



Universidad de Valladolid



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DE LA RIOJA**

TESIS DOCTORAL:

**ESTUDIO UNICÉNTRICO DE FASE II COMPARANDO
DOXICICLINA ORAL FRENTE A PLACEBO EN PA-
CIENTES CON PTERIGIÓN.**

**EFFECTOS CELULARES DE LA DOXICICLINA EN EL
PTERIGIÓN.**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

Presentada por Óscar Rúa Galisteo para optar al grado de
doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Ignacio Larráyoiz Roldán Dra. Sara Velilla Osés



Universidad de Valladolid

Impreso 1T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/A DE TESIS

(Art. 7.2 de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D./D^a SARA VELILLA OSES con D N I 16566663 Q, doctora en Medicina por la Universidad de Valladolid 2001, del Servicio de Oftalmología del Hospital San Pedro de Logroño, La Rioja, como codirectora de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO UNICÉNTRICO DE FASE II COMPARANDO DOXICICLINA ORAL FRENTE A PLACEBO EN PACIENTES CON PTERIGIÓN. EFECTOS CELULARES DE LA DOXICICLINA EN EL PTERIGION", presentada por el alumno D. OSCAR RUA GALISTEO, del programa DE DOCTORADO DE CIENCIAS DE LA VISIÓN, impartido por el Instituto de Oftalmobiología Aplicada, IOBA, **autoriza** la presentación de la misma, considerando que es **APTA** para su defensa.

Valladolid, 20 de Noviembre de 2016

El/La Director/a de la Tesis,

Fdo.: Sara Velilla Osés

SR/SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/A DE TESIS

(Art. 7.2 de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D./D^a IGNACIO LARRAYOZ ROLDAN, con D.N.I./Pasaporte 33444445 F

Profesor/a del departamento de: Biomarcadores y Señalización Molecular

Centro: Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR)

Dirección a efecto de notificaciones : Calle Piqueras 98, Logroño 26006.....

e-mail: ilarrayoz@riojasalud.es

como Director(a) de la Tesis Doctoral titulada: ESTUDIO UNICÉNTRICO DE FASE II
COMPARANDO DOXICICLINA ORAL FRENTE A PLACEBO EN PACIENTES CON
PTERIGIÓN. EFECTOS CELULARES DE LA DOXICICLINA EN EL PTERIGION

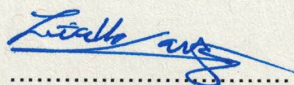
realizada por D./D^a D. OSCAR RUA GALISTEO

alumno/a del Programa de Doctorado..... CIENCIAS DE LA VISIÓN

autoriza su presentación, considerando que es APTA para su
defensa.....

Valladolid,..21... de.....Noviembre..... de.....2016....

EI/La Director/a de la Tesis,

Fdo.: 

SR/SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



A mi padre, por ser un referente en mi vida.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ACRÓNIMOS

FINANCIACIÓN

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

1- JUSTIFICACIÓN 6

2 - HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 10

2.1- HIPÓTESIS 10

2.2- OBJETIVOS 10

3.1- PTERIGIÓN	14
3.1.1-Morfología e histología	14
3.1.2- Epidemiología	15
3.1.3- Patogénesis	17
3.1.3.1- Estrés oxidativo	18
3.1.3.2- Regulación del ciclo celular	21
3.1.3.2.1- Biomarcadores de apoptosis	21
3.1.3.2.2- Biomarcadores de proliferación celular	25
3.1.3.3- Mediadores inflamatorios	27
3.1.3.4- Mecanismos inmunológicos	30
3.1.3.5- Factores de crecimiento	32
3.1.3.6- Estimulación angiogénica	34
3.1.3.7- Modulación de la matriz extracelular	34
3.1.3.8- Modificación del metabolismo del colesterol	37
3.1.3.9- Virus	37
3.1.3.10- Factores hereditarios	38
3.1.3.11- Modelo neurogénico	39
3.1.3.12- Predictores de recurrencia	40
3.1.4- Métodos actuales de tratamiento	41
3.1.4.1- Autoinjerto conjuntival o limbar comparado con resección con esclera desnuda	41
3.1.4.2- Mitomicina C intraoperatoria comparada con resección con esclera desnuda	41
3.1.4.3- Mitomicina C postoperatoria comparada con resección con esclera desnuda	42

3.1.4.4- Mitomicina C intraoperatoria comparada con mitomicina C postoperatoria	43
3.1.4.5- Mitomicina C comparada con el autoinjerto de conjuntiva o limbar	43
3.1.4.6- Membrana amniótica comparada con autoinjerto de conjuntiva o limbar	43
3.1.4.7- Otras combinaciones de adyuvantes para el pterigión	43
3.2- DOXICICLINA	46
3.3- DOXICICLINA Y PTERIGIÓN	49
<u>4 - PACIENTES Y MÉTODOS</u>	<u>56</u>
4.1- PACIENTES Y MÉTODO DEL ENSAYO CLÍNICO	56
4.1.1- Cuestiones éticas	56
4.1.2- Pacientes del ensayo clínico	56
4.1.3- Diseño del ensayo clínico	57
4.2- MATERIAL Y MÉTODO DEL ESTUDIO MOLECULAR MEDIANTE SECUENCIACIÓN	61
4.2.1- Pacientes y cultivo primario	61
4.2.2- Inmunofluorescencia y microscopía confocal	62
4.2.3- Extracción de RNA	62
4.2.4- Preparación el cDNA y secuenciación	62
4.2.5- Tratamiento de datos	63
4.2.6- Confirmación de los resultados de secuenciación	64

4.3- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
---------------------------	----

5 -RESULTADOS 70

5.1- RESULTADOS DEL ENSAYO CLÍNICO	70
------------------------------------	----

5.2- RESULTADOS DEL ESTUDIO MOLECULAR MEDIANTE SECUENCIACIÓN	74
--	----

6 -DISCUSIÓN 88

6.1- EFECTOS DE LA DOXICICLINA ORAL EN EL PTERIGIÓN EN PACIENTES DEL ENSAYO CLÍNICO	88
--	----

6.1.1- Limitaciones del estudio	88
---------------------------------	----

6.1.2- Interpretación de los resultados	89
---	----

6.1.3- Comparación de los resultados	91
--------------------------------------	----

6.2- EFECTOS MOLECULARES DE LA DOXICICLINA EN EL PTERIGIÓN	91
--	----

6.3- NORMALIZACIÓN DE DATOS	91
-----------------------------	----

6.4- ESTUDIOS PREVIOS DE RECURRENCIA EN EL PTERIGIÓN	92
--	----

6.5- ACCIONES DE LA DOXICICLINA EN LA MITOCONDRIA	93
6.6- VÍA RESPUESTA DE ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	94
6.7- LA MATRIZ EXTRACELULAR Y LAS INTEGRINAS	98
6.8- FACTORES DE CRECIMIENTO E INTERLEUQUINAS	100
6.9- DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR	101

7 - CONCLUSIONES 104

8 - IMPLICACIONES CLÍNICAS 108

9 - BIBLIOGRAFÍA 112

ANEXO I

ANEXO II

ANEXO III

ANEXO IV

ANEXO V

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años son muchas las personas que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y confianza que me han prestado de forma desinteresada.

En primer lugar quiero agradecer a la Unidad de Angiogénesis del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) y especialmente a su jefe el Dr. Alfredo Martínez por su acogida y el apoyo recibido por todos ellos.

Un sincero agradecimiento a mis directores, el Dr. Ignacio Larráyoz y la Dra. Sara Vellilla, agradecer todo el tiempo que me han dado, por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho he sacado, por su respaldo y amistad.

Quiero dar las gracias a Charo la enfermera que me ayudó de forma desinteresada durante todas esas tardes a incluir a los pacientes en el estudio.

Al Servicio de Farmacia en especial a la Dra. Marta Barajas por su colaboración en este proyecto.

A todos los demás miembros del CIBIR, que en algún momento me habéis ayudado, quiero agradecer todas vuestras aportaciones.

A todo el Servicio de Oftalmología que al conocer el estudio me enviaban paciente para poderlos incluir en él.

Gracias a todos los pacientes que de forma altruista han participado en este estudio.

Un agradecimiento especial al Profesor Pastor por posibilitar la presentación de esta tesis en la Universidad de Valladolid.

Durante estos años han nacido mis dos hijas, Amalia y Ágata, la mayor alegría de mi vida. Gracias al apoyo de mi mujer, Carmen, he podido dedicar tiempo a la realización de esta tesis sin ella no hubiera sido posible. Gracias a mis padres, Antonio y Carmen, por su apoyo durante toda mi vida, en especial a mi padre que falleció hace unos meses. ¡Gracias papa!

No lo habría conseguido sin todos vosotros. MUCHAS GRACIAS.

ACRÓNIMOS

βFGF	factor de crecimiento básico de fibroblastos
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AIF	factor inductor de apoptosis
Akt	protein-quinasa B
ANOVA	análisis de la varianza
BAX	proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bFGF	factor de crecimiento básico de fibroblastos
CAT	catalasa
CD	cluster of differentiation
cDNA	ácido dexosirribonucleico copia
CGRP	gen de la calcitonina
CHOP	proteína homóloga C / EBP
cNOS	óxido nítrico sintetasa constitutiva
CNTF	factor ciliar neurótico
CNV	neovascularización coroidea
Cols	colaboradores
COX	ciclooxigenasa
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMAE	degeneración macular asociada a la edad
DNA	ácido desoxirribonucleico
DIVAA	modelo de angiogénesis dirigido in vivo
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ER	retículo endoplasmático
ErbB	homólogos eritroblásticos
ERSE	potenciador del estrés del retículo endoplasmático
EudraCT	European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials
FAK	quinasa de adhesión focal

FDA	administración federal de Alimentos y Medicamentos Americana
FDR	tasa de descubrimientos falsos
FGF	factor de crecimiento de los fibroblastos
FITC-d	isotiocianato de fluoresceína-dextrano
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GSH-Px	glutation peroxidasa
GSK3- β	glucógeno sintasa quinasa 3-beta
HBEGF	factor de crecimiento epidérmico vinculado a la heparina
HLA	antígeno de histocompatibilidad
HMG-CoA	hidroximetilglutaril-coenzima A-reductasa
hOGG1	8-oxoguanina glicosidasa humana
HPV	virus del papiloma humano
HSV	virus herpes simple
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
ICAM	molécula de adhesión intercelular
Ig	inmunoglobulina
IGF1-BP2	factor de crecimiento insulínico
IL	interleuquina
iNOS	óxido nítrico sintetasa inducible
LDL	lipoproteína de baja densidad
MANF	factor mesencefálico neurotrófico derivado de astrocitos
MAPK	protein quinasa activadora de mitógenos
MDA	malondialdehído
MIB	antígeno nuclear de células-ciclo-asociado
MKI67	antígeno identificado mediante el anticuerpo monoclonal Ki-67
MMC	mitomicina C
MMP	metaloproteinasa
MIP	proteínas inflamatorias de macrófagos
MPTP	poro de transición de permeabilidad mitocondrial
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NEK	quinasa relacionada con NIMA
NF- κ B	factor nuclear kappa B
NGF	factor de crecimiento nervioso
NK1R	receptor de la sustancia P

NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetasa
NO ₃ ⁻	nitrato
O ₂ ⁻	anión superóxido
p	proteína
PBS	tampón fosfato salino
PCNA	antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEDF	factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario de la retina
PG	prostaglandina
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
qRT-PCR	reacción de cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RNA-ss	ácido ribonucleico monocatenario negativo
ROS	especies reactivas derivadas del oxígeno
RPKM	lecturas por base de kilo por millón
SCF	factor de crecimiento de células madre
SOD	superóxido dismutasa
SP	sustancia P
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta
TIMP	inhibidor tisular de la metaloproteínasa
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UPR	respuesta de la proteína desplegada
UPRE	elemento de respuesta a proteínas desplegada
uPA	receptor activador del plasminógeno de la uroquinasa
UV	ultravioleta
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
VCAM	molécula de adhesión vascular celular
8-OHdG	8-hidroxideoxiguanosina

FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias al apoyo económico recibido del Ministerio de Sanidad de España, Política Social e Igualdad, N ° DIN-021 año 2009.

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Este trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones, que se puede encontrar como Anexo I, Anexo II y Anexo III:

I- Larráyo IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, Martínez A. Molecular effects of doxycycline treatment on pterygium as revealed by massive transcriptome sequencing. PLoS One. 2012;7(6):e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359. Epub 2012 Jun 19. PubMed PMID: 22724003; PubMed Central PMCID: PMC3378547. IF (impact factor) 3.53. Cuartil 1°.

II- Rúa O, Larráyo IM, Barajas MT, Velilla S, Martínez A. Oral doxycycline reduces pterygium lesions; results from a double blind, randomized, placebo controlled clinical trial. PLoS One. 2012;7(12):e52696. doi: 10.1371/journal.pone.0052696. Epub 2012 Dec 19. PubMed PMID: 23285154; PubMed Central PMCID: PMC3526544. IF 3.53. Cuartil 1°.

III- Larráyo IM, Rúa O, Velilla S, Martínez A. Transcriptomic profiling explains racial disparities in pterygium patients treated with doxycycline. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Oct 30;55(11):7553-61. doi: 10.1167/iovs.14-14951. PMID: 25358733. IF 3.66. Cuartil 1°.

Y a las siguientes comunicaciones a congresos:

- 1- Óscar Rúa, Sara Velilla, Alfredo Martínez, Iñaki Larráyoz. Título: “La doxiciclina oral reduce el pterigión. Resultados de un ensayo clínico doble ciego, randomizado y controlado”. Primer premio de comunicación libre en el XXXIV congreso de la Asociación Oftalmológica del Norte (AON) celebrado en Bilbao del 23 al 24 de noviembre del 2012 con premio a la mejor comunicación.

- 2- Óscar Rúa. Títulos: “Estudio unicéntrico fase II: doxiciclina frente a placebo en el pterigión” y “Estudio unicéntrico fase II: efectos de la doxiciclina en la angiogénesis ocular”. Comunicaciones libres en el 88 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología (SEO) celebrado en Barcelona del 26 al 29 de septiembre del 2012.

1- JUSTIFICACIÓN

El pterigión es un proceso inflamatorio y degenerativo de la superficie ocular en el que se produce una hiperplasia fibrovascular de carácter benigno de la conjuntiva bulbar junto con crecimiento elastótico anormal sobre la córnea ¹.

La exposición crónica a la radiación ultravioleta tipo B (UV-B) es la principal causa desencadenante del pterigión y esto ha quedado confirmado en los estudios epidemiológicos. Si bien hay diferencias de prevalencia según el área geográfica, latitud, raza y exposición solar; parece existir una asociación positiva entre mayor edad y presencia de pterigión.

La exposición a radiación UV conlleva un mayor estrés oxidativo ¹, el cual causa una compleja cascada de daño genético y estimulación de mediadores inflamatorios, factores de crecimiento y estimulación angiogénica, desembocando en un estado proliferativo celular.

Recientemente se han logrado considerables avances en el estudio de la patogénesis del pterigión proporcionando un mayor conocimiento de esta compleja enfermedad. Estos estudios implican mecanismos antiapoptóticos, mecanismos inmunológicos, citoquinas, factores de crecimiento, moduladores de la matriz celular, factores genéticos e infecciones virales como posibles causas.

En las últimas décadas, los estudios clínicos se han centrado en la extirpación de esta lesión para eliminar las consecuencias clínicas derivadas de la inflamación ocular o de la disminución de la visión por la afectación corneal. La alta tasa de recidiva y complicaciones de las técnicas iniciales se han ido reduciendo mediante el empleo de fármacos antimetabólicos adyuvantes y la combinación de diferentes opciones quirúrgicas como el trasplante de membrana amniótica y el trasplante autólogo de conjuntiva, entre otras.

En la actualidad no se dispone de ningún tratamiento médico indicado para reducir la lesión o disminuir la elevada tasa de recurrencia tras la cirugía.

La doxiciclina es un antibiótico de amplio espectro empleado en muchos procesos infecciosos. Es un fármaco con gran seguridad y bajo coste. Además de las propiedades antimicrobianas, las tetraciclinas tienen otras muchas características conocidas: inhibidor de las metaloproteinasas (MMPs), eliminador de las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS), propiedades antiapoptóticas, y antiinflamatorias.

Estas propiedades han tenido diversas aplicaciones clínicas: el empleo como protector neuronal en lesiones cerebrales isquémicas ^{2,3}, como terapia en la disfunción cardíaca ⁴ y su indicación como antiinflamatorio en la rosácea ^{5,6}.

En oftalmología, Cox y cols ⁷ estudiaron por primera vez el empleo de la doxiciclina sobre la angiogénesis coroidea y el pterigión en tres modelos murinos: uno de neovascularización coroidea (CNV), un modelo de angiogénesis dirigido in vivo (DIVAA) y otro modelo murino de pterigión. La doxiciclina inhibió significativamente la angiogénesis en los tres modelos murinos. El efecto más claro se encontró en el modelo de CNV seguido por el DIVAA. El modelo de pterigión también mostró regresión histológica. Esto sugería que la doxiciclina podía tener éxito como tratamiento adyuvante en la neovascularización coroidea y en el pterigión humano.

La doxiciclina es el único inhibidor de las MMPs que está disponible clínicamente.

Los recientes hallazgos en estudios previos con doxiciclina en modelos murinos de neovascularización ocular así como el conocimiento de las propiedades de la doxiciclina justifican el interés del presente trabajo de investigación. En la actualidad no se conoce el efecto de este fármaco en humanos ni los mecanismos intracelulares y genéticos implicados en la respuesta al fármaco.

Este trabajo pretende ahondar en el conocimiento de la etiopatogenia del pterigión, el efecto de la doxiciclina en el pterigión y los mecanismos moleculares implicados en la angiogénesis y el crecimiento fibrocelular de esta lesión.

Se trata, por tanto, de un estudio original, ya que no existe ningún otro estudio realizado en humanos que muestre los efectos de la doxiciclina oral en la regresión del pterigión. No existe tampoco ningún otro estudio que recoja las variaciones genéticas que se originan en el pterigión tras el tratamiento con doxiciclina.

Estudia una población multirracial, aunque con predominio claro de caucásicos e hispanos. En la mayoría de los estudios no se comparan razas.

Cada vez hay más persona en nuestro medio con pterigión, por lo que su tratamiento conlleva cada vez un mayor gasto de recursos.

2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

La hipótesis que se intenta demostrar en el ensayo clínico es que el tratamiento con doxiciclina oral es capaz de reducir el crecimiento del pterigión en pacientes a través de la activación de diferentes cascadas de señalización intracelular. Por lo tanto se trata de una hipótesis de superioridad del tratamiento con doxiciclina frente a placebo.

En el estudio de ultrasecuenciación se intenta demostrar que la doxiciclina afecta a distintas vías celulares de gran importancia.

2.2- OBJETIVOS

PRINCIPALES

- Determinar si el tratamiento con doxiciclina oral puede reducir el crecimiento del pterigión en los pacientes.
- Determinar los efectos moleculares de la doxiciclina a corto plazo en cultivos primarios de células de pterigión, utilizando técnicas de ultrasecuenciación, para identificar mejor todas las vías que pueden verse afectadas por la doxiciclina en el pterigión.

SECUNDARIOS

- Analizar el efecto de intervención (doxiciclina versus placebo) en la medida de la superficie antes y después.
- Determinar la influencia de la edad y la raza en la posible respuesta de la doxiciclina en el pterigión.
- Identificar mediante el análisis transcriptómico de cultivos celulares expuestos a doxiciclina los genes que modifican su expresión.

3- INTRODUCCIÓN

3.1- PTERIGIÓN

3.1.1-Morfología e histología

El pterigión es un proceso inflamatorio y degenerativo de la superficie ocular atribuido, principalmente, a una exposición crónica a la radiación UV-B ¹.

Clínicamente el pterigión implica un crecimiento centripeto, asociado a inflamación y neovascularización ⁸. El pterigión es frecuente, benigno, de forma triangular y exclusivo de los humanos.

Conceptualmente, la histología del pterigión consiste en una masa de tejido conectivo subepitelial que ha sufrido degeneración elastótica dispuesto sobre un fondo de degeneración hialina ⁹. La proliferación del tejido conectivo junto con la presencia de angiogénesis provoca un crecimiento elastótico y de conjuntiva anormal sobre la córnea ⁸.

Al estudiar la córnea invadida por el pterigión, cerca de la membrana de Bowman existe una proliferación de las células madres limbares epiteliales originarias, así como una invasión vascular del tejido corneal y una remodelación de las MMPs con destrucción de la membrana de Bowman ⁹.

Tan y colaboradores ¹⁰ describieron un sistema de clasificación del pterigión basado en la visibilidad de los vasos epiesclerales como indicador del grosor de la lesión. Según estos investigadores el pterigión se clasifica en:

- Atrófico (T1, vasos epiesclerales visibles).
- Intermedio (T2, vasos epiesclerales parcialmente borrados).
- Carnoso (T3, vasos epiesclerales ocultos).

El examen con lámpara de hendidura revela tres áreas bien distintas del pterigión: la cabeza, el cuello y el cuerpo ¹¹.

La cabeza es un área grisácea, plana y avascular situada en el ápex. En el borde anterior de la cabeza se aprecia una línea pigmentada epitelial férrica, llamada línea de Stocker, que aparece en los casos de larga evolución y no en el pterigión de aparición rápida.

El cuello conecta la cabeza y el cuerpo, y aquí se encuentran neovasos finos incipientes y anastomóticos.

El cuerpo se localiza en la conjuntiva bulbar con vasos rectos y radiales respecto al ápex del pterigión.

La cabeza del pterigión se adhiere firmemente a la córnea, pero el cuerpo se puede separar de las capas superficiales del globo ocular. Entre los signos de actividad del pterigión destaca la presencia de pequeñas opacidades grisáceas en la membrana de Bowman que se anteponen a la cabeza del pterigión, son las llamadas islas de Fuchs que, con el tiempo, se multiplican y progresan hacia el centro de la córnea.

Son signos de actividad la mayor vascularización, la congestión, la falta de transparencia y las manchas en el epitelio corneal.

3.1.2-Epidemiología

La prevalencia del pterigión varía ampliamente según la población estudiada.

En uno de los estudios más recientes ¹² se comparó la prevalencia del pterigión entre la raza Han y la Uygur en China, la prevalencia global fue del 11.95% siendo mayor la prevalencia en la raza Han. El metaanálisis más reciente sobre la prevalencia del pterigión se publicó en 2013 incluía 20 estudios con un total de 900545 pacientes, la prevalencia del pterigión fue del 10.2% ¹³. Dos trabajos recientes informan de prevalencias del 17,9% en ancianos mongoles de China ¹⁴ y del 19,6% en mayores de 40 años de Myanmar ¹⁵.

En España también se realizó en 2010 un estudio de prevalencia, concretamente en O Salnés, comarca costera de la provincia de Pontevedra, se incluyeron 619 pacientes y la prevalencia fue del 5,9% ¹⁶.

En un estudio del 2013 ¹⁷ realizado en China con 6685 pacientes la prevalencia del pterigión fue del 6% . En otro estudio del 2012 ¹⁸ realizado también en China con 8906 pacientes de tres etnias distintas: malayos, indios y chinos la prevalencia fue del 10.1%. La prevalencia fue del 15.5% en malayos y del 7% en indios y chinos. Este estudio de personas asiáticas de diferentes razas que viven en la misma zona geográfica indica que la raza puede ser un factor de riesgo significativo para la aparición del pterigión.

Otro estudio realizado en la India en 2013 ¹⁹ sobre 4711 pacientes la prevalencia fue del 12.9%.

Los estudios realizados en hispanos son muy escasos. El más reciente de ellos, realizado en 2009 en Arizona ²⁰ entre 4774 latinos fue del 16%, 23.7% en los hombres y 11.5% en las mujeres (Tabla 1).

ESTUDIO	PAIS	N	E	P
CHEN y cols ¹²	China	4617	>30	11,95
LIU y cols ¹³	-	900545	-	10,2
LU y cols ¹⁴	China	2486	>40	17,9
DURKIN y cols ¹⁵	Myanmar	2481	>40	19,6
VISO y cols ¹⁶	España	619	>40	5,9
SUN y cols ¹⁷	China	6685	>40	6
ANG y cols ¹⁸	China	8906	>40	10,9
NANGIA y cols ¹⁹	India	4711	>30	12,9
WEST y cols ²⁰	EEUU (latinos)	4774	>40	16

Tabla 1. Prevalencia de pterigión en estudios recientes basados en la población. N: número de pacientes, E: edad (años), P: prevalencia (%).

Parece existir una asociación positiva entre mayor edad y presencia de pterigión ¹², también una mayor prevalencia en hombres ²¹.

Un metanálisis reciente ²² sobre una población de 95279 pacientes encontró una reducción en el riesgo de presentar pterigión en los fumadores respecto a los no fumadores.

Los estudios citados encuentran diferencias en los parámetros raza, latitud y exposición solar; pero generalmente la prevalencia en los trópicos es mayor que en otras latitudes y es claramente inferior en descendientes europeos que en los descendientes africanos.

3.1.3-Patogénesis

El crecimiento del pterigión se produce a partir del epitelio limbar que invade la córnea de forma centrípeta estando la radiación UV-B implicada en su etiología ⁸.

La contribución de los mediadores inflamatorios, mecanismos inmunológicos, factores de crecimiento, estímulos angiogénicos y la modulación de la matriz extracelular son probablemente factores secundarios en la patogénesis del pterigión.

Los estudios clínicos se han centrado principalmente en las características clínicas y en el tratamiento quirúrgico del pterigión.

Últimamente se han logrado considerables progresos en el estudio de la patogénesis del pterigión proporcionando avances en el conocimiento de esta compleja enfermedad. Estos estudios recientes implican mecanismos antiapoptóticos, mecanismos inmunológicos, citoquinas, factores de crecimiento, moduladores de la matriz extracelular, factores genéticos, infecciones virales y otras posibles causas ^{8, 23}.

3.1.3.1-Estrés oxidativo

Como se ha comentado anteriormente, la exposición crónica a la radiación UV- B es la principal causa desencadenante del pterigión ²⁴ y la relación entre la exposición a radiación UV y el pterigión está bien establecida en estudios epidemiológicos ²³.

Un estudio ha mostrado fluorescencia en el limbo nasal en los pacientes con pterigión ²⁵. Estos cambios pueden representar la primera evidencia de daño precoz en la superficie ocular provocado por exposición al sol.

