasta que se alcanzó la confluencia en la que las células se dividieron 1:3. El medio se reemplazó por medio conteniendo eTum5 purificado a concentraciones de 3.04 y 3.8 µg esto corresponde a 20 y 25 µg y se incubaron durante, 24, 48 y 72 horas, siguiendo el protocolo ya descrito y diariamente también se evaluó el porcentaje de sobrevivencia celular mediante un microscopio y se tomaron fotografías.

## ***5.7 ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS***

Después de realizar los experimentos antes mencionados, los conejos fueron sacrificados usando métodos permitidos y humanitarios, al día 7 de haberse realizado la lesión corneal y los ojos fueron recuperados y conservados en formol al 10%. En el laboratorio de Patología de la Asociación para Evitar la Ceguera en México se realizaron los cortes histológicos y las tinciones de Hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson en todos los casos para evaluar si microscópicamente se observaba algún cambio corneal en los ojos de los diferentes grupos de tratamientos empleados en los conejos. Se realizó también la eutanasia de un conejo sano y se recuperaron los ojos sin lesión o tratamiento alguno para realizar cortes histológicos de la córnea sana y así tener un patrón de comparación con nuestras córneas utilizadas en este experimento y poder demostrarlo fotográficamente.

# RESULTADOS

## 6.1 Clonación y expresión de *eTum5*:

Utilizando RNA total equino y los iniciadores Tum5ext se amplificó un fragmento de 236 pb perteneciente a la cadena  $\alpha$ 3CIV que incluía el dominio del eTum5. La PCR con el primer set interno Tum5int, usando el producto amplificado mediante RT-PCR mencionado arriba como molde, originó un fragmento de 390 pb consistente en el dominio eTum5 (Figura 1a). En la Figura 1b se presenta el mapa del vector pCR 2.1 que utilizamos con el eTum5 insertado dentro en los sitios de corte de las enzimas de restricción y en la Figura 2 se presenta el modelo del vector de expresión peT32 con el eTum5 insertado mostrando los sitios de corte de las enzimas.

El producto amplificado se purificó en el gel y se confirmó su identidad mediante secuenciación directa. La secuencia del DNA amplificado fue la reportada para el gen del Tum5 equino mostrada a continuación junto con la secuencia de aminoácidos para la proteína:

eTUM5

**AATGAACAAGCCCATGGACAAGACCTGGGAGCTCTTGGCAGCTGCCTGCA  
GCGATTTACCACAATGCCATTCTTATTCTGTAACATCAACAATGTATGTAA  
TTTCGCATCGCGAAACGATTATTCATACTGGCTGTCAACACCAGCACTGAT  
GCCAATGGACATGGCTCCAATTACTGGCAGGGCCCTGGAGCCTTATATTA  
GCAGGTGCACTGTCTGTGAAGGTCCTACGATTGCC**

## Secuencia de aminoácidos:

**NEQAHGQDLGALGSCLQRFTTMPFLFCNINNVCFASRNDYSYWL  
STPALMPMDMAPITGRALEPYISRCTVCEGPTIA**

```
1 aatgaacaagcccatggacaagacctgggagctcttggcagctgcctgcagcgatttacc
  N E Q A H G Q D L G A L G S C L Q R F T
61 acaatgccattcttattctgtaacatcaacaatgtatgtaatttcgcatcgcgaaacgat
  T M P F L F C N I N N V C N F A S R N D
121 tattcatactggctgtcaacaccagcactgatgccaatggacatggctccaattactggc
  Y S Y W L S T P A L M P M D M A P I T G
181 agggccctggagccttatattagcaggtgcactgtctgtgaaggctcctacgattgcc 237
  R A L E P Y I S R C T V C E G P T I A
```

Número de acceso en el Genbank: 884793

La comparación con el banco de secuencias NCBI mediante un análisis tipo BLAST reveló que este fragmento del gen eTum5 comparte el 93% de homología en la secuencia de nucleótidos y un 97% de homología de aminoácidos con el dominio Tum5 humano; presentó un 94% de homología con la del perro y un 92% con la del conejo, siendo la homología en la secuencia de aminoácidos del 98% con el perro y 97% con el conejo:

- Colágeno tipo IV cadena alfa 3 (conejo y caballo)
- Homología = 78/79 (98%)

Conejo:

1 NEQAHGQDLGALGSC LQRFTTMPFLFCNINNVCFASRNDYSYWLSTPALMPMDMAPITG 60

Equino:

31 NEQAHGQDLGILGSC LQRFTTMPFLFCNINNVCFASRNDYSYWLSTPALMPMDMAPITG 90

El único aminoácido que cambia en la secuencia está subrayado.

La ligación de este fragmento con el vector de inserción peT32 originó múltiples clonas conteniendo la secuencia del eTum5 con la orientación apropiada para su expresión en las células bacterianas; esto se confirmó mediante cortes con las siguientes enzimas de restricción:

Con la enzima Pst1 (carril 5), se comparó con el marcador en el carril 2 y el DNA no cortado y se observaron bandas de 4557 y 1422 pares de bases como se esperaba. Figura 3

Con la enzima PvuII en el carril 2 cortando al DNA, se comparó con el marcador en el carril 1 y el DNA no cortado en el carril 4 y se obtuvieron bandas de 2960, 2129, 999 y 93 pares de bases. Figura 4

Con las enzimas HindIII y EcoRV se obtuvieron las bandas esperadas de 5867 y 314 pares de bases comparadas con el DNA no cortado y un marcador. Figura 5

Después de la transformación en *E. coli* BL21 se realizó una última comprobación utilizando otra vez a la enzima PvuII y se observaron bandas de 2960, 2129, 999 y 93 pares de bases con la enzima en el carril 3 y se comparó con el carril 1 que tenía al marcador y el carril 2 con DNA no cortado (Figura 6).

### **Inducción de la expresión de eTum5**

En la Universidad de Louisiana se realizó una primera inducción del eTum5 demostrando la banda esperada de 31kDa. Para las siguientes repeticiones que nosotros hiciéramos en el CINVESTAV, la inducción de la proteína usando IPTG se realizó durante 16 y 2 horas y se observó una banda como se esperaba con un peso molecular de 31 kDa en el análisis electroforético; siendo mas evidente la de las 2 horas de inducción, recomendándose entonces este tiempo para repeticiones posteriores de nuestro mismo ensayo. En el gel colocado del lado derecho de la

figura, se observa la integridad del péptido eTum5 congelado durante un mes, se observó la banda de 31 kDa en la inducción de 2 horas por lo que se demostró que el péptido se puede congelar e inducir posteriormente y no sufre degradación. Figura 7

## **6.2 Purificación del eTum5**

La purificación del eTum5 se realizó en dos formas. Inicialmente el eTum5 se intentó purificar mediante afinidad en columnas de níquel mediante la fusión de polihistidinas pero el resultado no fue satisfactorio, por lo que se realizó el análisis de solubilidad, observándose la banda correspondiente al péptido en la fracción insoluble, indicando que se encontraba en forma de cuerpos de inclusión. En el gel en la última columna la banda correspondiente a 31 kDa y no se observa ninguna banda en la fracción soluble o en la parte sonicada. Figura 8

Cuando se obtuvo el lisado bacteriano, se analizaron estos cuerpos de inclusión mediante la realización de un análisis electroforético del producto mediante SDS-PAGE, revelando una banda de proteína de 31 kDa, similar a la que se observó en los extractos crudos. En el gel se demuestran los cuerpos de inclusión en las diferentes fases y sobre todo en la pastilla donde se observa una banda más gruesa. Figura 9

Finalmente, purificamos el péptido en la columna por afinidad al níquel y lo obtuvimos purificado en tres eluciones diferentes de la resina de la columna comparándose la banda con la obtenida en los cuerpos de inclusión y en la inducción siendo la misma banda observada de 31 kDa, con mayor intensidad en la primera elusión, estas eluciones fueron las que se utilizaron para los análisis de citotoxicidad y los ensayos en el modelo animal. Figura 10

### **6.3 Análisis de citotoxicidad**

Mediante los ensayos de viabilidad usando el método MTT se evaluó la viabilidad celular usando células HeLa tratadas con el péptido purificado. En el primer experimento se utilizaron células epiteliales HeLa y fueron sometidas a concentraciones de 0.38, 1.52, 2.28 y 3.04  $\mu\text{g}$  del péptido durante 48 h. En la gráfica se demuestra que el eTum5 purificado no daña a las células epiteliales permitiendo que sigan creciendo. Se compara con el efecto logrado al aplicar a los mismos cultivos el derivado heparínico llamado Gag-hed5 que si inhibe su crecimiento, ya que causa un arresto en la fase G2 del ciclo celular [72]. Con este resultado, se puede proponer que el uso tópico del eTum5 en el epitelio corneal no daña a las células epiteliales. Figura 11

En un segundo análisis se utilizó la línea celular RC-1 derivada de fibroblastos corneales de conejo. Estas células fueron sometidas a tratamiento utilizando dosis totales de 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6  $\mu\text{g}$  del péptido purificado. En la gráfica se observa que no existe disminución significativa en el número de células viables después de la exposición de esta línea celular al eTum5 purificado durante 24 y 48 horas en relación al grupo control, recomendándose el utilizar esta dosis para su aplicación en la córnea. Figura 12

En el caso de las células endoteliales, se utilizaron células derivadas de vena umbilical bovina (BUVEC) y fueron sometidas a tratamiento con dos diferentes concentraciones del péptido. Para las células endoteliales ha sido mostrado un efecto inhibidor de la tumstatina y sus derivados, lo que permite valorar la actividad biológica del péptido [55, 56] En este caso, en la gráfica se demuestra que el péptido cuando se administra a las células endoteliales a concentraciones de 3.04 y 3.8  $\mu\text{g}$  impide su crecimiento aún más eficientemente rápido que Gag-hed, comprobándose de esta manera nuestra hipótesis de que el eTum5 inhibe la angiogénesis al inhibir la viabilidad de las células endoteliales necesarias para la formación de los vasos sanguíneos. Figura 13a

Esta disminución del crecimiento celular se documentó también fotográficamente, teniendo un control con células a las que no se les aplicó el eTum5, la inhibición del crecimiento por el derivado de la heparina Gag-hed y las células con eTum5 a dos diferentes concentraciones diferentes de 3.04 y 3.8 µg. Este resultado nos confirma que el eTum5 inhibe la angiogénesis al inhibir el crecimiento de las células endoteliales. Figura 13b

#### ***6.4 Medición de la angiogénesis en el modelo animal***

Antes de realizar la prueba del eTum5 *in vivo* con los cuatro diferentes grupos de tratamiento, se realizó una lesión corneal y se midió el comportamiento de la angiogénesis en 4 conejos durante 10 días y en todos se observó que la mayor angiogénesis ocurría en el día tres después de realizada la lesión, lo cual nos ayudó a estandarizar la técnica para producir una lesión en los conejos que si les afectara causando así la angiogénesis necesaria para probar el péptido. Esto se observa en la gráfica de la Figura 14. Todos los conejos que se utilizaron en este experimento eran de la misma raza, sexo y peso.

#### ***6.5 Angiogénesis: evaluación in vivo***

Se utilizaron 16 conejos separados en grupos de 4 conejos cada uno, siendo un grupo control con lesión pero sin tratamiento alguno, un grupo tratado con la aplicación del eTum5 purificado, un grupo tratado con la combinación del EGF más el eTum5 purificado y un grupo solamente tratado con el EGF, estos tratamientos fueron aplicados a la misma hora a todos los conejos durante siete días consecutivos. En el caso particular del grupo tratado con el eTum5 purificado se observó una disminución drástica de la angiogénesis en comparación con los conejos de los otros grupos, en todos los casos los resultados se demostraron mediante fotografías seriadas para analizar la angiogénesis, y se observó que el eTum5 purificado funciona en el modelo animal como se esperaba, disminuyendo los vasos sanguíneos en menor tiempo. Estas fotografías se presentan en forma de recopilación en la Figura 15.

### **6.6 Comparación entre los diferentes tratamientos**

Para realizar esta gráfica se hizo una comparación de los cuatro grupos de conejos con los diferentes tratamientos aplicados durante 7 días midiendo a la angiogénesis presentada después de la realización de una herida corneal mediante fotografías y la fórmula descrita en la metodología; se observa que el mejor tratamiento observado en nuestros grupos animales para disminuir la vascularización corneal, es la aplicación del eTum5 purificado al disminuir más rápido en cuestión de días a la angiogénesis, seguido por la combinación del mismo con el EGF pues en estos conejos las heridas corneales cicatrizaron más transparentes sugiriendo que las células se acomodaron de forma mas regular y la angiogénesis desapareció en menos tiempo, pudiéndose recomendar con este resultado la aplicación de esta combinación como tratamiento extra para evitar la neovascularización corneal . Figura 16a

En la Figura 16b se muestran los resultados obtenidos por separado del comportamiento de la vascularización en respuesta a una lesión corneal y al tratamiento aplicado en cada uno de los diferentes grupos de conejos utilizados demostrando los mismos resultados descritos anteriormente.

### **6.7 Histologías**

Los resultados histológicos en el caso de los ojos con lesión pero no tratados indican una córnea con inflamación aguda, se observa duplicación y engrosamiento del epitelio corneal con crecimiento de este hacia el estroma anterior, se veían células en mitosis que trataban de llegar al sitio de la lesión para reparar el daño causado por la ulceración corneal, se observaba también infiltración fibroblástica en el estroma anterior además de que en algunas regiones el epitelio se veía muy adelgazado, sobre todo en sus estratos superficiales, indicando que no existía una reparación completa del mismo. Se observaba también engrosamiento e irregularidades en la formación y en el grosor de la

membrana basal del epitelio, junto con desorganización de las fibras en la porción anterior del estroma y un aumento en los espacios intercelulares entre las fibras de colágena. Todo lo anterior indica una reparación corneal que macroscópicamente se veía como una cicatriz grande y opaca en la córnea.

