



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado

Instituto de Oftalmología Fundación "Conde de Valenciana"

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS APOPTÓTICAS  
EN PTERIGIÓN PRIMARIO EN COMPARACIÓN CON  
CONJUNTIVA NORMAL

TESIS

PRESENTA:

Dra. Miriam Edith López Salas

ASESORES

Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio

Dr. Ángel Nava Castañeda



Agosto 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## ÍNDICE

	Páginas
Introducción .....	2 - 8
Justificación .....	9
Hipótesis .....	9
Objetivos .....	9
Material y métodos	
Diseño del estudio .....	10
Implicaciones éticas .....	10
Muestra .....	10
Variables del estudio .....	11
Análisis estadístico .....	12
Resultados .....	13-20
Discusión .....	21-23
Conclusión .....	23
Referencias .....	24-26
Apéndice	
Carta de consentimiento informado .....	27
Carta de cesión de derechos .....	28

## INTRODUCCIÓN

La descripción más antigua del pterigión data de la época de Hipócrates <sup>(1)</sup>, la palabra pterigión proviene del griego *pterygos* que significa ala <sup>(2)</sup>, por definición se trata de una enfermedad de la superficie ocular que consiste en un crecimiento fibrovascular de la conjuntiva hacia la córnea y que se asocia a crecimiento centrípeto, inflamación y neovascularización. <sup>(3)</sup>

Histológicamente se describe como una degeneración elastótica de la sustancia propia conjuntival con depósitos eosinofílicos y basofílicos. Los cambios epiteliales son variables e incluyen hiperqueratosis, paraqueratosis o acantosis. <sup>(1)</sup>

Existe una amplia variación en la prevalencia del pterigión dependiendo de la región estudiada siendo en Japón del 1%, en España del 5.6% y en lugares como las Islas Samoa del 29%. En un estudio realizado a una población de latinos residentes de Arizona la prevalencia encontrada fue del 16%.<sup>(4,5)</sup> La zona geográfica de mayor incidencia se encuentra en la latitud 40° norte y sur del ecuador. <sup>(6)</sup>

Como factores de riesgo se han descrito la exposición a la radiación solar y bajo nivel educativo, por otro lado se encontró que el tabaquismo puede ser un factor protector. <sup>(4)</sup> Un estudio realizado en Singapur demostró un aumento de la prevalencia con la edad, sexo masculino y con la presión sistólica alta, además el pterigión avanzado se asoció con niveles elevados de colesterol y con ocupaciones al aire libre. <sup>(7,8)</sup>

El cuadro clínico incluye lagrimeo, hiperemia conjuntival, astigmatismo inducido y disminución de la visión en caso de afectación del eje visual.

Se han planteado diversas teorías para explicar la fisiopatología del pterigión sin embargo ninguna explica completamente el origen por lo que a continuación se habla de los factores probablemente involucrados en la génesis del pterigión que se mencionan en la literatura actual.

### *Genética y herencia*

Al principio se pensaba que se heredaba de forma autosómica dominante sin embargo no se ha podido verificar si se hereda como un rasgo independiente o los individuos afectados comparten una susceptibilidad aumentada a los efectos oculodérmicos de la radiación solar. <sup>(9)</sup>

### *Mecanismos inmunes*

En el pterigión existe un aumento en la expresión de la molécula de adhesión vascular celular (VCAM-1) y de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1).

La E-caderina está implicada en la adhesión celular, se expresa en la cabeza del pterigión y está ausente en la conjuntiva normal y en la córnea, éstos hallazgos sugieren que ésta molécula juega un papel importante en la adherencia al globo ocular. <sup>(10)</sup>

La B-catenina se une a la E-caderina y participa en las vías de transducción de señales, también participa en el cambio de fenotipo de células epiteliales a fibroblastos después de una lesión y muchas proteínas relacionadas con pterigión como las metaloproteinasas y la ciclina D están bajo su control. <sup>(3,11)</sup>

Por otra parte, las reacciones de hipersensibilidad I, III y IV se han relacionado con el desarrollo del pterigión. <sup>(1)</sup>

### *Matriz extracelular*

La radiación ultravioleta B y los mediadores de la inflamación incrementan la expresión de metaloproteasas de matriz que intervienen en el remodelamiento celular.

Las metaloproteinasas son una familia de enzimas que degradan la matriz extracelular, disuelven la capa de Bowman y promueven angiogénesis y se ha visto que también intervienen en la invasión del pterigión a la córnea. <sup>(12)</sup>

### *Inflamación*

La expresión de los reactantes de fase aguda como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), y de la molécula quimiotáctica interleucina 8 (IL-8) así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) están aumentadas en el pterigión después de la exposición a rayos UV-B. <sup>(13)</sup>

### *Factores de crecimiento*

Los factores de crecimiento que se han demostrado elevados en pterigión son el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), actualmente se están llevando a cabo diversos estudios en donde se emplean anticuerpos contra éste para disminuir el riesgo y como tratamiento de los casos recidivantes de pterigión. Otros son el factor de crecimiento básico de los fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF-B) por mencionar algunos. <sup>(14)</sup>

### *Angiogénesis*

Los factores angiogénicos que se han encontrado elevados en el pterigión son el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la sustancia P. <sup>(1, 15, 16)</sup>. La trombospondina-1 se encarga de modular el crecimiento, movimiento y apoptosis de las células endoteliales, por otra parte se ha demostrado que promueve la angiogénesis *in vitro*, sin embargo en el estudio de Aspiotis y colaboradores se encontró una disminución de su expresión en pterigión. <sup>(15)</sup>

### *Metabolismo del colesterol*

Se han demostrado niveles aumentados de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa) y del receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL) y se piensa que esto puede estar relacionado con una estimulación de la proliferación de fibroblastos. <sup>(17)</sup>

### *Virus*

Se ha relacionado el virus herpes simple (VHS) y el virus del papiloma humano (VPH) con el desarrollo del pterigión y debido a que su presencia no es constante, éstos solo intervendrían provocando un aumento en la susceptibilidad y no son como tal indispensables en el desarrollo del pterigión. <sup>(18)</sup>