La exposición a radiación UV conlleva un mayor estrés oxidativo, el cual causa daño genético y estimulación de mediadores inflamatorios, desembocando en un estado hiperproliferativo ²³.

Tras la exposición a la radiación UV-B, la expresión de varias moléculas claves se incrementa, tales como las citoquinas, los factores de crecimiento y las MMPs, que participan probablemente en las fases inflamatoria, proliferativa y de remodelación de esta enfermedad ²³. Otros estudios sobre los efectos de UV-B en el pterigión y en las células epiteliales del pterigión en cultivo ^{26, 27} han demostrado que la inducción de las citoquinas, de los factores de crecimiento y de las MMPs producen la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la activación de las vías de proteína-quinasa activadas por mitógenos (MAPK).

La activación del receptor del EGF y de las MAPK inicia la inducción de factores de transcripción de la misma vía, tales como el factor nuclear-kappa B (NF-kB).

El NF-kB media la activación de algunas de las respuestas celulares a la radiación UV y al estrés hiperosmótico. Para las células cultivadas del pterigión la vía MAPK se activa por la exposición a la radiación UV-B. El NF-kB es un mediador clave de la expresión de IL-1 β y p53 ²⁸ que desempeñan papeles importantes en el desarrollo del pterigión. El NF-kB también se suprime por el ácido retinoico, que también inhibe la IL-6 y la IL-8 en las células epiteliales de pterigión irradiadas con UV.

Torres y cols ²⁷ analizaron los cambios en las vías del MAPK y NF-kB en el pterigión y, por primera vez, en la conjuntiva ipsilateral libre de pterigión. Los datos obtenidos apoyan el componente inflamatorio en la patogénesis del pterigión.

La radiación UV actúa directamente por fototoxicidad o indirectamente a través de los radicales libres. Dentro de la célula, el daño oxidativo produce radicales libres que actúan sobre macromoléculas tales como las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos.

Los radicales libres generados en el tejido incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito (NO_3^-), que pueden ser neutralizados por enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), y la glutatión peroxidasa (GSH-Px). El sistema antioxidante y la cantidad de radicales libres se mantienen en un cierto estado de homeostasis. Cuando los factores exógenos o endógenos aumentan el estrés oxidativo, la homeostasis se ve perturbada y los radicales libres desnaturalizan muchas moléculas intracelulares básicas como los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos.

El estrés oxidativo conlleva una sobreexpresión de algunos mediadores de crecimiento del pterigión. Una forma de cuantificar este daño es midiendo la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) que es un marcador usado para la identificación del daño oxidativo en el ácido desoxirribonucleico (DNA) y se ha encontrado en algunos estudios en el tejido del pterigión¹.

La 8-oxoguanina glicosilasa 1 humana (hOGG1) es el enzima que metaboliza la 8-OHdG y también se sobreexpresa en el pterigión²⁹.

El estrés oxidativo se manifiesta con el aumento del nivel de malondialdehído (MDA), que es un producto de la descomposición de las cadenas de ácidos grasos esenciales insaturados obtenidos principalmente a través del mecanismo de oxidación, y la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSH-Px. En un estudio reciente¹ se observó que el aumento significativo de MDA siempre acompaña a una disminución significativa en la actividad de SOD, CAT y GSH-Px, lo que nos lleva a pensar que el estrés oxidativo es un mecanismo importante en el desarrollo del pterigión. El MDA se acepta como un marcador fiable de la peroxidación lipídica que se produce como resultado del estrés oxidativo.

Existen evidencias de que la producción de óxido nítrico (NO) se incrementa por la acción de la óxido nítrico sintetasa (NOS) incrementada por la exposición a radiación UV.

La NOS tiene tres isoformas, dos son constitutivas (cNOS) y la tercera es inducible, sintetasa de oxido nítrico inducible (iNOS).

También es evidencia de estrés oxidativo en el pterigión la presencia de la iNOS y la reducción en la cantidad de antioxidantes. La iNOS es insensible al calcio. Hay que tener en cuenta que, habitualmente, la inducción de la iNOS sucede en un ambiente oxidativo, por lo que los altos niveles de NO producidos por la iNOS pueden reaccionar con el anión O_2^- formando NO_3^- , que provoca toxicidad¹.

También se sabe que la radiación UV aumenta la liberación de NO por medios no enzimáticos. Parece posible que los altos niveles de NO sea un factor de incremento del estrés oxidativo por medio de su influencia oxidante y de apoptosis.

Las ROS, los factores de crecimiento y diversas citoquinas, como la ciclooxigenasa 2 (COX2), desempeñan un papel conocido en el desarrollo de cánceres de piel bajo la influencia de la radiación UV¹.

En un reciente estudio se ha demostrado que la SERPINA3K, una proteinasa inhibidora de la serina, suprime la proliferación celular y la migración de las células epiteliales del pterigión, a través del bloqueo de las ROS³⁰.

La mayor actividad de las citoquinas causada por la radiación UV parece ser un posible mecanismo de aumento del NO.

En un estudio reciente¹ se evaluó el NO, las enzimas del sistema antioxidante y la peroxidación de lípidos juntos por primera vez, mostrando que el estrés oxidativo juega un papel importante en la etiopatogenia del pterigión. No se puede olvidar, sin embargo, que si la radiación UV es un factor importante en la patogénesis de estrés oxidativo, la inflamación crónica también desempeña un papel importante en el estrés oxidativo ya que éste aumenta apreciablemente con la inflamación.

Kim y cols³¹ informaron de una mayor expresión de las proteínas ALDH3A1, PDIA3 y PRDX2 en el pterigión, son proteínas conocidas por su importante relación con el estrés oxidativo. El estudio concluye que la exposición a radiación UV y el estrés oxidativo resultante conduce a un aumento de los niveles de estas proteínas, que proporcionan resistencia a la apoptosis inducida por radiación UV y desemboca en un estado hiperproliferativo.

Para concluir, el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo del pterigión, y este complejo proceso debe tenerse en cuenta en la prevención y tratamiento de esta patología.

3.1.3.2-Regulación del ciclo celular

El pterigión se caracteriza por un crecimiento excesivo de células epiteliales con metaplasia escamosa, hiperplasia de células caliciformes, expresión anormal de p53 y un estroma subyacente de fibroblastos y vasos sanguíneos.

El mantenimiento de la homeostasis celular es regulado esencialmente por dos procesos: la apoptosis y la proliferación celular.

El ciclo celular, y en concreto, los biomarcadores de apoptosis (Bcl-2, Bcl-2 asociada a proteína X (BAX), survivina y p53) y los biomarcadores de proliferación celular (antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), Ki-67 y ciclina D1) han demostrado jugar un papel muy importante en la formación y en el crecimiento del pterigión³².

Kase y cols³³ demostraron que el crecimiento del pterigión y su desarrollo se asocia con la proliferación del epitelio.

3.1.3.2.1-Biomarcadores de apoptosis

La proteína antiapoptótica Bcl-2, que se contrarresta con la proteína proapoptótica BAX, se ha encontrado en el epitelio de pterigión pero no en la conjuntiva. Las interacciones de la familia de proteínas Bcl-2 regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y la apoptosis. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa es el paso clave en la apoptosis regulada por las proteínas de la familia Bcl-2³⁴. La BAX forma un oligómero que permeabiliza la membrana mitocondrial.

La survivina es un miembro de la familia de las proteínas antiapoptóticas. El incremento de la survivina se ha asociado al pterigión³⁵. Maxia y cols^{36,37} han demostrado

que la expresión de la survivina está incrementada en el pterigión primario con respecto a la conjuntiva normal y tiene una relación clara con la expresión de la p53, la COX2 y la 8-OHdG.

La survivina puede bloquear la apoptosis inducida por una gran variedad de factores desencadenantes y posee un mayor efecto en la supresión de a apoptosis que otra familia de inhibidores como el Bcl-2.

La survivina se ha demostrado que actúa a través de la inhibición de la caspasa 3 y 7, lo que daría lugar a una regulación negativa de la apoptosis³⁸. Se cree que la caspasa 3 podría desempeñar un papel central en la apoptosis, aunque no en todos los tipos celulares; algunos autores defienden que el tipo de caspasa implicada varía dependiendo del tipo celular e incluso del estímulo que induzca el proceso.

Esto ha sido demostrado mediante la interrupción de la cascada de la survivina, que conduce a un aumento de apoptosis y a una disminución del crecimiento del tumor. La survivina se sobreexpresa en la mayoría de los tumores y del tejido fetal, pero está completamente ausente en las células totalmente diferenciadas. Este hecho hace de la survivina un objetivo ideal para la terapia del cáncer. Su expresión está regulada por el ciclo celular y sólo se expresa en la fase G2-M. Se sabe que se localiza en el huso mitótico por interacción con la tubulina durante la mitosis y puede desempeñar una importante función en la regulación de ésta. Los mecanismos moleculares de la regulación de la survivina todavía no se conocen del todo, pero su regulación parece estar ligada a la proteína p53 y también es sobrerregulada por la β -catenina.

En un estudio reciente³⁹, la survivina se expresaba en todos los tejidos del pterigión pero no en la conjuntiva humana normal. Estaba presente principalmente en el citoplasma del epitelio del pterigión en etapas iniciales, mientras que estaba más presente en el núcleo en etapas más avanzadas. Se demostró que la disminución de los niveles de survivina inhibía la proliferación de las células epiteliales del pterigión, y se acompañaba de una infrarregulación del p63 y una sobrerregulación de la p57 y de la p21.

Zhang y cols⁴⁰ han demostrado que el 35% de los pterigiones primarios y el 40% de los pterigiones recurrentes han sido positivos en la tinción de la survivina, mientras que la conjuntiva humana normal no se teñía. Este es el primer estudio que demuestra una sobreexpresión de survivina en el pterigión recidivante. En este mismo estudio se observó que la expresión de la survivina diferencia claramente el pterigión p53 positivo de

los casos negativos de p53, lo que confirma una correlación entre la survivina y la expresión de p53. La sobreexpresión de la survivina está probablemente relacionada con la inestabilidad genética inducida en la p53 por la radiación UV. Por otra parte, no hubo diferencia en la inmunoreactividad de la p53 y la survivina entre los grupos de pterigión primario y recidivante.

La regulación de la survivina por la p53 juega un papel antiapoptótico importante en el pterigión. Con estos datos la survivina podría tener un papel clave en las estrategias terapéuticas de inhibición de la formación del pterigión.

El gen p53 se ha investigado ampliamente en el contexto de su implicación en el desarrollo del pterigión.

También llamado el "guardián del genoma" es una proteína supresora tumoral que está codificada por el gen TP53, que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17⁴¹. El P53 está implicada en los mecanismos de la función contra el cáncer, y desempeña un papel importante en la apoptosis, la estabilidad genómica, y en la inhibición de la angiogénesis. El gen p53 pertenece a una familia de factores de transcripción, a la cual pertenecen también el gen p63 y p73. Estas tres proteínas colaboran en una compleja red de interacciones que aún no se conoce en su totalidad. El gen p53 es ubicuo (se expresa en todos los tejidos), mientras que los genes p63 y el p73 presentan especificidad tisular. Además, parece que todos ellos presentan isoformas, algunas de las cuales funcionan como activadoras, mientras que otras funcionan como inhibidoras. El gen p53 actúa previniendo la proliferación e induciendo apoptosis si existen mutaciones en el DNA.

Algunos trabajos han confirmado el aumento de los niveles de p53 en el epitelio basal del pterigión^{24, 36}. La función normal de p53 en este contexto sería prevenir la acumulación de aberraciones genéticas y de mutaciones inducidas por la radiación UV.

Varios estudios postulan la presencia de una mutación del gen p53 que no permite su función normal, produciendo crecimiento del pterigión⁸.

Smith y Kumar⁴² estudiaron a este supresor tumoral después de la exposición a radiación UV, observando que el p53 se convertía en residuos de serina p53 fosforilada induciendo la reparación del DNA. Este proceso dependía de la longitud de onda UV y la dosis de la radiación UV.

La exposición a radiación UV induce reacciones fotoquímicas que forman dímeros de pirimidina, que son lesiones moleculares del DNA formadas por bases de timina o citosina unidas entre sí de forma anormal a través de reacciones fotoquímicas. Estas lesiones tienen características premutagénicas y alteran la estructura del DNA⁴³. Los dímeros de pirimidina más frecuentes son los de timina. Los dímeros de pirimidina pueden ser reparados por fotorreactivación, pero los dímeros no reparados son mutagénicos.

Aunque el papel de la radiación UV en la patogénesis de pterigión humano es aceptado, los datos sobre la presencia y distribución de los dímeros de timidina se reduce a su descripción en el segmento anterior del ojo normales de conejos⁴³. No hay datos sobre la expresión de dímeros de pirimidina o su posible participación en la patogénesis del pterigión primario o recurrente.

La exposición a la radiación UV induce dos tipos de alteraciones en las bases del DNA (los cambios predominantes son C → T y mutaciones CC → TT en secuencias de dipirimidina) demostrado por muchos sistemas experimentales, pero no demostrados en el pterigión humano. Entre los diversos tipos de lesiones provocadas en el DNA después de exposición a radiación UV, los dímeros de pirimidina ciclobutano son las lesiones más mutagénicas. El gen p53 es uno de los genes más sensibles para la formación de pirimidina ciclobutano como punto de acceso mutacional en el codón 270 (que corresponde al codón 278 en los seres humanos) .

Cimpean y cols⁴⁴ encontraron el mayor número de células positivas al p53 dentro del epitelio del pterigión humano en donde más del 70% de total de las células epiteliales fueron positivas para los dímeros de pirimidina como un signo de daño severo en el DNA. La persistencia de la positividad de p53 en las células suprabasales y de la capa en basal sugiere que estas células son especialmente sensibles a la radiación UV y pueden ser los llamados p53 mutante o p53 nulo. Este hallazgo estaría en concordancia con estudios previos que sugieren que las células basales del epitelio del pterigión humano son altamente inestables y pueden adquirir mutaciones⁴⁵. Estas mutaciones podrían provocar la supervivencia celular y pueden ser responsables de la recurrencia de pterigión humano.

La reparación por escisión de nucleótidos y la reparación por escisión de bases⁴⁶, son dos de las principales vías implicadas en la reparación del DNA dependiente de p53 en las células expuestas a la radiación UV. Las células con p53 normal realizan la reparación por escisión de bases sin alteraciones, mientras que las células con p53 mutante o

nulo presentan problemas en esta reparación. Basándose en estos hallazgos anteriores, la persistencia de la expresión del dímero de pirimidina junto con la ausencia de expresión del p53 en los componentes del estroma de la mayoría de los casos sugiere la falta de un papel protector contra la radiación UV del p53 provocando daño en el DNA de las células endoteliales y en los fibroblastos del compartimento fibrovascular del pterigión humano. La persistencia de dímeros de pirimidina seguido por la inducción de cambios mutacionales en las células del estroma de pterigión humano podrían ser responsables del mayor número de recurrencias y de la resistencia a las terapias convencionales. Se necesitan más estudios moleculares y genéticos para dilucidar la implicación del gen p53 en la reparación de dímeros de pirimidina del pterigión humano.

3.1.3.2.2-Biomarcadores de proliferación celular

Kun Liang y cols ³² encontraron una positividad elevada de los biomarcadores de proliferación Ki-67 y del PCNA en los pacientes con pterigión.

El antígeno Ki-67, también conocido como MKI67, es una proteína que en los humanos está codificada por el gen MKI67 (antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67). La proteína Ki-67 es un marcador de proliferación celular. Además, está asociada con la transcripción del RNA ribosomal. La inactivación del antígeno Ki-67 conduce a la inhibición de la síntesis de RNA ribosomal ⁴⁷. Durante la interfase, el antígeno Ki-67 se detecta exclusivamente en el núcleo de la célula, mientras que en la mitosis la mayor parte de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas. El antígeno Ki-67 es un excelente marcador para determinar la fracción de crecimiento de una población celular determinada y es muy útil para el seguimiento del cáncer. El anticuerpo monoclonal que determina el índice de Ki-67 es el MIB-1. Los ejemplos más estudiados en este contexto son los carcinomas de la próstata, del cerebro y de la mama.

El número de células inmunopositivas Ki-67 está muy aumentado en la cabeza del pterigión en comparación con la conjuntiva normal ^{33, 35}.

El PCNA es una proteína nuclear sintetizada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular. Es un importante biomarcador de proliferación celular. Esta proteína se localiza en el núcleo y favorece la síntesis de DNA, ya que es un cofactor de la DNA polimerasa delta. Cuando existen daños en el DNA, la proteína PCNA se reubica y par-

participa en la vía de reparación del DNA dependiente de RAD6. En un estudio reciente ³⁸ se ha observado una sobreexpresión de este antígeno en el pterigión.

La ciclina D1 es una proteína que en los humanos está codificada por el gen CCND. Las ciclinas funcionan como reguladores de las quinasas CDK. Las distintas ciclinas presentan un patrón específico de expresión y degradación a lo largo del ciclo que contribuye a la coordinación temporal de cada fase del ciclo celular. La ciclina D1 está aumentada en el cuerpo y en la cabeza del pterigión ^{33, 35}.

Otros reguladores del ciclo celular que han sido estudiados en el pterigión incluyen a los genes p16, p27 y p63 (este último de la familia del p53), al K-RAS y el Ku70 ^{33, 48}.

En el pterigión existe también una hipermetilación del p16. El producto de este gen es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas 2A, codificadas por el gen CDKN2A. El p16 juega un papel importante en la regulación del ciclo celular y sus mutaciones aumentan el riesgo de desarrollar distintos tipos de cáncer, especialmente el melanoma. Este gen se encuentra con frecuencia mutado o inactivo en las células cancerosas, característica que lo identifica como gen supresor de tumores. La expresión del gen p16 aumenta con la edad y reduce la proliferación de las células madre. Esta reducción en la división y la producción de células madre protege contra el cáncer al tiempo que aumenta los riesgos asociados al envejecimiento celular.

El gen p27 parece estar disminuido en la cabeza del pterigión ³³. Es un gen inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas 1B, es una enzima que en los humanos está codificada por el gen CDKN1B. Su principal función es detener o ralentizar el ciclo de división celular.

En un estudio se observó que el promotor Ku70 T991C se correlacionaba con el pterigión, pudiéndose convertir en un marcador potencial para la predicción de la susceptibilidad a padecer pterigión ⁴⁹.

La Ku70 es una proteína codificada en humanos por el gen XRCC6. La Ku70, junto con Ku80, conforman un heterodímero denominado proteína Ku, que se une a los extremos de la doble hebra de DNA que ha sufrido un corte, y es requerida para el proceso de recombinación no homóloga durante la reparación del DNA.

3.1.3.3-Mediadores inflamatorios

Los mediadores inflamatorios parecen asociarse con el desarrollo y crecimiento del pterigión. La exposición a radiación UV induce a las quimioquinas, interleuquinas y a los factores de crecimiento a activar las células inflamatorias y la neovascularización.

La IL-1, IL-6, IL-8 y el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) se incrementan en el pterigión después de la exposición a radiación UV induciendo la expresión de MMP²⁶, mientras que la IL-4 puede mediar en la fibrosis de las lesiones recurrentes⁵⁰.

El TNF- α es una citoquina liberada por células del sistema inmune. Su estimulación está relacionada con otros mediadores celulares como la IL-1 y las endotoxinas bacterianas. El TNF- α ejerce distintas funciones en diferentes órganos, una de estas funciones es la activación de la producción de otros mediadores como las IL- 1 o la IL- 6. La liberación de TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de NO con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetaria y, probablemente, la oclusión vascular resultante sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene su nombre. Las funciones del TNF- α se deben a su unión a dos receptores celulares diferentes que se localizan en neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Además, estos receptores se encuentran en estado soluble en el suero y en el líquido sinovial²⁶.

La IL-1 se incrementa con la exposición a radiación UV lo que contribuye a la sobre-regulación de otros mediadores inflamatorios y de las MMPs y potencialmente a la patogénesis del pterigión⁸.

La IL-8 es una citoquina de la familia de las quimioquinas de naturaleza proinflamatoria. Su síntesis se realiza en fibroblastos, células endoteliales, monocitos y macrófagos. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos. Es una citoquina proinflamatoria que amplifica la respuesta inflamatoria local, multifuncional, con actividad angiogénica, de quimiotaxis de neutrófilos y de actividad proliferativa de queratocitos. También ha demostrado inducir la producción de MMPs.

La IL-6 es una glucoproteína proinflamatoria sintetizada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Localizada en el cromosoma 7, su liberación está inducida por la IL-1 y el TNF- α .

Al igual que la IL-8, las IL-6 también pueden inducir la expresión de MMPs y también existen evidencias de que la producción de estas citoquinas puede ser inducida por la radiación UV ²⁶ .

La COX es una enzima que permite al organismo producir prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La COX2 tiene como función mediar en los procesos de inflamación y en la señalización por prostanoïdes. La COX2 produce prostaglandina E2 que juega un papel importante en la angiogénesis inducida por citoquinas inflamatorias.

Si bien la COX1 se expresa constitutivamente en la mayoría de tipos de células y tejidos, la COX2 es inducida por los factores de crecimiento, las citoquinas, las endotoxinas bacterianas y por el daño tisular. La COX2 también está implicada en la patogénesis de los tumores de piel en respuesta al estrés oxidativo generado por la radiación UV.

La COX2 puede mediar el incremento de MMP-1 y de MMP-9 a través del aumento de la lipocalina 2 (NGAL) y puede contribuir también a la elevada expresión de las MMPs en el pterigión. Recientemente, se vio que la COX2 mediaba en el incremento de los niveles de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) en la inflamación crónica y en diversos tumores ⁵¹⁻⁵⁴.

La COX2 se sobreexpresa en el pterigión promoviendo el aumento de prostaglandinas y de la cascada inflamatoria ⁵⁵, también esta sobreexpresión de la COX2 se asocia con el factor antiapoptótico survivina ³⁷. Algunos estudios recientes indican que la expresión de la COX2 en el pterigión influye en la patogénesis de la enfermedad y en el pronóstico después de la resección quirúrgica ^{37, 55-57}.

Chiang y cols ⁵⁵ encontraron que más del 80% de los pterigiones estudiados mostraron expresión positiva de la COX2 en la capa epitelial. Sin embargo, no encontraron ninguna expresión de la COX2 en la capa estromal. Estudios posteriores de Karahan y cols ⁵⁷ y Maxia y cols ³⁷ encontraron expresión de la COX2 en la capa epitelial de pterigión primario, del 84,2% en el estudio de Karahan y del 67,7% en el estudio de Maxia. También informaron de la expresión COX2 en las capas estromales, localizadas en capilares y células inflamatorias. La alta expresión de la COX2 se sugirió como un factor de riesgo para la recurrencia del pterigión ⁵⁵⁻⁵⁷. En un estudio reciente, 9 de 17 pterigiones

(52,9%) expresaron COX2 en la capa epitelial y el 100% expresaron la COX2 en la capa estromal, especialmente en los macrófagos infiltrantes de la lesión⁵⁸. La heterogeneidad en la expresión epitelial de la COX2 puede estar relacionada con el estado inflamatorio de la superficie ocular. Sin embargo, el hallazgo constante en el estroma de la COX2 sugiere que estas células están estrechamente relacionadas con la patogénesis y/o el mantenimiento del pterigión.

La coexpresión de la COX2 y el VEGF en varios tumores ha sido descrita previamente^{53, 59, 60}.

La prostaglandina E2 (PGE2), producto de la actividad COX2, también es angiogénica por influencia directa sobre las células endoteliales o mediante la inducción de la liberación de factores de crecimiento angiogénicos, tales como el receptor activador del plasminógeno de la uroquinasa (uPA), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el VEGF⁶¹.

La fosfolipasa D es una enzima localizada en la membrana plasmática que hidroliza el lípido fosfatidilcolina a ácido fosfatídico (que queda alojado en la membrana) y colina (hidrosoluble y capaz de difundir en el citosol). Este ácido es hidrolizado rápidamente por parte de la ácido fosfatídico fosfohidrolasa, dando lugar a diacilglicerol, el cual es un compuesto clave en las rutas de señalización celular. Un incremento en la fosfolipasa D, que está implicada en la inflamación y la diferenciación celular, se puede también encontrar en el pterigión⁶².

Las proteínas S100A son una familia de pequeñas proteínas dimérica que e unen a calcio. El heterodímero S100A8 / A9 se expresa abundantemente en la superficie ocular y parece participar en la patogénesis de diversas enfermedades de la superficie ocular, tales como el ojo seco, la angiogénesis corneal y el pterigión^{63, 64}.

En un reciente estudio⁶⁵ se encontró proteína S100A6 en la capa epitelial y estromal del pterigión y también en el epitelio conjuntival normal. Las proteínas S100A8 y A9 se localizaron en niveles muy altos en el epitelio del pterigión y en mucha menor medida en el epitelio conjuntival normal. La proteína S100A11 se expresó en las células basales del epitelio conjuntival, pero sólo en las capas suprabasales de epitelio del pterigión. El estudio concluyó que las proteínas S100A6, A8 y A9 se sobreexpresaban en el tejido de pterigión en comparación con la conjuntiva normal. Además, se observó una clara alte-

ración de la localización de la expresión de S100A11 en el epitelio pterigión en comparación con el conjuntiva.

En otro estudio ⁶⁶ se quería determinar si la naturaleza inflamatoria del pterigión se reflejaba en los componentes proteicos de las lágrimas. En comparación con las lágrimas de los ojos de control (sin pterigión u otras anomalías), el nivel de la proteína S100A8 aumentó en los pacientes con pterigión un promedio de 4,5 veces y la proteína S100A9 se incrementó un promedio de 2,3. Se concluyó que la expresión regulada por el incremento de α -defensinas humanas, S100A8 y A9 en las lágrimas de pacientes con pterigión sugiere que estas proteínas pueden ser parte de la respuesta inflamatoria de la superficie ocular, o una respuesta al proceso de fibrovascularización del pterigión. Estos marcadores se sugirieron también como posibles indicadores para predecir la recurrencia después de la cirugía de pterigión.

A pesar de su importancia en la evolución de la lesión, probablemente los mediadores inflamatorios se elevan secundariamente en el pterigión y no son la causa primaria de su aparición.

3.1.3.4-Mecanismos inmunológicos

Es importante señalar que la cantidad de células T inflamatorias en el pterigión no se correlaciona con los parámetros clínicos ni con la severidad de la inflamación ni con el uso de esteroides tópicos ni antiinflamatorios no esteroideos ⁶⁷. Esto implica que la inflamación no actúa sola y que otros factores pueden contribuir a la recurrencia del pterigión.