En el caso de los ojos tratados con el eTum5 purificado, no se observaban vasos de neo formación probablemente debido a la aplicación de éste péptido, había mayor organización en todas las capas corneales, el epitelio se observaba más uniforme y grueso, la membrana basal del mismo se veía muy homogénea, no se observaba infiltración vascular del estroma y la agregación fibroblástica era menor lo cual habla de un proceso de fibrosis menor del estroma por lo que la reacción cicatrizal macroscópica es menos exacerbada. Se observó también una organización en forma de empalizada del epitelio y mayor formación de capas epiteliales, existía también preservación del espacio intercelular y este se veía más compactado, observándose también áreas focales donde se observó duplicidad del epitelio con crecimiento de éste hacia el estroma anterior.

En los ojos tratados con la combinación del EGF mas el eTum5 purificado la córnea se veía casi como una córnea normal, se observaba re-establecimiento de la integridad tanto del epitelio como del estroma, no había fibroblastos en el epitelio y la distribución de fibroblastos a nivel del estroma anterior y posterior se observaba muy homogénea, el epitelio se encontraba perfectamente alineado, presentando un grosor homogéneo, incrementado ligeramente en 2 o 3 capas en ciertas zonas muy localizadas; la membrana basal del epitelio se encontró íntegramente regenerada y se veía una organización en forma de empalizada de las células epiteliales demostrando una organización prácticamente perfecta del epitelio alcanzando el grosor del mismo número de capas que una córnea normal. No se observaban conglomerados celulares ni agrupamiento de queratocitos, tampoco existía reacción inflamatoria ni en el epitelio ni en el estroma, éste a su vez presentaba buena compactación.

Los cortes histológicos anteriores se compararon con el de la córnea sana en la que se observaba una total alineación e integridad en las cuatro capas corneales normales y una completa organización de las fibras de colágeno del estroma. Figura 17

## ***DISCUSIÓN***

La ulceración corneal es una enfermedad observada con frecuencia en los equinos, puede causar ceguera en un tiempo relativamente corto sin importar la extensión de la úlcera. Resulta imperativo que estas lesiones sean diagnosticadas lo antes posible para iniciar el tratamiento adecuado a la mayor brevedad, una úlcera corneal puede representar un atentado contra la integridad de la visión y el tratamiento debe de ser rápido y agresivo desde el inicio, con el fin de preservar la visión, el bienestar y la apariencia cosmética del paciente. [76]

En la oftalmología equina las úlceras corneales representan la primera enfermedad reportada respecto a su incidencia y la segunda causa de pérdida visual debido a su patofisiología, rápida progresión y difícil manejo de la licuefacción corneal y excesiva angiogénesis. Aunque un problema oftálmico no imposibilita tanto a un caballo como una enfermedad del aparato locomotor, a largo plazo pueden complicarse hasta perder el ojo o la visión y deteriorar así el bienestar, el fin zootécnico y el valor económico del animal.

En caballos con problemas corneales, cuando el tratamiento médico a pesar de ser intensivo es insuficiente por lo grave de la infección y sobre todo por la licuefacción corneal que predispone a ruptura ocular, se utilizan los mandiles conjuntivales, las transposiciones corneoesclerales y las queratoplastías penetrantes terapéuticas (transplantes de córnea) como alternativas quirúrgicas. Estos procedimientos son indicados para controlar infecciones corneales severas incluyendo los casos de abscesos del estroma, para contrarrestar los efectos de una queratitis ulcerativa traumática cuando el estroma se perdió y también son empleados para reemplazar la integridad estructural, para remover y reemplazar la córnea necrótica cuando esta es la causa de uveítis anterior, para suprimir la colagenolisis ocasionada por las metaloproteinasas y enzimas proteolíticas bacterianas y/o fungales y para proveer el soporte fibroso a una córnea

desvitalizada. En estos tratamientos quirúrgicos, se observa un aumento de vascularización durante el proceso de cicatrización corneal, produciendo cicatrices grandes y opacas que pueden obstruir al eje pupilar y así interferir con la visión disminuyendo con esto la funcionalidad zootécnica y el valor económico de los animales.

La angiogénesis es esencial para la progresión de varios desórdenes patológicos como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética, el crecimiento tumoral y la metástasis; los mayores inductores son el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento de fibroblastos. [77] Por otro lado, un aspecto clínico importante en la reparación corneal es la angiogénesis, generalmente proveniente del limbo corneo-escleral. La curación de los trasplantes colocados en caballos requiere de la vascularización para que la infección sea controlada, ésta vascularización da fuerza y soporte a la herida y lleva los antibióticos al sitio de la lesión. Esta angiogénesis es también la mayor complicación, involucra pérdida de la visión después de infecciones corneales, quemaduras y queratoplastías. Dadas las características principales de la córnea como la transparencia y su ausencia de vascularidad, cuando existe un daño al epitelio los vasos sanguíneos deben avanzar hasta la zona de la lesión para tratar de cubrirla y hacer que las células epiteliales, proteínas y fibrina migren a través de la lesión del estroma para proveer nutrientes adicionales y células de reparación; en la angiogénesis, la distribución y configuración de estos vasos son determinadas por la profundidad y la extensión de la herida original. [78]

El suplemento sanguíneo hacia la córnea se deriva de las arterias ciliares, que son ramas que salen de la arteria oftálmica que se divide y acaba en el plexo pericorneal en el área del limbo córneo escleral. La neovascularización (NV) corneal involucra la formación de nuevos vasos, esencialmente en forma de capilares y vénulas desde el plexo pericorneal. Aunque esta NV involucra diferentes capas corneales, se ha demostrado que la localización principal de la

vascularización en los injertos corneales se da en las áreas de arriba y de en medio del estroma anterior. [63]

En humanos, los mayores factores de riesgo para un rechazo del trasplante son ojos con glaucoma, trasplante de córnea previo y que exista vascularización corneal pre-operatoria. [79] Las enfermedades asociadas con neovascularización corneal se asocian con una falta de balance entre los factores angiogénicos (como el factor de crecimiento de fibroblastos o el factor de crecimiento endotelial vascular) y las moléculas anti-angiogénicas en la córnea (como la angiostatina y la endostatina). Este balance debe de inclinarse a favor de la NV debido a la sobre regulación de factores angiogénicos y la menor regulación de factores anti-angiogénicos. [80] Se sabe también que la localización en la córnea y el tamaño del trasplante influyen mucho en el éxito o rechazo del mismo. Se ha comprobado que los trasplantes localizados cercanos al limbo, debido a su proximidad con los vasos sanguíneos y las queratoplastías mayores a 8 mm de diámetro, se asocian con un aumento de rechazos, por lo que se recomienda utilizar la menor cantidad de córnea posible; además de utilizar preferentemente córneas frescas en lugar de congeladas, usar un patrón de sutura interrumpido en lugar de simple y realizar la cirugía con la mejor técnica quirúrgica, misma que debe ser hecha por personal experimentado para que la manipulación ocular sea lo menor posible, todo esto para aumentar el rango de mayor éxito visual postquirúrgico. [62]

En caballos con infecciones a nivel del estroma corneal, la neovascularización proveniente del limbo avanza aproximadamente 1 mm por día; los vasos superficiales aparecen como ramas individuales del epitelio del estroma anterior, los vasos del estroma profundo son cortos y forman un borde alrededor de la córnea y por último los vasos del estroma y de la membrana de Descemet aparecen como vasos aislados. En nuestro experimento, la neovascularización corneal en los conejos que utilizamos avanzó con una frecuencia variante de 0.3 a 0.4 mm por día, desapareciendo rápidamente en un promedio de 0.5 mm por día

en los casos en que aplicamos el eTum5 purificado siendo estos resultados muy favorables porque no dan tiempo a que la cicatriz se opaque.

Cuando se realiza un trasplante de córnea en caballos o se coloca un mandil conjuntival, la función principal de estos procedimientos es la salvación del ojo como estructura, evitando que los contenidos intraoculares se salgan y disminuyendo también con el tratamiento post-quirúrgico la inflamación ocular secundaria encontrada siempre en casos de daños corneales. Este tratamiento es largo y costoso y no siempre se obtienen los resultados esperados, en el mejor de los casos el ojo se conserva y la córnea se transparenta en la periferia de la lesión, en la periferia del mandil conjuntival o del trasplante corneal, permitiendo así en esta parte transparente la visión. En el peor escenario, la inflamación es tan severa que el cuerpo ciliar se atrofia y deja de producir humor acuoso llevando con esto al ojo a una condición clínica conocida como *phtisis bulbi* en la que se pierde la estructura normal del ojo y por consiguiente su función ya que este al atrofiarse disminuye drásticamente en su tamaño y en el de todas sus estructuras internas. Existe también un resultado intermedio en el que se conserva la estructura del ojo de manera cosmética pero no su funcionalidad. La principal causa de esto son las adherencias llamadas sinequias intraoculares entre el iris y la córnea que impiden que la pupila se mueva y que el ojo pueda ver, estas adherencias actualmente ya pueden eliminarse mediante el uso del inhibidor del plasminógeno tisular; la segunda causa es que la córnea se vea cubierta de excesiva vascularización y de cicatrices muy grandes después de la colocación del mandil conjuntival, impidiendo con esto el paso de la luz y por lo tanto de la visión, para esta última la recomendación del uso del péptido purificado eTum5 durante el proceso de regeneración y cicatrización corneal.

Como se mencionó anteriormente la tumstatina es un inhibidor de la angiogénesis que recibe este nombre por su habilidad para causar “estasis” tumoral ya que es un inhibidor de la proliferación celular endotelial y causa específicamente apoptosis de células endoteliales uniéndose a estas por medio de

la integrina  $\alpha_5\beta_3$  siendo esta unión el paso esencial para la actividad antiangiogénica. Esta actividad se localiza en la sección de la molécula comprendida entre los aminoácidos 54-132, de donde se obtiene la molécula conocida como tum5. [77]

En la búsqueda de alternativas extras para mejorar la capacidad visual y la eliminación de cicatrices extensas después de la cirugía del trasplante de córnea y/o de la colocación de mandiles conjuntivales en caballos, se pensó en la posibilidad de utilizar equineTum5 recombinante. El Tum5 canino ha demostrado sus capacidades antiangiogénicas en los casos de osteosarcoma canino en los que inhibió el crecimiento de vasos sanguíneos controlando así la metástasis, usándose como terapia angiostática crónica y sin producir reacciones inmunes adversas. Tomando en consideración la similitud con el Tum5 humano y el Tum5 canino, se pensó en la utilidad del Tum5 equino para controlar la excesiva vascularización en este caso en la córnea.

Realizamos la expresión del eTum5 en un sistema bacteriano para su producción y demostramos una actividad biológica similar a la reportada para el Tum5 humano, el siguiente paso fue purificarlo para eliminar el polisacárido que ocasiona inflamación en el ojo. La adecuada purificación de la proteína fue complicada, la purificación para la proteína pura mediante afinidad a la columna de níquel como primer paso fue inadecuada, quizás esto se debió a la falta de una especificidad de unión adecuada de nuestra proteína comparándola con proteínas contaminantes, a cambios en el pH de los diferentes amortiguadores utilizados o a alguna interferencia con la habilidad de la región de polihistidina para unirse a la resina de níquel. Realizamos la evaluación del pH de todos los buffers utilizados, sin encontrar algún cambio significativo en ninguno de ellos; basándonos en su secuencia de nucleótidos, predecimos que el eTum5 tiene una estructura compleja y con dobleces y probablemente por esta razón la región de polihistidina fue difícil de encontrar evitando su unión con la columna de níquel.

Como se mencionó, en un primer intento no fue posible purificar el péptido directo en la columna de níquel, por lo que fue necesario realizar un análisis de solubilidad, encontrándose en la fracción insoluble indicando que nuestro péptido se encontraba en forma de cuerpos de inclusión; los cuerpos de inclusión son depósitos de proteína dentro de la célula formados por proteína insoluble inactiva, son vistos muy frecuentemente en bacterias recombinantes que producen proteínas heterólogas bajo el control de promotores, como en nuestro caso. Después de que los cuerpos de inclusión fueron lisados, en un segundo intento se logró purificar la proteína colocándola en la columna con afinidad al níquel y la obtuvimos en tres eluciones distintas. Estas eluciones fueron congeladas en alícuotas de 100  $\mu$ l a  $-80^{\circ}$  C para usarlas posteriormente en la realización de los ensayos de viabilidad celular y su aplicación en el modelo animal, demostrando que si se conserva congelado el eTum5 no pierde sus características y puede descongelarse y utilizarse.

Los ensayos de viabilidad celular epitelial (MTT) se basan en la habilidad de la mitocondria de las células presumiblemente viables en convertir el MTT a un precipitado morado, que se evalúa espectrofotométricamente midiendo la proliferación y sobrevivencia celular. El péptido fue aplicado a diferentes concentraciones usando primero células HeLa y después la línea celular RCE1 obtenida de células epiteliales corneales de conejo, ambos tipos de células demostraron que el péptido purificado no disminuye ni impide su crecimiento, nos da la posibilidad de aplicarlo en forma de gotas tópicas sobre el epitelio corneal sin tener reacciones adversas (Figura 12).

En el caso de los ensayos de viabilidad en células endoteliales vasculares, el resultado fue opuesto ya que la aplicación del péptido purificado disminuyó la sobrevivencia celular en un patrón dependiente de la dosis. Este resultado también lo consideramos favorable pues confirma la hipótesis de que el eTum5 tiene efecto antiangiogénico, inhibiendo el crecimiento de células endoteliales, principales formadoras de vasos sanguíneos; sugiriendo con estos resultados su

uso como tratamiento extra para inhibir el exceso de nuevos vasos sanguíneos durante la reparación corneal.