### *Estrés oxidativo*

Los efectos nocivos de la radiación ultravioleta actúan por medio de un daño fototóxico directo o de forma indirecta a través de especies reactivas de oxígeno. Estos últimos son muy dañinos a las células porque causan daño en el DNA celular, proteínas, lípidos en un proceso llamado estrés oxidativo. <sup>(19)</sup>

La localización más frecuente del pterigión es la nasal lo cual es indicativo del papel patogénico de la radiación solar ya que es la zona más expuesta a ésta. Los rayos UV A y UV B son los que más se han vinculado. <sup>(20)</sup>

La 8-hidroxideoguanosina (8-oHdG) es un marcador de estrés oxidativo que evalúa el daño en el DNA y se ha demostrado su presencia en pterigión. <sup>(2, 19, 21)</sup>

La 8-oHdG muta con mucha frecuencia causando un cambio de guanina por timidina, esto sugiere un posible origen mutagénico. <sup>(21,22)</sup>

### *Regulación del ciclo celular*

El pterigión comparte muchas características similares con los tumores como proliferación celular, invasión a la córnea y recurrencia después de resección. Recientemente se ha propuesto al pterigión como una proliferación no controlada. <sup>(23)</sup>

La apoptosis representa la muerte celular programada normal de una célula que ha llegado al final de su ciclo de vida. Es una forma de muerte celular descrita como algo separado a la necrosis por Kerr y colaboradores en 1972. Al contrario que la necrosis, la apoptosis requiere de energía y de una cascada de genes. <sup>(24)</sup>

Se cree que es un proceso regulado por genes que la promueven y la inhiben. Dentro de los inhibidores se encuentran los genes bcl-2 y bcl-xl, mientras que dentro de los promotores se encuentran los genes bax, bad, bak y bcl-xs. El ratio entre bcl-2 y bax determina el destino de la célula. Si el bax está en exceso, todo el bcl-2 queda unido y se estimula la apoptosis. Ambos genes están regulados por el gen supresor de tumores p53, y p53 inhibe la expresión de bcl-2 y promueve la expresión de bax. <sup>(24)</sup>

La survivina, miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis, se encuentra aumentada en pterigión así como el factor supresor de tumores p53. <sup>(21, 22, 25)</sup>



Otros hallazgos relacionados son un aumento en la actividad de telomerasa. <sup>(1)</sup> En el epitelio del pterigión se han demostrado moléculas relacionadas con el ciclo celular como p27 (KIP1), la cual se expresa en un estado normal pero se encuentra regulada a la baja en pterigión, la expresión de la ciclina D1 es inducida en pterigión. <sup>(26)</sup>

En un estudio se demostró la existencia de CD30 (la cual pertenece a la familia de receptores de factor de necrosis tumoral) en el epitelio basal del pterigión lo que sugiere que puede estar asociada a una proliferación celular descontrolada a nivel del epitelio del pterigión. <sup>(27)</sup>

Los radicales libres de oxígeno inducen la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). La COX-2 es suprimida por p53 y se ha reportado una sobreexpresión en diversos tumores malignos, premalignos y metastásicos, así como en pterigión. <sup>(28, 29)</sup>

Dentro de los sistemas de reparación del DNA se encuentra la reparación por escisión de bases (BER) y la reparación por escisión de nucleótidos (NER), se han demostrado en pterigión polimorfismos de la 8-oxoguanina DNA glucosilasa 1 (hOGG1) los cuales pueden estar asociados con su desarrollo. <sup>(27, 30)</sup>

En resumen, se han realizado estudios que han demostrado que la regulación de la apoptosis juega un papel importante en la patogénesis del pterigión. Sin embargo, también se han reportado estudios del papel de la proliferación celular en el pterigión. La pregunta es si la apoptosis y si la proliferación participan en la patogénesis del pterigión. <sup>(23)</sup>

## ANTECEDENTES DE PROTEÓMICA

A pesar de que el genoma humano ha sido secuenciado y de que se han descubierto un gran número de genes asociados a enfermedades oculares, el estado biológico de la célula es dictado finalmente por las proteínas las cuales son el producto de los genes. Sin embargo, resulta difícil entender cómo es que 1 millón de proteínas humanas son codificadas por aproximadamente 25 000 genes. La mayoría de los genes pasa por un proceso denominado splicing después de la transcripción, lo que da como resultado, múltiples transcritos de cada gen. Finalmente, las proteínas pueden sufrir modificaciones que alteran significativamente su función.<sup>(31)</sup>

La proteómica puede comparar de forma cualitativa y cuantitativa los perfiles proteómicos bajo diferentes condiciones para explicar los sistemas biológicos e identificar los marcadores con fines de diagnóstico y tratamiento. Los geles bidimensionales de poliacrilamida combinados con la espectrometría de masas, son una de las tecnologías más efectivas para el análisis proteómico.<sup>(31)</sup>

El análisis proteómico es una técnica relativamente reciente, en ojo se han estudiado humor acuoso y vítreo, sin embargo en cuanto a proteómica de pterigión solo se ha realizado un trabajo por Aryankalayil y colaboradores, en donde se analizó la expresión global de genes del pterigión en comparación con conjuntiva autóloga, encontrándose sobreexpresión de 29 genes y expresión a la baja de 5 genes.<sup>(32)</sup>

Los genes se dividieron en categorías y la que tuvo una mayor expresión fue la de moléculas de adhesión y proteínas de la matriz extracelular tales como fibronectina, colágeno tipo III, versicano, proteína de la matriz extracelular 1, factor de von Willebrand, colágeno tipo VI, antígeno CD31 y proteína de matriz oligomérica de cartílago, cabe resaltar que el estudio fue a nivel de expresión génica.<sup>(32)</sup>

## **JUSTIFICACIÓN**

El pterigión es una patología que se presenta con una alta frecuencia en la consulta oftalmológica diaria y por el momento no existe una explicación para su etiopatogenia, por lo que el análisis y comparación de los perfiles proteómicos apoptóticos de pterigión primario y conjuntiva sana podría ayudar a determinar el papel que tienen las proteínas apoptóticas en su desarrollo, así como también se podría determinar su posible uso como blanco terapéutico.