Los mecanismos inmunológicos pueden jugar un papel importante en la patogénesis del pterigión dada la presencia en éste de linfocitos T, células plasmáticas, células cebadas, células de Langerhans, monocitos, macrófagos, inmunoglobulinas (Ig G e IgE), expresión aberrante del antígeno leucocitario humano (HLA-DR) en el epitelio del pterigión y la sobreexpresión de las moléculas de adhesión vascular celular -1 (VCAM-1) y de las moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) ⁸.

El pterigión muestra niveles elevados de señales celulares y moléculas de adhesión. En un estudio reciente ⁶⁸, se ha detectado una elevada infiltración de linfocitos CD4 y

CD8, un incremento en la expresión de las VCAM-1 e ICAM, y una expresión aberrante del HLA-DR en el epitelio del pterigión, no encontrándose diferencias en el número de células cebadas entre el epitelio del pterigión y el epitelio de la conjuntiva normal.

La VCAM-1 es una proteína que, en los seres humanos, es codificada por el gen CADM1. Esta molécula actúa en la adhesión celular al endotelio vascular de los linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos.

La ICAM-1 (CD54) es una proteína transmembrana, que se encuentra en células endoteliales y leucocitos, es de gran importancia en la estabilización de las interacciones célula-célula en células endoteliales y facilita la transmigración de los leucocitos. Debido a estas asociaciones con la respuesta inmune, muchos investigadores han supuesto que ICAM-1 podría ser parte del mecanismo de transducción de señales. La ICAM-1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que incluye a los anticuerpos y a los receptores de células T, posee sitios de unión para una serie de ligandos asociados con el sistema inmune ⁸.

Otras moléculas de señalización, como las E-cadherinas y β -cateninas, están sobreexpresadas y se concentran en la cabeza del pterigión ⁶⁹. El incremento de las β -cateninas estimula ciertas proteínas del ciclo celular y a las MMPs ⁷⁰.

Las cadherinas son una clase de proteínas transmembrana de tipo-1, que juegan un papel importante en la adhesión celular, asegurando que las células dentro de los tejidos estén unidas. Las E-cadherinas se encuentran en el tejido epitelial. La pérdida de la función de la E-cadherina se ha implicado en la progresión y metástasis del cáncer.

Un estudio reciente comparó la expresión genética del pterigión con tejido conjuntival normal encontrando un significativo incremento de las proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP) ⁷¹. Estas proteínas pertenecen a la familia de citoquinas quimiotácticas conocidas como quimioquinas. En los seres humanos hay dos formas principales, MIP-1 α y MIP-1 β , que ahora reciben el nombre oficial de CCL3 y CCL4, respectivamente. Ambas son factores importantes producidos por los macrófagos después de ser estimulados con endotoxina bacteriana. Activan a los granulocitos (neutrófilos , eosinófilos y basófilos) y por lo tanto pueden conducir a la inflamación neutrofílica aguda. También inducen la síntesis y liberación de otras citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α , a partir de fibroblastos y macrófagos.

3.1.3.5-Factores de crecimiento

Otros mecanismos de señalización como son los factores de crecimiento y sus receptores se han estudiado como partícipes en el desarrollo del pterigión. Estas moléculas inducen proliferación y/o migración de células epiteliales, fibroblastos o células vasculares, procesos que contribuyen a la hiperplasia, fibrosis y angiogénesis en el pterigión²³.

Las citoquinas profibróticas y los factores de crecimiento expresados en el pterigión incluyen el factor de crecimiento epidérmico vinculado a la heparina (HBEGF), VEGF, la proteína unidora del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-BP), al factor derivado del epitelio pigmentario de la retina (PEDF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (β FGF), los factores de crecimientos derivados de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y al factor de crecimiento de células madre (SCF).

El HBEGF induce la migración celular de células epiteliales y de fibroblastos en el pterigión⁸. Estudios previos han demostrado una sobreexpresión de β FGF, HBEGF y VEGF después de la exposición a radiación UV⁷². El VEGF, el factor proangiogénico más estudiado, está elevado en las lágrimas, en el plasma y en el tejido ocular de los pacientes con pterigión. La expresión del VEGF en el pterigión puede ser debida a múltiples estímulos (UV, hipoxia, citoquinas y factores de crecimiento)^{66,73} y probablemente representa una vía común de la proangiogénesis. Además, la inhibición del VEGF está siendo investigada por este motivo como posible tratamiento⁷³.

La presencia del polimorfismo VEGF-460C se ha correlacionado con la formación precoz de pterigión en mujeres jóvenes⁷⁴.

El VEGF es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis (formación de novo del sistema circulatorio embrionario) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). Las acciones del VEGF han sido estudiadas en las células del endotelio vascular, aunque también tiene efectos sobre otros tipos celulares (por ejemplo, estimula la migración de monocitos/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales y células tumorales). Se ha demostrado, *in vitro*, que el VEGF

estimula la división y la migración de células endoteliales. El VEGF también es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular.

El hallazgo de que dos importantes moléculas inflamatorias, COX2 y VEGF, se expresan de forma importante en los macrófagos infiltrantes del pterigión humano sugiere el papel clave de estos macrófagos en la patogénesis del pterigión. Se han descrito macrófagos con expresión de la COX2 en varias enfermedades inflamatorias y tumores ⁵⁸. Además, algunos estudios recientes han demostrado que la expresión del VEGF en los macrófagos es importante en la génesis de la fibrosis y la angiogénesis de la superficie ocular ⁴⁵. Por lo tanto, los macrófagos que expresan tanto la COX2 como el VEGF pueden tener potencial para promover la angiogénesis, la deposición de colágeno, y el crecimiento del pterigión. Además, la COX2 y la expresión del VEGF en los macrófagos sugieren el papel que desempeñan estas células como puente entre el proceso inmunológico y las características tumorales del pterigión, porque tanto la COX2 como el VEGF son importantes en la carcinogénesis inducida en la piel por la radiación ⁷³.

En el pterigión se ha descrito un aumento en la expresión de factores neurotróficos, incluyendo el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), la sustancia P, la neurotrofina-4 y la neurotrofina-5 ⁷⁵.

La elevación de los factores proangiogénicos (IL-8, TNF, β FGF, HBEGF y VEGF) junto con la falta de inhibidores angiogénicos (PEDF y la trombospondina-1) fomentan la neovascularización en el pterigión ⁷⁶. Se ha encontrado una disminución del PEDF en el pterigión. El PEDF actúa como inhibidor de la angiogénesis, por ello la disminución de sus niveles contribuye a la estimulación angiogénica y a la formación y progresión del pterigión.

El SCF es una citoquina que se une al receptor c-Kit (CD117), aunque se trate de una citoquina se incluye también dentro de los factores de crecimiento como su nombre indica. El SCF puede existir tanto como una proteína transmembrana como una proteína soluble. Esta citoquina desempeña un papel importante en la hematopoyesis, la espermatogénesis, y la melanogénesis. El SCF también se encuentra elevado en el plasma y en el tejido ocular de los pacientes con pterigión ⁷⁷. Se han encontrado células de Langerhans en el tejido del pterigión por inmunohistoquímica y en estudios in vivo ^{78, 79}.

3.1.3.6-Estimulación angiogénica

La inflamación provoca diferentes patrones de angiogénesis produciendo neovascularización que contribuye a la formación y desarrollo del pterigión. La estimulación de la angiogénesis debida a la exposición a radiación UV-B o a los procesos inflamatorios probablemente sean fenómenos secundarios, que contribuyen al crecimiento del pterigión ⁸.

Algunos marcadores de las células endoteliales vasculares, como el CD31 están aumentados en el pterigión. Factores angiogénicos, como el VEGF y la sustancia P, están incrementados mientras que la trombospondina-1 está disminuida ⁸. Estos factores están aumentados en la lágrima y el plasma, aumentando la actividad del factor de transcripción ETS-1, que activa directamente la angiogénesis.

La familia ETS está presente en todo el cuerpo y está implicada en una amplia variedad de funciones, incluyendo la regulación de la diferenciación celular, control del ciclo celular, la migración celular, la proliferación celular, la apoptosis y la angiogénesis.

3.1.3.7-Modulación de la matriz extracelular

Como se ha indicado anteriormente, en el desarrollo y progresión del pterigión se han involucrado factores de crecimiento tales como el β FGF, el PEDF, el TGF- β y el TNF- α . De estos estudios se ha postulado que estos factores de crecimiento y otras citoquinas contribuyen a la inflamación, proliferación celular, remodelación del tejido conectivo y angiogénesis observadas en el pterigión.

Es importante resaltar que estas citoquinas modulan a las enzimas proteolíticas llamadas MMPs, las cuales son activas contra todos los componentes de la matriz extracelular. Las MMPs han sido implicadas en tumores invasivos, en las metástasis, en la destrucción articular en pacientes con artritis reumatoide y en la degradación de la esclera en pacientes con escleritis necrotizante.

A consecuencia de la exposición a la radiación UV y con la acumulación de suficientes mutaciones, las células del pterigión invaden la membrana basal de la córnea y colocan células epiteliales de la conjuntiva junto con éstas. La degradación de la membrana

de Bowman es consecuencia de un aumento en la concentración de proteasas que degradan los componentes de la membrana basal como el colágeno tipo IV y el colágeno fibrilar del estroma corneal.

Recientemente se observó que los fibroblastos del pterigión tienen una expresión elevada de MMPs⁹. Estas proteasas facilitan la degradación de los componentes de la membrana basal (como la membrana de Bowman) adyacente a la matriz estromal. Las MMPs también degradan moléculas de la superficie ocular.

Algunas mutaciones en los genes de la elastina y la tropoelastina, componentes del tejido conectivo, se han asociado al pterigión⁹. En el tejido fibrovascular del pterigión se han encontrado miofibroblastos.

Se ha relacionado la presencia de células derivadas de la médula ósea, hematopoyéticas y mesenquimales con la formación del estroma fibrovascular. Esto es apoyado por el aumento de linfocitos CD34⁺ en la sangre de los pacientes con pterigión⁷⁶. Las células epiteliales del margen del pterigión producen niveles elevados de MMPs y VEGF.

Las gelatinasas, que pertenecen a la familia de las MMPs, juegan un papel muy importante en la migración celular y en la angiogénesis. Estas enzimas son capaces de degradar todo tipo de matriz extracelular, pero también pueden procesar un cierto número de moléculas bioactivas solubles o asociadas a membrana. Se sabe que participan en la escisión de receptores de la superficie celular, en la liberación de ligandos proapoptóticos (como el ligando FAS) y en la activación o inactivación de quimioquinas y citoquinas. Las MMPs también juegan un papel importante en los comportamientos celulares tales como la proliferación celular, la migración (adherencia / dispersión), la diferenciación , la angiogénesis , la apoptosis y la defensa del huésped. Algunas MMPs, incluyendo MMP-1 (colagenasa intersticial), MMP-2 (gelatinasa A), MMP-3 (estromelisin 1), MMP-7 (matrilisina) y la MMP-9 (gelatinasa B), están aumentadas sobre todo en la parte anterior de la cabeza del pterigión⁹. También se expresan la MMP-8 (colagenasa de neutrófilos) y algunas MMPs unidas a membrana (MMP-14 y MMP-15). En cultivo de fibroblastos de pterigión, la adicción de mediadores inflamatorios produce un incremento en la expresión de MMP-1 y MMP-3⁹. La MMP-7 es capaz de desnaturalizar un amplio espectro de proteínas de matriz incluyendo fibronectina, vitronectina, elastina, colágeno IV y proteoglicanos. Esta proteinasa puede amplificar la respuesta inflamatoria a través de facilitar el proceso en la superficie celular implicando al TNF- α .

Además, la MMP-2 y la MMP-9 (gelatinasas) se han asociado con progresión del pterigión⁸⁰ lo que sugiere que las MMPs pueden ser un objetivo atractivo para el manejo de esta enfermedad.

Los incrementos de las diferentes MMPs en el pterigión son recogidas en la tabla 2.

MMP	1	2	3	7	8	9	14	15
CABEZA	↑	↑	↑	↑	★	↑	★	★
CUERPO/ COLA	↑	★	↑	★	↑	★	↑	↑

Tabla 2. En el encabezado (rosa) observamos las diferentes MMPs que se modifican en el pterigión. El pterigión está dividido en la tabla entre cabeza y cuello/cola. Las flechas gruesas hacia arriba significan que esas MMPs están incrementadas, las estrellas significan que las MMPs no experimentan variación. (tabla adaptada del artículo Solomon A, Li DQ, Lee SB, Tseng SC. Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase-type plasminogen activator in primary pterygium body fibroblasts by inflammatory cytokines. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41(8):2154-2163).

Las MMPs activadas son controladas por inhibidores endógenos como la α -2-macroglobulina y los TIMPs. La disregulación de las MMPs y la actividad de los TIMPs se han asociado al pterigión⁸.

Además de la rotura de la matriz extracelular, se han descrito alteraciones en la síntesis de otros componente de la matriz extracelular en el pterigión, incluyendo alteraciones en la tropoelastina, en los glicosaminoglicanos, en el ácido hialurónico y en la periostina⁵⁰. La alteración de los componentes de la matriz extracelular puede incrementar la biodisponibilidad de HBEGF y de las citoquinas, las cuales normalmente están unidas a la matriz extracelular y se liberan por la degradación de ésta.

La expresión de las MMPs juega un papel importante en la migración y crecimiento del pterigión, pero probablemente no sea un prerrequisito para su formación. Las variaciones de las MMPs pueden explicar las diferencias en el crecimiento del pterigión vistas en la clínica⁸.

3.1.3.8-Modificación del metabolismo del colesterol

Se ha demostrado asociación entre el desarrollo del pterigión y modificaciones en el metabolismo del colesterol. Se ha encontrado un aumento de los niveles de la enzima hidroximetilglutaril-coenzimaA-reductasa (HMG-CoA) y del receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL); se cree que esto es debido a la estimulación de la proliferación de los fibroblastos. Se ha demostrado que ciertos fármacos que alteran el metabolismo lipídico disminuyen la proliferación de fibroblastos en el pterigión. Esta asociación puede servir como terapia en el futuro para prevenir el desarrollo y crecimiento del pterigión ⁸¹.

3.1.3.9-Virus

Se sospecha que los virus promueven la proliferación tisular o inducen mutaciones en el DNA que estimulan la tumorigénesis.

Estudios antiguos encontraron una asociación significativa del pterigión con el virus papiloma virus (VPH); un estudio detectó el virus en el 100% de los casos y otro encontró una prevalencia del 28% ⁸². Otros estudios no corroboran estos hallazgos ^{82, 83}. Estas discrepancias entre los diferentes estudios pueden estar relacionadas por la variabilidad geográfica en la incidencia de la infección viral.

Se sabe que la oncoproteína viral HPV 16/18 E6 inactiva al p53 ⁸⁴, fomentando así la proliferación celular.

Sin embargo, la opinión actual es que la presencia de HPV no es absolutamente necesaria para el desarrollo del pterigión ya que los índices positivos de HPV fueron bajos o incluso indetectables en algunos estudios ^{82, 83}.

3.1.3.10-Factores hereditarios

Aunque la presencia de pterigión está fuertemente asociada con la exposición ambiental, los factores hereditarios también pueden jugar un papel en su desarrollo. Hay informes de familias o parientes cercanos de enfermos de pterigión que también tienen pterigión, y en estos casos, las lesiones oculares a menudo se presentan en una edad temprana. Se ha sugerido que la herencia de esta dolencia puede seguir un patrón autosómico dominante con penetrancia incompleta ⁸⁵.

También se ha observado que un defecto hereditario en la reparación del DNA puede ocasionar una alta incidencia de pterigión bilateral en pacientes con xeroderma pigmentosa.

La predisposición hereditaria es fundamental para el inicio y el mantenimiento de pterigión. El tamaño del pterigión puede ser determinado por factores hereditarios. La predisposición a la aparición de pterigión sigue un modelo poligénico de herencia multifactorial. Es posible que dos tipos de genes, uno para las proteínas Smad inhibitorias (smad 7) y otro para las proteínas Smurf inactivadas, predispongan la aparición del pterigión. Parece que los factores de crecimiento fibrogénicos son cruciales para el desarrollo de pterigión, y parece que la angiogénesis pterigión sigue proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágeno, y colagenolisis.

Sin embargo, los estudios actuales siguen siendo limitados y los datos deben ser interpretados con precaución ⁸⁵.

3.1.3.11-Modelo neurogénico

Las teorías anteriores no explican algunos aspectos del pterigión como su patrón de crecimiento centrípeto que da lugar a su característica forma de ala. Para solucionar este problema se ha propuesto un modelo neurogénico, en el que los nervios corneales pueden influir en la migración centrípeta de las células del epitelio corneal y el pterigión ⁸⁶.

El limbo es el punto focal de la exposición crónica a la radiación UV-B, en donde el epitelio limbar, las células del estroma, los vasos sanguíneos y los nervios del plexo perilímbico ⁸⁷ sufren el daño producido por la luz UV-B. Mientras que la mayoría de los estudios se han centrado en el daño producido por la radiación UV-B en el epitelio y en las células del estroma, la respuesta neuronal a las lesiones por radiación UV-B también puede jugar un papel importante en el desarrollo del pterigión ya que la córnea normal tiene una alta inervación estructural. La exposición a la radiación UV puede provocar una liberación de neuropéptidos sensoriales, tales como la SP y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), que participan en la inflamación neurogénica a través de funciones como la vasodilatación y la quimiotaxis de células inmunes que inducen la producción de citoquinas en las células corneales amplificando la respuesta inflamatoria ⁸⁸.

La SP y el CGRP también pueden inducir la proliferación y la migración de las células epiteliales ⁸⁹ y de los fibroblastos, así como contribuir a la angiogénesis. En el pterigión, la SP y su receptor (NK1R) se expresan en células epiteliales y fibroblastos y se ha demostrado que pueden inducir la migración de los fibroblastos del pterigión, sugiriendo un papel profibroangiogénico ⁸⁰. Los datos anteriores junto con la distribución de los nervios de la córnea sugieren que la inervación corneal pueden jugar algún tipo de papel en el desarrollo del pterigión.

3.1.3.12-Predictores de recurrencia

El problema principal en el manejo quirúrgico del pterigión se encuentra en la tasa de recurrencia. Mientras algunos factores que contribuyen a la recidiva han sido identificados, el proceso general sigue siendo poco conocido. Hasta la fecha, los predictores de recurrencia o biomarcadores no están bien definidos en el pterigión. Muchas variables pueden contribuir a la recidiva de una lesión, algunas referidas al paciente (genética, la exposición ambiental, la naturaleza de la lesión) y otras al cirujano (métodos de tratamiento, experiencia clínica).

Tan y cols ¹⁰ demostraron que los pterigiones T3 o carnosos representan un factor de riesgo para la recurrencia en pacientes en los que se ha realizado una resección de esclera desnuda. Los factores raciales también pueden influir en las tasas de recurrencia. Un estudio ha observado mayor recurrencia en los hispanos que en los blancos ⁹⁰. En el pterigión recurrente se encontró tinción completa en el epitelio para p63 y p16, lo cual refleja un incremento en la proliferación de las células epiteliales ⁹¹. Los factores de crecimiento proangiogénicos, el VEGF y la SP están elevados en las lágrimas y en el plasma del pterigión recurrente ⁷⁷. Algunos estudios de amplificación genómica han identificado algunos marcadores que se asocian con el pterigión recurrente al compararlo con el pterigión primario. Estos marcadores incluyen la periostina, el TIMP-2, la L-3-fosfoserina fosfatasa homóloga, la sialoforina y quinasa relacionada con NIMA (NEK), que juegan un cierto papel en la adhesión y la motilidad celular ⁹².

3.1.4- Métodos actuales de tratamiento

Se han revisados diversos estudios con modificaciones en la técnica quirúrgica de resección con esclera desnuda y diversos métodos adyuvantes que incluyen el autoinjerto conjuntival o limbar, el injerto de membrana amniótica, el uso de MMC y de nuevas terapias como la ciclosporina A, los antiangiogénicos y los adhesivos tisulares. Se han revisado también los artículos que comparan los diferentes métodos entre sí, así como las asociaciones entre ellos.

3.1.4.1- Autoinjerto conjuntival o limbar comparado con la resección con esclera desnuda

Los datos de diversos estudios indican que el autoinjerto de conjuntiva o limbar reduce entre un 20 y un 50% la tasa de recurrencia del pterigión en comparación con la resección con esclera desnuda en el pterigión primario y en el recidivante ⁹³.

3.1.4.2-Mitomicina C intraoperatoria comparada con la resección con esclera desnuda

La MMC es un agente quimioterapéutico que tiene actividad antitumoral y antibiótica, deriva de la bacteria *Streptomyces caespitosus*.

La MMC es un antibiótico antitumoral que actúa como un agente alquilante del DNA. Esto resulta en el desapareamiento de las bases y la rotura de la cadena del DNA y las uniones cruzadas de cadenas complementarias en la síntesis del DNA. La RNA polimerasa dependiente del DNA también es inhibida, disminuyendo la transcripción. Este agente puede llevar a mutaciones en el DNA.

Se administra por vía intravenosa para tratar varios tipos de cáncer, tales como el carcinoma esofágico, el cáncer anal y el cáncer de mama. También es utilizado para instilaciones del cáncer de vejiga. En oftalmología se utiliza de forma tópica en la cirugía del glaucoma y del pterigión.

La MMC provoca toxicidad diferida de la médula. Su uso prolongado puede inducir daño permanente en la médula ósea. Puede provocar fibrosis pulmonar y fallo renal.

Varios estudios (cinco de ellos aleatorizados) compararon el uso de la MMC intraoperatoria con la resección con esclera desnuda, indicando que la MMC intraoperatoria reduce la tasa de recurrencia del pterigión primario⁹³. La concentración más común utilizada de MMC fue del 0,02% (0,2 mg / ml), y la duración común de tratamiento fue de 3 minutos. Se necesitan más estudios para determinar la concentración óptima y el tiempo de exposición, y si la MMC debe aplicarse en la esclera desnuda, membrana de Tenon, o en la parte inferior de la conjuntiva.

La recurrencia es menor con el tratamiento con MMC intraoperatoria entre un 20 y un 30%.

3.1.4.3- Mitomicina C postoperatoria comparada con la resección con esclera desnuda

Tres estudios⁹³ compararon la tasa de recurrencia con la utilización de MMC postoperatoria tópica con la resección con esclera desnuda.

En los tres estudios los datos indican que el uso de MMC postoperatoria reduce entre un 40 y un 60% la recurrencia del pterigión en comparación con la resección con esclera desnuda.

3.1.4.4- Mitomicina C intraoperatoria comparada con mitomicina C postoperatoria

Seis ensayos clínicos controlados y aleatorizados⁹³ compararon la tasa de recurrencia usando varios protocolos que incorporan MMC intraoperatoria o MMC postoperatoria en diferentes pautas.

Los estudios de pterigión primario o combinados con pterigión recurrente no encontraron diferencias significativas al comparar el uso de MMC intraoperatoria o postoperatoria.

3.1.4.5- Mitomicina C comparada con el autoinjerto de conjuntiva o limbar

Seis de los ocho ensayos aleatorizados ⁹³ sobre el pterigión primario que comparan el uso de MMC postoperatoria (al 0,02% dos veces al día durante 5 días) o de MMC intraoperatoria (al 0,02% durante 2,5 minutos, al 0,04% durante 3 minutos, al 0,02% durante 2 minutos o al 0,02% durante 3 minutos) con el autoinjerto de conjuntiva o autoinjerto limbar no encontraron diferencias significativas en la tasa de recurrencia.

No existen datos que sugieran que la MMC intra o postoperatoria sea más eficaz cuando se combina con autoinjerto conjuntival o limbar. Una limitación potencial en los resultados de estos análisis comparativos son los diferentes métodos utilizados durante la aplicación de la MMC intraoperatoria (MMC en papel de filtro o esponja aplicada a la esclera desnuda o en la tenon).

3.1.4.6- Membrana amniótica comparada con autoinjerto de conjuntiva o limbar

Algunos estudios han demostrado una tasa de recurrencia del pterigión inferior entre en el grupo de autoinjerto conjuntival o limbar, lo que sugiere que el autoinjerto de conjuntiva o de limbo es más eficaz que el injerto de membrana amniótica ⁹⁴.

3.1.4.7- Otras combinaciones de adyuvantes para el pterigión

La ciclosporina es una sustancia derivada de un hongo (*Tolypocladium inflatum*). La ciclosporina es un fármaco inmunosupresor, con una acción relativamente específica sobre el sistema inmune, sin efectos tóxicos sobre las propias células en las que actúa.

Los efectos inmunosupresores de la ciclosporina se deben a su capacidad de interferir el normal funcionamiento de determinadas células que intervienen en la respuesta inmune, sobre todo en los linfocitos T. En condiciones normales estas células producen citoquinas, que están implicadas en la defensa del organismo contra agentes extraños, como microorganismos que causan infecciones u órganos trasplantados. En determinadas circunstancias, la producción de estas citoquinas aumenta y esto puede favorecer el

desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas. En estas enfermedades, el tratamiento con ciclosporina puede ser útil, ya que la mayoría de sus efectos sobre la respuesta inmunitaria son debidos a la inactivación de linfocitos T.

Estas células inmunes menos reactivas tendrán una menor capacidad para reaccionar contra el injerto o, en el caso de las enfermedades inflamatorias, producirán menos sustancias que faciliten la inflamación.

A pesar de que su principal indicación es el trasplante de órganos sólidos, también se utiliza para el tratamiento de determinadas enfermedades reumáticas, como por ejemplo la artritis reumatoide, la artritis psoriásica o el lupus eritematoso sistémico.

Dos estudios analizaron la tasa de recurrencia tras la administración tópica de ciclosporina A. Los dos estudios demostraron una tasa de recurrencia del pterigión inferior en el grupo tratado con ciclosporina A ^{95,96}.

El bevacizumab ha demostrado su eficacia en el tratamiento de algunas enfermedades neoplásicas como el cáncer de colon, cáncer de mama, el cáncer de pulmón no microcítico y el carcinoma de células renales.

El bevacizumab y el ranibizumab son antiangiogénicos usados actualmente en patologías oculares como la DMAE y la retinopatía diabética. Actualmente se han utilizado en la cirugía del pterigión.

Recientemente se han realizado nueve estudios con bevacizumab y dos tras realizar una resección con esclera desnuda y administración intraoperatoria de bevacizumab subconjuntival a dosis de 1,25 mg/0.1 ml, sin observarse una disminución significativa en la tasa de recurrencia ⁹³.