Para probar el efecto de la aplicación directa de eTum5 sobre la reparación corneal, decidimos utilizar como modelo animal al conejo. Estos animales se eligieron debido a sus características de disponibilidad y fácil manejo, además de la facilidad de poder hacer repeticiones del experimento en el mismo número de individuos con las mismas características como sexo, edad y peso, lo cual en el caso de los caballos hubiera dificultado estandarizar los resultados. Consideramos necesario probarlo antes en los conejos que en caballos dado el alto valor económico y estimativo de estos animales. Los conejos fueron una mejor alternativa también por el alto porcentaje de identidad en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos si se compara el Tum5 entre ambas especies como se mostró en la sección de Resultados. Cuando realizamos el ensayo aplicando *in vivo* al péptido eTum5, los animales fueron monitoreados diariamente para evaluar cualquier incomodidad o efecto adverso a la aplicación de nuestros tratamientos, además para realizar la documentación fotográfica y el dibujo de las úlceras y de la angiogénesis en diagramas diarios para obtener un valor numérico con respecto al avance de la neovascularización y poder hacer comparaciones de la misma en los diferentes grupos de animales.

Los conejos, al igual que los caballos sufren de gran inflamación ocular manifestándose como primer signo clínico de esta la neovascularización corneal, por este motivo en el modelo animal que utilizamos, se decidió el realizar una herida corneal simulando un transplante de cornea mal suturado, mismo que en condiciones reales ocasionaría gran inflamación y por lo tanto angiogénesis corneal. Para la realización de la herida, se decidió utilizar un trépano corneal del número 6.5 para obtener la misma profundidad y tamaño de la herida en todos los animales usando el protocolo mencionado durante la Metodología.

En cada uno de los grupos tratados, se evaluó el comportamiento de la vascularización dependiendo del tratamiento aplicado, en todos los casos se observó un gran aumento de la vascularización entre los días 2 y 3 después de realizada la lesión, observándose como se esperaba también, una tiempo de disminución mayor de la misma en el caso de los conejos tratados con el eTum5 purificado, en los que en el día 7 la angiogénesis era muy poca o inexistente, seguido por el grupo tratado con la combinación del eTum5 purificado mas el EGF en el que las córneas además se observaban mejor cicatrizadas con una apariencia más transparente macroscópicamente.

Se realizó también una gráfica que mostrara en conjunto la comparación de los resultados de la angiogénesis en los diferentes grupos de tratamiento y con estos resultados junto con las fotografías seriales de los conejos tratados con el péptido, recomendamos el uso del eTum purificado ya que este grupo demostró una inhibición más rápida de la vascularización, seguido del grupo al que se le aplicó la combinación del péptido y el FCE que como se esperaba ayudó a que la cicatrización fuera mas transparente y en menor tiempo, junto con la disminución de la vascularización en pocos días debida al efecto inhibidor de la angiogénesis del eTum5.

En lo que respecta a los resultados histológicos, se observaron cambios evidentes de reparación corneal en el caso de los ojos tratados con la combinación del EGF más eTum5 purificado, observándose una córnea con características de una cornea sana completamente regenerada, lo que nos confirma la sinergia de los mismos y que favorecen a que la cicatrización macroscópica de la córnea se vea menos exacerbada por lo tanto la córnea se conserve más transparente y se conserve mayor capacidad visual. En los ojos tratados solo con el Tum5 purificado el epitelio corneal se encontró más uniforme y grueso, se observaban células en mitosis y la infiltración fibroblástica era menor que en los ojos con lesión pero no tratados en los cuales la córnea presentaba signos evidentes de inflamación, el epitelio estaba con zonas adelgazadas sin

regeneración y crecía hacia el estroma con irregularidad junto con una mayor infiltración de fibroblastos hacia el estroma anterior, todo esto macroscópicamente se observa como una córnea fibrosada con una cicatriz evidente y opaca. Con estos resultados se confirma también que el mejor tratamiento es la combinación del EGF y el péptido purificado para favorecer una cicatrización corneal en menor tiempo y con un arreglo más uniforme manteniendo así la transparencia corneal y la funcionalidad visual.

## **CONCLUSIONES**

- El eTum5 purificado mediante columnas de níquel no presentó efecto citotóxico en los ensayos con células epiteliales por lo que se podría recomendar su aplicación tópica en el epitelio corneal sin dañarlo.
- En los ensayos de viabilidad *in vitro* con células endoteliales, el eTum5 purificado disminuyó significativamente el crecimiento de las células; al inhibir células endoteliales, se inhibe entonces la formación de nuevos vasos sanguíneos
- El EGF ayuda a la rápida regeneración corneal, sin tener efectos en la neo vascularización
- eTum5 purificado indujo una disminución de la angiogénesis en corto tiempo, seguido por el grupo con la aplicación del péptido purificado combinado con el EGF que presentó disminución de la angiogénesis y mejor cicatrización corneal en menor tiempo.
- Se puede recomendar entonces la aplicación del péptido eTum5 purificado, solo o en combinación con el Factor de Crecimiento Epidermal para el tratamiento post quirúrgico aplicado regularmente en transplantes de córnea.
- Se recomienda continuar con la investigación para en trabajos posteriores evaluar su aplicación tópica en caballos inhibiendo la excesiva vascularización corneal vista en la reparación corneal post inflamación o post cirugía.
- En el caso de los caballos, se recomienda también investigar y probarlo también en otras patologías comunes que involucran al ojo equino y a la

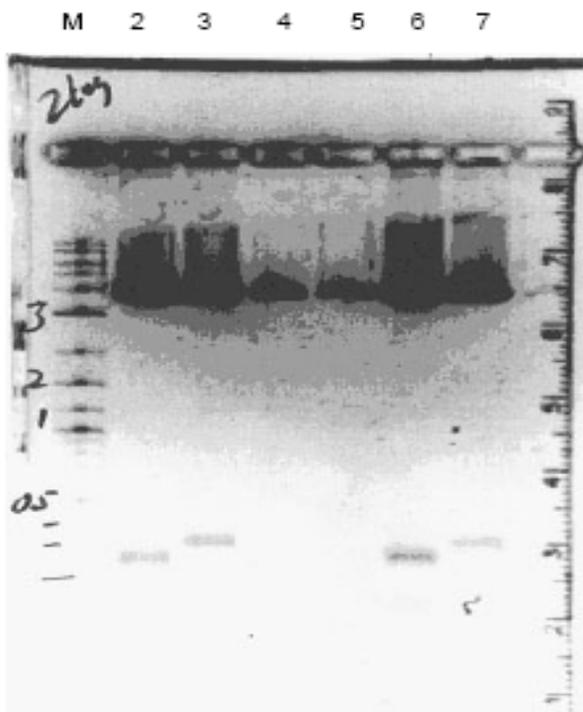
angiogénesis como el carcinoma de células escamosas basándonos en el principio de que cualquier tumor crece a través de vasos sanguíneos y su homólogo canino ya es usado para controlar osteosarcoma con resultados favorables.

## FIGURAS Y LEYENDAS.

### FIGURA 1. Clonación del eTum5

**Figura 1 a.** Electroforesis de la PCR del RNA total en la que fue observada una banda de 390 pb del dominio putativo del eTum5 como producto de la amplificación.

eTum5 en el vector de transporte pCR 2.1



3.9

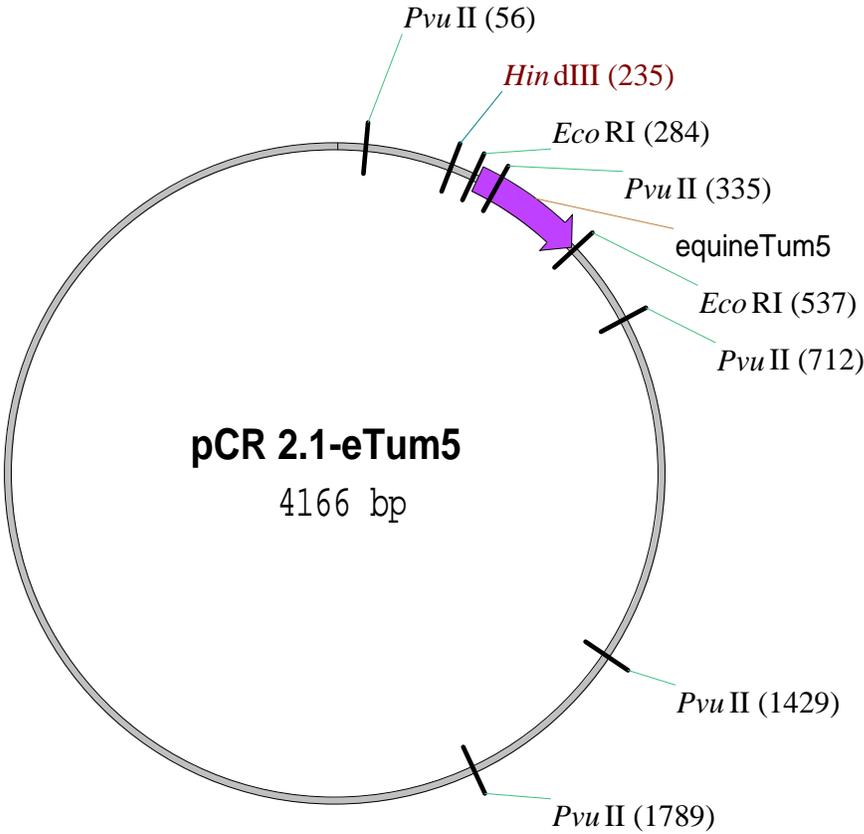
Carril 1: marcador

Carriles 2 y 3: eTum5 de la colonia A

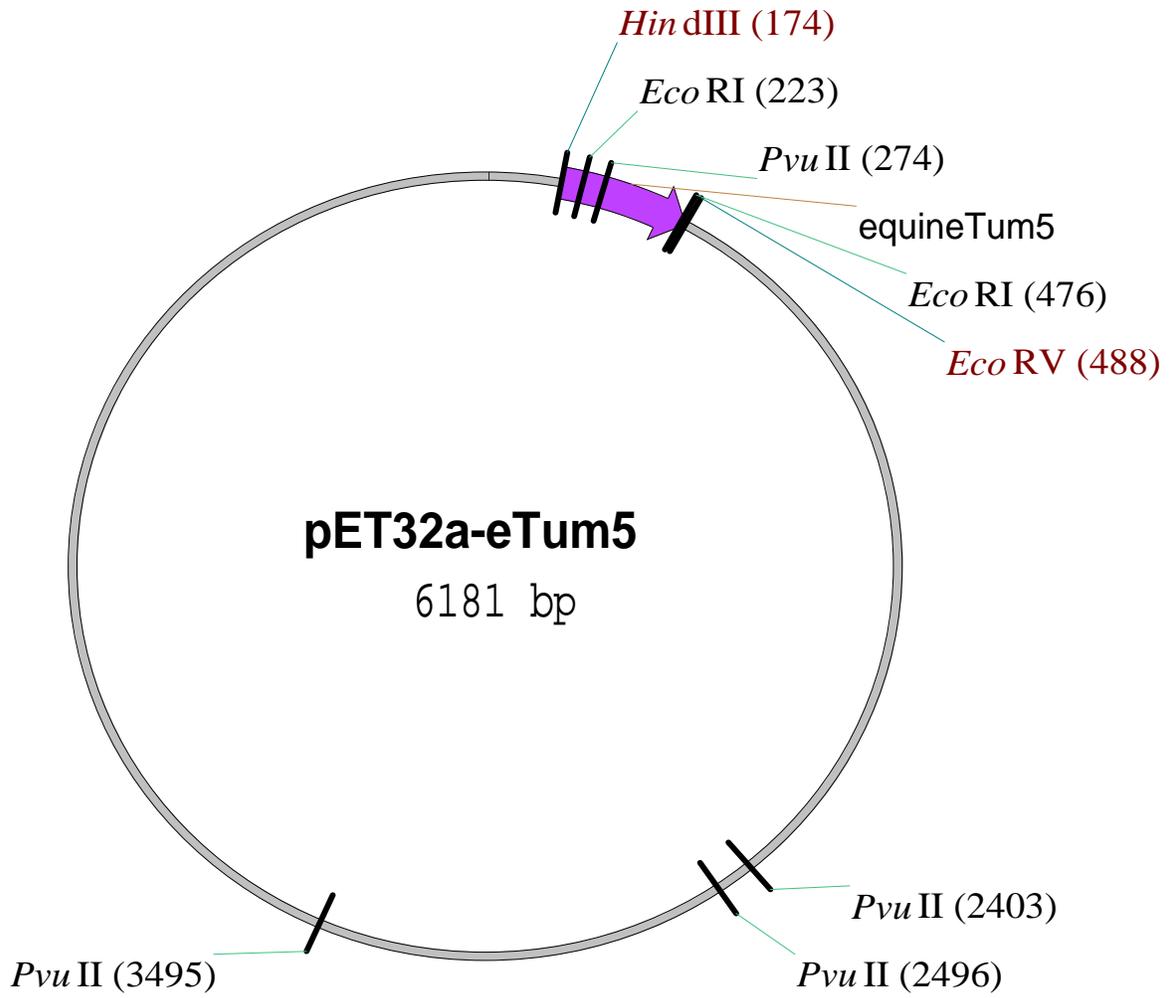
Carriles 4 y 5: muestras de la colonia B