## **HIPÓTESIS**

Existe una expresión diferencial de proteínas apoptóticas en pterigión primario en comparación con conjuntiva normal.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar y comparar la expresión diferencial de proteínas apoptóticas en el pterigión primario y conjuntiva normal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño del estudio**

Se trata de un estudio de tipo transversal analítico.

### **Implicaciones éticas**

El estudio fue aprobado por el comité de ética del instituto bajo los criterios éticos de la Declaración de Helsinki, todos los pacientes recibieron consentimiento informado por escrito.

### **Muestra**

Para el cálculo de tamaño de muestra al no existir referencias aplicables a este tipo de estudio en cuanto a razón o diferencias, se decidió tomar 6 muestras de conjuntiva sana y 6 de pterigión primario de pacientes que acudieron a cirugía de resección de pterigión y que aceptaron participar en el estudio.

### **Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

Criterios de inclusión: edad 18 a 75 años, ambos sexos, cualquier ocupación y lugar de residencia, localización nasal, pterigión primario de tiempo de evolución indeterminado.

Criterios de exclusión: pterigión recidivante, enfermedad que afecte membranas mucosas y conjuntiva (conjuntivitis crónica, Steven Johnson, tracoma), enfermedad ocular que requiera el uso crónico de colirio y uso crónico de medicamentos tópicos a excepción de lágrimas artificiales.

Criterios de eliminación: muestra insuficiente

## **Variables**

Variables independientes: pterigión primario, conjuntiva sana.

Variables dependientes: expresión de proteínas apoptóticas en unidades relativas.

## **Técnica quirúrgica de resección de pterigión y conjuntiva**

La técnica de obtención del tejido de pterigión y conjuntiva normal se llevó a cabo por solo 2 cirujanos. Después de realizar asepsia y antisepsia, así como la colocación de campos estériles, se realizó infiltración del pterigión con xilocaína con epinefrina para hemostasis y disección, se introdujo la espátula para separar el cuello, se inició por la cabeza separándola de la córnea con una aguja u hoja de bisturí No. 15, se cortó el pterigión con tijera Wescott, se escarificó y disecó tenon, realizando hemostasia con cauterio. La toma de la muestra de conjuntiva sana se obtuvo del injerto de localización superior. Posteriormente las muestras se colocaron en PBS 1X con inhibidores de proteasas (Roche) a -80°C.

## **Microarreglos de proteínas**

Se analizaron un total de 12 muestras, 6 de pterigión primario y 6 de conjuntiva sana del mismo ojo de los pacientes incluidos. Se analizó la expresión de 35 proteínas apoptóticas utilizando un microarreglo proteómico (R&D Systems).

Las muestras de conjuntiva y pterigión se homogenizaron en un buffer de lisis (1% NP-40, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 137mM NaCl, 10% glicerol, 2mM de ácido etilenodiaminotetracético, 1 mM de ortovanadato, 10µg/ml aprotinina, 10µg/mL de leupeptina en agua) por 3 horas, en movimiento de 2° a 8°. Después de vortexear las muestras, se separaron los sobrenadantes por centrifugación (14 000 rpm, 30 minutos, 4°C) y posteriormente se almacenaron a -80°C y se cuantificaron usando el arreglo de proteínas (Bio-Rad). El volumen por lisado fue de 200 microlitros por arreglo.

Se realizó lo indicado en el kit del arreglo Proteome Profiler Human Apoptosis (R&D Systems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se tomaron 500µg de proteínas, las cuales se diluyeron e incubaron con el arreglo de apoptosis durante toda la noche a 4°C. Después de lavar las proteínas no unidas, se incubó con un cocktail de anticuerpos conjugados con biotina con estreptavidina-HRP y se reveló por quimioluminiscencia (GE Healthcare, UK), y los patrones fueron capturados por medio del fotodocumentador Dyversity System (Syngene, UK) y analizados con el software Gene Tools (Syngene, UK). La densitometría del patrón fue normalizada con respecto al control interno.

### **Análisis estadístico**

Las diferencias entre los arreglos entre conjuntiva sana y pterigión primario fueron analizadas con una prueba de t de student utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0; una  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativa.

## RESULTADOS

### Características de la población en estudio

Se incluyeron en el estudio un total de 12 muestras que correspondían a 6 conjuntivas y 6 pterigiones de 6 pacientes que aceptaron participar en el estudio. El promedio de edad encontrado fue de 54 años (rango de 30 a 74 años), el género femenino fue el más frecuente con un 6.6%. Sólo se encontró tabaquismo positivo en un paciente. El promedio de tamaño del pterigión en su longitud horizontal (del limbo hacia la córnea) fue de 2.51 mm. (Tabla 1)

**Tabla 1. Características de la población**

<b>Características</b>	<b>Total de pacientes</b>
Ojo con pterigión	Derecho 2 Izquierdo 4
Edad	30 a 74 años (media 54 años)
Género	Femenino 4 Masculino 2
Tabaquismo positivo	1
Localización	Nasal 6
Tamaño (mm)	1.2 a 4.4 (media 2.51)

## Análisis de la expresión de proteínas apoptóticas en pterigión primario y conjuntiva sana

Se analizó la expresión de 35 proteínas apoptóticas en pterigión primario y en conjuntiva sana, utilizando un microarreglo de proteínas (Figura 1).