Los adhesivos biológicos son una nueva terapia que ha revolucionado la cirugía del pterigión y otras cirugías del polo anterior al disminuir de forma clara el tiempo de intervención quirúrgica en el caso de autoinjertos conjuntivales o limbares, así como el trasplante de membrana amniótica.

El adhesivo de fibrina es una herramienta segura y eficaz en la cirugía del pterigión con autoinjerto conjuntival o limbar y en el trasplante de membrana amniótica. La ventaja más importante del adhesivo de fibrina es el menor tiempo de cirugía postoperatoria

mejorando el confort del paciente. Aunque la tasa de recurrencia es menor con el adhesivo de fibrina que con la sutura se precisa un seguimiento a más largo plazo.

Son necesarios otros ensayos controlados y aleatorizados en cirugía de pterigión para evaluar la relativa seguridad y eficacia del autoinjerto conjuntival o limbar, los diversos tiempos de exposición y las técnicas asociadas con el uso de MMC, los nuevos adyuvantes tales como la membrana amniótica, los tratamientos antiinflamatorios, los antiangiogénicos, los adhesivos y las combinaciones de estos adyuvantes^{97,98}. El uso de una escala uniforme, como la clasificación del pterigión propuesta por Tan y colaboradores¹⁰ ayuda en la evaluación de estas opciones en la cirugía del pterigión.

Parece que un método satisfactorio de intervención del pterigión sería aquel en el que las complicaciones fueran mínimas y el índice de recurrencias fuera bajo, menor del 5%. El seguimiento de al menos un año sería necesario para identificar al menos el 95% de las recurrencias. Son necesarios más estudios controlados para valorar los diferentes métodos de intervención en el pterigión, tanto para el seguimiento a largo plazo como para observar sus complicaciones.

3.2- DOXICICLINA

Aparte de las propiedades antimicrobianas, las tetraciclinas tienen otras muchas características, incluyendo su capacidad para inhibir la actividad de los miembros de la familia de las MMPs.

Se han desarrollado numerosos compuestos sintéticos con potente actividad inhibidora de las MMPs y se han realizado numerosos ensayos clínicos. Sin embargo, debido a la falta de eficacia y los efectos secundarios musculoesqueléticos, ninguno ensayo clínico ha progresado a la fase III. Actualmente, sólo disponemos clínicamente de un inhibidor de MMPs, la doxiciclina.

Tras el experimento realizado por Golub y cols⁹⁹ en mujeres postmenopáusicas, en el que la doxiciclina oral a dosis subterapéuticas redujo la severidad de la inflamación gingival a través de la inhibición de la actividad de la colagenasa y la reducción de los niveles proteicos, especialmente de la MMP-8; las tetraciclinas han sido cada vez más estudiadas por esta capacidad.

El mecanismo por el que las tetraciclinas inhiben las MMPs no ha sido completamente dilucidado. Se cree que ejercen sus efectos por la inhibición directa de las MMPs y por inhibición de su expresión.

En cardiología, las MMPs, además de su papel en la mediación de la cicatrización postinfarto y la remodelación, pueden contribuir realmente a la muerte del miocito y disfunción producida por la isquemia-reperusión.

El tratamiento con doxiciclina mejoró significativamente la función cardiaca y la hipertrofia cardiaca en un estudio reciente. La observación histológica reveló que la doxiciclina redujo significativamente la expresión de colágeno en el corazón. Este estudio reveló que el tratamiento con doxiciclina podría promover la autofagia, reducir la expresión de colágeno y del péptido natriurético atrial en los corazones post-infarto, e inhibir MMP-2 y MMP-9. La doxiciclina podría actuar como terapia en la disfunción cardiaca⁴.

Otra propiedad característica de las tetraciclinas es su capacidad para eliminar las ROS. El exceso de ROS se produce bajo muchas condiciones patológicas, incluyendo lesión de miocardio después de la isquemia-reperusión y los procesos inflamatorios, y puede conducir a la destrucción oxidativa o la disfunción de muchos constituyentes ce-

lulares. Tanto la doxiciclina como la minociclina y la tetraciclina tienen un anillo múltiple fenol similar a la vitamina E. El anillo de fenol es clave para las capacidades de bloqueo de las ROS que tienen estos compuestos. La reacción del anillo de fenol con un radical libre genera un radical fenólico que se vuelve relativamente estable. Aunque sabemos que la doxiciclina es un eliminador eficaz de las ROS, en un estudio reciente no encontramos una relación directa entre la eliminación de las ROS y la inhibición de las MMPs ¹⁰⁰.

Un acontecimiento clave en la ejecución de la cascada de la apoptosis es la activación de las caspasas, una familia de proteasas de cisteína. Las caspasas pueden ser activadas por vía extrínseca (mediada por receptor) o intrínseca (mitocondrial). En la vía extrínseca ¹⁰¹ las proteínas inductoras de apoptosis tales como el TNF- α se unen a los receptores de la superficie celular del ligando Fas y, a través de cascadas de transducción de señales, conducen a la activación de una caspasa iniciadora, la caspasa 8. La caspasa 8 a su vez activa otras caspasas por debajo de la cascada, como la caspasa 3.

En la vía intrínseca ¹⁰² una variedad de estímulos de estrés extra e intracelulares convergen en las mitocondrias para desestabilizar y provocar la liberación de factores proapoptóticos en el citosol. Un factor mediador clave de desestabilización mitocondrial es la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP), un poro grande de alta conductancia que abarca tanto la membrana mitocondrial interna como la externa. Una vez que el MPTP se abre, hay una afluencia de agua, lo que conduce a un hinchamiento de la matriz mitocondrial y a la rotura de la membrana mitocondrial externa. El citocromo c y otras proteínas proapoptóticas, tales como Smac / DIABLO y el factor inductor de apoptosis (AIF) se liberan desde el espacio intermembrana en el citosol. El citocromo c se une a la proteína adaptadora citosólica Apaf-1, que permite el reclutamiento y la activación de una caspasa iniciadora, caspasa 9, que a continuación, activa las caspasas inferiores de la cascada. El Smac / DIABLO se une e inhibe a las proteínas inhibidoras de las caspasas. El AIF se transloca al núcleo e induce la condensación de la cromatina y fragmentación del DNA de una manera independiente de caspasas ¹⁰³. La vía de la apoptosis mitocondrial también está parcialmente regulada por la familia de proteínas Bcl-2 ¹⁰⁴. Los miembros de la familia Bcl-2 pueden ser proapoptóticos (BAX, Bid Bad) o antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL).

Hay evidencias que sugieren que las tetraciclinas poseen propiedades antiapoptóticas. La minociclina se evaluó en modelos de lesión neuronal y demostró proteger con-

tra la enfermedad de Huntington, lesión traumática del cerebro y la enfermedad de Parkinson³. En cada uno de estos casos, la neuroprotección por minociclina se asoció con una reducción en la expresión de la caspasa 1 y / o de la caspasa 3, lo que sugiere protección de la minociclina mediante la inhibición de la expresión de los factores clave en la cascada apoptótica. Además de la inhibición en la expresión de las caspasas, la minociclina también inhibe la actividad de las caspasas mediante el bloqueo de su activación. Festoff y cols² demostraron que la minociclina inhibe la liberación de citocromo c y la activación de la caspasa 3 en ratones con esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Huntington. En otro estudio, el mismo grupo mostró que la minociclina inhibía la liberación de citocromo c, Smac / DIABLO, y el AIF tanto en un modelo de cultivo como en un modelo in vivo de ratón con la enfermedad de Huntington, indicando que la minociclina inhibe tanto las vías dependientes de caspasas (citocromo c y Smac / DIABLO) como las vías independientes. La minociclina también protege los cultivos de células epiteliales renales de la lesión de isquemia-reperfusión e inhibe la liberación mitocondrial de citocromo c¹⁰⁵. Tomados en conjunto, estos estudios demuestran que la minociclina, y posiblemente también la doxiciclina¹⁰⁶, poseen propiedades antiapoptóticas, efectos mediados por la inhibición de la expresión de caspasa y por la estabilización mitocondrial.

Estos compuestos que pueden actuar como eliminadores antiproteolíticos y de las ROS es probable que ejerzan acciones antiinflamatorias. Es bien conocido en el campo de la dermatología que la rosácea es una enfermedad de naturaleza inflamatoria^{5,6}. La doxiciclina se utiliza con éxito en el tratamiento de enfermedades de la piel tales como el acné y la rosácea. En las biopsias de lesiones inflamatorias de los pacientes con acné, están elevadas las citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF- α , la IL-8 y la IL-1 β . Estas citoquinas son inductoras de las MMPs y de su actividad. Las ROS y el NO también juegan cierto papel en la fisiopatología de la rosácea⁶. El NO provoca aumentos en la permeabilidad de los vasos y edema, y puede apoyar el desarrollo de eritema que se produce con la rosácea.

3.3- DOXICICLINA Y PTERIGIÓN

Cox y cols ⁷ determinaron in vivo el efecto de la doxíciclina sobre la angiogénesis mediante el uso de tres modelos animales: un modelo murino de CNV, un modelo de DIVAA y otro modelo murino de pterigión.

En primer lugar, demostraron que la doxíciclina inhibe la migración de las células endoteliales, y por ello la eficacia de este fármaco fue probada en un ensayo de neovascularización coroidea. La CNV se indujo experimentalmente en ratones. Se administró a estos animales agua con doxíciclina 4 horas antes, y a continuación, se dañaron las membranas de Bruch con láser para inducir la CNV. Los animales recibieron agua sola o conteniendo doxíciclina durante siete días y se determinaron los volúmenes de las lesiones, observándose una disminución importante (50-60%) en el volumen de la lesión coroidea en ratones que recibieron doxíciclina.

En el ensayo de DIVAA se implantaron tubos de silicona con Matrigel conteniendo tampón fosfato salino (PBS), 7 nM de β FGF o 10.000 células epiteliales de pterigión humanos bajo la piel de ratones desnudos. Después de 11 días, se inyectó en la vena de la cola isotiocianato de fluoresceína-dextrano (FITC-d) y diez minutos más tarde se sacrificaron y se cuantificó el grado de la neovascularización midiendo la fluorescencia de los tubos, demostrando que las células epiteliales del pterigión humano eran altamente angiogénicas en comparación con Matrigel solo o Matrigel con β FGF, indicando así que las células epiteliales de pterigión inducen neovascularización.

En un experimento posterior, se añadió doxíciclina al agua después de implantar tubos de silicona con 10.000 células epiteliales de pterigión humano en los ratones. La doxíciclina a dosis de 30 mg / kg / día en el agua redujo la neovascularización en un 30% en comparación con agua sola o doxíciclina a 5 mg / kg / día. Este resultado demuestra la capacidad de la doxíciclina para inhibir la angiogénesis cuando se proporciona por vía oral.

Hasta ese estudio no se había generado un modelo animal de pterigión. Estos mismos autores mezclaron 10.000 células epiteliales de pterigión humano con 5 microlitros de Matrigel y se inyectó bajo el espacio subconjuntival nasal paralimbar en ratones atímicos. A los 6 días, de los 26 ojos inyectados, 18 ojos (aproximadamente 70%) tenían

lesiones notables. No hubo otros cambios observados en el ojo o en el fenotipo general del animal. Algunas de las lesiones tenían afectación de vasos sanguíneos visibles y los ratones a los que se les inyectó solo Matrigel no mostraron lesiones visibles.

Para comprobar si la doxiciclina era capaz de revertir estas lesiones en un modelo in vivo, se trató a la mitad de los ratones con doxiciclina mientras los otros recibían agua sola. A los 9 días de tratamiento se observó una regresión total de las lesiones oculares (Fig.1).

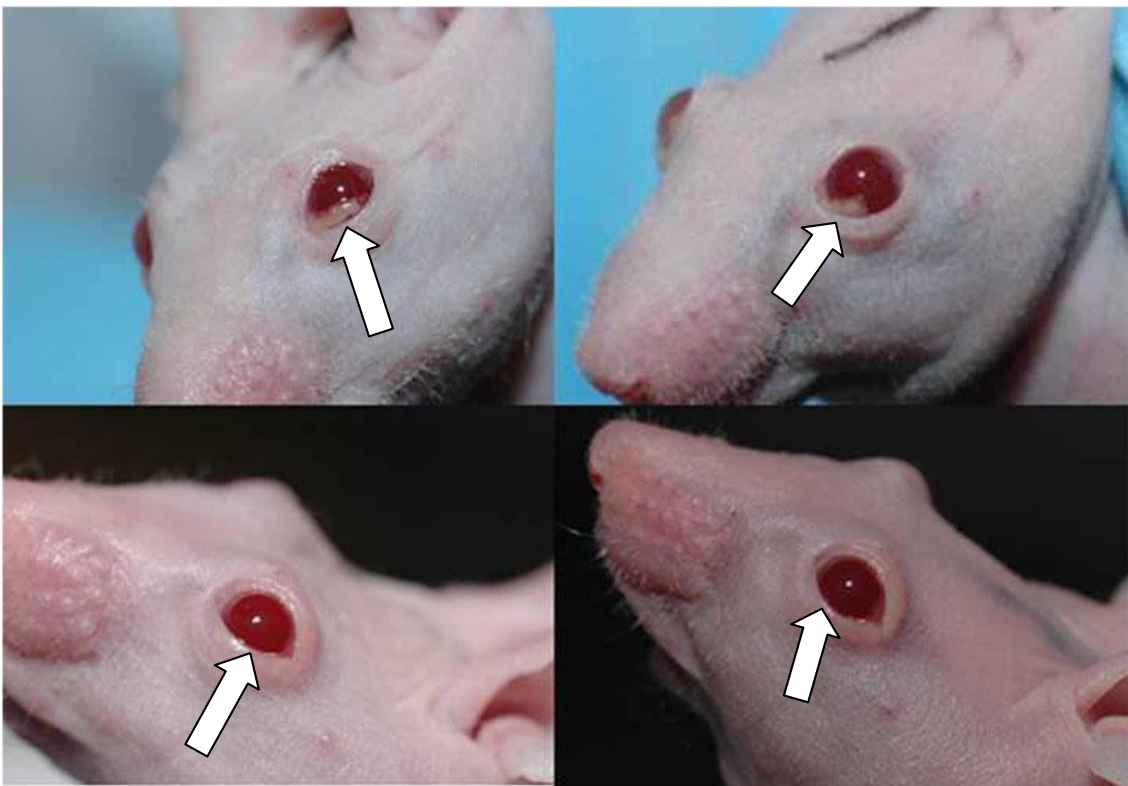


Fig.1. En esta figura se aprecia como la doxiciclina causó la regresión de las lesiones de las células epiteliales del pterigión en un modelo de ratón desnudo. Las flechas de las fotos superiores muestran a los ratones 6 días después de la inyección de células de pterigión; se administró dosis de 50 mg / kg / día de doxiciclina junto con agua. Las flechas de las fotos inferiores muestran a los ratones 15 días después de la inyección de células de pterigión y de recibir doxiciclina durante 9 días. Los ratones que sólo recibieron agua no mostraron regresión de las lesiones. Reproducido con la autorización del editor : Cox CA, Amaral J, Salloum R et al. Doxycycline's effect on ocular angiogenesis: an in vivo analysis. *Ophthalmology* 2010;117(9):1782-1791.

La doxíciclina inhibió significativamente la angiogénesis en los tres modelos murinos. El efecto más claro se encontró en el modelo de CNV seguido por el DIVAA. El modelo de pterigión también mostró regresión histológica. Esto sugería que la doxíciclina podía tener éxito como tratamiento adyuvante en la neovascularización coroidea y en el pterigión humano; en esta suposición se ha basado nuestro ensayo clínico.

La doxíciclina es segura, barata y fácil de obtener. Podría ser útil como terapia en el pterigión primario o como terapia coadyuvante para prevenir las recurrencias después de las cirugías.

Otro estudio con modelo corneal murino sobre la inhibición de la angiogénesis comparó doxíciclina oral con dexametasona tópica y oral. Mostró un 37,4% de reducción en la neovascularización después de tratamiento con doxíciclina durante 14 días, mientras que la reducción fue del 70,7% y del 67,4% usando dexametasona tópica y oral, respectivamente ¹⁰⁷. Esto muestra nuevamente que los esteroides son buenos agentes antiangiogénicos, pero sus potenciales complicaciones y sus efectos secundarios pueden ser prohibitivos. Los escasos efectos colaterales de la doxíciclina la hacen una buena candidata para el tratamiento del pterigión.

La doxíciclina ha demostrado que posee propiedades antiinflamatorias y reduce significativamente los niveles de TNF- α , IL-10 e interferón- γ en un modelo murino in vivo ¹⁰⁸.

Las células epiteliales del pterigión más externas producen niveles elevados de MMPs y de VEGF ⁸. En los experimentos del DIVAA se muestra cómo las células epiteliales del pterigión tienen capacidad para inducir neovascularización y que la doxíciclina es un inhibidor efectivo de este proceso.

La capacidad de secretar gelatinasas por parte de las células epiteliales del pterigión fue valorada en cultivo celular durante 24 horas en un medio libre de suero. Estas proteinasas fueron inhibidas de forma dependiente de la dosis por la doxíciclina ⁷.

La doxíciclina es el único inhibidor de las MMPs que está ampliamente disponible clínicamente. El uso de doxíciclina en la neovascularización ocular puede servir como terapia coadyuvante de otros tratamientos antiangiogénicos, aunque no se han realizado ensayos clínicos humanos prospectivos. La doxíciclina podría reducir la recidiva del pterigión, especialmente en los pacientes que viven cerca del ecuador y tiene una alta exposición a la radiación UV-B. El coste bajo y la seguridad que proporciona, así como

la capacidad de la doxiciclina para reducir la neovascularización y el crecimiento fibrovascular, sugirieron que la doxiciclina podía ser un candidato prometedor para ensayos clínicos en humano ⁷.

4- PACIENTES Y MÉTODOS

4.1- PACIENTES Y MÉTODO DEL ENSAYO CLÍNICO

4.1.1- Cuestiones éticas

Todos los procedimientos fueron aprobados por la junta de revisión local (Comité Ético de Investigación Clínica de La Rioja, CEICLAR) y la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios). Por otra parte, el ensayo se registró en la base de datos de ensayos clínicos de la Comunidad Europea con el número de código EudraCT 2008-007178-39. El ensayo clínico no se registró en el “Clinical-Trials.gov” por no ser requerido de manera obligatoria en Europa ni para la publicación de los resultados en esa fecha.

A todos los pacientes se les entregó una hoja de información detallando los pormenores del estudio y el consentimiento informado (ANEXO IV).

El consentimiento informado para la manipulación de sangre o muestras biológicas para estudios genéticos se entregó a la vez que la hoja de información (ANEXO IV), no precisando tener bancos de tejidos por haberse recogido las muestras con anterioridad al real decreto 1716/2011.

4.1.2- Pacientes del ensayo clínico

Se trata de un estudio unicéntrico fase II, randomizado y doble ciego. Se administra doxiciclina 100 mg vía oral cada 12 horas o placebo, durante 30 días. Se realizan fotos del pterigión, antes de comenzar el tratamiento, al mes, a los seis meses y al año de haber comenzado el tratamiento. En todas ellas se calcula el área del pterigión y se intenta valorar la disminución o no del área en las sucesivas fotografías.

Noventa y ocho pacientes que cumplían los criterios de inclusión firmaron los documentos de consentimiento informado y fueron incluidos en el ensayo. Cada paciente debía completar 4 visitas al consultorio del oftalmólogo.

Se incluyeron pacientes con pterigión sin tratamiento primario con al menos uno de los siguientes síntomas: 1) astigmatismo sin otra causa, 2) sensación de cuerpo extraño, y / o 3) compromiso de la córnea que amenaza el eje visual. Además, los pacientes debían tener al menos 18 años de edad.

Se excluyeron a las mujeres embarazadas o lactantes, mujeres en edad fértil que no siguen un plan de anticoncepción, alérgicos a doxiciclina, condiciones en que la doxiciclina está contraindicada, tales como lupus eritematoso o miastenia gravis, el tratamiento con drogas incompatibles con el tratamiento con doxiciclina y los pacientes que por sus características impedían el debido seguimiento.

El número de pacientes necesarios para cada rama del estudio se estimó asumiendo una reducción media del 5% del pterigión en el grupo placebo versus una reducción media del 15% en grupo tratado con doxiciclina con una desviación estándar máxima del 15%. Usando el test t Student para dos muestras independientes, con significación alfa del 5% bilateral y una potencia del 90%, eran necesarios 49 pacientes en cada rama para detectar diferencias significativas entre los dos grupos de un 10% en la reducción de la superficie del pterigión.

4.1.3- Diseño del ensayo clínico

La doxiciclina se presentó como Vibracina © 100 mg (Invicta Farma, Madrid, España). Las cápsulas se extrajeron y reenvasaron por la farmacia del hospital en contenedores marrones de vidrio conteniendo 60 cápsulas por recipiente. El placebo fue preparado por la farmacia del hospital usando cápsulas vacías de vibracina ©, que fueron proporcionadas por Invicta Farma. Estas cápsulas se llenaron con una solución de lactosa, se desecaron, se cerraron y se envasaron en botes de vidrio marrón (60 cápsulas / frasco). A cada recipiente de doxiciclina o placebo se le asignó un código generado de forma aleatoria, lo que garantizaba un enmascaramiento doble ciego del ensayo. Se eligió la dosis de 200 mg/día basándonos en el estudio de Smith y cols ¹⁰⁹ donde se describe esta dosis como la más eficaz en la reducción de la actividad de las MMPs en pacientes.

En la primera visita, se diagnosticó el pterigión y se recogieron todos los datos en la hoja de recogida de datos de cada paciente (ANEXO V). Si el paciente cumplía los cri-

terios de inclusión y no cumplía ninguno de los criterios de exclusión aplicados, se incluía en el ensayo. Después de firmar los formularios de consentimiento informado, se asignó un código a cada paciente durante la duración del ensayo. Para estimar el tamaño de la lesión, se midió el diámetro de la córnea con un compás y se calculó la superficie corneal con la fórmula del círculo ($A=\pi r^2$), a continuación se tomó una fotografía del ojo afectado (o ambos en el caso de pterigión bilateral) con el retinógrafo Zeiss 450 FF IR (Carl Zeiss, Meditec AG, Berlín, Alemania). El tamaño de la lesión que invadía la córnea se calculó con el paquete de software que incluye la cámara (Visupac™, Carl Zeiss). Los pterigionos fueron clasificados morfológicamente en este estudio como T1, T2 o T3, según el sistema de clasificación de Tan¹⁰. Haciendo uso de su código, al paciente se le entregó un recipiente con cápsulas de la farmacia del hospital y la información de contacto pertinente en el caso de que ocurrieran eventos adversos. A los pacientes se les pidió que tomaran dos cápsulas al día, una por la mañana y otra por la tarde, durante 30 días consecutivos.

La segunda visita fue programada 31 días después de la primera, coincidiendo con el fin del tratamiento. En este momento, se realizaba una segunda fotografía del ojo afectado y una evaluación general. Posteriormente, se realizaba resección quirúrgica del pterigión cuando este procedimiento era indicado clínicamente y el paciente estaba de acuerdo. En estos casos, el procedimiento consistió en una resección simple, seguida de trasplante autólogo de conjuntiva y la aplicación de un pegamento biológico de fibrina (Tissucol®, Baxter, Valencia, España).

Las visitas tercera y cuarta se produjeron a los 6 y 12 meses de iniciar tratamiento.

Entre octubre de 2009 y mayo de 2010, un total de 98 pacientes con diagnóstico de pterigión primario se sometieron a aleatorización (49 en cada grupo) en el Hospital San Pedro (Logroño, España).