Carriles 6 y 7: muestras de la colonia C

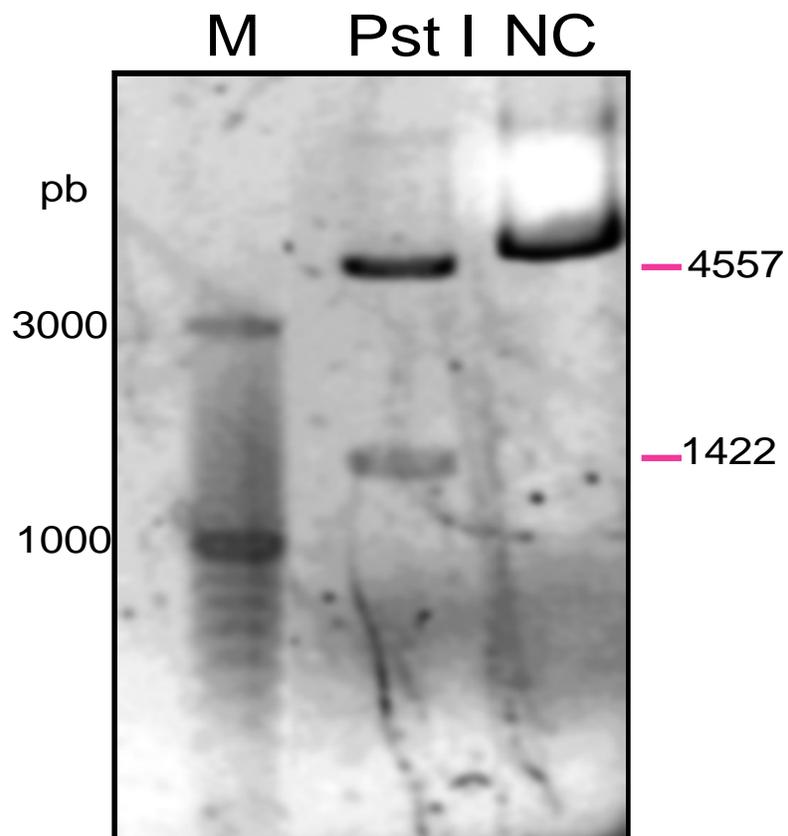
**Figura 1b.**- mapa del eTum5 insertado dentro del vector pCR 2.1



**FIGURA 2. Mapa del vector de expresión pET32/Tum5**



**FIGURA 3. Electroforesis de la comprobación de la inserción del eTum5 con la enzima de restricción PstI**

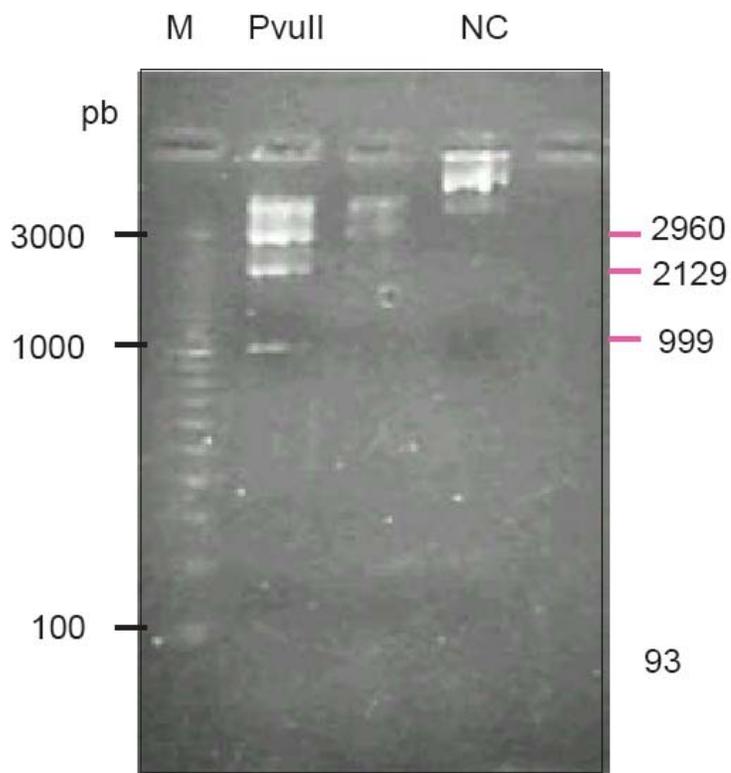


Carril 1: marcador

Carriles 2: DNA del eTum5 cortado con la enzima de restricción PST1 demostrando las bandas correspondientes a la misma

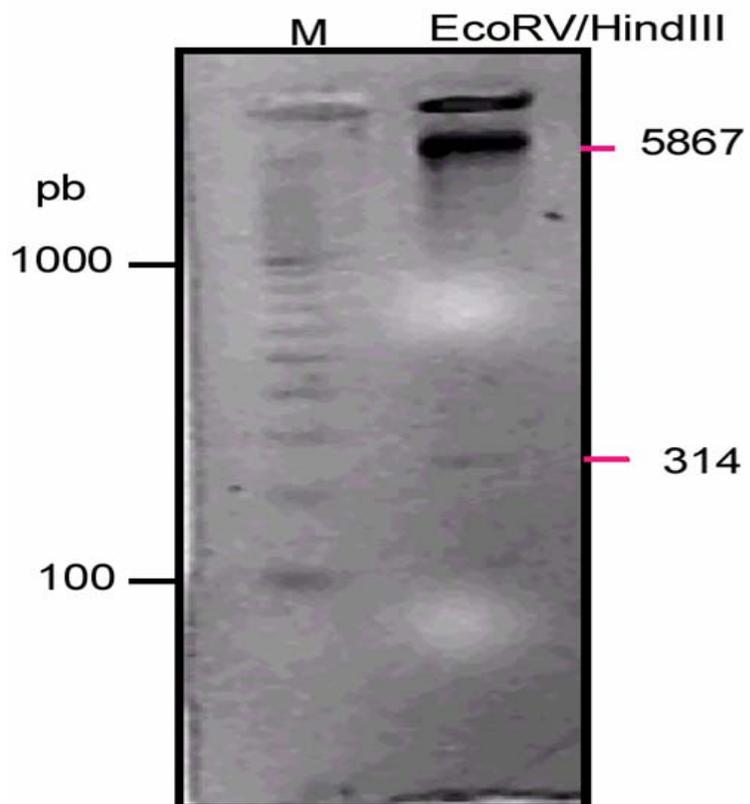
Carril 3: DNA no cortado

**FIGURA 4. Electroforesis de la comprobación de la inserción del eTum5 con la enzima de restricción PVUII**



- Carril 1: marcador
- Carril 2: DNA cortado con la enzima PVUII
- Carril 3: libre
- Carril 4: DNA no cortado
- Carril 5: libre

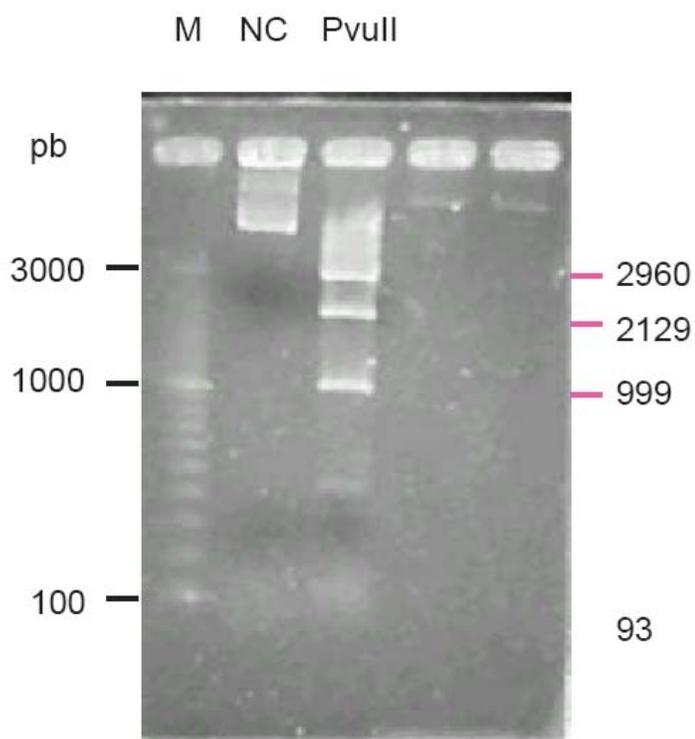
**FIGURA 5. Electroforesis de la comprobación de la inserción del eTum5 con las enzimas de restricción EcoRV y HindIII**



Carril 1: marcador

Carril 2: DNA cortado con las enzimas EcoRV/HindIII

**FIGURA 6. Electroforesis de la comprobación de la transformación del eTum5 con la enzima de restricción PvuII.**



Carril 1: marcador

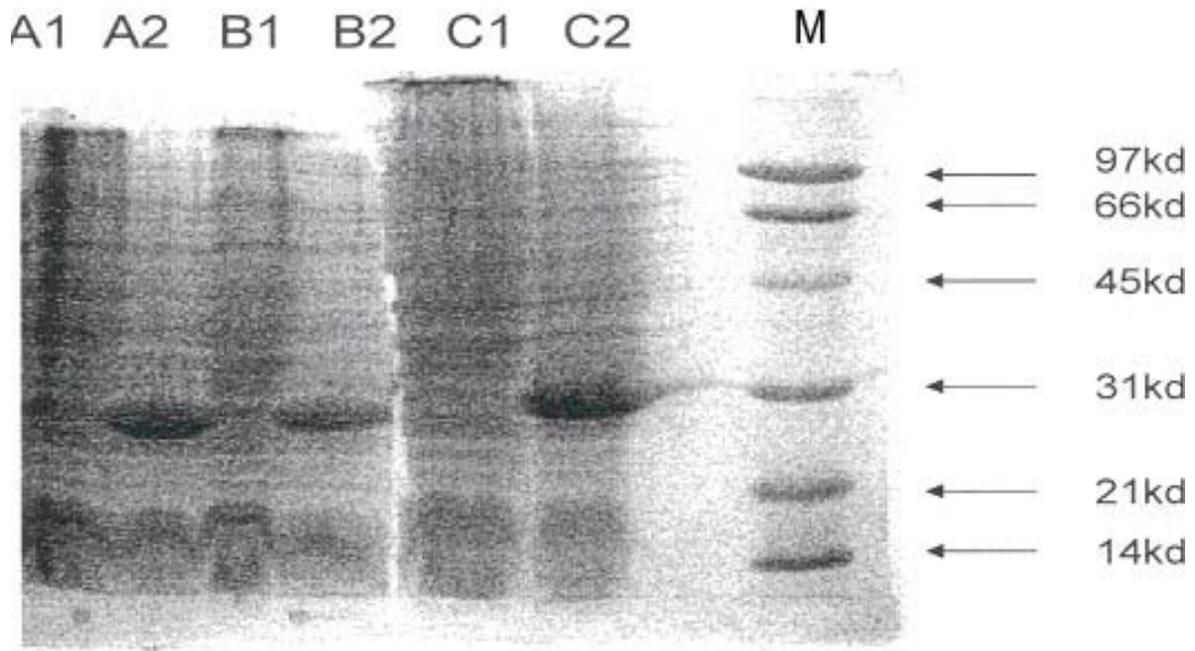
Carril 2: DNA no cortado

Carril 3: DNA transformado cortado con la enzima PVUII

Carriles 4 y 5: libres

**FIGURA 7. Electroforesis del eTum5 inducido con IPTG**

Inducción obtenida en el Laboratorio de Oncología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Louisiana, USA:



A, B y C: cultivos de tres diferentes colonias

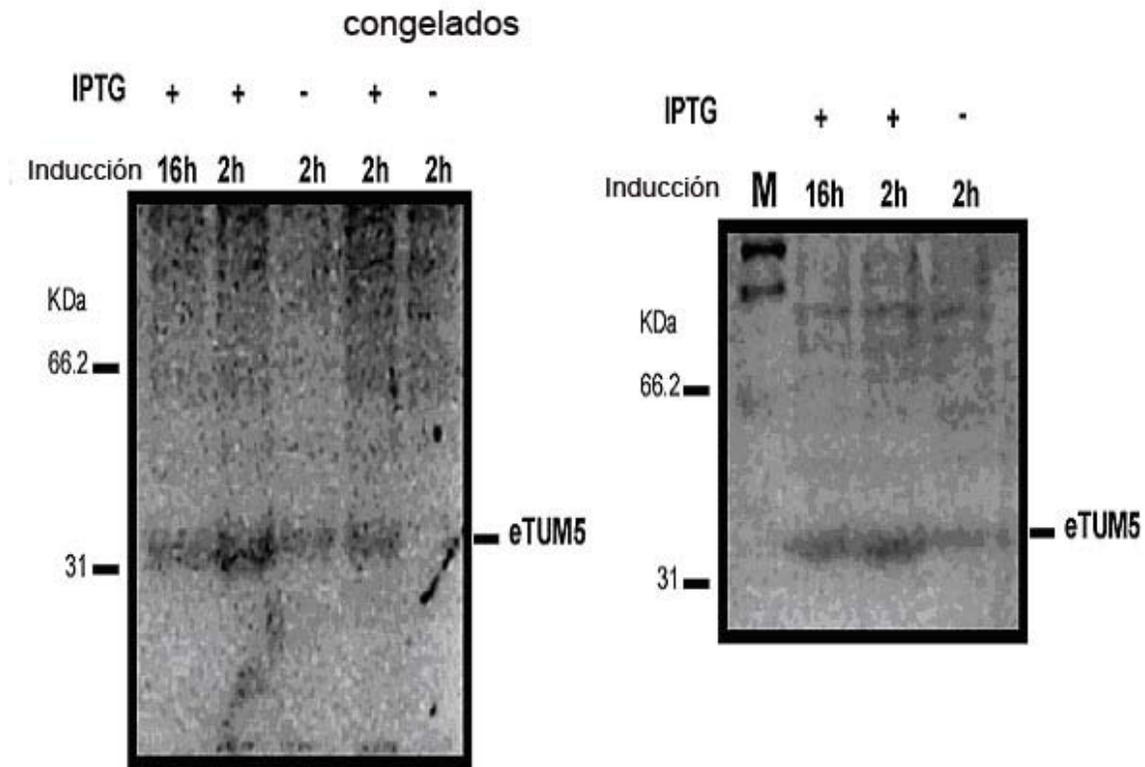
Número 1: no inducido

Número 2: inducción con IPTG (1mM)

eTum5: banda ancha correspondiente a 31 kDa

M: marcador

Inducciones obtenidas en el Laboratorio 5 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, México:



Inducción de la izquierda:

Carril 1: inducción con IPTG en un tiempo de incubación de 16 horas

Carril 2: inducción con IPTG en un tiempo de incubación de 2 horas (tiempo de incubación recomendado para este péptido) demostrando una banda más ancha de 31 kDa correspondiente al eTum5

Carril 3: eTum5 no inducido

Carril 4: eTum5 inducido y congelado durante 15 días

Carril 5: eTum5 congelado y no inducido

Inducción de la derecha:

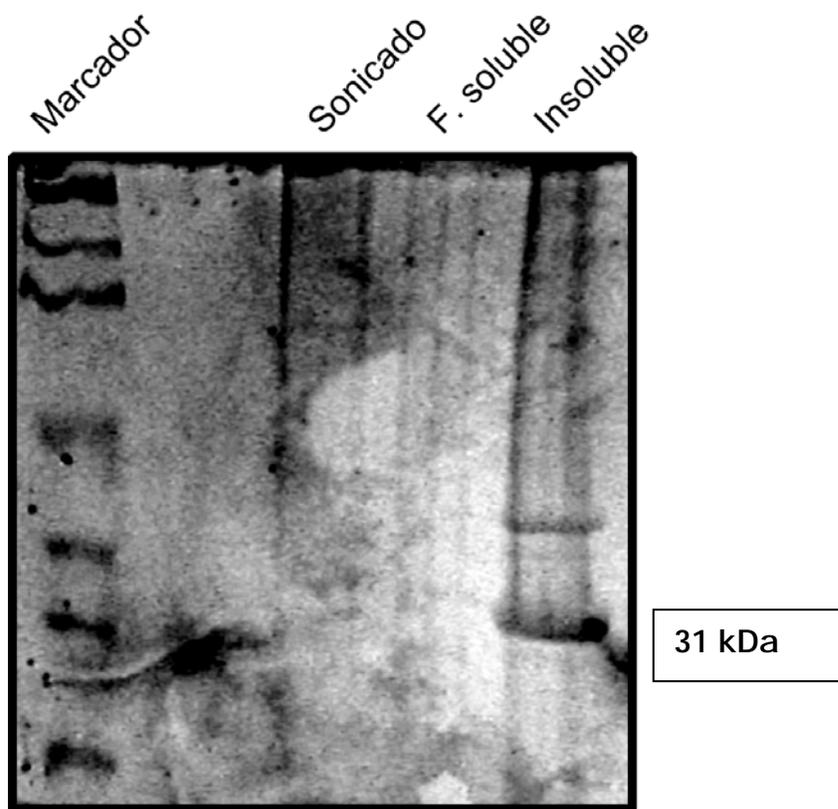
Carril 1: marcador

Carril 2: eTum5 inducido con IPTG en un tiempo de incubación de 16 horas

Carril 3: inducción con IPTG en un tiempo de incubación de 2 horas (tiempo recomendado) demostrando una banda del eTum5 (31 kDa) más fuerte

Carril 4: eTum5 no inducido.

**FIGURA 8. Análisis de solubilidad del eTum5**



Carril 1: marcador

Carril 2: libre

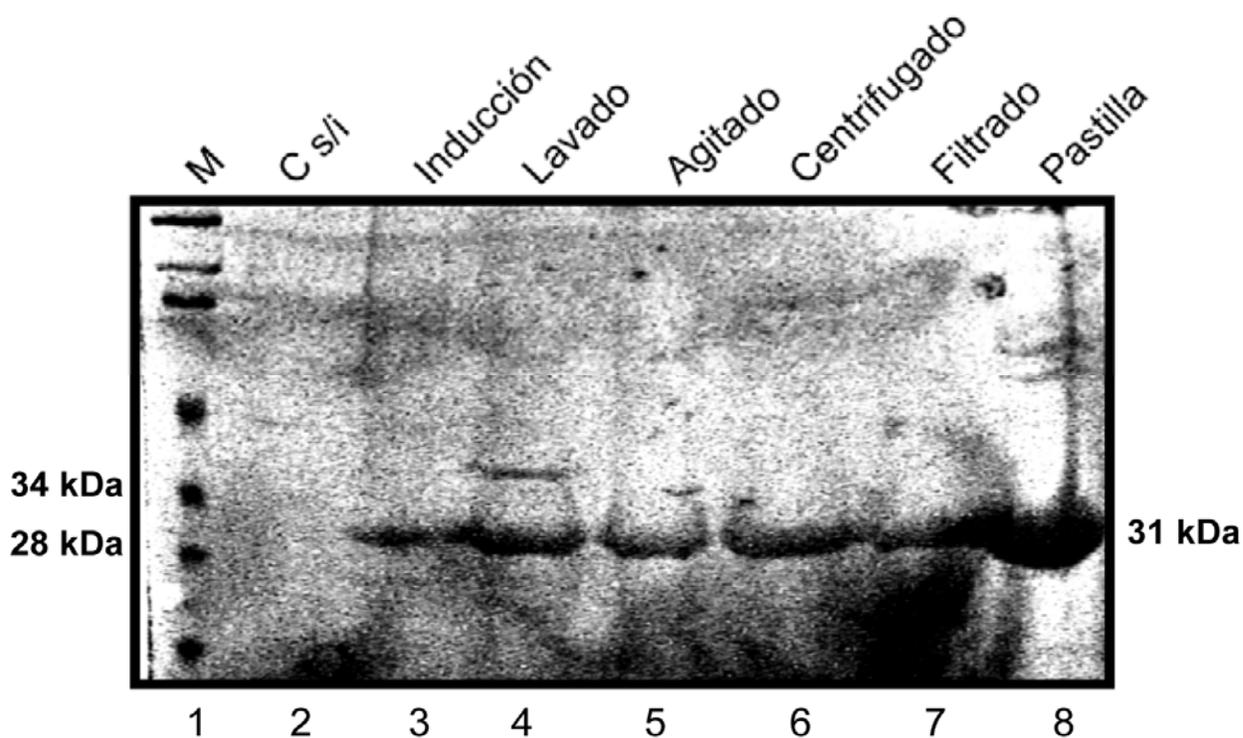
Carril 3: producto sonicado

Carril 4: fracción soluble

Carril 5: fracción insoluble observándose una banda de 31 kDa correspondiente al eTum5

□

**FIGURA 9. Análisis de los Cuerpos de inclusión**



Carril 1: marcador

Carril 2: control sin inducción

Carril 3: control con inducción con IPTG

Carril 4: producto del lavado

Carril 5: producto del agitado

Carril 6: producto del centrifugado

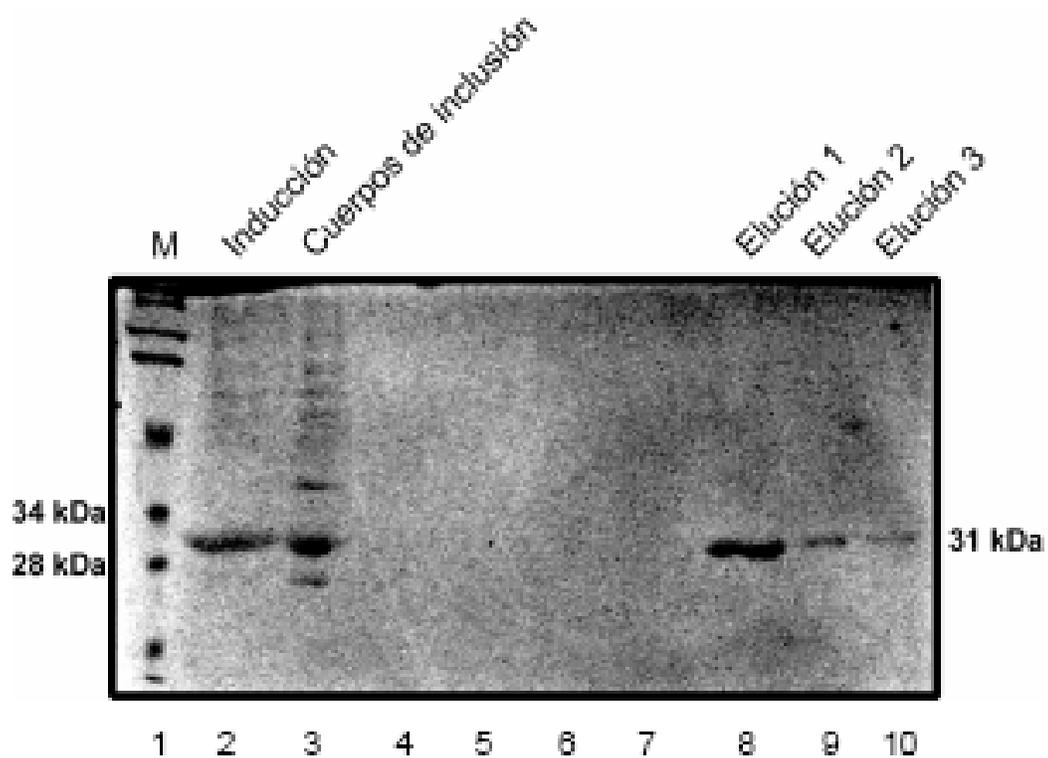
Carril 7: producto del filtrado

Carril 8: pastilla

A partir del carril 3 y hasta el carril 7 se observa una banda de 31 kDa correspondiente al eTum5, en el caso del carril 8 esta banda se observa más gruesa indicando mayor cantidad del péptido en el caso de la pastilla.

## FIGURA 10. Purificación del eTum5

Interacción con la columna de níquel



Carril 1: marcador

Carril 2: control inducido con IPTG

Carril 3: cuerpos de inclusión

Carriles 4 al 7: sin muestra

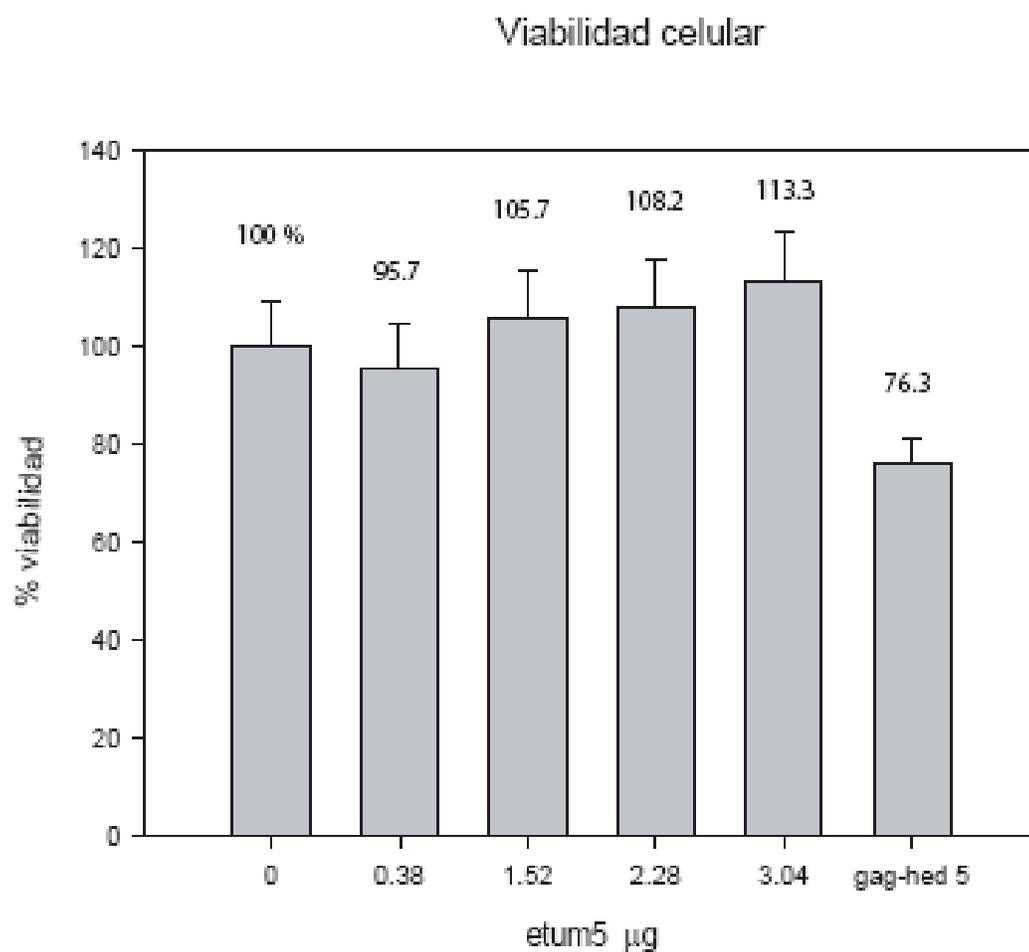
Carril 8: producto de la primera elusión observándose una banda más gruesa de 31 Da indicando mayor obtención de eTum5

Carril 9: producto de la segunda elusión

Carril 10: producto de la tercera elusión

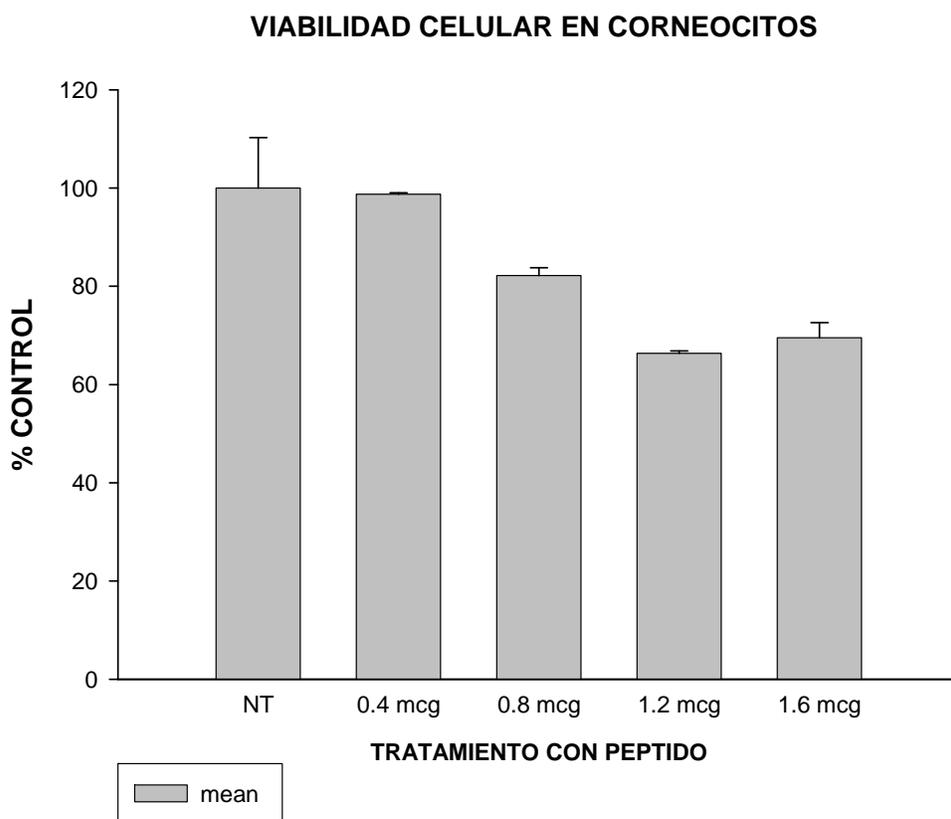
**FIGURA 11.** Gráfica de la citotoxicidad del eTum5 purificado en células epiteliales HeLa.