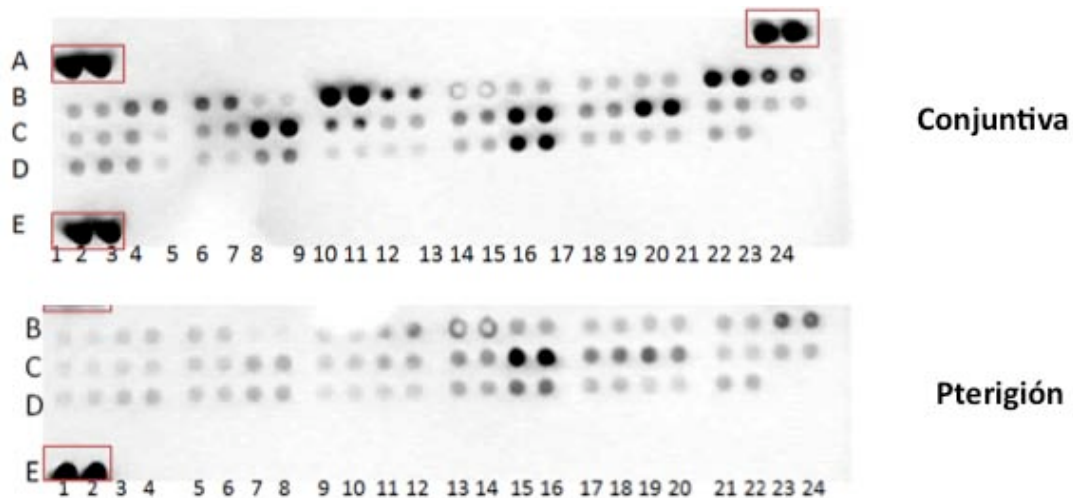


Figura 1. Microarreglo representativo de la conjuntiva sana (c) y pterigión primario (p). Los microarreglos se revelaron por quimioluminiscencia. En los marcos rojos se presentan los controles positivos.

Al analizar los niveles de expresión de las proteínas apoptóticas en pterigión primario en contraste con conjuntiva sana, se observó que 20 de éstas proteínas presentaron una expresión elevada ( $p < 0.05$ ), sólo una proteína presentó expresión disminuida ( $p < 0.05$ ) y 14 proteínas no presentaron cambios (Tabla 2 y Figura 2,3).



**Tabla 2. Expresión de proteínas en pterigión primario en comparación con conjuntiva sana.**

<b>Expresión Aumentada</b>	<b>Expresión Sin cambios</b>	<b>Expresión Disminuida</b>
Pro-caspasa 3	Bad	Catalasa
Caspasa 3	Bax	
Citocromo 3	c IAP-1	
FADD	Claspina	
HIF-1a	TRAIL R1	
HTRA 2	TRAIL R2	
fosfo-p53 (S15)	Fas/TNFRSF6	
fosfo p-53 (S46)	HO-1	
SMAC/Diablo	HO-2	
TNF-R1	HSP-273	
Bcl-2	PON-2	
Bcl-xl	p21/CIP1	
cIAP-2	p27/Kip 1	
HSP-60	fosfo-p53 (S392)	
HSP-70		
Livina		
fosfo-RAD17 (S635)		
Survivina		
XIAP		
Clusterina		

## Proteínas pro-apoptóticas

A continuación se muestran las proteínas pro-apoptóticas, podemos observar que todas se encontraron elevadas en pterigión primario en comparación con conjuntiva sana.

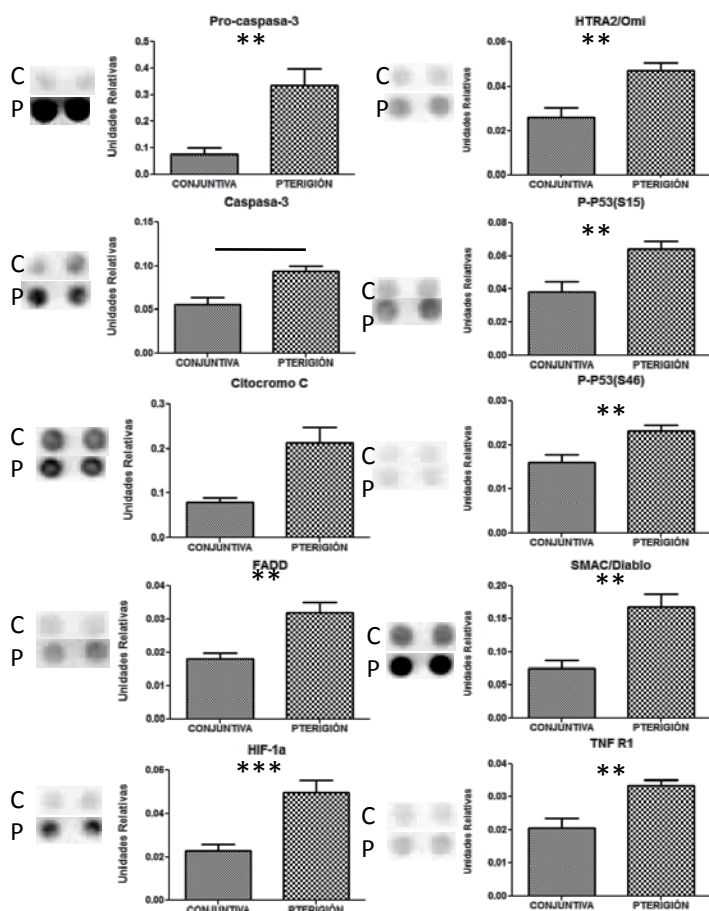


Figura 2. Expresión de proteínas pro-apoptóticas en pterigión primario y conjuntiva sana. Las muestras se normalizaron y se graficaron las unidades relativas (UR). Se realizó la prueba de t de student para determinar diferencias entre pterigión y conjuntiva sana.  $p < 0.05$  se consideró significativo. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , donde C es conjuntiva y P pterigión)

## Proteínas anti-apoptóticas

Estas proteínas se encontraron en su mayoría con un aumento de la expresión en pterigión primario con comparación con conjuntiva sana.