Catorce pacientes del grupo placebo y veintiún pacientes del grupo tratado con doxiciclina no acudieron a la visita del mes. Por otra parte, un paciente del grupo placebo y cinco pacientes del grupo tratado con doxiciclina abandonaron el tratamiento por efectos adversos. De esta forma, en el análisis por protocolo, los datos estaban disponibles para treinta y cuatro pacientes en el grupo placebo y veintitrés en el grupo tratado con doxiciclina (Fig 2). Las características demográficas y clínicas basales fueron similares entre los dos grupos (tabla 3)

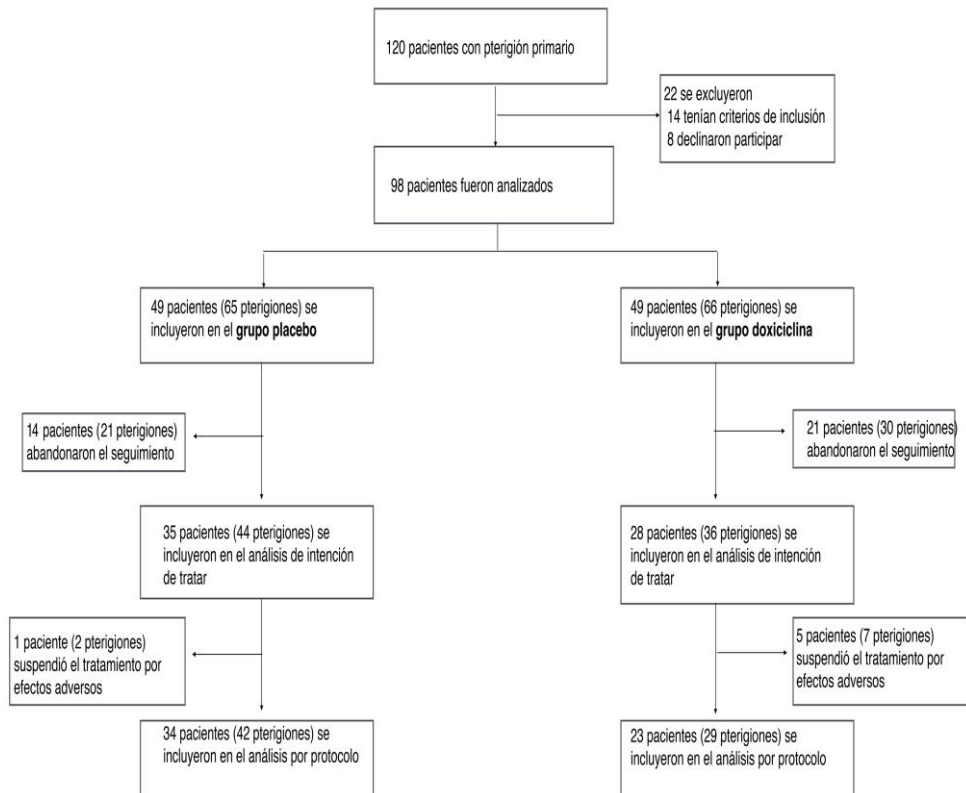


Fig.2. Diagrama de flujo. De los 120 pacientes con pterigiones primarios iniciales, se excluyeron 22, 14 no reunieron los criterios de inclusión y 8 declinaron participar. Las principales razones para no cumplir con los criterios de inclusión fueron el embarazo (8) y estar en tratamiento con medicamentos incompatibles doxiciclina (6). De los 98 pacientes que iniciaron el estudio, 49 se asignaron al grupo de placebo y 49 al grupo tratado con doxiciclina. En el grupo placebo 14 pacientes (21 pterigiones) se perdieron en el seguimiento y 21 pacientes (30 pterigiones) se perdieron en el grupo tratado con doxiciclina. Muchos pacientes se perdieron durante el seguimiento, probablemente debido a la gran cantidad de inmigrantes, una población muy móvil, que fueron incluidos en el ensayo. 35 pacientes (44 pterigiones) se incluyeron en el análisis por intención de tratar en el grupo placebo y 28 pacientes (36 pterigiones) en el grupo tratado con doxiciclina. Seis pacientes tuvieron que suspender el tratamiento debido a efectos adversos leves entre ambos grupos. Finalmente, 34 pacientes (42 pterigiones) en el grupo placebo y 23 pacientes (29 pterigiones) en el grupo tratado con doxiciclina se incluyeron en el análisis por protocolo al mes. Varios de los pacientes tenían más de un pterigión, por lo que se incluye el número total de pterigiones. Figura adaptada de: Rúa O, Larráyoz IM, Barajas MT, Velilla S, Martínez A (2012) Oral Doxycycline Reduces Pterygium Lesions; Results from a Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Trial. PLoS ONE 7(12): e52696. doi: 10.1371/journal.pone.0052696

	Placebo (n=49)	doxiciclina (n=49)	Estadística	<i>p</i>
Sexo (hombre/mujer)	28/21	27/22	χ^2	1,00
Raza o grupo étnico (caucásicos/hispanos/otros)	19/24/6	19/25/5	χ^2	0,95
Edad (años)	51,29+/-1,98 [29-80]	49,71+/-2,14	<i>t</i>	0,59
Tamaño inicial del pterigión (mm ²)	4,65+/-0,39 [1,07-14,48]	5,25+/-0,48 [0,71-17,49]	<i>t</i>	0,34
Morfología del pterigión ⁸ (T1/T2/T3)	(9/21/19)	(6/22/21)	χ^2	0,65

Tabla 3. En esta tabla aparecen las características basales demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el ensayo. Se dividen en dos grupos (placebo y tratados con doxiciclina) con 49 pacientes en cada uno de ellos. El sexo predominante en ambos es el masculino con proporción similar. En ambos predomina los hispanos en proporción también similar. La edad de ambos grupos ronda los 50 años. El tamaño inicial medio es algo mayor en los tratados con doxiciclina (5.25 mm²) frente al grupo placebo (4.65 mm²). En cuanto a la morfología del pterigión predomina en ambos grupos el T2 (intermedio) seguido del T3 (carnoso) y en menor número el T1 (atrófico). Tabla adaptada de: Rúa O, Larráyoiz IM, Barajas MT, Velilla S, Martínez A (2012) Oral Doxycycline Reduces Pterygium Lesions; Results from a Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Trial. PLoS ONE 7(12): e52696. doi: 10.1371/journal.pone.0052696

4.2- MATERIAL Y MÉTODO DEL ESTUDIO MOLECULAR MEDIANTE SECUENCIACIÓN

Para el estudio se extrajeron quirúrgicamente los pterigiones de 10 pacientes y se inició el cultivo primario. Las células en pasajes 3-5 se pusieron en contacto con 0 (control), 50, 200 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de doxiciclina durante 24 horas, después su mRNA se purificó, se realizó transcripción inversa y secuenciación, según los protocolos de secuenciación masiva de Illumina. Los datos adquiridos fueron sometidos a normalización por cuantiles y analizados utilizando el software GENEMANIA (plug-in de Cytoscape) para conocer las vías involucradas. Se utilizó la tasa de descubrimientos falsos (FDR) para identificar aquellos genes cuya expresión se había modificado de una forma dependiente de la dosis después de la exposición a doxiciclina.

4.2.1- Pacientes y Cultivo Primario

Los pterigiones extirpados fueron trasladados al laboratorio para ser cultivados como se describió previamente. Los pterigiones se cortaron en trozos pequeños y se cultivaron durante 3 días en medio DMEM/F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 200 mM de L-glutamina, DMSO 0,5% y 1% de penicilina / estreptomycin / anfotericina (todos los reactivos de cultivo son de Invitrogen, Carlsbad, CA). Una vez que las células habían migrado de los explantes y se habían unido a la superficie de la placa, los fragmentos de explantes fueron retirados y se cambió a medio de queratinocitos, con suero fetal bovino al 5% y 1% de penicilina / estreptomycin / anfotericina. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se pasaron a placas frescas con 0,25% de tripsina. El medio se renovaba cada 2-3 días y fue reemplazado por medio fresco 24 horas antes de añadir el antibiótico. Las células de cada paciente fueron sometidas a cuatro tratamientos: 0 (control), 50, 200 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de doxiciclina (Vibravenosa, Pfizer, Madrid, España) durante 24 horas.

4.2.2- Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Antes del tratamiento con doxiciclina, algunas células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio durante la noche, se fijaron con 10% de formol tamponado durante 10 minutos, se permeabilizaron con 0,1% triton X-100 en PBS durante 10 minutos, y se expusieron a una mezcla de tres anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C. Estos anticuerpos primarios incluyen: ratón anti-vimentina (1:40, Sigma, Madrid, España), conejo anti-citoqueratina 4 (1:100, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y cabra anti-CD31 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Después de varios lavados, se añadió la segunda capa durante 2 horas a temperatura ambiente. Esta segunda capa incluía anticuerpos conjugados: Alexa 633 burro anti-cabra, Alexa 546 burro anti-conejo y Alexa 488 burro anti-ratón (1:200, Invitrogen). Después de otra serie de lavados, los cubreobjetos fueron montados con medio de montaje que contiene DAPI (Invitrogen). Como controles positivos, se procesaron en paralelo algunas secciones de parafina de útero y apéndice humano. Para visualizar los cortes se utilizó un microscopio confocal (Leica TCS SP5, Leica, Badalona, España).

4.2.3- Extracción del RNA

El RNA total fue aislado a partir de cultivos de células de pterigión con TRIzol (Invitrogen), se purificó mediante el kitRNeasy Mini(Qiagen, Valencia, CA) y se trató con DNasa I (Qiagen),siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

4.2.4- Preparación del cDNA y Ultrasecuenciación

En primer lugar, se evaluó la integridad y calidad del RNA total con el sistema de electroforesis automatizada de Experion (BioRad, Hercules, CA). Entonces, el mRNA se aisló a partir de 1µg de RNA total usando perlas magnéticas recubiertas de oligo d-T. Este mRNA se fragmentó en trozos de aproximadamente 200 pb usando cationes diva-

lentes a temperatura elevada. Los fragmentos escindidos de RNA se transcribieron utilizando la transcriptasa inversa y cebadores aleatorios. A continuación, la segunda cadena se sintetizó utilizando la DNA polimerasa I y RNasa H. Estos fragmentos de cDNA de doble cadena fueron finalmente reparados por la DNA polimerasa T4, y fosforilados por polinucleótido quinasa de T4. Los productos de cDNA se incubaron con Klenow DNA-polimerasa para generar extremos cohesivos con una adenina en el extremo 3', lo que permitió la ligadura de los adaptadores de indexación Illumina a los extremos del cDNA. Los productos ligados a los adaptadores se purificaron con perlas magnéticas XP (Corporación Agencourt Bioscience, Beverly, MA, EE.UU.) y las bibliotecas fueron amplificadas mediante 15 ciclos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con la DNA polimerasa Phusion (Reactivos Finnzymes, Vantaa, Finlandia). Las bibliotecas construidas fueron validadas y cuantificadas mediante electroforesis en el sistema Experion y por qPCR. Los datos de las seis bibliotecas indexadas fueron mezclados (multiplexado) en proporciones equimolares para dar una mezcla de oligonucleótidos con una concentración total de 10 nM. Por último, las bibliotecas resultantes fueron secuenciadas en la plataforma Genome Analizador Iix (Illumina) para generar lecturas de unas 150 pb. En cada carril de la celda de flujo se secuenciaron seis bibliotecas agrupadas e indexadas.

4.2.5- Tratamiento de datos

Los datos brutos de secuencia en formato fastq se procesaron a través de una serie de pasos secuenciales:

- a) Eliminación del adaptador: el adaptador de secuencias fue retirado de las secuencias en bruto con una serie de comandos determinados para este fin mediante un enfoque no conservador. Así, incluso las representaciones más cortas (un nucleótido) fueron eliminadas.
- b) Alineación del mRNA al DNA genómico: la alineación fue realizada por tophat (un alineador Bowtie DNA). Los resultados fueron ordenados e indexados utilizando samtools.

- c) Se calcularon valores de cobertura para cada muestra en el entorno estadístico “R” usando la biblioteca rsamtools. La anotación GTF de ensembl para el genoma humano se aplicó como referencia para los rangos. Los datos de expresión de exones de las 40 muestras diferentes se normalizaron por cuantiles y la expresión fue calculada por simple adición de todos los eventos de expresión en cada exón.
- d) Las muestras fueron agrupadas por paciente y cada valor de expresión se redujo al intervalo [0,1] con el fin de corregir los rangos de respuesta observados para el mismo gen en diferentes fondos genéticos.
- e) Se usó la librería siggenes para seleccionar los genes expresados de forma diferencial utilizando método SAM basado en FDR.
- f) Los datos obtenidos fueron enviados a GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) y están disponibles con el número de acceso GSE34736.
- g) Los genes cuya expresión se modula por la doxiciclina, con un valor de FDR < 0,05, se representaron como un mapa de calor mediante el uso de un método de Manhattan para la disimilitud y un método de Ward para la agrupación jerárquica, calculado en un entorno R.
- h) Análisis de redes y vías metabólicas: El plugin FI cytoscape reactome (www.reactome.org) y el genemania cytoscape plugin (www.genemania.org)¹¹⁰ se utilizaron para identificar las vías y redes reguladas por el tratamiento con doxiciclina.

4.2.6- Confirmación de los resultados de la ultrasecuenciación

Se eligieron algunos genes cuya expresión cambiaba de manera significativa tras la aplicación de doxiciclina para una confirmación posterior. Se sintetizó cDNA por transcripción inversa de 1 µg de RNA total utilizando el kit de síntesis (Invitrogen) en un volumen total de 20 µl de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se amplificó por qRT-PCR utilizando sondas TaqMan (Tabla 4) en el sistema de PCR en tiempo real 7300 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) y su expresión génica fue calculada utilizan-

do una cuantificación por interpolación en una curva estándar¹¹¹. Todos los valores se dividieron por la expresión del gen GAPDH, para evitar posibles errores de pipeteo.

Familia de genes	Gen	Número TaqMan
Estrés del ER	HYOU1	Hs00197328
	PDIA4	Hs00197328
	PPIB	Hs00197328
	HSPA5	Hs00197328
	ATF4	Hs00197328
	ATF6	Hs00197328
	VCP	Hs00197328
Integrinas	ICAM1	Hs00197328
	TBS1	Hs00197328
	SVEP1	Hs00197328
	CTGF	Hs00197328
Ciclo celular	TP53	Hs00197328
	CDK2AP2	Hs00197328
	CDKN1A	Hs00197328
Oligotransferasas	SRPR	Hs00197328
	SEC61A1	Hs00197328
Mitocondria	MT-ND6	Hs00197328
	MT-CO1	Hs00197328
	MT-CYB	Hs00197328
Otro	VEGFA	Hs00197328
	MANF	Hs00197328
	IL6	Hs00197328
Almacenamiento	GAPDH	Hs00197328

Tabla 4. Sondas TaqMan utilizadas para la cuantificación de genes expresados mediante qRT-PCR. Los parámetros del termociclador fueron 10 min de desnaturalización a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 min. Los valores se interpolan en un curva estándar para calcular la expresión absoluta. Estos valores dividieron después por la expresión de GAPDH en las mismas muestras para corregir posibles errores de pipeteo. Tabla adaptada de: Larráyo IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

4.3- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La variación de la superficie ocupada por el pterigión, una variable continua, se comparó entre los dos grupos experimentales con la prueba t de Student-Fisher. La normalidad se determinó mediante el test de Shapiro-Wilk. El análisis de subgrupos se realizó mediante pruebas de regresión logística. Las interacciones entre variables se estudiaron con modelos de regresión. Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado. Las pruebas de correlación (coeficiente de correlación de Spearman) se utilizaron para comparar la edad y la respuesta al fármaco. Valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos estos análisis se realizaron con el programa SPSS 17,0. Se realizaron análisis tanto por protocolo como por intención de tratar.

Con ANOVA de dos vías se analizaron los datos de ultrasecuenciación y de qRT-PCR. Mientras que para comparar los datos de la ultrasecuenciación y de la qRT-PCR se utilizó el análisis de correlación.

5- RESULTADOS

5.1- RESULTADOS DEL ENSAYO CLÍNICO

Se realizaron fotografías de los pterigiones en todas las visitas (Fig 3). Después de un mes de tratamiento, los datos globales mostraron que los pterigiones que habían sido tratados con doxiciclina oral experimentaron un cambio relativo (tamaño medido en la segunda visita dividido por el tamaño medio en la primera visita) de $0,98 \pm 0,05$, mientras que entre los que recibieron placebo el cambio relativo fue de $1,01 \pm 0,03$. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ni por análisis por protocolo ($p = 0,225$) ni por intención de tratar ($p = 0,191$) (test de t de Student).

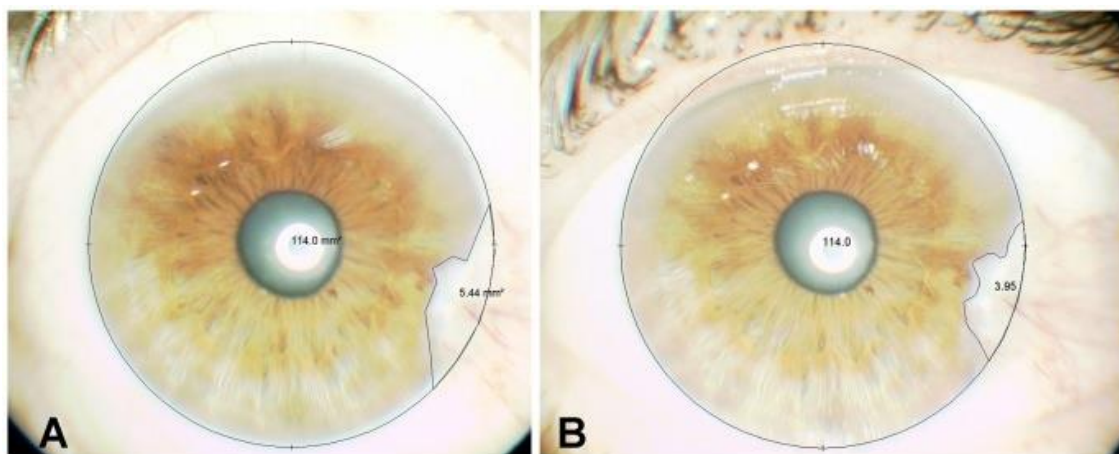


Fig.3. Fotografías del ojo del paciente número 20 (varón, 61 años de edad, de raza caucásica) antes (A) y después (B) del tratamiento con doxiciclina durante 30 días. Se aprecia una clara reducción de la lesión de 5.44 mm^2 a 3.95 mm^2 . Figura adaptada de: Rúa O, Larráyoiz IM, Barajas MT, Velilla S, Martínez A (2012) Oral Doxycycline Reduces Pterygium Lesions; Results from a Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Trial. PLoS ONE 7(12): e52696. doi: 10.1371/journal.pone.0052696

Para investigar si la doxiciclina tuvo un efecto beneficioso en determinados grupos definidos por edad, sexo, raza, tamaño de la lesión inicial y morfología del pterigión, se realizó un análisis de subgrupos mediante regresión logística. A los pterigiones cuyo cambio relativo fue ≥ 1 (no cambiaron de tamaño o crecieron) se les dio el valor "0", mientras que aquellos con una variación relativa <1 (reducción del crecimiento) fueron etiquetados como "1". Por raza, los pacientes de origen caucásico fueron calificados como "0", y todos los demás como "1". Otras variables incluidas fueron el sexo, la edad, la morfología inicial del pterigión y el tamaño inicial del pterigión. La regresión logística multivariante (también llamada regresión simultánea) reveló que sólo la "edad" tuvo un efecto independiente sobre la reducción de la lesión ($p < 0,019$). Para probar si había interacciones entre todas estas variables, se aplicó un modelo de regresión logística donde todas las variables independientes se introdujeron de una sola vez y luego se retiraron de una en una basándose en un valor de significación preestablecido, utilizando coeficientes de verosimilitudes. La edad, la raza y el tratamiento fueron las únicas variables significativas. No se pudo estimar la odds ratio para cada variable, el modelo no convergía debido al tamaño insuficiente de la muestra para el número elevado de variables, existe una significación estadística en el tratamiento ($p < 0,001$), edad por tratamiento ($< 0,001$), raza por tratamiento ($p 0,002$) y edad por raza por tratamiento ($p 0,002$).

Se observó una correlación positiva (Spearman $r = -0,4783$, IC 95% $-0,7025$ a $-0,1678$, $p = 0,003$) entre mayor edad y mayor reducción del pterigión en los individuos tratados. No existe tal correlación en pacientes que recibían placebo (Fig.4).

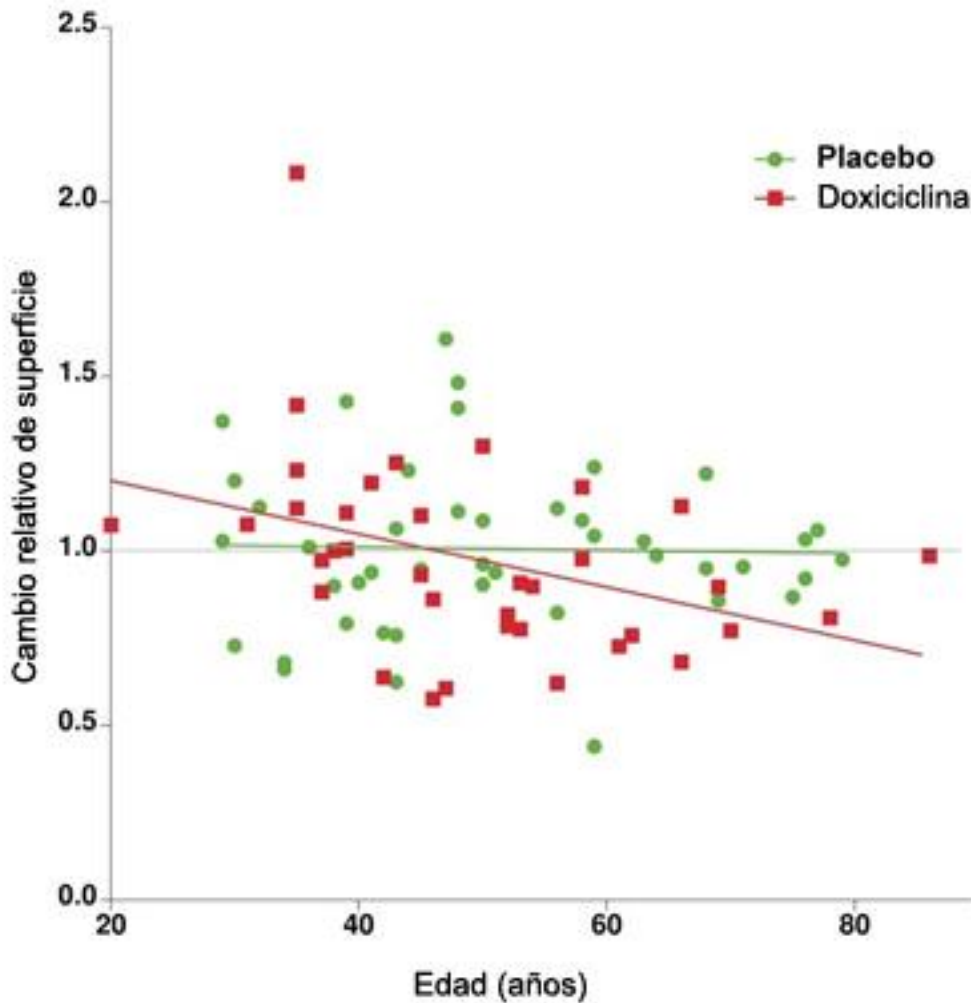


Fig. 4. Correlación entre la edad del paciente (abscisas) y la respuesta al tratamiento (ordenadas) para los pacientes que recibieron placebo (círculos verdes) o doxiciclina (cuadrados rojos). Se aprecia que a mayor edad existe una reducción mayor del pterigión en los individuos tratados. Figura adaptada de: Rúa O, Larráyo IM, Barajas MT, Velilla S, Martínez A (2012) Oral Doxycycline Reduces Pterygium Lesions; Results from a Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Trial. PLoS ONE 7(12): e52696. doi: 10.1371/journal.pone.0052696

Se compararon en el estudio las dos razas mayoritarias caucásicos e hispanos, aunque el estudio incluía además dos pacientes magrebíes y uno de raza negra en el grupo placebo, y dos pacientes magrebíes en el grupo tratado con doxiciclina.

La contribución de la raza se puede representar a través de un gráfico en cascada, que es una forma de visualización de datos que ayuda a determinar el efecto acumulado de valores positivos o negativos en una secuencia. En el estudio el efecto de la doxiciclina es claro en caucásicos (fig.5B), pero es indistinguible del placebo en pacientes hispanos

(Fig.5D). En los pacientes tratados con placebo no se observó variación de la superficie del pterigión (Fig.5A,C).

La reducción del tamaño del pterigión varía en función de la edad de los pacientes, siendo más eficaz en personas de mayor edad.

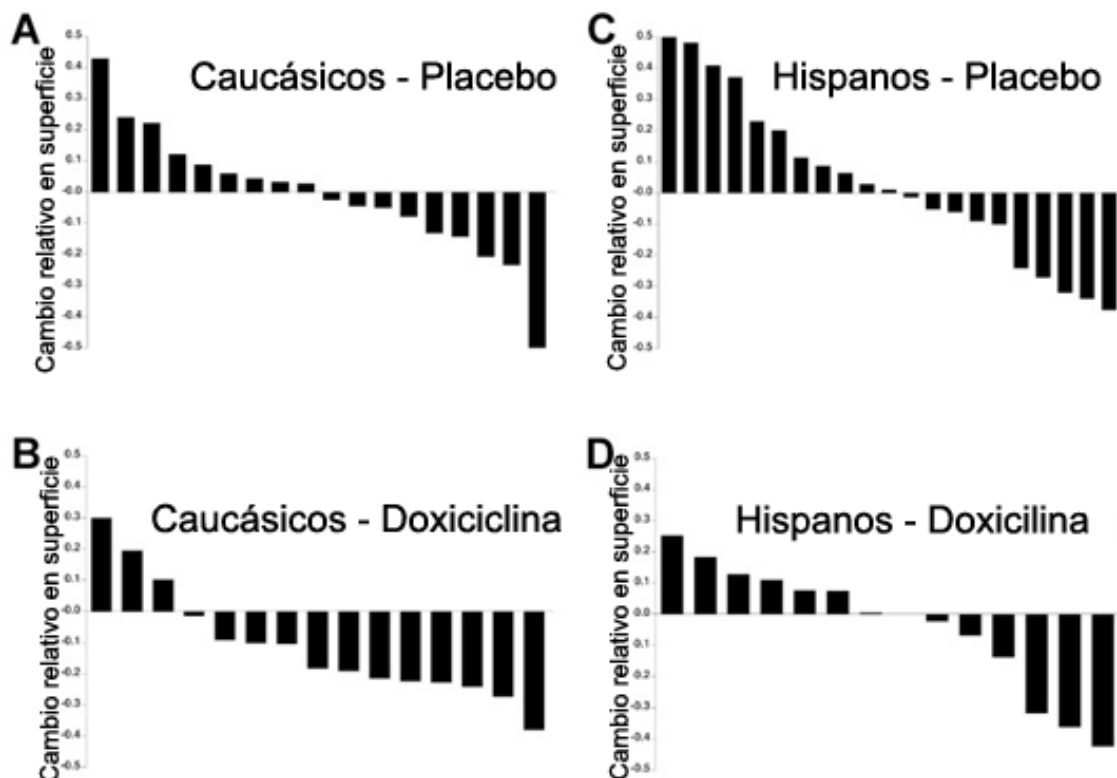


Fig.5. Representación de gráfico en cascada de los cambios relativos en la superficie del pterigión en todos los pacientes por intención de tratar tratados con placebo (A, C) o con doxiciclina (B, D), según la raza. Se aprecia un claro efecto de la doxiciclina en caucásicos, no así en los hispanos. Figura adaptada de: Rúa O, Larráyo IM, Barajas MT, Velilla S, Martínez A (2012) Oral Doxycycline Reduces Pterygium Lesions; Results from a Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Trial. PLoS ONE 7(12): e52696. doi: 10.1371/journal.pone.0052696

Como se esperaba de la doxiciclina, los eventos adversos fueron mínimos y se resolvieron rápidamente después de suspender la medicación. Entre ellos hay que destacar cinco casos de náuseas y vómitos (un paciente en el grupo placebo, cuatro pacientes del grupo que recibió doxiciclina), dos casos de eczema (un paciente del grupo placebo, un

paciente del grupo que recibió doxiciclina) y un caso de fototoxicidad en el grupo placebo.

5.2- RESULTADOS DEL ESTUDIO MOLECULAR MEDIANTE ULTRASECUENCIACIÓN

Los cultivos primarios se realizaron a partir de la exéresis quirúrgica de los pterigiones en 10 pacientes.

De los 10 pacientes 6 eran hispanos y 4 eran caucásicos, 5 eran hombres y 5 mujeres, la edad media era superior entre los caucásicos (54,75 años) que entre los hispanos (42,83 años) y también era superior la edad en las mujeres (53,2 años) que en los hombres (42 años).