Se observa que todas las células epiteliales tratadas con el eTum5 purificado vivieron en comparación con el control análogo de la heparina Gag-hed en el último carril que está comprobado que produce disminución en las mismas.



**FIGURA 12.** Gráfica de la citotoxicidad del eTum5 purificado en células epiteliales corneales de conejo.

Se observa que a la dosis de 0.4 mcg el eTum5 purificado no es tóxico para las células epiteliales corneales, por lo que se recomendará esa dosis para su utilización.

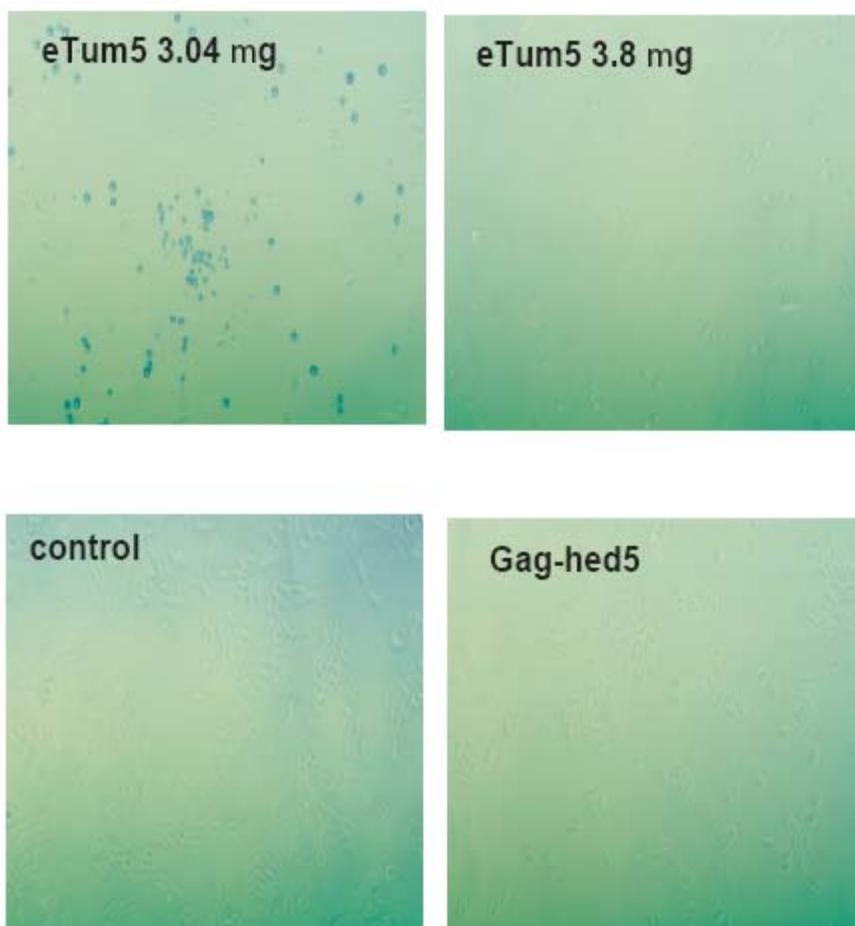


**FIGURA 13. Sobrevivencia celular endotelial mediante ensayos de MTT**

**Figura 13a**

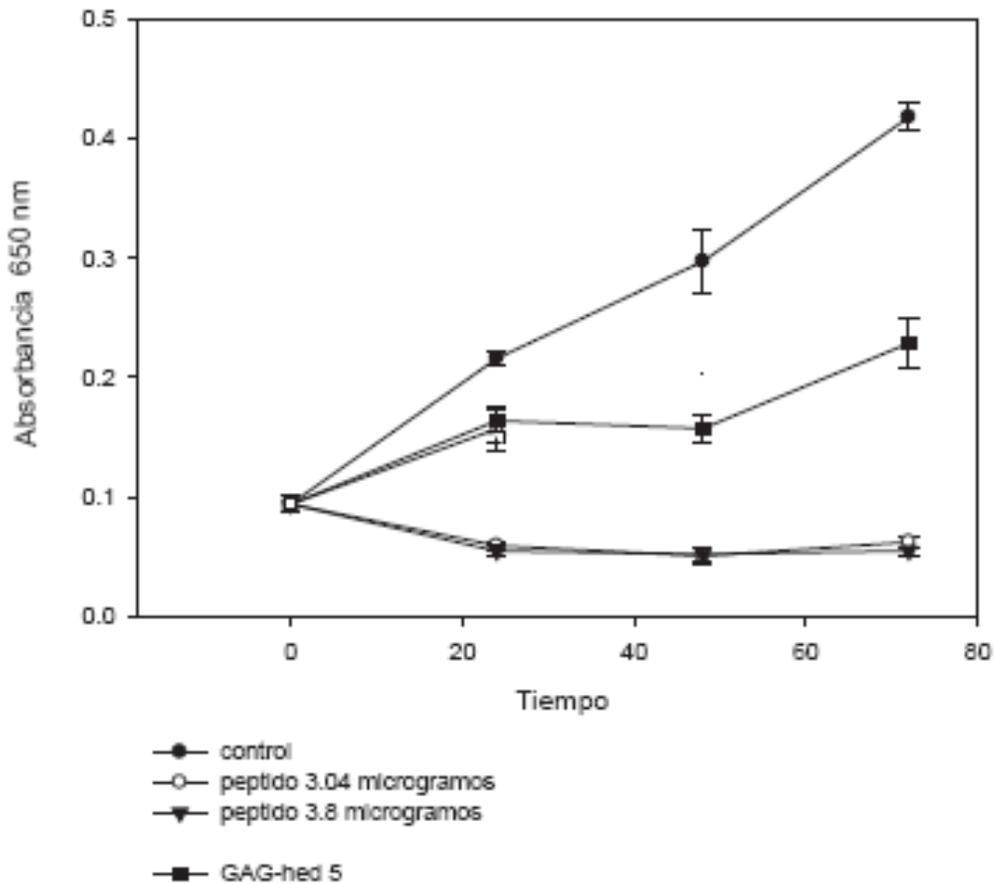
Fotografías del análisis de sobrevivencia celular en células BUVEC tratadas con el eTum5 purificado

Como se esperaba, se observa que en las células endoteliales tratadas con el eTum5 purificado hay muerte celular comprobándose así la propiedad antiangiogénica del mismo



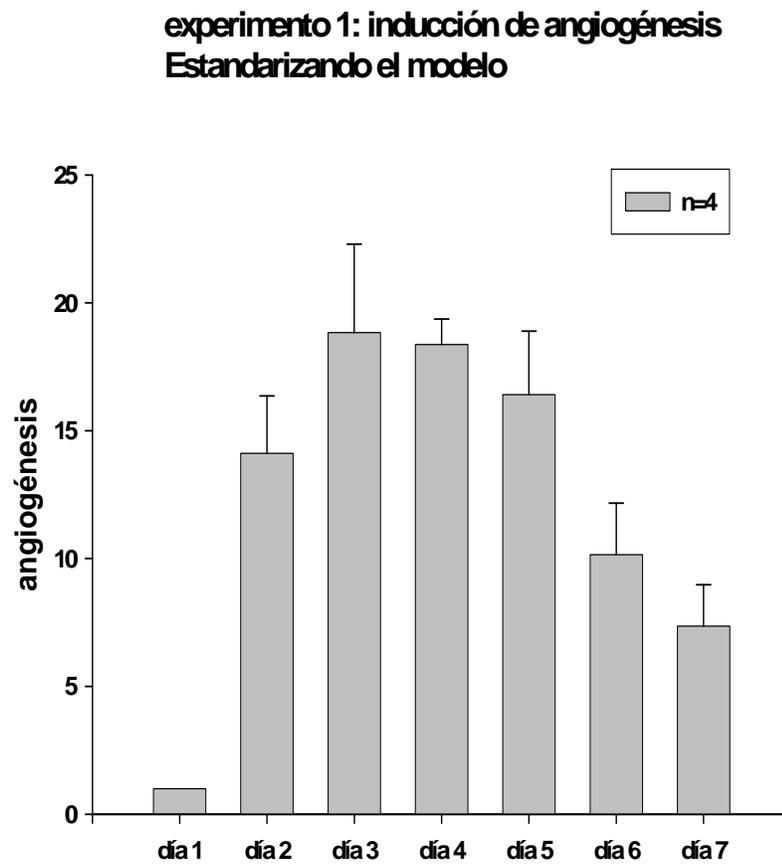
**Figura 13b.-** Gráfica de la supervivencia celular endotelial en células BUVEC

Las células endoteliales presentaron una disminución al ser tratadas con el eTum5 purificado y mediante este mecanismo éste inhibe la angiogénesis.



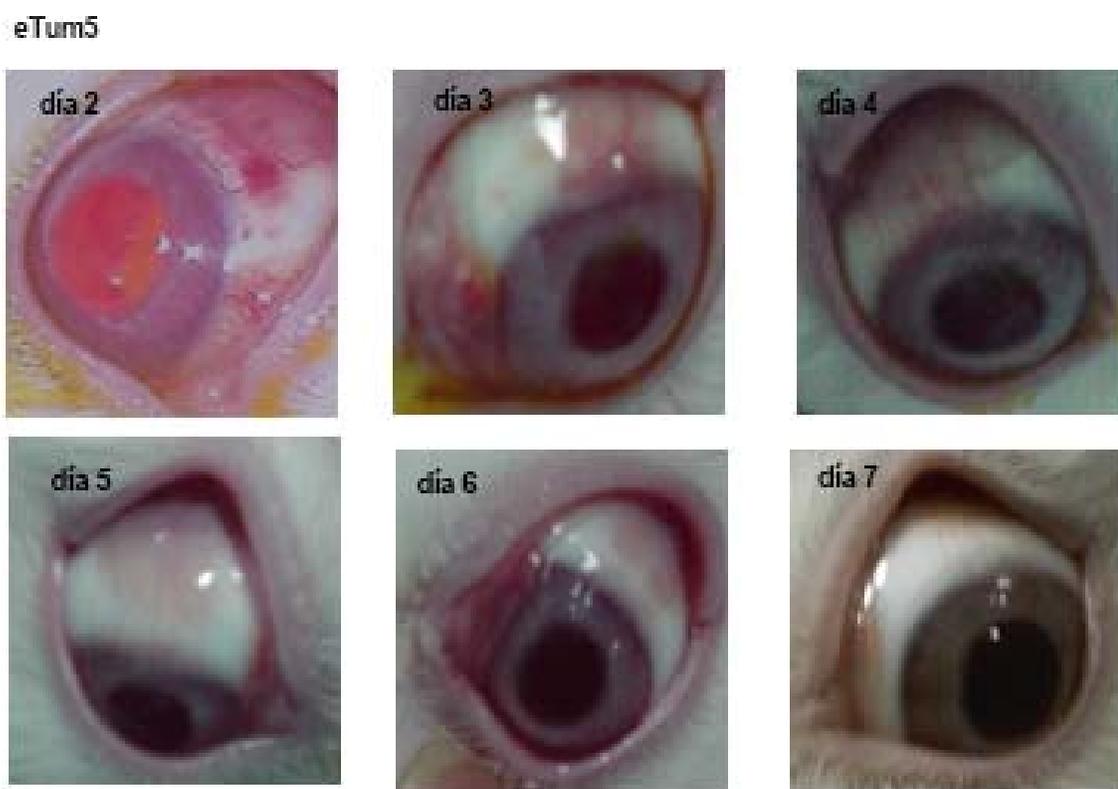
**FIGURA 14.** Gráfica para la estandarización del modelo experimental animal.

Se observa que la mayor angiogénesis después de un daño corneal se presenta en el día 3 y disminuye progresivamente hasta el día 7.



**FIGURA 15. Fotografías seriadas en el modelo animal del día dos al siete de un conejo del grupo tratado con la aplicación del eTum5 purificado evaluando la angiogénesis.**

Se observa la disminución de los vasos sanguíneos conforme avanzan los días hasta casi ser imperceptible en el día 7 del tratamiento, comprobando la actividad anti-angiogénica esperada del eTum5 purificado.