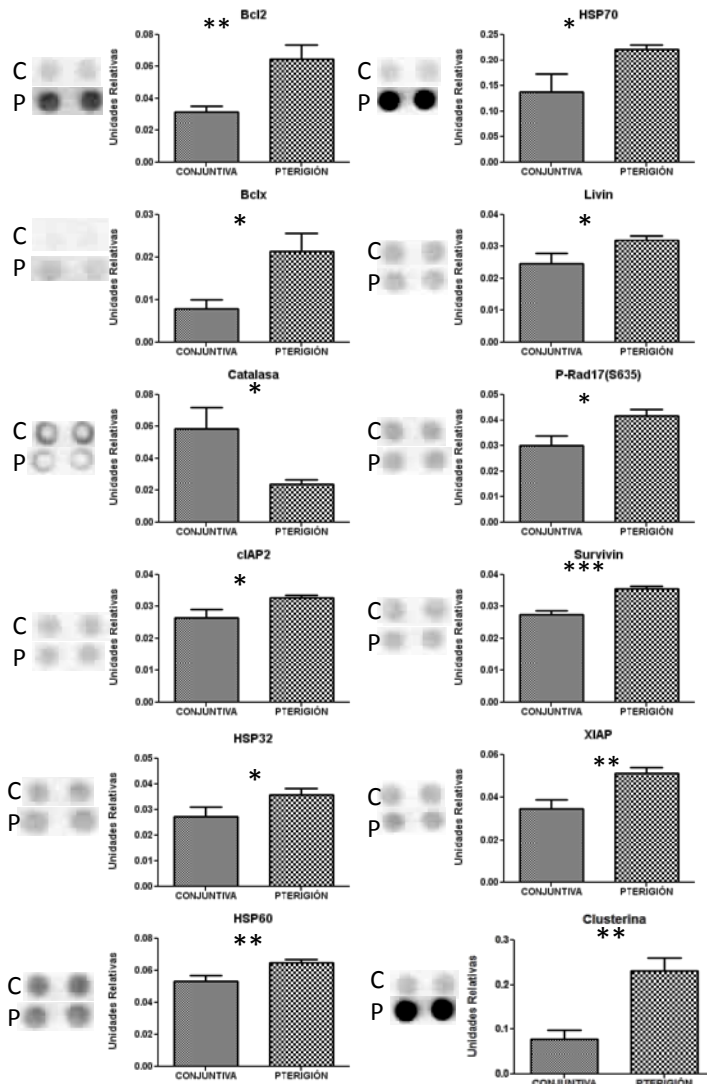


Figura 3. Expresión de proteínas anti-apoptóticas en pterigión primario y conjuntiva sana. Las muestras se normalizaron y se graficaron las unidades relativas (UR). Se realizó la prueba de t de student para determinar diferencias entre pterigión y conjuntiva sana.  $p < 0.05$  se consideró significativo. (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , donde C es conjuntiva y P pterigión)

Siete proteínas se encontraron con una expresión aumentada en pterigión primario en comparación con conjuntiva sana, mostrando un cambio de más del doble. (Figura 4, Tabla 3). Estas proteínas fueron Bcl-x, pro-caspasa 3, citocromo C, SMAC/DIABLO, HIF-1 a, fas/TNFRSF6 y clusterina. Las otras proteínas mostraron una expresión con un aumento menor al doble. Así mismo, se calculó el valor conocido como “fold change” de cada proteína el cual se obtiene a través del radio de quimioluminiscencia entre el pterigión primario y la conjuntiva sana. Está descrito que un incremento mayor a 2 tiene una significancia biológica así como el menor a 1 como es el caso de la catalasa.

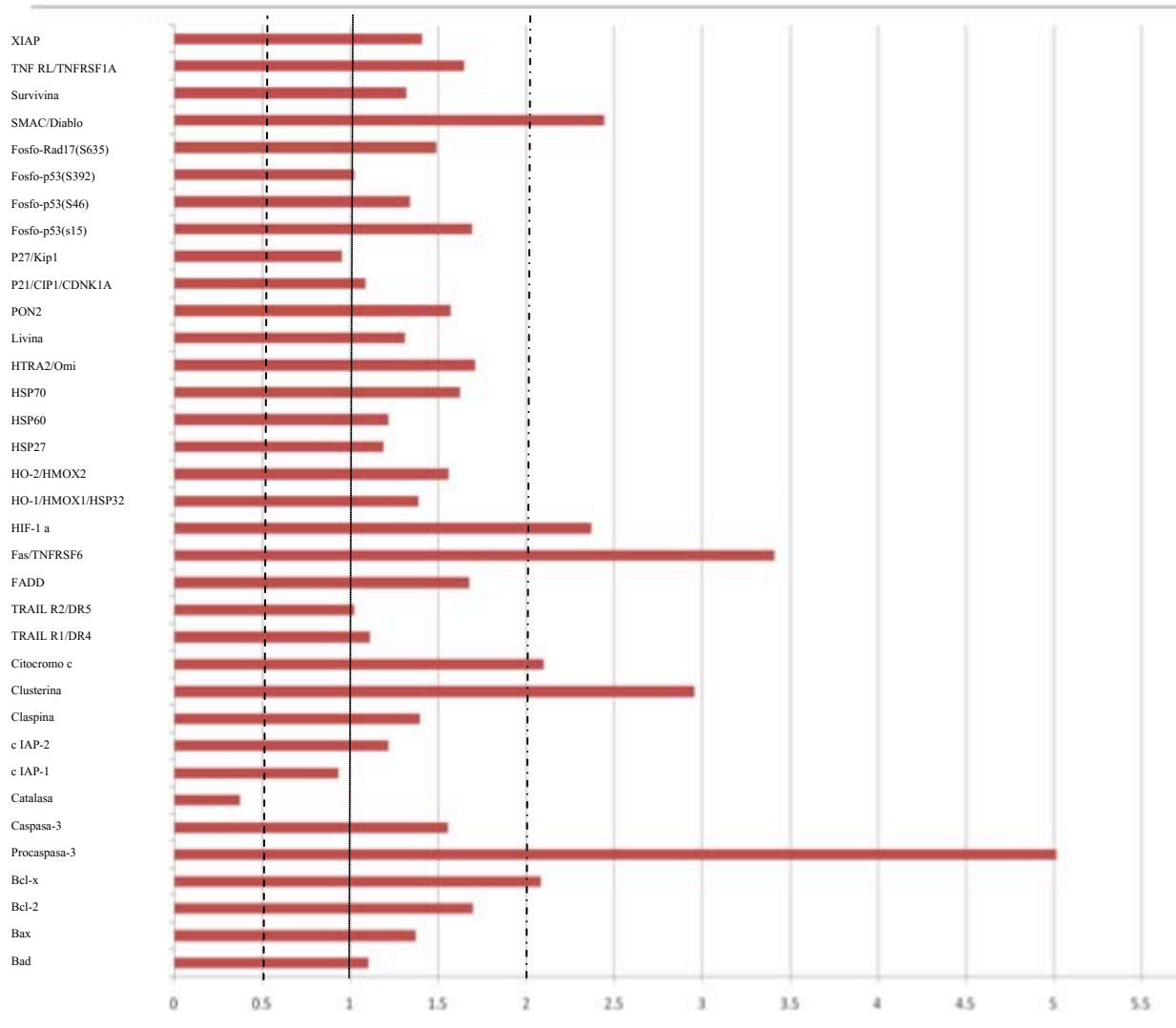


Figura 4. Análisis de incremento de las proteínas apoptóticas en pterigión primario con respecto a conjuntiva sana (Fold Change). En el eje de las X se muestra el valor “Fold Change”, se consideró como biológicamente significativo el incremento de más de 2 y menor de 1.