Para identificar la población de células presentes en estos cultivos, se realizó inmunofluorescencia para diferentes marcadores. La microscopía confocal mostró que la población celular predominante en estas muestras está compuesta de células positivas para vimentina, con una morfología compatible con los fibroblastos (Fig.6).

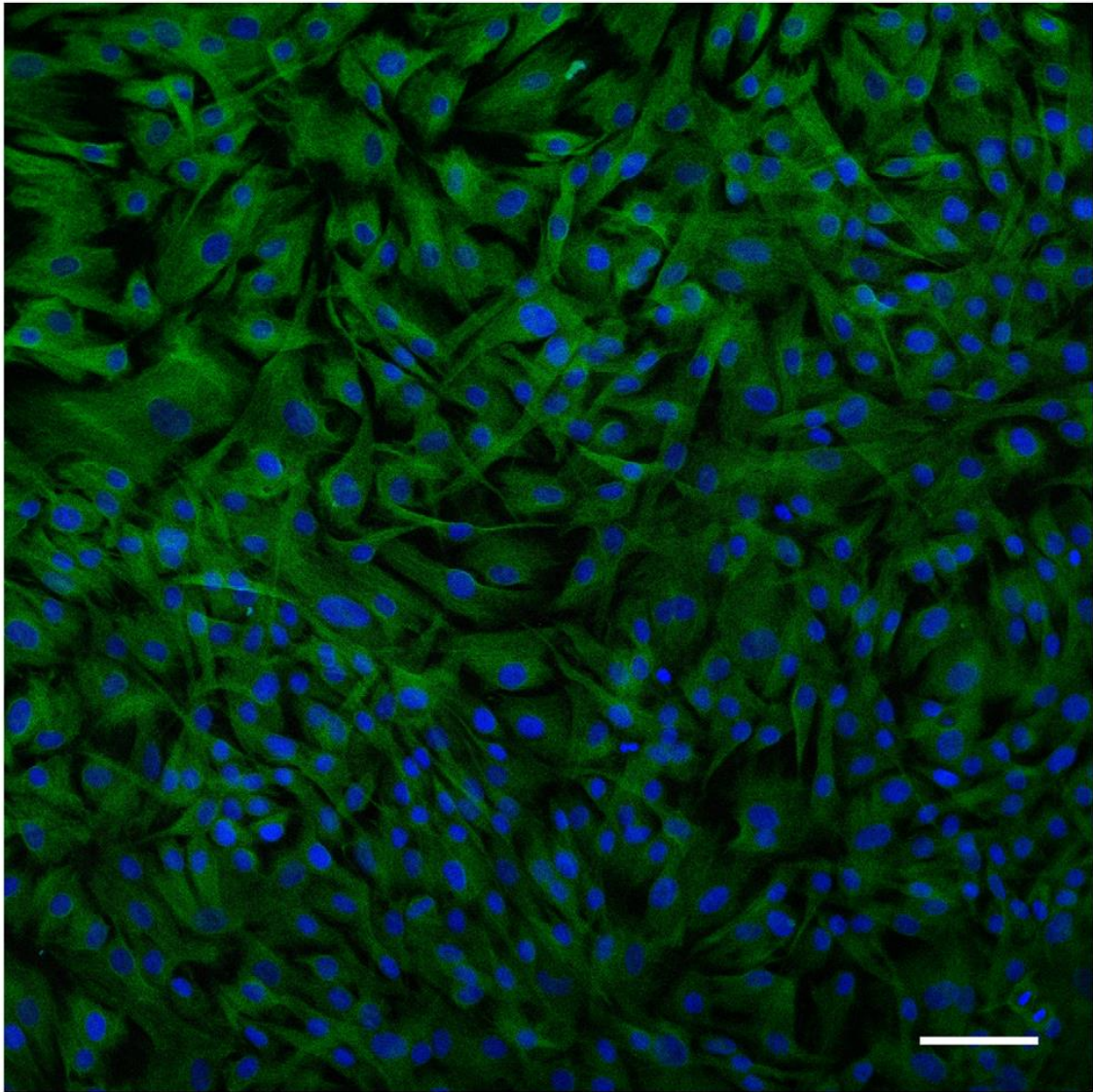


Fig.6. Imagen confocal de células de pterigión en cultivo teñidas con anticuerpos contra vimentina (verde), CD31 (blanco), y queratina 4 (rojo). DAPI se utilizó como contratinción nuclear (azul). Todas las células fueron vimentina-positivas y no se encontró inmunoreactividad para marcadores epiteliales o linajes endoteliales. Barra = 20 μ m. Figura adaptada de: Larráyoz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

Los cultivos se trataron con doxiciclina y el RNA de las muestras se analizó mediante ultrasecuenciación. Debido a las características del protocolo de multiplicado y otras razones técnicas, había una amplia variabilidad en el número de lecturas de secuencia por muestra, que van desde 82,040 a más de 7,5 millones de lecturas (Fig. 7). Para hacer frente a esta variabilidad los datos se normalizaron en todas las muestras. Para probar la eficacia de nuestro protocolo de normalización, se hicieron varias predicciones y se

comprobaron en el banco de datos. Una de las pruebas consistió en la predicción del sexo del paciente mediante el análisis de expresión de los genes codificados por el cromosoma Y (Fig.8 A,B) o de otros genes cuya expresión está ligada al sexo del individuo, tales como XIST o RPS4Y1. El sexo de todos los pacientes se predijo correctamente. Una segunda prueba consistió en el análisis de los genes cuya expresión no había sido modificada por el tratamiento con doxiciclina. En estos casos, los antecedentes genéticos de cada paciente son muy homogéneos en comparación con la expresión en otros pacientes, que es más variable (Fig. 8 C-H).

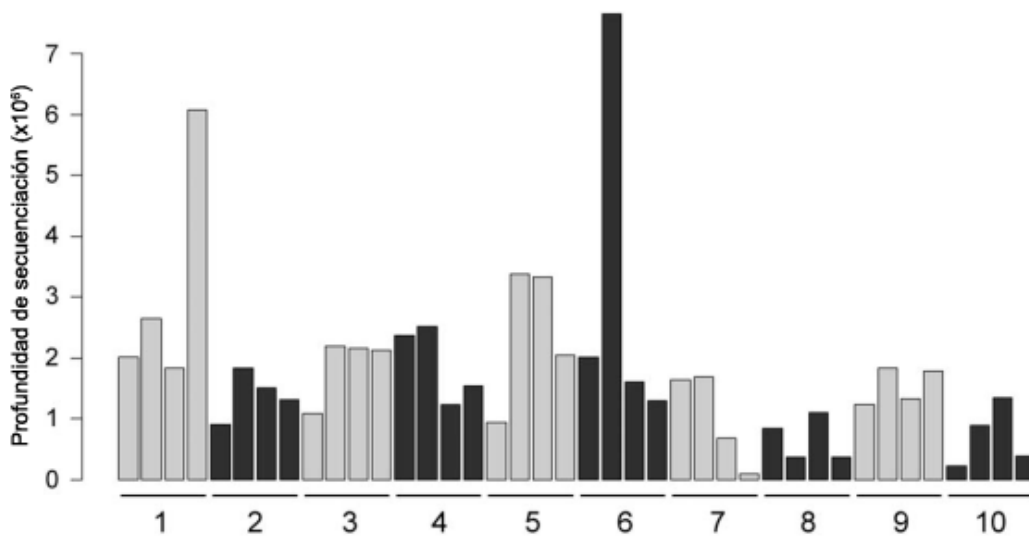


Fig.7. Histograma que muestra el número de secuencias alineadas para cada una de las 40 muestras experimentales (profundidad de secuenciación). Los números representan los donantes individuales y las 4 barras de cada donante se corresponden con control no tratado, y las células de pterigión tratadas durante 24 h con 50, doxiciclina 200 y 500 µg / ml (de izquierda a derecha). Hay una gran variación en la profundidad de secuenciación que va desde 82.040 lecturas para las células (menos representados de paciente número 7, se trató con 500 µg / ml de doxiciclina) a 7.653.010 lecturas para las células tratadas con 50 µg/ ml de doxiciclina (mejor representados de paciente número 6). Figura adaptada de: Larráyoz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

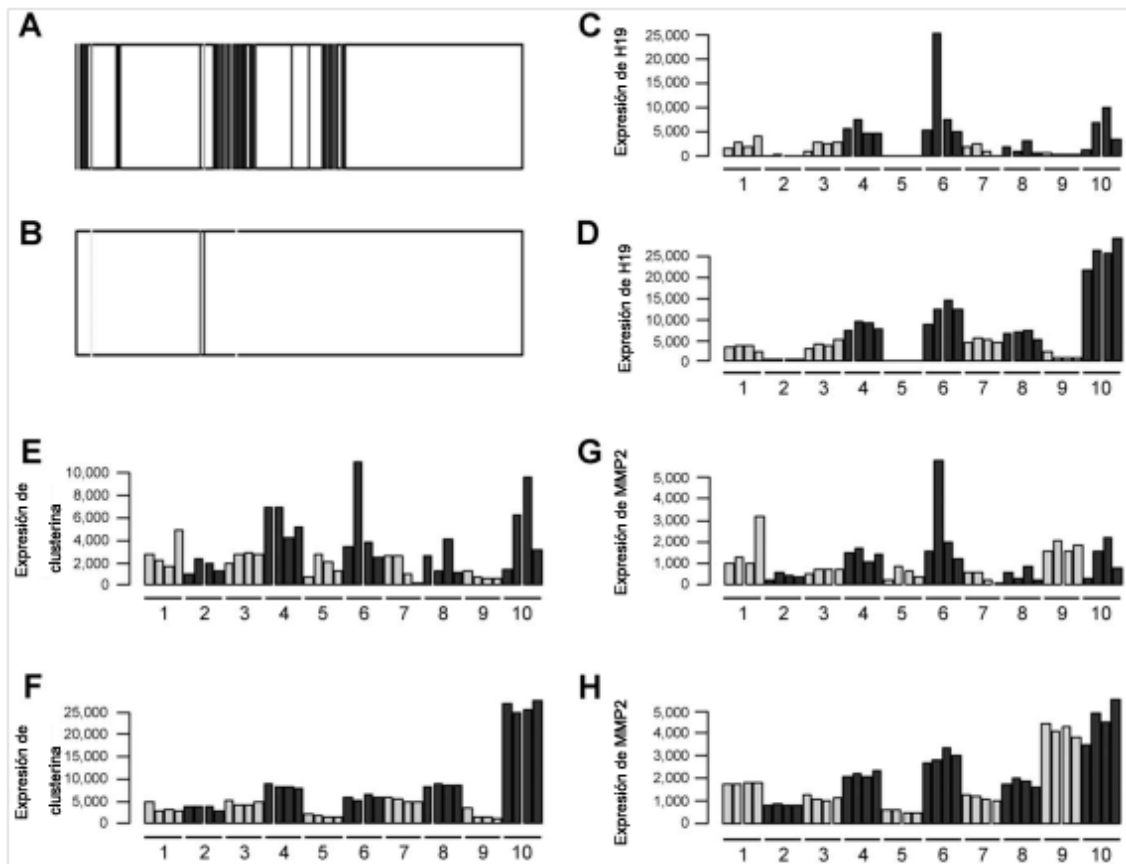


Fig.8. Demostración experimental de que fue aplicado un protocolo correcto de ultrasecuenciación. Representación de los niveles de expresión en el cromosoma Y en un paciente hombre (A) y en una paciente mujer (B). Cada línea oscura representa la expresión de un exón a lo largo de la longitud del cromosoma. Las pocas líneas observadas en las hembras corresponden a regiones repetidas del genoma. Niveles de expresión de 3 genes: H19 (C, D), clusterina (E, F), y MMP 2 (G, H), tal como aparecen antes (C, E, G) y después (D, F, H) de la aplicación de nuestro protocolo de normalización. El éxito de la normalización se puede apreciar ya que las variaciones individuales son más grandes que los cambios inducidos por el tratamiento en estos genes. Figura adaptada de: Larráyoiz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

Después de la normalización, la primera observación fue confirmar el tipo celular predominante en los cultivos. Varios marcadores de fibroblastos, incluyendo la fibronectina 1, el colágeno tipo 1 α y β , la vimentina y el colágeno de tipo III se encontraron en las diez muestras con un alto nivel de expresión, mientras que los marcadores de las células epiteliales tenían una expresión muy baja.

Después, la expresión génica de las muestras tratadas con doxiciclina se comparó con los controles no tratados. Se identificaron 332 genes cuya expresión variaba de acuerdo a la exposición al antibiótico y se representan en un mapa de calor tipo Manhattan, donde se muestra que los tratamientos tienden a agruparse, lo que indica que estas variaciones en los genes debidas al tratamiento son mayores que las debidas a la idiosincrasia individual (Fig.9).

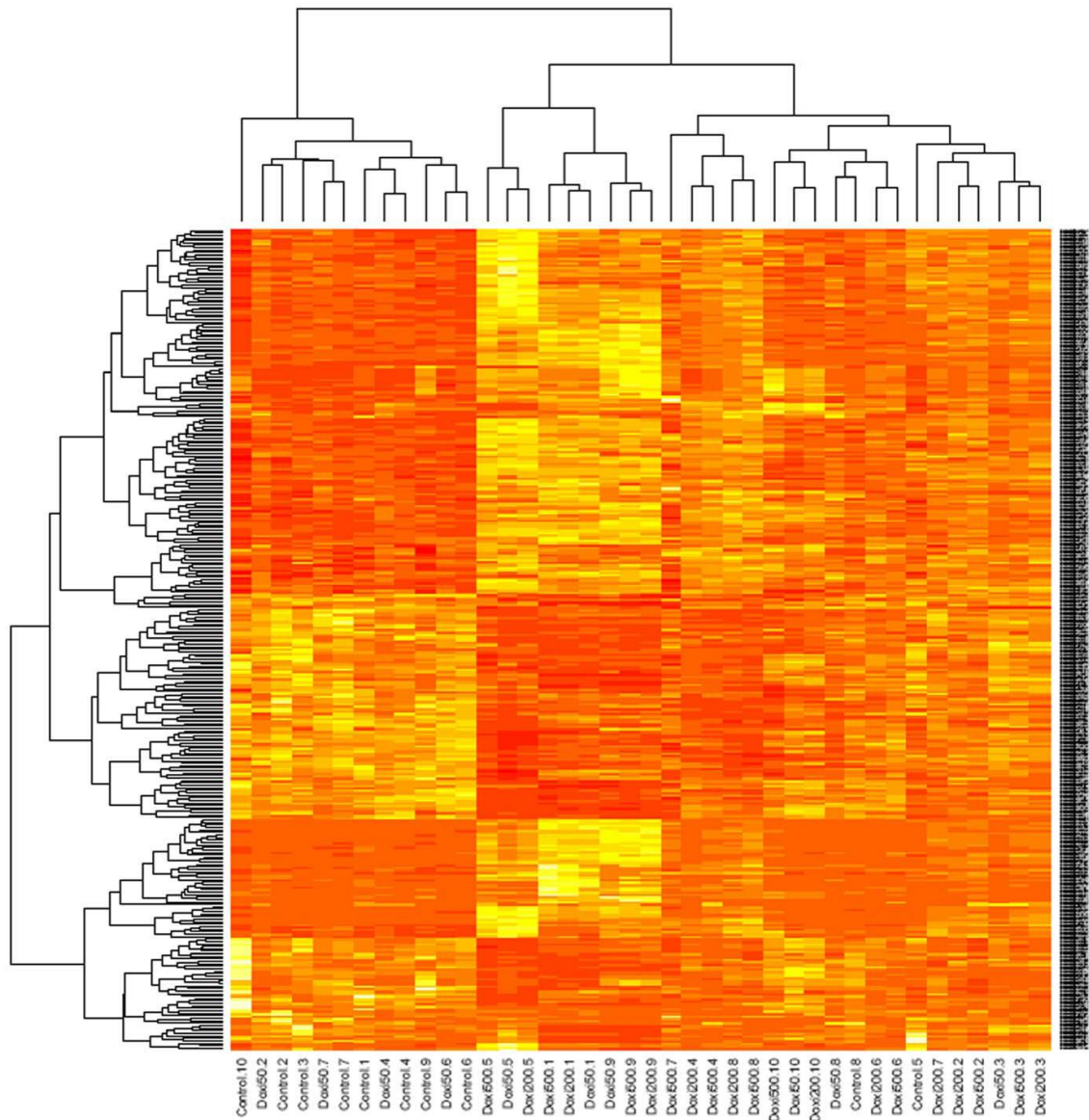


Fig. 9. Agrupación jerárquica (mapa de calor Manhattan) de todas las muestras (columnas) y de los 332 genes que experimentaron los mayores cambios tras el tratamiento con doxiciclina (líneas). Todos los controles tienden a agruparse (a la izquierda) lo cual indica una buena técnica de normalización. El color rojo expresa niveles bajos de expresión y el amarillo expresa niveles altos de expresión. Figura adaptada de: Larráyo IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

Para investigar las vías celulares que estaban involucradas en la respuesta a la doxiciclina por parte de las células del pterigión, se analizaron los resultados de la ultrasecuenciación con software especializado. El grupo de genes que experimentó mayor variación después del tratamiento con el antibiótico son los genes expresados por el genoma mitocondrial. El DNA mitocondrial está compuesto por 15 genes importantes, de los cuales un solo gen el MT-ATP8 no cambió, la expresión de 2 genes que codifican el RNA ribosomal aumentó mucho en función de la dosis, mientras que la expresión de los otros 12 genes disminuyó sustancialmente, también en una forma dependiente de la dosis (Tabla 5).

Nombre del gen	Número de ensamblamiento	Cambio		
		50 µg/ml doxiciclina	200 µg/ml doxiciclina	500 µg/ml doxiciclina
MT-ATP6	ENSG00000198899	-1,27	-1,45	-1,75
MT-CO1	ENSG00000198804	-2,04	-2,56	-2,94
MT-CO2	ENSG00000198712	-1,20	-1,56	-1,96
MT-CO3	ENSG00000198938	-1,49	-1,72	-2,38
MT-CYB	ENSG00000198727	-1,75	-2,33	-2,86
MT-ND1	ENSG00000198888	-1,67	-1,92	-2,50
MT-ND2	ENSG00000198763	-1,32	-1,39	-1,92
MT-ND3	ENSG00000198840	-1,72	-2,27	-2,70
MT-ND4	ENSG00000198886	-1,64	-1,89	-2,38
MT-ND4L	ENSG00000212907	-1,56	-2,00	-2,38
MT-ND5	ENSG00000198786	-1,47	-1,79	-2,27
MT-ND6	ENSG00000198695	-1,54	-1,92	-2,44
MTRNR1	ENSG00000211459	2,60	3,08	3,33
MTRNR2	ENSG00000210082	1,28	1,36	1,64

Tabla 5. Valores de la ultrasecuenciación de los genes mitocondriales. Los valores se representan como el cambio medio de 10 pacientes con respecto a los controles no tratados. En esta tabla se aprecia que la expresión de los 12 primeros genes mitocondriales que aparecen en ella disminuyen sustancialmente de forma dosis dependientes con el tratamiento con doxiciclina y los dos últimos, que codifican el RNA ribosomal, aumentaron su expresión según aumentaba la dosis de doxiciclina. Tabla adaptada de: Larráyoz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

Otra vía cuya expresión se modificó de forma importante por el tratamiento con doxiciclina (todos los genes en esta vía se sobreexpresan) incluye casi todas las proteínas que aparecen en el retículo endoplásmico (ER) en respuesta al estrés (Fig. 10). Esta vía está implicada a todos los niveles, desde el acoplamiento del ribosoma al ER (SSR2, RRBP1, SEC61A1), a las moléculas implicadas en el plegamiento de proteínas (PPIB, PDIA1a 6, etc), a las proteínas de control de calidad (BIP, SIL1, HSP47), a los miembros de la respuesta a proteínas desplegadas (ATF6, IRE1, PERK) y al proceso de degradación de proteínas asociadas al ER (EDEMI1, SEC61, complejo ubiquitina ligasa, etc). Cuando se activa la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), las señales de varios mediadores son enviadas al núcleo para activar los genes que responden a UPR y para promover la apoptosis. Uno de ellos es CHOP, que también está aumentado en las células tratadas con doxiciclina.

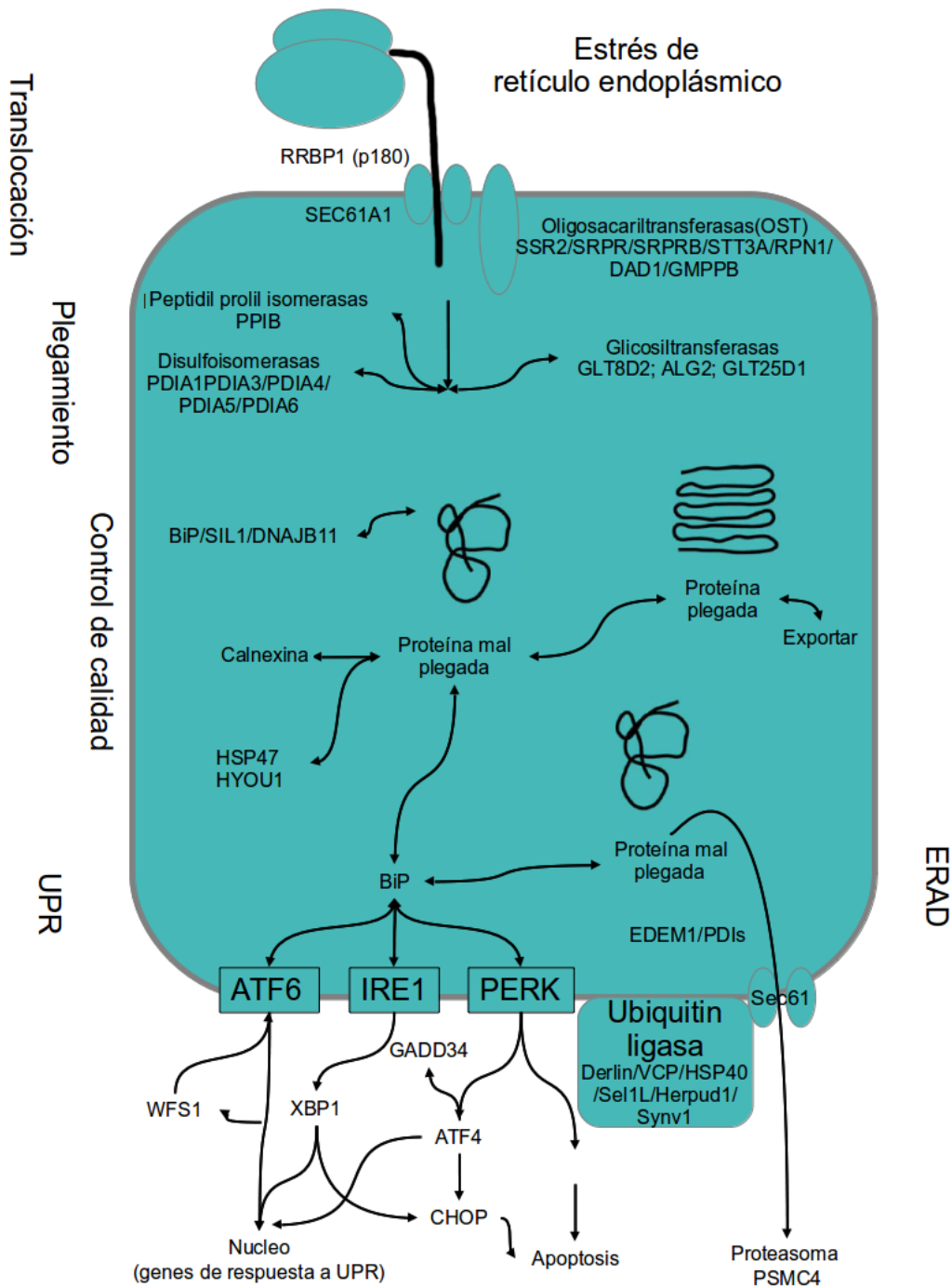


Fig.10. Todas las proteínas representadas en el esquema son sobreexpresadas significativamente con el tratamiento doxiciclina. Esquema de las principales vías del retículo endoplasmático (ER) en respuesta al estrés. Las proteínas se translocan directamente desde el ribosoma en el ER y el plegamiento de las proteínas tiene lugar con la ayuda de chaperones específicos. Si se pliegan correctamente, las proteínas siguen su camino hacia el complejo de Golgi y la vía secretora. Si las proteínas mal plegadas se acumulan en la luz del ER, el UPR se activará, se enviarán señales al núcleo y se inducirá apoptosis a través del CHOP. Figura adaptada de: Larráyoiz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

Otro conjunto de genes que se afectan por el tratamiento con doxiciclina incluye varias integrinas, colágenos y otros componentes de la matriz extracelular (Tabla 6), lo que indica que la doxiciclina tiene un impacto significativo en la remodelación de la matriz. Además, varios factores de crecimiento como el VEGF y el factor mesencefálico neurotrófico derivado de astrocitos (MANF), citoquinas como la IL-6, y algunos factores relacionados con el ciclo celular (TP53, CDKN1A, CDK2AP2) también tenían modificadas su expresión en las células tratadas con doxiciclina.

Familia de genes	Nombre del gen	Número de ensamblamiento	Cambio		
			50 µg/ml doxiciclina	200 µg/ml doxiciclina	500 µg/ml doxiciclina
Integrinas	CTGF	ENSG00000118523	-2,04	-2,70	-4,55
	CRELD1	ENSG00000163703	2,60	3,40	3,47
	CYR61	ENSG00000142871	-1,82	-1,92	-2,33
	ICAM1	ENSG00000090339	2,13	3,40	3,69
	ITGA4	ENSG00000115232	-1,33	-2,04	-1,64
	ITGA5	ENSG00000161638	1,87	2,26	2,31
	ITGB1	ENSG00000150093	-1,16	-1,69	-1,35
	ITGB8	ENSG00000105855	-1,54	-2,50	-1,89
	ITGBL1	ENSG00000198542	-1,43	-1,72	-2,13
proteínas interacción con interinas	SLC3A2	ENSG00000168003	2,75	3,22	3,15
	THBS1	ENSG00000137801	-1,39	-1,67	-1,85
	SVEP1	ENSG00000165124	-1,44	-1,71	-2,06
Colagenasas	COL12A1	ENSG00000111799	-1,32	-1,92	-1,82
	COL3A2	ENSG00000204262	-1,25	-1,47	-1,61
Matriz extracelular	LAMPB1	ENSG00000091136	-1,52	-2,04	-2,33
	LAMA3	ENSG00000053747	-1,47	-1,41	-1,32
	LAMA4	ENSG00000112769	-1,33	-1,82	-1,79
	SPARC	ENSG00000113140	-1,09	-1,18	-1,37

Tabla 6. Valores de ultrasecuenciación de las integrinas y de los genes de la matriz extracelular. Los valores se representan como el cambio medio de 10 pacientes con respecto a los controles no tratados. La expresión de los genes de la matriz extracelular, las colagenasas y las integrinas que interaccionan con proteínas se reduce de forma dosis dependiente en los tratados con doxiciclina. En cambio, algunas integrinas aumentan su expresión dependiendo de la dosis de doxiciclina mientras otras disminuyen no estando tan clara su relación con la dosis. Tabla adaptada de: Larráyo IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on *Pterygium* as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

Los resultados de la ultrasecuenciación se confirmaron mediante un estudio con reacción de cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). En todos los casos, se confirmó la dirección y magnitud del cambio en la expresión (Fig. 11). Para todos los genes seleccionados existe una estrecha correlación entre los datos obtenidos a través de la ultrasecuenciación y los recogidos por qRT-PCR (Fig. 12), lo que indica la eficacia de nuestro método de cuantificación y normalización.