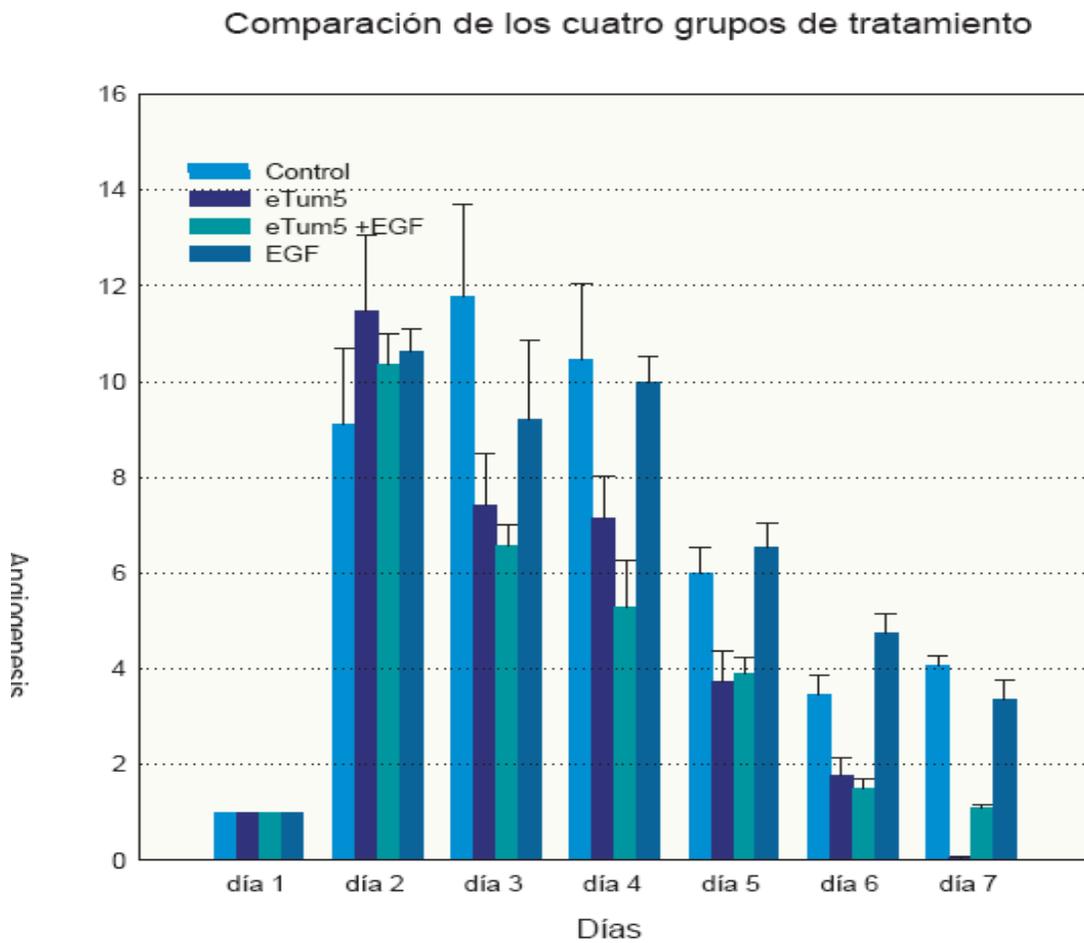


**FIGURA 16. Angiogénesis con los diferentes tratamientos aplicados en el modelo animal.**

**Figura 16a**

Gráfica que muestra la comparación del comportamiento de la angiogénesis con los diferentes tratamientos aplicados en el modelo animal.

Con esta gráfica se demuestra que el grupo en el que disminuyó más rápido la angiogénesis fue el tratado con el eTum5 purificado seguido por el grupo en el que se aplicó la combinación de EGF y eTum5 purificado.



**Figura 16b**

Comparación del comportamiento de la vascularización en los cuatro diferentes grupos tratados evaluando las diferencias entre las gráficas obtenidas en cada uno de ellos, en las cuales también se comprueba que el grupo tratado con el eTum5 presenta una disminución en la angiogénesis más rápida seguida por el grupo tratado con la combinación del eTum5 más EGF.

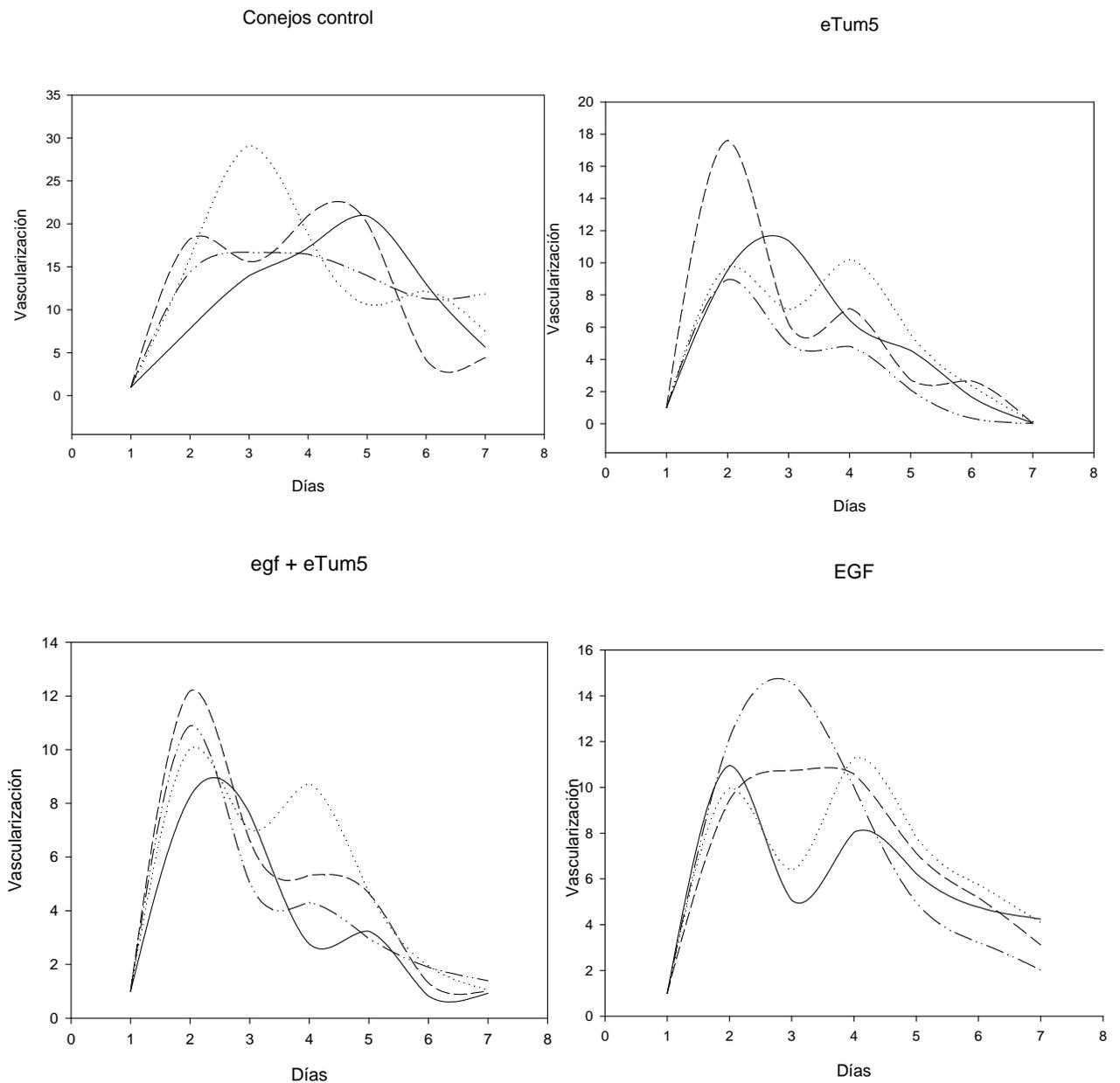
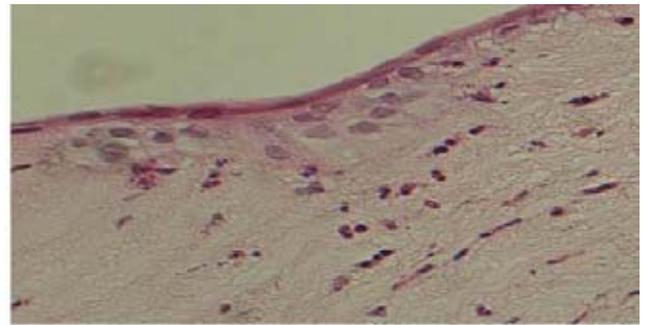


Figura 17. Histologías.

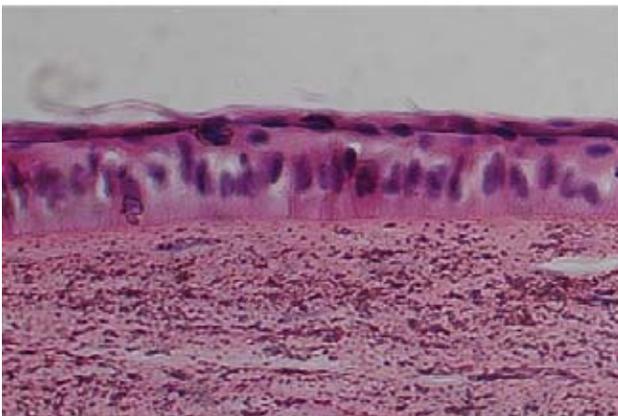
- 1) Córnea de un ojo sano de conejo mostrando las capas normales
- 2) Córnea de un ojo con lesión y sin tratamiento demostrando una córnea inflamada con un epitelio adelgazado y muchas células con crecimiento del epitelio hacia el estroma
- 3) Córnea tratada con el eTum5 purificado observándose regularidad del epitelio, células en mitosis e infiltración celular sin crecimiento hacia el estroma
- 4) Córnea tratada con la combinación del EGF y el eTum5 purificado observándose una cornea totalmente regenerada



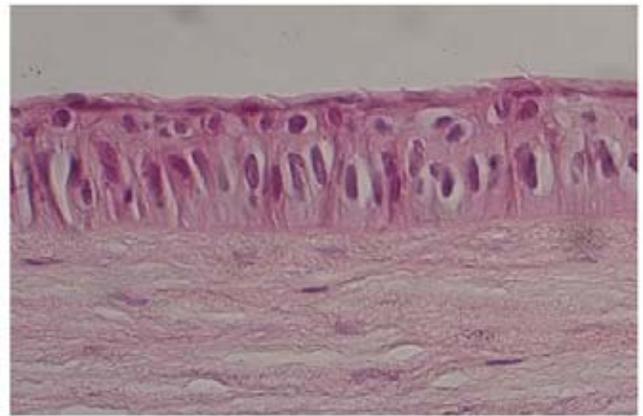
Córnea sana



Córnea con lesión sin tratamiento



eTum5



EGF + eTum5

## **SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS**

**GAGs.**- glicosaminoglicanos

**Na+.**- Sodio

**Cl-.** Cloro

**K.**- Potasio

**EGF.**- Factor de Crecimiento Epidermal

**βFGF.**- Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico

**TGFβ.**- Factor Beta de Crecimiento Transformador

**PDGF.**- Factor de Crecimiento Derivador de Plaquetas

**VEGF.**- Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

**SMA.**- α-actina de músculo liso

**IL-1.**- interleucina 1

**MMPs.**- metaloproteinasas

**SMA.**- α-actina de músculo liso

**IL-1.**- interleucina 1

**MMPs.**- metaloproteinasas

**PMN.**- leucocitos polimorfonucleares

**MEC.**- matriz extracelular

**NV.**-neovascularización

**eTum5.**- péptido recombinante equine Tum5

**TPK.**- queratoplastia penetrante terapéutica

**RT-PCR.**- Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa

**LB.**- medio de cultivo Luria Bertani

**OD.**- densidad óptica

**IPTG.**- inductor del operon de la lactosa isopropil beta D galactosida

**HeLa.**- células

**BUVEC.**- células endoteliales de vena umbilical de bovino

## **MEDIOS Y REACTIVOS**

### **Para el cultivo:**

#### **Medio LB (Luria Bertani):**

Triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1.0%

- 1.- Para preparar 1 litro, disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 950 ml de agua destilada.
- 2.- Ajustar el pH a 7 con NaOH y llevar el volumen a 1 litro.
- 3.- Esterilizar mediante autoclave durante 20 minutos. Dejar que la solución se enfríe hasta 55 °C y agregar antibióticos si son necesarios. Guardar a temperatura ambiente.

#### **LB agar:**

- 1.- Preparar medio LB como se indica arriba, pero agregar 15 g/L de agar antes de esterilizar.
- 2.- Esterilizar en la autoclave durante 20 minutos
- 3.- Después de esterilizar, dejar que se enfríe y agregar 50 µg/ml de ampicilina o kanamicina. Servir en los platos de 10 cm y dejar que solidifiquen y guardar a 4°C.