**Tabla 3. Función de las proteínas y valor “fold change” que mostraron una expresión de más del doble en pterigión primario en comparación con conjuntiva sana.**

<b>Proteína</b>	<b>Función</b>	<b>“Fold change”</b>
<b>Fas/TNFRSF6</b>	Asociada a fibroblastos, también conocida como Apo-1, CD95, es una proteína de superficie de membrana celular que se une a anticuerpos monoclonales que son citolíticos para varias líneas celulares.	3.4
<b>Bcl-x</b>	La isoforma mayor actúa como un inhibidor apoptótico y la menor como un activador apoptótico.	2.72
<b>Clusterina</b>	Al parecer está involucrada en diversos eventos biológicos como muerte celular, progresión tumoral y desórdenes neurodegenerativos.	2.98
<b>Pro-caspasa 3</b>	Participa en la fase de ejecución de la apoptosis celular, rompe y activa a las caspasas 6, 7 y 9.	4.46
<b>Citocromo C</b>	Proteína que funciona como un componente central en la cadena de	2.66

	transporte de electrones en la mitocondria. Está relacionada con el inicio de la apoptosis.	
<b>SMAC/DIABLO</b>	Activador mitocondrial secundario de las caspasas/proteína de unión al IAP. Este gen codifica a una proteína de unión a un inhibidor de la apoptosis (IAP)	2.27
<b>HIF-1 a</b>	Factor de transcripción que juega un papel esencial en las respuestas celulares homeostáticas y sistémicas frente la hipoxia.	2.22
<b>Catalasa</b>	Es una enzima que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno el cual es un compuesto inestable en oxígeno y agua.	0.4

## DISCUSIÓN

Usando los arreglos de proteínas de apoptosis analizamos 35 proteínas en pterigión primario y conjuntiva sana (Figura 1). Se encontró expresión aumentada de 20 proteínas (pro-caspasa 3, caspasa 3, citocromo 3, FADD, HIF-1a, HTRA 2, fosfo-p53 (S15), fosfo p-53 (S46), SMAC/Diablo, TNF-R1, Bcl-2, Bcl-xl, cIAP-2, HSP-60, HSP-70, livina, fosfo-RAD17 (S635), survivina, XIAP y clusterina) y sólo una proteína se encontró con una expresión disminuida (catalasa) (Tabla 2) y 14 proteínas sin cambios (Bad, Bax, c IAP-1, claspina, TRAIL R1, TRAIL R2, Fas/TNFRSF6, HO-1, HO-2, HSP-27, PON-2, p21/CIP1, p27/Kip 1 y fosfo-p53 (S392)) en pterigión primario con comparación con conjuntiva normal.

Siete proteínas se encontraron con una expresión aumentada en pterigión primario en comparación con conjuntiva sana, mostrando un cambio de más del doble. (Tabla 3). Estas proteínas fueron fas/TNFRSF6, Bcl-x, pro-caspasa 3, citocromo C, SMAC/DIABLO, HIF-1a y clusterina. Las otras proteínas mostraron una expresión con un aumento menor al doble.

Reportes previos muestran que el estrés oxidativo juega un papel en la etiopatogenia del pterigión. La radiación UV es una factor importante en la patogénesis del estrés oxidativo, la inflamación crónica también juega un papel en el desarrollo de ésta lesión, y el estrés oxidativo puede incluso potenciar la inflamación. Balci y colaboradores proponen que el estrés oxidativo y el óxido nítrico intervienen en la fisiopatología del pterigión.

En este trabajo nosotros describimos una expresión alterada de algunas proteínas involucradas en la apoptosis. Llama la atención que algunas de las proteínas sobre expresadas en el pterigión primario tienen un actividad pro-apoptótica, pero también algunas de ellas tienen una actividad anti-apoptótica. Al analizar éstas proteínas y en un intento de correlacionar los hallazgos del estudio con su función, en la figura 5 se propone un modelo de la vía de apoptosis que probablemente es representativo de lo que probablemente podría suceder en el pterigión primario.