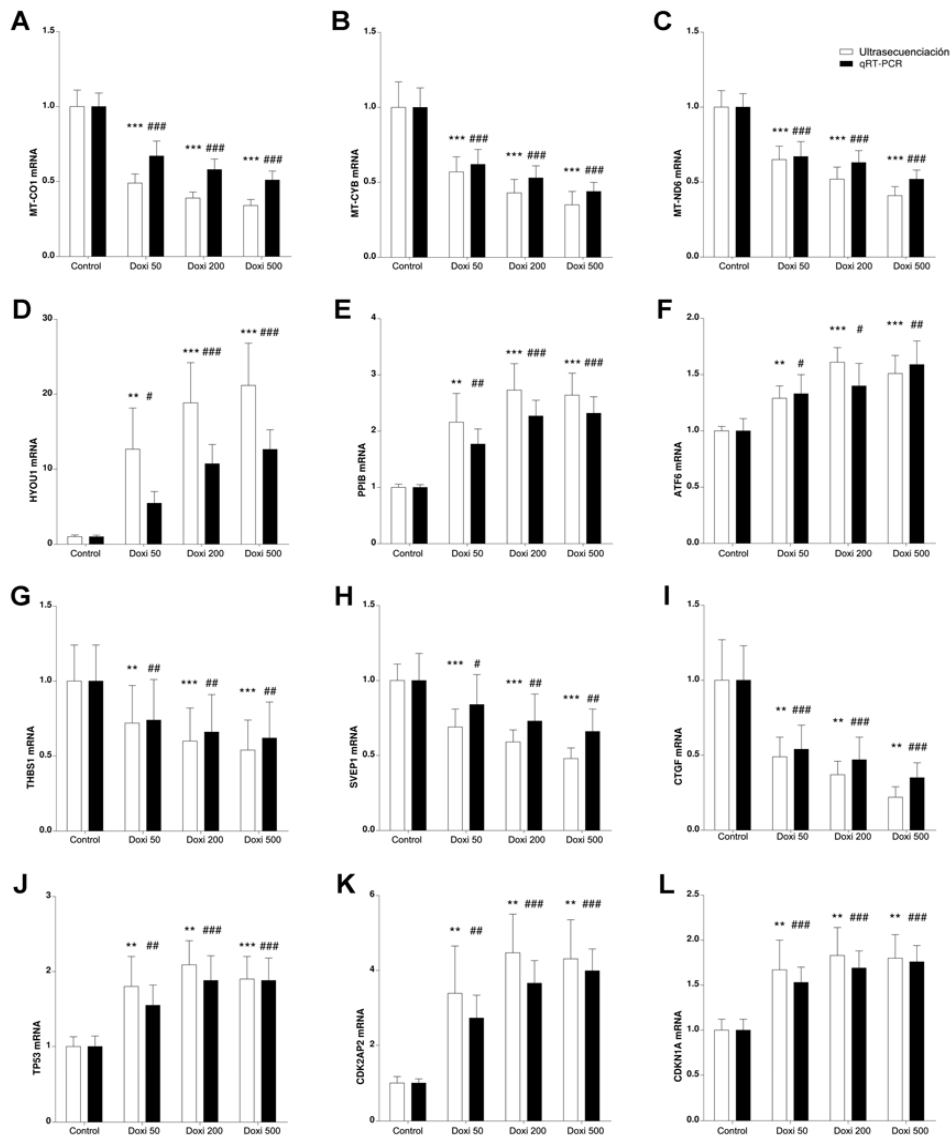


Fig 11. Expresión de varios genes cuantificados por ultrasecuenciación (barras abiertas) y qRT-PCR (barras sólidas) involucrados en las diferentes vías. Los genes mitocondriales (AC), la respuesta de estrés del retículo endoplasmático (DF), los miembros de la familia de las integrinas (GI), y los genes relacionados con el ciclo celular (JL). Las barras representan incremento (o disminución) con respecto a los controles no tratados \pm SEM para 10 muestras independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con los controles no tratados están representados por asteriscos * (por ultrasecuenciación) o almohadillas # (por qRT-PCR). **: P, 0,01; ***: p, 0,001; #: p, 0,05; ##: p, 0,01; ###: p, 0,001. Figura adaptada de: Larráyo IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

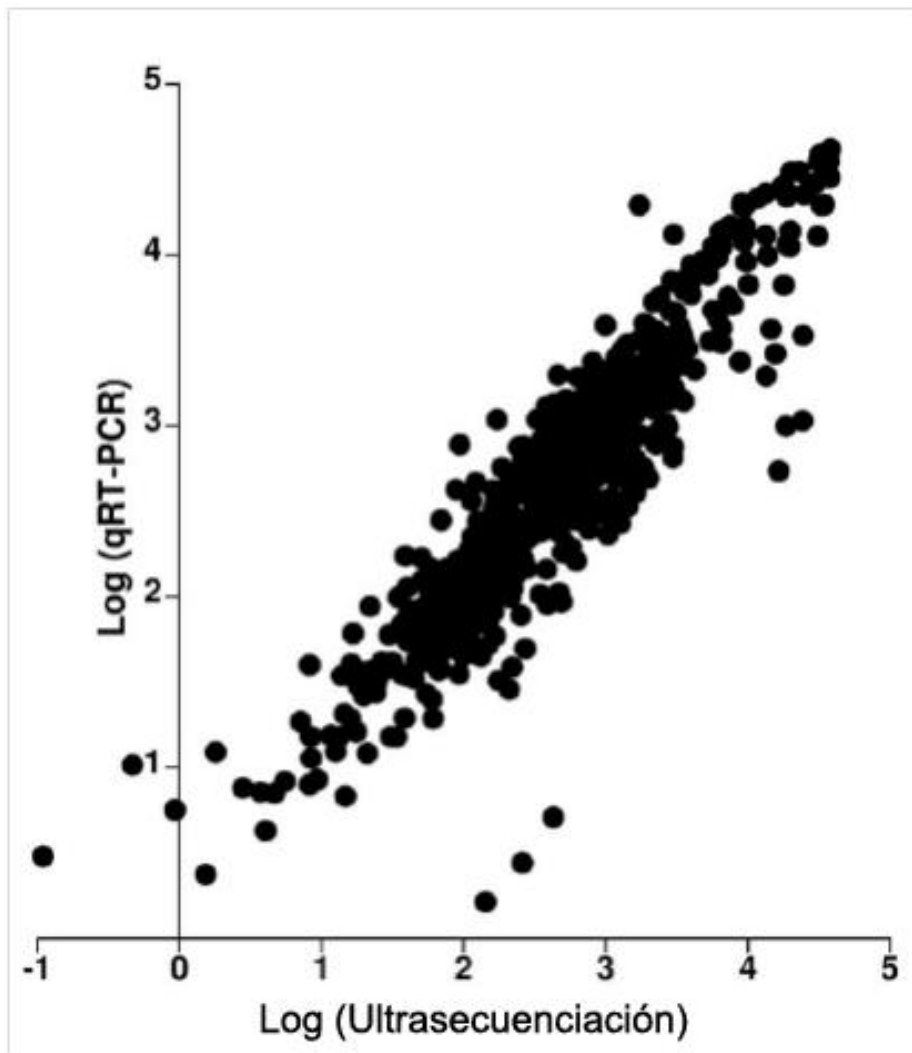


Fig.12. Análisis de correlación entre los valores obtenidos a través de ultrasecuenciación (abscisas) y mediante qRT-PCR (ordenadas). El coeficiente de Pearson es 0.9110 y $R^2 = 0,8299$; $p, 0.0001$. Indica la eficacia de nuestro método de normalización. Figura adaptada de: Larráyoiz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

Para algunos genes que generan proteínas secretoras, tales como el MANF, la IL-6 y el VEGF, se realizó una confirmación adicional mediante la determinación de proteínas por ELISA en el sobrenadante de los cultivos tratados y sin tratar. Una vez más, se observó una alta correlación entre los datos de la secuenciación, la cuantificación mediante qRT-PCR y ELISA (Fig.13).

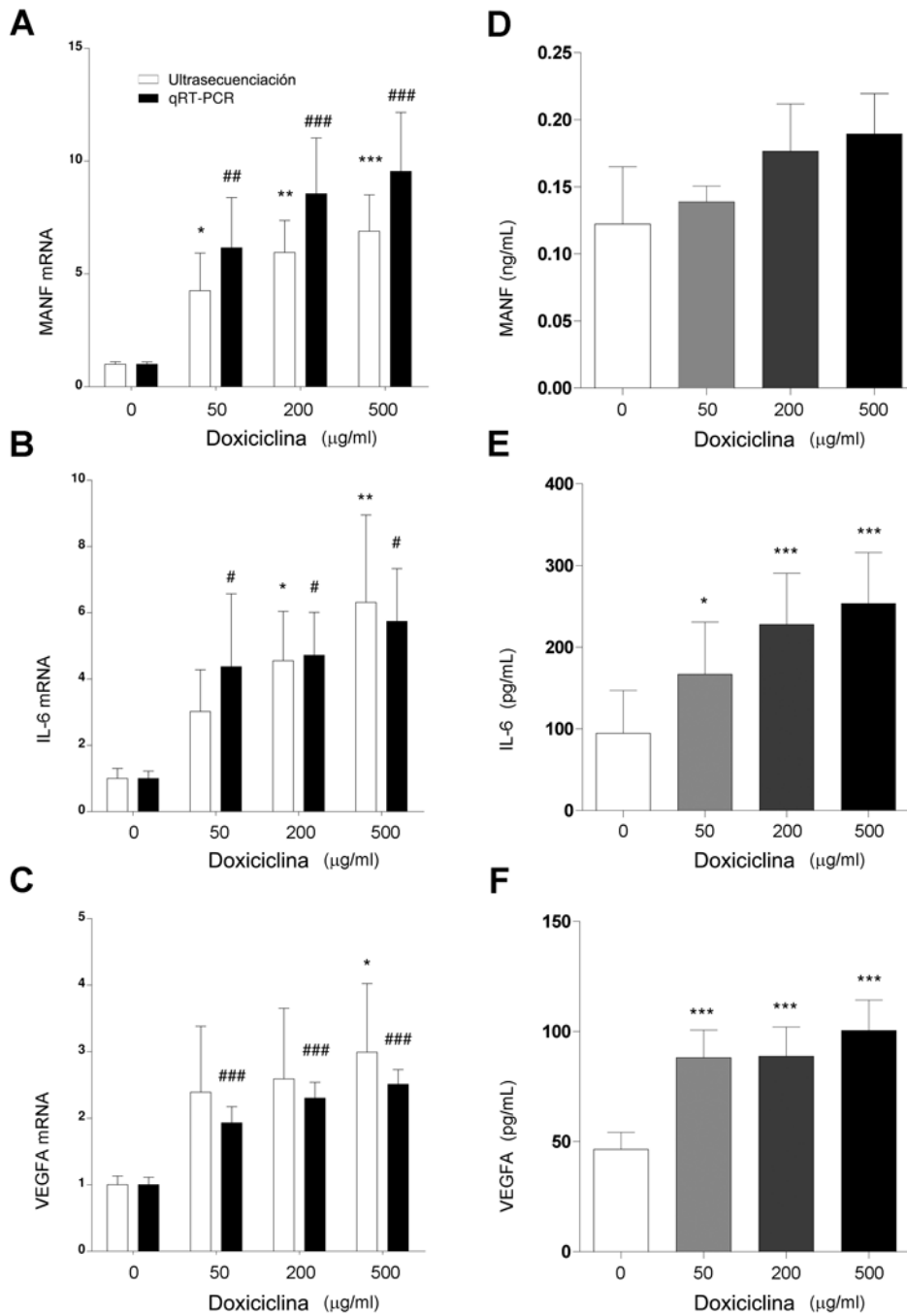


Fig.13. La correlación entre los valores obtenidos a través de ultrasecuenciación, qRT-PCR y ELISA para 3 proteínas secretoras cuya expresión varía con el tratamiento con doxiciclina. Estos incluyen el MANF (A, D), IL-6 (B, E), y el VEGF-A (C, F). Para la cuantificación del mRNA (A, B, C), todas las barras representan incrementos con respecto a los controles no tratados +/- SEM para 10 muestras independientes. Para la cuantificación de proteínas (D, E, F), las barras representan la media +/- SEM para 10 muestras independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con los controles no tratados están representados por asteriscos * (por ultrasecuenciación y datos de proteínas) o almohadillas # (por QRT-PCR). *: P, 0,05; **: p, 0,01; ***: p, 0,001; #: p, 0,05; ##: p, 0,01; ###: p, 0,001. Figura adaptada de: Larráyoiz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi: 10.1371/journal.pone.0039359

6- DISCUSIÓN

6.1 – EFECTO DE LA DOXICICLINA ORAL EN EL PTERIGIÓN EN PACIENTES DEL ENSAYO CLÍNICO

6.1.1- LIMITACIONES DEL ESTUDIO

- El tamaño de la muestra es escaso debido a las pérdidas de pacientes durante el estudio, lo cual condiciona que el análisis de regresión logística a pesar de presentar la edad, la raza y el tratamiento como variables significativas, no sabemos “cuánto” de significativas son estas variables.

- Hubo un bajo nivel de cumplimiento del estudio. De hecho, sólo el 64% de los pacientes volvió a la segunda visita, que era necesaria para permitir la medición del resultado primario. Dos razones pueden explicar este comportamiento. En primer lugar, al no ser una enfermedad potencialmente mortal, el pterigión es a menudo visto como un problema estético más que como una enfermedad. En segundo lugar, el pterigión es más frecuente en regiones tropicales y subtropicales del mundo, probablemente en relación con una mayor exposición a radiación UV ¹¹². En consecuencia, una gran proporción de todos los casos diagnosticados en España corresponde a inmigrantes de Suramérica y América Central, que es una población muy móvil, a menudo dependiente de empleo temporal. Esta cuestión debe tenerse en cuenta para el diseño de futuros ensayos clínicos en pacientes con pterigión.

- La medida de la superficie puede tener cierta variabilidad ya que la medida se realiza sobre la foto, se marcan dos puntos en la córnea y el programa informático realiza la circunferencia y sobre ella definen los límites del pterigión.

6.1.2- INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En el ensayo clínico parece que la doxiciclina oral, administrada durante 30 días a 200 mg / día, modifica el patrón de crecimiento del pterigión en pacientes de raza blanca, un resultado que está de acuerdo con observaciones anteriores en un modelo de ratón ⁷.

Una de las variables más predictivas de la respuesta a la doxiciclina fue la raza. Los pacientes hispanos no respondieron al tratamiento con doxiciclina, mientras que los caucásicos sí lo hicieron. Se han observados amplias diferencias en la prevalencia del pterigión dependiendo de la etnia ^{12, 13, 18, 21}. También hay informes sobre las diferentes tasas de recurrencia entre los pacientes hispanos y caucásicos ⁹⁰. Además, parece ser que la doxiciclina modifica hasta en 332 genes cuando actúa en las células del pterigión, que implican diversas vías celulares tales como la expresión de genes mitocondriales, estrés del ER, integrinas, componentes de la matriz extracelular, reguladores del ciclo celular y factores de crecimiento. Las diferencias en estas vías entre las razas pueden ser responsables de sus respuestas diferenciales a la doxiciclina. Los estudios genéticos en pacientes caucásicos e hispanos pueden arrojar algo de luz sobre este distinto comportamiento al aplicar doxiciclina.

Otro factor importante en los resultados al tratamiento fue la edad de los pacientes, se ha visto que existe una correlación significativa entre la incidencia de pterigión y la edad ^{16, 114}, pero es necesario encontrar una explicación de por qué el tratamiento con doxiciclina es más eficiente en los pacientes de mayor edad. Nuestra hipótesis sería que el ojo de los pacientes de mayor edad se volvería más permeable a la doxiciclina sistémica, lo que permitiría una concentración más alta en la superficie del ojo. Esto puede estar en relación con el hecho de que el efecto beneficioso de la doxiciclina fue mucho mayor en ratones ⁷ que en los seres humanos, lo que puede ser debido a varias razones. En primer lugar, la anatomía y la fisiología de los ojos de ratón y la de los ojos humanos son muy diferentes ⁸⁷. Estas diferencias incluyen el tamaño, hábitos diurnos/nocturnos y características histológicas tales como una membrana de Bowman rudimentaria en el ratón y todo ello puede ser que influya en la farmacocinética de un fármaco administrado oralmente. Hay algunas discrepancias en la cantidad de doxiciclina administrada por vía oral que puede alcanzar la superficie del ojo. Por ejemplo, en un

conjunto de pacientes e individuos sanos que recibieron doxiciclina oral, el fármaco se encontró fácilmente en la sangre, pero no en las lágrimas ¹⁰⁹, un resultado similar se encontró en caballos ¹⁰⁹. Sin embargo, un experimento realizado en monos encontró que la administración oral de doxiciclina era suficiente para inducir la activación de los transgenes en el ojo de estos animales ¹¹⁵. En otro estudio, la doxiciclina oral fue capaz de reducir la angiogénesis en la córnea de rata ¹¹⁶. Por lo tanto, parece que hay una correlación inversa entre el tamaño de los ojos y la capacidad de la doxiciclina para alcanzar la superficie exterior del ojo. Puede haber una relajación dependiente de la edad de esta barrera o simplemente un aumento en la sensibilidad a la doxiciclina en pacientes de mayor edad.

Otra observación inesperada fue la amplia variación en el tamaño del pterigión observada en pacientes tratados con placebo. Una pequeña parte de esta variación puede deberse a errores de medición y la dificultad de medir adecuadamente el tamaño del pterigión, como ha sido reconocido por otros autores ¹¹⁷. Pero, aparte de eso, hubo cambios reales en el tamaño durante las cuatro semanas entre las fotografías, incluyendo tanto aumentos como disminuciones de la superficie afectada. Esto puede representar una característica intrínseca de la biología de pterigión que no había sido observada previamente. Es posible que exista un equilibrio inestable entre los factores de promoción del crecimiento del pterigión y de los mecanismos de defensa del huésped tratando de reducirlo, lo que resulta en este "vaivén" en su comportamiento. Este hecho debe ser tenido en cuenta para el diseño de futuros ensayos clínicos.

Al igual que en estudios previos en que se aplicaba la doxiciclina durante periodos relativamente cortos, los eventos adversos en nuestro ensayo clínico han sido poco frecuentes, débiles y se han resuelto completamente al suspender el tratamiento.

6.1.3- COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS

Al comparar las superficies de los pterigiones en pacientes tratados con doxiciclina, se observó que al mes de la inclusión en el estudio los pacientes de raza caucásica y los de edad más avanzada presentaron una disminución de la superficie del pterigión respecto a los pacientes de raza hispana y respecto a los pacientes más jóvenes.

6.2- EFECTOS MOLECULARES DE LA DOXICICLINA EN EL PTERIGIÓN

En este estudio hemos demostrado a través del análisis de ultrasecuenciación que las células de pterigión responden al tratamiento con doxiciclina mediante la modificación de los niveles de expresión de un amplio número de genes responsables de importantes funciones celulares. Entre las rutas que fueron más modificadas encontramos a los genes mitocondriales, la cascada relacionada con el estrés del ER, los factores de crecimiento, las interleuquinas, los reguladores del ciclo celular, las integrinas y los componentes de la matriz extracelular.

6.3- NORMALIZACIÓN DE DATOS

La secuenciación masiva para el análisis del transcriptoma es una técnica relativamente nueva y, como tal, necesita un tiempo y una serie de mejoras adicionales antes de lograr su potencial real. En este sentido, la normalización de datos es uno de los problemas más relevantes en los documentos actuales que manejan datos de ultrasecuenciación. En un principio se suponía que las técnicas de RNA-seq estaban libres de las distorsiones no lineales que plagaron las técnicas de hibridación. Por lo tanto los valores de expresión se derivaban directamente de la cantidad total de alineaciones de un exón particular, dividida por su longitud¹¹⁸. Más tarde, esa medida fue mejorada por la lectura por kilobase del modelo de exón por millón de lecturas asignadas (RPKM)¹¹⁹. Sin embargo,

estos métodos y similares se ven afectados por un sesgo de secuenciación importante. Hoy en día, están apareciendo nuevos métodos de normalización para hacer frente a todos estos problemas ¹²⁰.

Nuestro protocolo de normalización utiliza la amplia experiencia acumulada en los últimos años de análisis de microarrays, donde la normalización por cuantiles ha sido el “gold standard” ¹²¹. Este enfoque evita la introducción de sesgos importantes en los genes con baja expresión, así como en aquellos con altos niveles de expresión. La calidad de nuestro método fue confirmada por una serie de pruebas biológicas.

En primer lugar, nuestros datos predijeron correctamente el sexo de todos los pacientes basándose en la expresión de los genes codificados por el cromosoma Y.

En segundo lugar, los genes cuya expresión está unida a la muestra genética se diferencian claramente con este método. Además, los datos de expresión obtenidos mediante la suma de las alineaciones de secuencia presentan una alta correlación con los datos obtenidos en las mismas muestras por qRT-PCR. Una ventaja sobresaliente de esta metodología es que muestras con profundidad de secuenciación muy diferente (desde 80.000 a más de 7.000.000 lecturas) pueden ser utilizadas para el análisis mientras que en otras metodologías deben ser desechadas con el fin de evitar sesgos ¹²².

6.4- ESTUDIOS PREVIOS DE SECUENCIACIÓN EN PTERIGIÓN

A pocos estudios anteriores se les habían aplicado técnicas de alto rendimiento para estudiar la transcriptómica del pterigión. Por ejemplo, en un estudio reciente ¹²³, la expresión de los genes del pterigión se comparó con la de la conjuntiva autóloga normal, encontrando un aumento significativo de fibronectina, CD24, MIP-4, y NGAL en el pterigión. Un trabajo reciente ¹²⁴ ha demostrado que el pterigión presenta patrones aberrantes de metilación del DNA en regiones cercanas a los genes de remodelación de la matriz tales como TGM-2, MMP-2 y CD24. Este estudio es el primero en analizar los cambios en el mRNA y en las proteínas producidas por un tratamiento antibiótico en las células del pterigión.

Las células que cultivamos fueron positivas para vimentina y negativas para marcadores epiteliales y endoteliales. Por tanto, las clasificamos como fibroblastos. Sin embargo, Dushku y Reid ¹¹³ mostraron que el pterigión se origina a partir de la alteración de las células epiteliales basales del limbo. Estas células expresan vimentina, pero no se tiñen para la queratina, por lo que estos cultivos primarios parecen representar las células características del pterigión.

6.5- ACCIONES DE LA DOXICICLINA EN LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son esenciales para mantener la vida en todos los organismos superiores, ya que mediante la cadena respiratoria proporcionan 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa en contraste con las 2 moléculas de ATP producidas por glucólisis. Cualquier problema con alguna de las numerosas enzimas usadas por las mitocondrias puede ser devastador para la célula.

El genoma mitocondrial contiene 13 genes codificantes de proteínas. Muchos de estos genes codifican proteínas de la cadena de transporte de electrones.

La doxiciclina es un inhibidor reversible de la traducción mitocondrial en bacterias ¹²⁵. La doxiciclina inhibe la unión del aminoacil-RNA transferasa en la subunidad 30S del ribosoma concluyendo de esta forma el proceso de traducción. Esta inhibición de la traducción se ha asociado con la detención del ciclo celular, la apoptosis / necrosis y el desprendimiento de las células debido a la activación de la caspasa 3, 8 y 9 ^{125, 126}.

Nuestro estudio proporciona la primera evidencia de que la doxiciclina actúa como un inhibidor selectivo de la transcripción de los genes mitocondriales. La inhibición es potente y plantea la pregunta de si el efecto de la doxiciclina como un inhibidor de la síntesis de proteína mitocondrial es debido, al menos en parte, a la inhibición de la transcripción de los genes mitocondriales codificados, además de a su unión a los ribosomas.

Sin embargo, el pretratamiento con doxiciclina ha demostrado que contrarresta la apoptosis y la respuesta de estrés del ER inducida por la doxorubicina en el corazón y tes-

título del ratón ^{125, 127, 128} probablemente a través de un mecanismo de acondicionamiento. Esto concuerda con nuestros datos que muestran el aumento de moléculas de supervivencia tales como IL-6, VEGF, p21 o RelA. Una exposición durante un breve periodo de tiempo a la doxiciclina puede provocar un daño transitorio mitocondrial y de estrés del ER que estimula a los factores de supervivencia que pueden proteger a las células del daño producido por otros fármacos. Sin embargo, en nuestro paradigma experimental los factores de supervivencia parecen estar superados por la producción de factores proapoptóticos tales como CHOP, BAX y la activación de caspasas.

6.6- VÍA DE RESPUESTA DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

El ER cumple múltiples funciones ^{128, 129}. El lumen del ER es un entorno único, que contiene la mayor concentración de calcio dentro de la célula debido al transporte activo de iones de calcio por las ATPasas. El lumen es un entorno oxidativo, crítico para la formación de enlaces disulfuro y el plegamiento correcto de las proteínas destinadas a la secreción o a la formación de la superficie celular. Debido a su papel en el plegamiento de proteínas y en el transporte, el ER es también rico en chaperones dependientes de calcio tales como el GRP78 y GRP94 calreticulina que estabilizan los intermediarios del plegamiento de las proteínas ¹³⁰. Muchos trastornos, incluidos los de regulación redox celular, causan la acumulación de proteínas desplegadas en el ER lo que provoca una activación de la UPR. La privación de glucosa también conduce al estrés del ER, al interferir con la glicosilación de las proteínas N-enlazadas. La infección viral también puede activar la UPR, lo que provoca estrés del ER con el fin de evitar la propagación del virus. Con una cierta cantidad de proteínas mal plegadas producidas en el ER se podría producir un colapso y atasco del tráfico de proteínas que puede incluso causar cuerpos de inclusión relacionados con las enfermedades neurodegenerativas, esta situación mejora por el transporte retrógrado de estas proteínas mal plegadas.