### **Para la inducción:**

#### **Solución de IPTG:**

- 1.- Preparar una solución 100 nM disolviendo 238 mg de IPTG en 10 ml de agua destilada
- 2.- Esterilizar mediante filtración y guardar en alícuotas de 1 ml a -20° C

#### **RF1:**

Cloruro de rubidio	6 gramos	
Cloruro de manganeso	4.95 g	
Acetato de potasio	1.47 g	
Cloruro de calcio	0.75 g	
Glicerol	59.5 ml	
Agua cbp	500 ml	pH = 5.8

**RF2:**

MOPS 0.5 M	2 ml	
Cloruro de rubidio	0.12 g	
Cloruro de calcio	1.1 g	
Glicerol	11.9 ml	
Agua cbp	100 ml	pH = 6.8 (ajustar con Hidróxido de sodio)

**Para el aislamiento de los cuerpos de inclusión:****Buffer de resuspensión:**

20 mM de Tris HCl pH8 y 1mM de pmsf

**Buffer de aislamiento:**

2M urea, 20mM Tris HCl con ph=8, 0.5 M NaCl y 2% Tritón X-100

**Buffer de solubilización:**

8M urea, 0.5 M de NaCl, 20 mM Tris HCl con ph=8 y 1 mM de 2  $\beta$ ME

**Para la purificación:****Buffer de unión:**

8M urea

20mM fosfato de sodio pH= 7.8

500 mM NaCl

**Buffer de lavado:**

8M urea

20mM fosfato de sodio pH= 6

500 mM NaCl

**Buffer de elución:**

8 M urea

20 m NaHPO

500 mM NaCl pH= 4.5

## BIBLIOGRAFIA

1. Knill, L.M., R.D. Eagleton, and E. Harver, *Physical optics of the equine eye*. Am J Vet Res, 1977. 38(6): p. 735-7.
2. Garner, A. and P. Griffiths, *Bilateral congenital ocular defects in a foal*. Br J Ophthalmol, 1969. 53(8): p. 513-7.
3. Plummer, C.E., D.T. Ramsey, and J.G. Hauptman, *Assessment of corneal thickness, intraocular pressure, optical corneal diameter, and axial globe dimensions in Miniature Horses*. Am J Vet Res, 2003. 64(6): p. 661-5.
4. Xu, K.P., et al., *Wound-induced HB-EGF ectodomain shedding and EGFR activation in corneal epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. 45(3): p. 813-20.
5. Mettenleiter, E.M., [Sonographic diagnosis (B-mode technique) for the eyes in horses. 1. Methods and normal findings]. Tierarztl Prax, 1995. 23(5): p. 481-8.
6. Chmielewski, N.T., et al., *Visual outcome and ocular survival following iris prolapse in the horse: a review of 32 cases*. Equine Vet J, 1997. 29(1): p. 31-9.
7. Ramsey, D.T., J.G. Hauptman, and S.M. Petersen-Jones, *Corneal thickness, intraocular pressure, and optical corneal diameter in Rocky Mountain Horses with cornea globosa or clinically normal corneas*. Am J Vet Res, 1999. 60(10): p. 1317-21.
8. Brooks, D.E., et al., *Nonulcerative keratouveitis in five horses*. J Am Vet Med Assoc, 1990. 196(12): p. 1985-91.
9. Cutler, T.J., *Corneal epithelial disease*. Vet Clin North Am Equine Pract, 2004. 20(2): p. 319-43, vi.
10. Latimer, C.A. and M. Wyman, *Neonatal ophthalmology*. Vet Clin North Am Equine Pract, 1985. 1(1): p. 235-59.
11. Parry, D.A., G.R. Barnes, and A.S. Craig, *A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1978. 203(1152): p. 305-21.
12. Biros, D.J., et al., *Regional and zonal variations in the sulfation patterns of chondroitin sulfate in normal equine corneal stroma*. Am J Vet Res, 2002. 63(1): p. 143-7.
13. Parlebas, J., [Chemical and immunologic study of a new glycoprotein from the cornea]. Rev Immunol (Paris), 1970. 34(4): p. 205-43.
14. Funaki, T., et al., *Smad7 suppresses the inhibitory effect of TGF-beta2 on corneal endothelial cell proliferation and accelerates corneal endothelial wound closure in vitro*. Cornea, 2003. 22(2): p. 153-9.
15. Dice, P.F. and P.L. Cooley, *Peripheral corneal ulcers in the horse*. Equine Vet J Suppl, 1990(10): p. 18-21.
16. Bentley, E. and C.J. Murphy, *Thermal cautery of the cornea for treatment of spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs and horses*. J Am Vet Med Assoc, 2004. 224(2): p. 250-3, 224.
17. Andrew, S.E., et al., *Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses*. Am J Vet Res, 2001. 62(4): p. 479-82.

18. Mustakallio, A., *Monoamine oxidase activity in the various structures of the mammalian eye. Histochemical staining and quantitative chemical study.* Acta Ophthalmol (Copenh), 1967: p. Suppl 93:1-62.
19. Kurpakus, M.A., E.L. Stock, and J.C. Jones, *Analysis of wound healing in an in vitro model: early appearance of laminin and a 125 x 10<sup>3</sup> Mr polypeptide during adhesion complex formation.* J Cell Sci, 1990. 96 ( Pt 4): p. 651-60.
20. Conconi, M.T., et al., *Prostaglandin F2 alpha can modulate the growth and the differentiation of bovine corneal epithelial cells cultured in vitro.* Ann Anat, 2001. 183(6): p. 567-73.
21. Hamilton, H.I., et al., *Histological findings in corneal stromal abscesses of 11 horses: correlation with cultures and cytology.* Equine Vet J, 1994. 26(6): p. 448-53.
22. Saika, S., *TGF-beta signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target.* Cornea, 2004. 23(8 Suppl): p. S25-30.
23. Gilger, B.C., T.M. Michau, and J.H. Salmon, *Immune-mediated keratitis in horses: 19 cases (1998-2004).* Vet Ophthalmol, 2005. 8(4): p. 233-9.
24. Wyman, M., *Surgery of the cornea and anterior segment of the horse's eye.* J Am Vet Med Assoc, 1968. 153(12): p. 1703-4.
25. Strissel, K.J., W.B. Rinehart, and M.E. Fini, *A corneal epithelial inhibitor of stromal cell collagenase synthesis identified as TGF-beta 2.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. 36(1): p. 151-62.
26. Sharma, G.D., J. He, and H.E. Bazan, *p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades.* J Biol Chem, 2003. 278(24): p. 21989-97.
27. Petroustos, G., et al., *Comparison of the effects of EGF, pFGF and EDGF on corneal epithelium wound healing.* Curr Eye Res, 1984. 3(4): p. 593-8.
28. Taliana, L., et al., *The influence of stromal contraction in a wound model system on corneal epithelial stratification.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. 42(1): p. 81-9.
29. Wu, X.Y., et al., *The role of connective tissue growth factor, transforming growth factor beta1 and Smad signaling pathway in cornea wound healing.* Chin Med J (Engl), 2006. 119(1): p. 57-62.
30. Haber, M., et al., *Effects of growth factors (EGF, PDGF-BB and TGF-beta 1) on cultured equine epithelial cells and keratocytes: implications for wound healing.* Vet Ophthalmol, 2003. 6(3): p. 211-7.
31. Stramer, B.M., et al., *Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. 44(10): p. 4237-46.
32. Haq, F. and V. Trinkaus-Randall, *Injury of stromal fibroblasts induces phosphorylation of focal adhesion proteins.* Curr Eye Res, 1998. 17(5): p. 512-23.
33. Hendrix, D.V., et al., *Corneal stromal abscesses in the horse: a review of 24 cases.* Equine Vet J, 1995. 27(6): p. 440-7.
34. Turkington, R.W., J.L. Males, and S. Cohen, *Synthesis and storage of epithelial-epidermal growth factor in submaxillary gland.* Cancer Res, 1971. 31(3): p. 252-6.

35. Bazan, H.E., *Cellular and molecular events in corneal wound healing: significance of lipid signalling*. *Exp Eye Res*, 2005. 80(4): p. 453-63.
36. Murthy, R.C., et al., *Corneal transduction to inhibit angiogenesis and graft failure*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. 44(5): p. 1837-42.
37. Berryhill, B.L., et al., *Increased SPARC accumulation during corneal repair*. *Exp Eye Res*, 2003. 77(1): p. 85-92.
38. Ollivier, F.J., et al., *Profiles of matrix metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis*. *Vet Ophthalmol*, 2004. 7(6): p. 397-405.
39. Haffner, J.C., K.A. Fecteau, and H. Eiler, *Inhibition of collagenase breakdown of equine corneas by tetanus antitoxin, equine serum and acetylcysteine*. *Vet Ophthalmol*, 2003. 6(1): p. 67-72.
40. Massa, K.L., et al., *Usefulness of aerobic microbial culture and cytologic evaluation of corneal specimens in the diagnosis of infectious ulcerative keratitis in animals*. *J Am Vet Med Assoc*, 1999. 215(11): p. 1671-4.
41. Cohen, S., *Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal*. *J Biol Chem*, 1962. 237: p. 1555-62.
42. Knorr, M., et al., *[EGF in therapy of corneal diseases. Principles and possible uses]*. *Ophthalmologe*, 1992. 89(2): p. 119-27.
43. Liu, L., et al., *[Infection of recombinant adenovirus expressing acidic fibroblasts growth factor enhances rabbit corneal endothelium proliferation]*. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 2004. 40(3): p. 156-9.
44. Sheardown, H. and Y.L. Cheng, *Tear EGF concentration following corneal epithelial wound creation*. *J Ocul Pharmacol Ther*, 1996. 12(3): p. 239-43.
45. Boisjoly, H.M., et al., *Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis*. *Exp Eye Res*, 1993. 57(3): p. 293-300.
46. Joyce, N.C., et al., *EGF and PGE2: effects on corneal endothelial cell migration and monolayer spreading during wound repair in vitro*. *Curr Eye Res*, 1995. 14(7): p. 601-9.
47. Hongo, M., et al., *Distribution of epidermal growth factor (EGF) receptors in rabbit corneal epithelial cells, keratocytes and endothelial cells, and the changes induced by transforming growth factor-beta 1*. *Exp Eye Res*, 1992. 54(1): p. 9-16.
48. Hutchings, H., N. Ortega, and J. Plouet, *Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation*. *Faseb J*, 2003. 17(11): p. 1520-2.
49. Kalluri, R., *Discovery of type IV collagen non-collagenous domains as novel integrin ligands and endogenous inhibitors of angiogenesis*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2002. 67: p. 255-66.
50. Serini, G., D. Valdembri, and F. Bussolino, *Integrins and angiogenesis: a sticky business*. *Exp Cell Res*, 2006. 312(5): p. 651-8.
51. Welch, P.M., et al., *In vitro analysis of antiangiogenic activity of fungi isolated from clinical cases of equine keratomycosis*. *Vet Ophthalmol*, 2000. 3(2-3): p. 145-151.
52. Bouma-ter Steege, J.C., K.H. Mayo, and A.W. Griffioen, *Angiostatic proteins and peptides*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2001. 11(4): p. 319-34.

53. Floquet, N., et al., *The antitumor properties of the alpha3(IV)-(185-203) peptide from the NC1 domain of type IV collagen (tumstatin) are conformation-dependent.* J Biol Chem, 2004. 279(3): p. 2091-100.
54. Tarui, T., L.A. Miles, and Y. Takada, *Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells.* J Biol Chem, 2001. 276(43): p. 39562-8.
55. Sudhakar, A., et al., *Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(8): p. 4766-71.
56. Hamano, Y. and R. Kalluri, *Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. 333(2): p. 292-8.
57. Andrew, S.E., et al., *Posterior lamellar keratoplasty for treatment of deep stromal abscesses in nine horses.* Vet Ophthalmol, 2000. 3(2-3): p. 99-103.
58. van der Velden, M.A., *[Pathology of the cornea in the horse (part 3)].* Tijdschr Diergeneeskd, 2005. 130(2): p. 45-7.
59. Brooks, D.E., *Inflammatory stromal keratopathies: medical management of stromal keratomalacia, stromal abscesses, eosinophilic keratitis, and band keratopathy in the horse.* Vet Clin North Am Equine Pract, 2004. 20(2): p. 345-60, vi.
60. Azar, D.T., *Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an american ophthalmological society thesis).* Trans Am Ophthalmol Soc, 2006. 104: p. 264-302.
61. Denis, H.M., *Equine corneal surgery and transplantation.* Vet Clin North Am Equine Pract, 2004. 20(2): p. 361-80, vi-vii.
62. Whittaker, C.J.G., et al., *Therapeutic Penetrating Keratoplasty for Deep Corneal Stromal Abscesses in Eight Horses.* Veterinary and Comparative Ophthalmology, 1997. 7(1): p. 19-28.
63. Chang, J.H., et al., *Corneal neovascularization.* Curr Opin Ophthalmol, 2001. 12(4): p. 242-9.
64. Morbidelli, L. and M. Ziche, *The rabbit corneal pocket assay for the study of angiogenesis.* Cancer Treat Res, 2004. 117: p. 147-51.
65. Ahmed, F.E., et al., *Improved methods for extracting RNA from exfoliated human colonocytes in stool and RT-PCR analysis.* Dig Dis Sci, 2004. 49(11-12): p. 1889-98.
66. Seiden, M. and J.L. Sklar, *PCR- and RT-PCR-based methods of tumor detection: potential applications and clinical implications.* Important Adv Oncol, 1996: p. 191-204.
67. Liedtke, W., et al., *A comparison of methods for RNA extraction from lymphocytes for RT-PCR.* PCR Methods Appl, 1994. 4(3): p. 185-7.
68. Ollivier, F.J., *The precorneal tear film in horses: its importance and disorders.* Vet Clin North Am Equine Pract, 2004. 20(2): p. 301-18.
69. Yang, W. and D. Acosta, *Cytotoxicity potential of surfactant mixtures evaluated by primary cultures of rabbit corneal epithelial cells.* Toxicol Lett, 1994. 70(3): p. 309-18.

70. Banchonglikitkul, C., et al., *An in-vitro evaluation of lectin cytotoxicity using cell lines derived from the ocular surface*. J Drug Target, 2002. 10(8): p. 601-6.
71. Kim, B., et al., *Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis*. Am J Pathol, 2004. 165(6): p. 2177-85.
72. Villanueva, R., et al., *Heparin (GAG-hed) inhibits LCR activity of human papillomavirus type 18 by decreasing API binding*. BMC Cancer, 2006. 6: p. 218.
73. Castro-Munozledo, F., *Development of a spontaneous permanent cell line of rabbit corneal epithelial cells that undergoes sequential stages of differentiation in cell culture*. J Cell Sci, 1994. 107 ( Pt 8): p. 2343-51.
74. Taubert, A., et al., *[Reaction of bovine endothelial cells in vitro to coccidia (Eimeria bovis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum) infections as the expression of a non-adaptive immune response]*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2006. 119(7-8): p. 274-81.
75. Cajero-Juarez, M., et al., *Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium*. Eur J Cell Biol, 2002. 81(1): p. 1-8.
76. García-Sánchez G., P.A., *Manejo de la ulceración corneal en el equino*. Revisión Médica Equina, 2007. 1(3): p. 113-121.
77. Maeshima Y., M.M., Reimer C., Holthaus K., Hopfer H., Chandamuri B., et.al., *Identification of the ant-angiogenic site within vascular basement membrane-derived Tumstatin*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(18): p. 15240-15248.
78. Sunderkotter, C., et al., *Cellular events associated with inflammatory angiogenesis in the mouse cornea*. Am J Pathol, 1991. 138(4): p. 931-9.
79. Friedlander, M., et al., *Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(18): p. 9764-9.
80. Huang, A.J., et al., *Modulation of corneal vascularization*. Ocul Surf, 2005. 3(4 Suppl): p. S190-3.