## Apoptosis en pterigión primario

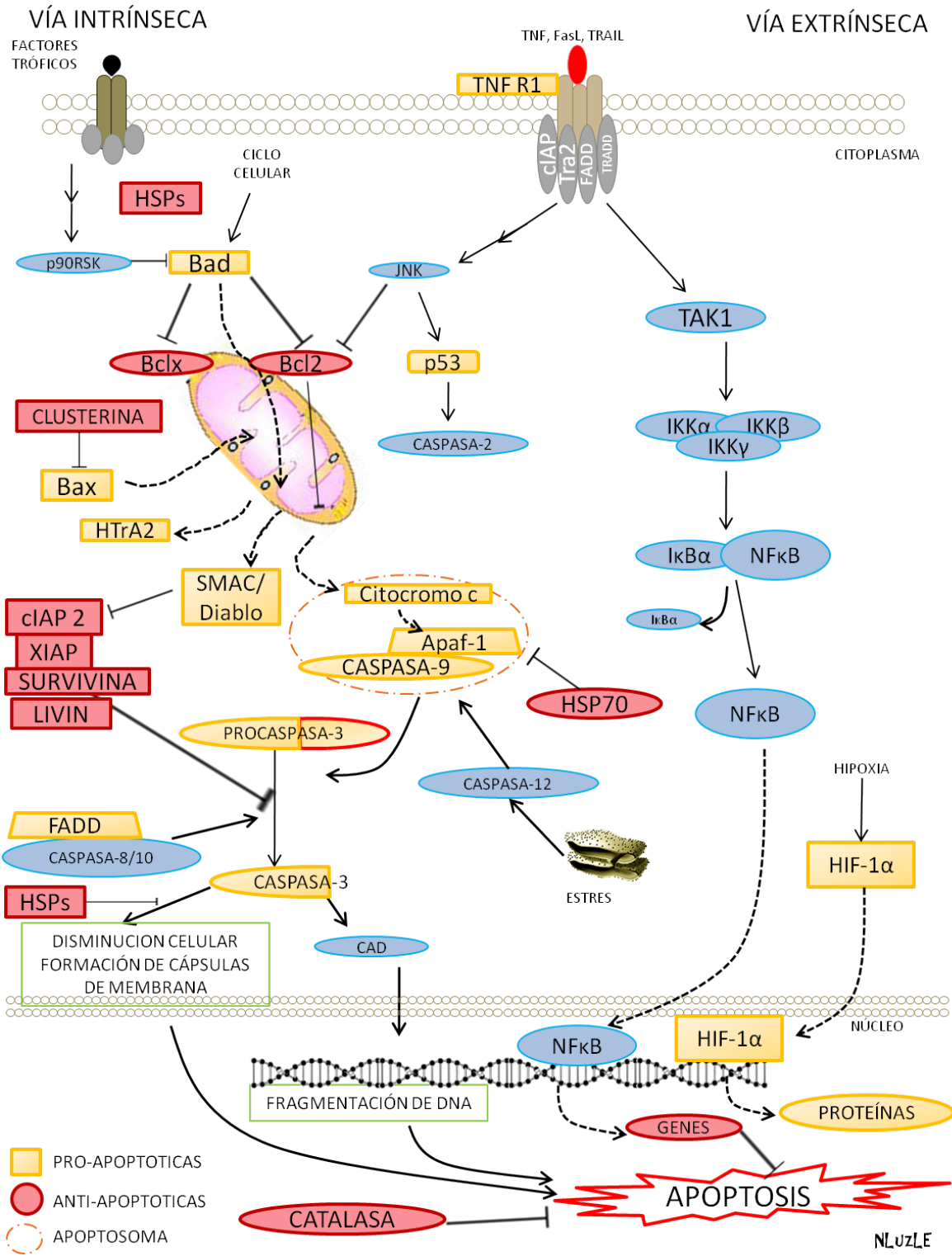


Figura 5. Modelo propuesto de la apoptosis en pterigión primario



La apoptosis es un proceso que se ha conservado en la evolución y es una forma extremadamente sincronizada de muerte celular para facilitar la muerte de células redundantes, infectadas, heridas, o con alteraciones durante el ciclo de vida normal en muchos sistemas biológicos, el cual es un curso esencial en el mantenimiento de la homeostasis en organismos multicelulares. Una apoptosis alterada o una alteración en la maquinaria apoptótica individual puede causar muchas patologías como el cáncer. Se ha propuesto que el pterigión es el resultado de una disrupción del proceso normal de apoptosis que sucede en conjuntiva sana normal. Algunos genes se han implicado como p53, bcl-2 y bax, los cuales muestran una mutación o expresión altera. También se han descrito algunos marcadores de la proliferación como p63.

A pesar de que muchas proteínas pro-apoptóticas se encontraron con una expresión aumentada en pterigión como el citocromo c, HIF-1 a, pro-caspasa 3; Bcl-2, Bcl-x y clusterina, las cuales son proteínas anti-apoptóticas, también se encontraron sobre expresadas y el ratio entre Bcl-2 y Bax fue de 1.5 lo que sugiere que hay un efecto anti-apoptótico en pterigión primario, eso también se explica por la expresión diferencial de forma estadísticamente significativa de proteínas como Hsp-70 que inhibe la vía de la apoptosis en el paso entre la liberación del citocromo C y la activación de la caspasa 3 y la acumulación de procaspasa 3 podría ser el resultado de esta inhibición.

## **CONCLUSIONES**

En resumen, estos resultados sugieren que la apoptosis en el pterigión se encuentra inhibida en comparación con la conjuntiva sana. Este estudio también revela por primera vez un mecanismo nuevo para explicar el efecto anti apoptosis en el pterigión primario y además da la pauta para nuevos trabajos los cuales podrían incluir una muestra mayor e investigar más a fondo alguna aplicación terapéutica.

## REFERENCIAS

1. Detorakis E, Spandidos D. Pathogenetic mechanisms and treatment options for ophthalmic pterygium: Trends and perspectives (Review). *International Journal of molecular medicine* 2009;23:439-447
2. H-C Kau C-C Tsa, C-F Lee, S-C Kao, et al. Increased oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human pterygium. *Eye* 2006; 20:826–831
3. Bradley J, Yang W, Bradley R, et al. The Science of Pterygium. *Br J Ophthalmol* 2009
4. West S, Muñoz B, Prevalence of pterygium in Latinos: Proyecto VER. *Br J Ophthalmol* 2009;93:1287–1290
5. E Viso, F Gude, MT Rodríguez-Ares. Prevalence of pinguecula and pterygium in a general population in Spain. *Eye* (2011) 25, 350–357.
6. Coroneo MT: Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis. *Br J Ophthalmol* 1993;77: 734-739
7. Howard Yu Cajucum-Uy, Louis H T Tong, Tien-Yin Wong, et al. The prevalence and risks factors for pterygium in an urban malay population: The Singapore Malay Eye Study (SiMES). *Br J Ophthalmol* 2009
8. Fotouhi A , Hashemi H, Khabazkhoob M, Mohammad K. Prevalence and risk factors of pterygium and pinguecula: the Tehran Eye Study. *Eye* 2009; 23: 1125–1129
9. Detorakis ET, Drakonaki EE and Spandidos DA: Molecular genetic alterations and viral presence in ophthalmic pterygium (Review). *Int J Mol Med* 6: 35-41, 2000.
10. Kase S, Osaki M, Sato I, et al. Immunolocalisation of E-cadherin and b-catenin in human pterygium. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1209–1212
11. Kato N, Shimmura S, Kawakita T, et al, Catenin Activation and Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Pterygium. *IOVS* 2007; 48: 1511-1517

12. Shun-Fa Yang, Ching-Yang Lin, et al. Increased Expression of Gelatinase (MMP-2 and MMP-9) in Pterygia and Pterygium Fibroblasts with Disease Progression and Activation of Protein Kinase C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 4588-4596
13. Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Nov;43(11):3430-7.
14. Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jun;47(6):2430-7.
15. Aspiotis M, Tsanou E, Gorezis S. Angiogenesis in pterygium: study of microvessel density, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1. *Eye* 2007; 21:1095–1101
16. Chui J, Di Girolamo, Coroneo M. The Role of Substance P in the Pathogenesis of Pterygia. *Invest ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4482-4489
17. Peiretti E, Dessì S, Putzolu M, Fossarello M. Hyperexpression of low-density lipoprotein receptors and hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A-reductase in human pinguecula and primary pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Nov;45(11):3982-5.
18. Piecyk-Sidor M, Polz-Dacewicz M, et al. Occurrence of human papillomavirus in pterygia. *Acta Ophthalmol*. 2009; 87: 890–895
19. Coroneo MT. Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis. *Br J Ophthalmol* 1993; 77:734-9
20. Nolan TM, DiGirolamo N, Sachdev NH, Hampartzoumian T, Coroneo MT, Wakefield D. The role of ultraviolet irradiation and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the pathogenesis of pterygium. *Am J Pathol*. 2003 Feb;162(2):567-74.
21. Perra M, Maxia C, Corbu A, et al. Oxidative stress in pterygium: relationship between p53 and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Molecular Vision* 2006; 12:1136-42

22. Maxia, C, et al. relationship between the expression of cyclooxygenase-2 and survivin in primary pterygium. *Molecular Vision* 2009; 15:458-463
23. Liang, K., et al. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Mol Vis.* 2011; 17: 1687–1693.
24. Tan, D., et al. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol* 2000;84:212–216
25. Weinstein O, Rosenthal G, Zirkin H, et al. Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye.* 2002;16(5):619-21
26. Satoru Kase, Shuji Takahashi, Izuru Sato, et al. Expression of p27(KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium. *Br J Ophthalmol* 2007;91:958–961
27. Garfias, Y., Bautista-De Lucio, V., et al., Study of the expression of CD30 in pterygia compared to healthy conjunctivas. *Molecular Vision* 2009; 15:2068-2073
28. Yi-Yu Tsai, Ya-Wen Cheng, Huei Lee, et al. Oxidative DNA damage in pterygium. *Molecular Vision* 2005;11:71-5
29. Chun-Chi Chiang, Ya-Wen Cheng, Chien-Lin Lin. Cyclooxygenase 2 expression in pterygium. *Molecular Vision* 2007; 13:635-8
30. Chun-Chi Chiang, Yi-Yu Tsai, Da-Tian Bau, et al. Pterygium and genetic polymorphisms of the DNA repair enzymes XRCC1, XPA, and XPD. *Molecular Vision* 2010; 16:698-704
31. Mandal, N. Heegaard, S., Prause, J., Honoré, B., Vorum, H. Ocular Proteomics with Emphasis on Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Biological Procedures Online* 2010, 12:56-88
32. Aryankalayil, J, et al. Microarray and protein analysis of human pterygium. *Molecular Vision* 2006; 12:55-64.



**Instituto de Oftalmología**  
"Fundación Conde de Valenciana IAP"

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se está llevando a cabo en el Instituto de oftalmología un protocolo de investigación acerca de las causas del pterigión las cuales hasta el momento se desconocen, el protocolo consiste en analizar las proteínas de la conjuntiva normal y compararlas con tejido de pterigión. Se le invita a usted a participar donando el tejido de pterigión extirpado y conjuntiva sana. Es importante recalcar que normalmente ese tejido es desechado. El beneficio que obtendrá es principalmente la contribución a la ciencia. Los riesgos son los mismos que cualquier cirugía de pterigión sin añadir otros.

Procedimiento: el día de la cirugía se tomará el tejido de pterigión y una muestra de conjuntiva sana los cuales se congelarán para su posterior análisis, su nombre se mantendrá en el anonimato.

Cualquier duda o aclaración puede comunicarse con los responsables de la investigación.

Dra. Miriam E. López Salas, Residente de 3er año de Oftalmología

Dr. Víctor M. Bautista de Lucio, Investigador titular

Dr. Ángel Nava Castañeda, Adscrito al servicio de Oculoplástica

---

Nombre completo y

Firma del Aceptante

## CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de México D. F., en el mes de Agosto del año 2011, la que suscribe Dra. MIRIAM EDITH LOPEZ SALAS, alumna del Programa de Oftalmología de la Facultad de Medicina, sede académica Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada “Conde de Valenciana” I.A.P, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Víctor M. Bautista de Lucio y Dr. Ángel Nava Castañeda y cede los derechos del trabajo intitulado “Expresión diferencial de proteínas apoptóticas en pterigión primario en comparación con conjuntiva normal”, a la Universidad Nacional Autónoma de México para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben de reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del director del trabajo bajo reserva de contravenir tácitamente a la ley Federal de derechos y protección del autor. El permiso puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección electrónica: [vbautistal@institutodeoftalmologia.org](mailto:vbautistal@institutodeoftalmologia.org). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y cita la fuente del mismo.

Dra. Miriam Edith López Salas

Dr. Víctor M. Bautista de Lucio

Residente de 3er año de  
Oftalmología

Investigador titular

Dr. Ángel Nava Castañeda

Médico adscrito al servicio de oculoplástica

El trabajo de investigación “EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS APOPTÓTICAS EN PTERIGIÓN PRIMARIO EN COMPARACIÓN CON CONJUNTIVA NORMAL” se realizó en la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio y Dr. Ángel Nava Castañeda.

Este trabajo fue financiado por el proyecto CONACyt 71291.