La intención inicial de la UPR es adaptarse a los cambios del entorno y restablecer la función normal del ER. Estos mecanismos de adaptación implican programas transcripcionales que inducen la expresión de genes que aumentan la capacidad de plegado de las proteínas del ER y promueven la degradación y eliminación de las proteínas mal

plegadas. La traducción de los mRNA también está inicialmente inhibida, reduciendo la llegada de nuevas proteínas al ER. Si falla la adaptación el ER envía la señal de alarma mediante la activación del NF- κ B, un factor de transcripción que induce la expresión de genes que codifican mediadores de defensa del huésped. El estrés excesivo y prolongado del ER provoca la apoptosis celular, lo que representa un último recurso de los organismos multicelulares para deshacerse de células disfuncionales.

Cuando se acumulan proteínas en el ER, la liberación de proteínas transmembrana del ER se implican en la inducción de la UPR. Estas proteínas transmembrana del ER, con su extremo N-terminal en el lumen del ER y su C-terminal en el citosol, proporcionan un puente que conecta estos dos compartimentos. Normalmente, los extremos N-terminales de estas proteínas transmembrana del ER se unen por chaperones ER GRP78 (BiP), evitando su agregación. Sin embargo, cuando las proteínas mal plegadas se acumulan se unen a la GRP78, lo que permite la agregación de estas proteínas de señalización transmembrana y la iniciación de la UPR. Entre estas proteínas de señalización transmembrana se encuentran la PERK, la Ire1 y la ATF6¹³¹(Fig.14).

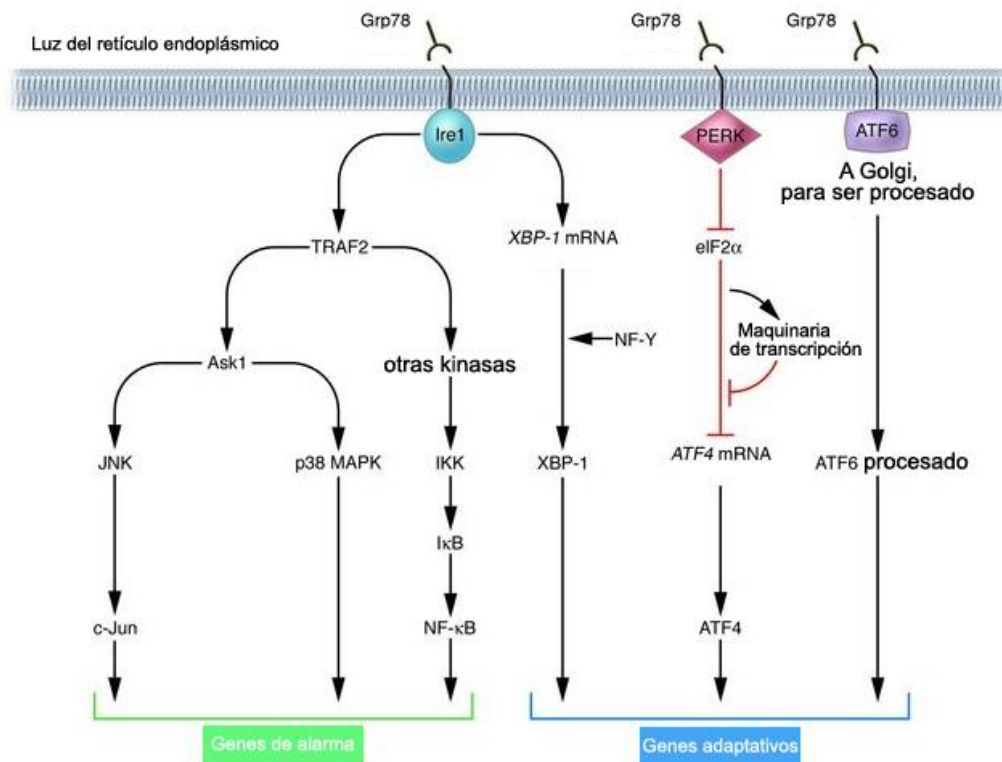


Figura 14. Esta figura muestra las señales en los eventos relacionados con el ER de estrés. La Chaperona GRP78 une los extremos N de Ire1, PERK y ATF6, impidiendo su activación. Las proteínas desplegadas provocan que las GRP78 liberen a Ire1, PERK y ATF6. Al liberarse de las GRP78, el Ire1 y la PERK se oligomerizan en las membranas del ER. La Ire1 oligomerizada se une a TRAF2, más tarde se activan las quinasas que activan NF-κB y c-Jun (AP-1), que causan la expresión de genes asociados con la defensa del huésped (alarma). La actividad de ribonucleasa intrínseca de Ire1 también estimula la producción de XBP-1, un factor de transcripción que induce la expresión de genes implicados en la restauración del plegamiento de proteínas. La oligomerización de la PERK estimula su actividad de quinasa intrínseca, lo que resulta en la fosforilación de eIF2α y la supresión de la traducción del mRNA. De esta forma, sólo los mRNAs seleccionados, incluyendo ATF4, se traducen. La ATF4 induce la expresión de genes implicados en la restauración de la homeostasis del ER. La liberación del GRP78 de la ATF6 permite a esta proteína la translocación al aparato de Golgi para el procesamiento proteolítico y liberar ATF6 activo, que controla la expresión de genes UPR. Figura adaptada de: Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(10):2656-2664. doi:10.1172/JCI26373.

La PERK (quinasa PKR del ER) es una quinasa, con el dominio compartido con otras quinasas de la familia de iniciación eucariótica 2α (eIF2α). Tras la eliminación del GRP78 se oligomeriza en la membrana del ER y se induce su autofosforilación activándose la quinasa. La PERK fosforila e inactiva la eIF2α, con lo que se ralentiza la traducción del mRNA con la consecuente reducción del número de proteínas que llegan al ER. Sin embargo, ciertos mRNA obtienen una ventaja selectiva para la traducción en

estas condiciones, incluyendo la ATF4 mRNA que codifica un factor de transcripción. La proteína ATF4 es un miembro de la familia de factores de transcripción bZIP, que regula los promotores de varios genes implicados en la UPR. La importancia de las señales PERK para la protección contra el estrés del ER ha sido documentada en varios estudios ^{131, 132}.

La Ire1 se oligomeriza, de forma similar al PERK, en las membranas del ER cuando se libera del GRP78. La proteína Ire1 α es una proteína transmembrana de tipo I, que contiene dos dominios, una quinasa y una endorribonucleasa; esta última procesa un intrón de la familia de la proteína X-1 (XBP-1) mRNA, haciéndola competente para la traducción y la producción de la proteína XBP-1. XBP-1 se heterodimeriza con la proteína NF-Y y se une a elementos que actúan en los genes, incluyendo el potenciador del estrés del ER (ERSE) y el elemento de respuesta a proteínas desplegadas (UPRE) ¹³³.

La liberación de GRP78 de la ATF6 desencadena un mecanismo diferente de activación de la proteína, en comparación con la PERK y la Ire1. En lugar de oligomerización, la liberación de GRP78 hace que el ATF6 se traslade al aparato de Golgi, donde las proteasas escinden a la ATF6 en un sitio cercano a la membrana, liberando este factor de transcripción en el citosol y permitiendo que migre hacia el núcleo a regular la expresión génica ¹³¹. La ATF6 colabora con la Ire1, donde la ATF6 induce la transcripción para aumentar XBP-1 mRNA, y la actividad de la endorribonucleasa.

La producción masiva de glicoproteínas se asocia con muchas infecciones virales, por ello no es sorprendente que el estrés del ER active las mismas vías de transducción de señal asociadas con la inmunidad innata. En este sentido, la Ire1 tiene en común con muchos miembros de la familia de receptores de TNF la capacidad de unirse al adaptador de proteína TRAF2. La TRAF2 es una ligasa E3 que se une al UBC13 ¹³⁴. La TRAF2 activa las quinasas implicadas en la inmunidad y la inflamación, incluyendo la ASK1, que activa la JNK, y las quinasas relacionadas con la activación del NF- κ B.

La respuesta de adaptación a las proteínas mal plegadas en el ER proporciona protección contra la muerte celular, ya que la transferencia de genes mediada por la sobreexpresión de GRP78 reduce la muerte celular inducida por el estrés oxidativo, por las alteraciones en el calcio y por la hipoxia. Sin embargo, si el mal plegamiento de proteínas es persistente o excesivo, el ER desencadena la muerte celular, generalmente por apoptosis. Existen diversos mecanismos propuestos de muerte celular inducida por el

estrés del ER, que incluyen la activación directa de las proteasas, de las quinasas, de los factores de transcripción, de las proteínas de la familia Bcl-2 o por sus moduladores.

6.7- LA MATRIZ EXTRACELULAR Y LAS INTEGRINAS

Las integrinas son una superfamilia de glicoproteínas que participan mayoritariamente en la unión de las células con la matriz extracelular, aunque hay algunas que también participan en la unión célula-célula. Están presentes en la superficie celular en elevadas concentraciones.

Fundamentalmente son receptores de membrana y son componentes mayoritarios de la matriz extracelular. Algunas de estas integrinas pueden ser específicas para una sola molécula, pero en cambio hay otras que pueden reconocer diferentes ligandos.

Las integrinas asocian la matriz extracelular con el citoesqueleto de la célula. El tipo de ligando que se unirá a una u otra integrina vendrá dado por el tipo de subunidades α y β que posea la integrina. Entre los múltiples ligandos de las integrinas se encuentran la fibronectina, la vitronectina, el colágeno y la laminina. La conexión entre la célula y la matriz extracelular podría ayudar a que la célula soporte fuerzas de empuje sin ser arrancada de la matriz.

El anclaje de la célula a la matriz extracelular es un requerimiento básico para la formación de un organismo pluricelular. Las integrinas no son simples garfios, sino que transmiten numerosas señales claves sobre el entorno que rodea a la célula. Junto con las señales recibidas por los receptores celulares para factores de crecimiento solubles como VEGF o EGF, refuerzan la capacidad de la célula a la hora de tomar decisiones biológicas: moverse, ser anclada, morir, diferenciarse, etc. Por ello, las integrinas se encuentran en el centro de multitud de procesos biológicos. El anclaje de la célula se produce a través de la formación de complejos de adhesión celular, que se componen de integrinas y otras muchas proteínas citoplásmicas tales como la talina, vinculina, paxilina y α -actinina. Dicho anclaje es regulado por quinasas tales como la FAK (quinasa de adhesión focal) y los miembros de la familia Src quinasa, que fosforilan ciertos sustratos como la p130CAS, dando lugar al reclutamiento de adaptadores de señalización del tipo CRK. Estos complejos de adhesión se anclan al citoesqueleto de actina.

Las integrinas juegan un papel crucial en la señalización celular. La conexión con los componentes de la matriz extracelular pueden causar una señal que será transmitida al interior celular por medio de una quinasa que se encuentra indirecta y temporalmente conectada con el extremo intracelular de la integrina, probablemente recibiendo los cambios conformacionales inducidos por la unión con componentes de la matriz extracelular ¹³⁵.

Los receptores de las integrinas y las mismas integrinas regulan muchos aspectos de la fisiología celular, siendo de particular importancia en la adhesión celular y la migración. En un epitelio normal, las α / β integrinas funcionan como receptores para la familia de laminina, proteínas de la matriz extracelular (como la laminina 1 y la laminina 5) y median en la unión estable de las células epiteliales a la membrana basal subyacente.

La función de algunas integrinas, como la integrina $\alpha 6 / \beta 4$, se altera sustancialmente a medida que el epitelio normal sufre una transformación maligna y evoluciona a carcinoma invasivo. La señal de cooperación entre las integrinas y los homólogos eritroblásticos 2 y 3 (ErbB2 y ErbB3) son necesarias para promover la activación del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Esta activación está mediada por GAB1 ¹³⁶. La integrina $\alpha 6 / \beta 4$ también puede formar complejos con receptores específicos de señalización del factor de crecimiento que actúan sinérgicamente para activar PI3K ¹³⁶.

En nuestros experimentos, el tratamiento con doxiciplina disminuye la expresión de múltiples factores implicados en la interacción entre la célula y la membrana extracelular, incluyendo ligandos tales como la laminina 1, la laminina 5 y la THBS1, también las integrinas $\beta 1$ y ErbB3, mediadores intracelulares como vinculina, GAB1, PI3K, p85 y EIF4E3, lo que sugiere que la anoikis puede ser otro mecanismo por el cual la doxiciplina ejerce su acción sobre las células de pterigión.

6.8- FACTORES DE CRECIMIENTO E INTERLEUQUINAS

Varios factores de crecimiento como el VEGF, el MANF e interleuquinas como la IL-6 se encuentran elevados en las células del pterigión expuestas a doxiciclina.

El VEGF ha atraído mucha atención en el estudio de las lesiones de pterigión, ya que son lesiones muy vascularizadas y el aumento del VEGF en el pterigión se ha apreciado claramente comparándolo con la conjuntiva normal ⁷⁴. Además, las mujeres con un polimorfismo en el gen VEGF (VEGF-460C) tienen un riesgo 2,5 veces mayor de desarrollar pterigión ¹³⁷. Estas observaciones fueron fundamentales en el diseño de ensayos clínicos en los que utilizó bevacizumab, un anticuerpo humanizado contra el VEGF, para tratar el pterigión ⁸⁹. El hecho de que en los resultados del tratamiento con doxiciclina aparezca una mayor expresión del VEGF sugiere que esto puede ser una reacción compensatoria de las células cuya supervivencia se ve comprometida por la disminución en la síntesis de proteínas mitocondriales y del incremento del estrés del ER.

En la misma línea, el MANF no sólo actúa como un factor de crecimiento de los astrocitos y otras células nerviosas, sino también como un factor protector contra el estrés del ER ¹³⁸. Como existe un aumento enorme en los genes relacionados con la respuesta del estrés del ER al tratamiento con doxiciclina, la expresión del MANF se puede interpretar como un intento de compensar estas circunstancias perjudiciales.

La IL-6 es una citoquina proinflamatoria que aparece en el pterigión por exposición a la luz UV y podría ser parte de la vía patológica que conduce a la formación de la lesión ²⁶. La elevación de esta citoquina se relaciona con un aumento de la angiogénesis, la proliferación celular, el potencial de invasión y la inflamación. La elevación de los niveles de IL-6 después del tratamiento con doxiciclina puede ser también parte del programa de supervivencia de las células de pterigión que se enfrenten a las duras condiciones creadas por el antibiótico.

6.9- DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR

La doxiciclina ha demostrado que detiene el ciclo celular, aunque este efecto es dependiente de la línea celular estudiada¹³⁹. Del mismo modo, la inducción de la expresión del gen p53 en las células cancerosas puede llevar a detener el ciclo celular y a la apoptosis. Además, la expresión de la molécula proapoptótica BAX es regulada después de un aumento en los niveles de p53⁷. Parece ser que el tratamiento con doxiciclina en el cultivo del pterigión aumenta la expresión de p53 y otras moléculas que regulan el ciclo celular tales como CDKs CDKN1A y CDK2AP2, así como la proteína proapoptótica BAX, proporcionando un mecanismo adicional a los cambios observados.

7- CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta la limitación del bajo tamaño muestral creemos que podemos obtener las siguientes conclusiones:

La doxiciclina administrada por vía oral parece ser más eficaz en la raza caucásica.

El tratamiento con doxiciclina oral se ha manifestado ineficaz en personas de raza hispana.

El análisis transcriptómico de cultivos primarios de pterigión expuestos a la doxiciclina ha detectado la existencia de 332 genes cuya expresión se modifica significativamente de forma dependiente de la dosis.

El grupo de genes más afectado por la doxiciclina incluye la práctica totalidad de los genes con expresión mitocondrial, identificando a la mitocondria como la diana central del antibiótico en las células eucariotas.

Otra vía fuertemente regulada por la doxiciclina es la que regula la respuesta al estrés del ER, originando inicialmente una respuesta de supervivencia que se transforma en inducción de apoptosis a concentraciones altas o largo tiempo de exposición.

Los genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular, y el ciclo celular, así como factores de crecimiento y/o angiogénesis también están modificados por la exposición a la doxiciclina.

Todos estos genes afectados por la doxiciclina están implicados en rutas muy importantes en la viabilidad celular, lo que clínicamente condiciona una disminución del tamaño del pterigión en nuestro estudio.

En conjunto, estos resultados indican que la doxiciclina puede ser un buen tratamiento por sí solo o en combinación con otros medicamentos en el tratamiento del pterigión.

En resumen, el efecto de la doxiciclina en el pterigión parece dependiente de la raza y la edad del paciente, siendo más eficaz en personas de ascendencia caucásica y de edad avanzada.

8- IMPLICACIONES CLÍNICAS

Tras este estudio y valorando los resultados sabemos que la doxiciclina actúa en la estructura molecular del pterigión, especialmente en caucásicos, y clínicamente parece disminuir también el tamaño del pterigión con lo que se abren nuevas expectativas de tratamiento de esta patología.

Sería interesante seguir investigando en esta línea por lo que tenemos en proyecto realizar otro estudio administrando doxiciclina tópica a un grupo de paciente con pterigión y valorar su evolución. Queremos saber si el fármaco sería tan efectivo a nivel tópico como sistémico y si de esta manera evitaríamos los efectos secundarios de la vía oral.

A parte de las implicaciones clínicas en los pacientes de pterigión también podría ser interesante iniciar nuevas investigaciones en otras patologías que puedan beneficiarse de las alteraciones descritas por la doxiciclina a nivel molecular.

9- BIBLIOGRAFÍA

1. Balci M, Sahin S, Mutlu FM, Yagci R, Karanci P, Yildiz M. Investigation of oxidative stress in pterygium tissue. *Mol Vis* 2011;17:443-447.
2. Festoff BW, Ameenuddin S, Arnold PM, Wong A, Santacruz KS, Citron BA. Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *J Neurochem* 2006;97(5):1314-1326.
3. Kim HS, Suh YH. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res* 2009;196(2):168-179.
4. Zhu H, Sun X, Wang D, Hu N, Zhang Y. Doxycycline ameliorates aggregation of collagen and atrial natriuretic peptide in murine post-infarction heart. *Eur J Pharmacol* 2015;754:66-72.
5. Casas C, Paul C, Lahfa M et al. Quantification of *Demodex folliculorum* by PCR in rosacea and its relationship to skin innate immune activation. *Exp Dermatol* 2012;21(12):906-910.
6. Korting HC, Schollmann C. Tetracycline actions relevant to rosacea treatment. *Skin Pharmacol Physiol* 2009;22(6):287-294.
7. Cox CA, Amaral J, Salloum R et al. Doxycycline's effect on ocular angiogenesis: an in vivo analysis. *Ophthalmology* 2010;117(9):1782-1791.
8. Bradley JC, Yang W, Bradley RH, Reid TW, Schwab IR. The science of pterygia. *Br J Ophthalmol* 2010;94(7):815-820.
9. Solomon A, Li DQ, Lee SB, Tseng SC. Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase-type plasminogen activator in primary pterygium body fibroblasts by inflammatory cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(8):2154-2163.
10. Tan DT, Chee SP, Dear KB, Lim AS. Effect of pterygium morphology on pterygium recurrence in a controlled trial comparing conjunctival autografting with bare sclera excision. *Arch Ophthalmol* 1997;115(10):1235-1240.
11. Bai H, Teng Y, Wong L, Jhanji V, Pang CP, Yam GH. Proliferative and migratory aptitude in pterygium. *Histochem Cell Biol* 2010;134(5):527-535.
12. Chen T, Ding L, Shan G, Ke L, Ma J, Zhong Y. Prevalence and racial differences in pterygium: a cross-sectional study in han and uygur adults in xinjiang, china. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(2):1109-1117.
13. Liu L, Wu J, Geng J, Yuan Z, Huang D. Geographical prevalence and risk factors for pterygium: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2013;3(11):e003787.
14. Lu J, Wang Z, Lu P et al. Pterygium in an aged Mongolian population: a population-based study in China. *Eye (Lond)* 2009;23(2):421-427.
15. Durkin SR, Abhary S, Newland HS, Selva D, Aung T, Casson RJ. The prevalence, severity and risk factors for pterygium in central Myanmar: the Meiktila Eye Study. *Br J Ophthalmol* 2008;92(1):25-29.
16. Viso E, Gude F, Rodriguez-Ares MT. Prevalence of pinguecula and pterygium in a general population in Spain. *Eye (Lond)* 2011;25(3):350-357.
17. Sun LP, Lv W, Liang YB et al. The prevalence of and risk factors associated with pterygium in a rural adult Chinese population: the Handan Eye Study. *Ophthalmic Epidemiol* 2013;20(3):148-154.
18. Ang M, Li X, Wong W et al. Prevalence of and racial differences in pterygium: a multiethnic population study in Asians. *Ophthalmology* 2012;119(8):1509-1515.
19. Nangia V, Jonas JB, Nair D, Saini N, Nangia P, Panda-Jonas S. Prevalence and associated factors for pterygium in rural agrarian central India. The central India eye and medical study. *PLoS One* 2013;8(12):e82439.
20. West S, Munoz B. Prevalence of pterygium in Latinos: Proyecto VER. *Br J Ophthalmol* 2009;93(10):1287-1290.
21. Li Z, Cui H. Prevalence and associated factors for pterygium in a rural adult population (the Southern Harbin Eye Study). *Cornea* 2013;32(6):806-809.

22. Rong SS, Peng Y, Liang YB, Cao D, Jhanji V. Does cigarette smoking alter the risk of pterygium? A systematic review and meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(10):6235-6243.
23. Chui J, Di GN, Wakefield D, Coroneo MT. The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications. *Ocul Surf* 2008;6(1):24-43.
24. Liu T, Liu Y, Xie L, He X, Bai J. Progress in the pathogenesis of pterygium. *Curr Eye Res* 2013;38(12):1191-1197.
25. Ooi JL, Sharma NS, Sharma S et al. Ultraviolet fluorescence photography: patterns in established pterygia. *Am J Ophthalmol* 2007;143(1):97-101.
26. Di Girolamo, 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;47(6):2430-2437.
27. Torres J, Enriquez-de-Salamanca A, Fernandez I et al. Activation of MAPK signaling pathway and NF-kappaB activation in pterygium and ipsilateral pterygium-free conjunctival specimens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(8):5842-5852.
28. Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008;8(11):837-848.
29. Chen PL, Yeh KT, Tsai YY et al. XRCC1, but not APE1 and hOGG1 gene polymorphisms is a risk factor for pterygium. *Mol Vis* 2010;16:991-996.
30. Zhu C, Pan F, Ge L et al. SERPINA3K plays antioxidant roles in cultured pterygial epithelial cells through regulating ROS system. *PLoS One* 2014;9(10):e108859.
31. Kim SW, Lee J, Lee B, Rhim T. Proteomic analysis in pterygium; upregulated protein expression of ALDH3A1, PDIA3, and PRDX2. *Mol Vis* 2014;20:1192-1202.
32. Liang K, Jiang Z, Ding BQ, Cheng P, Huang DK, Tao LM. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Mol Vis* 2011;17:1687-1693.
33. Kase S, Takahashi S, Sato I, Nakanishi K, Yoshida K, Ohno S. Expression of p27(KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium. *Br J Ophthalmol* 2007;91(7):958-961.
34. Leber B, Lin J, Andrews DW. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* 2007;12(5):897-911.
35. Nubile M, Curcio C, Lanzini M et al. Expression of CREB in primary pterygium and correlation with cyclin D1, ki-67, MMP7, p53, p63, Survivin and Vimentin. *Ophthalmic Res* 2013;50(2):99-107.
36. Maxia C, Perra MT, Demurtas P et al. Expression of survivin protein in pterygium and relationship with oxidative DNA damage. *J Cell Mol Med* 2008;12(6A):2372-2380.
37. Maxia C, Perra MT, Demurtas P et al. Relationship between the expression of cyclooxygenase-2 and survivin in primary pterygium. *Mol Vis* 2009;15:458-463.
38. Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J* 2010;430(2):199-205.
39. Xu YX, Zhang LY, Zou DL et al. Differential expression and function of survivin during the progress of pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(12):8480-8487.
40. Zhang LW, Chen BH, Xi XH, Han QQ, Tang LS. Survivin and p53 expression in primary and recurrent pterygium in Chinese patients. *Int J Ophthalmol* 2011;4(4):388-392.
41. Muller PA, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol* 2011;192(2):209-218.
42. Smith ML, Kumar MA. The "Two faces" of Tumor Suppressor p53-revisited. *Mol Cell Pharmacol* 2010;2(3):117-119.

43. Mallet JD, Rochette PJ. Ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in rabbit eyes. *Photochem Photobiol* 2011;87(6):1363-1368.
44. Cimpean AM, Sava MP, Raica M. DNA damage in human pterygium: one-shot multiple targets. *Mol Vis* 2013;19:348-356.
45. Chui J, Coroneo MT, Tat LT, Crouch R, Wakefield D, Di GN. Ophthalmic pterygium: a stem cell disorder with premalignant features. *Am J Pathol* 2011;178(2):817-827.
46. Chiang CC, Tsai YY, Bau DT et al. Pterygium and genetic polymorphisms of the DNA repair enzymes XRCC1, XPA, and XPD. *Mol Vis* 2010;16:698-704.
47. Rahmanzadeh R, Huttmann G, Gerdes J, Scholzen T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif* 2007;40(3):422-430.
48. Tong L. Expression of p27(KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium. *Br J Ophthalmol* 2008;92(1):157.
49. Tsai YY, Bau DT, Chiang CC, Cheng YW, Tseng SH, Tsai FJ. Pterygium and genetic polymorphism of DNA double strand break repair gene Ku70. *Mol Vis* 2007;13:1436-1440.
50. Kuo CH, Miyazaki D, Yakura K, Araki-Sasaki K, Inoue Y. Role of periostin and interleukin-4 in recurrence of pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(1):139-143.
51. Luo H, Chen Z, Jin H et al. Cyclooxygenase-2 up-regulates vascular endothelial growth factor via a protein kinase C pathway in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:6.
52. Toomey DP, Murphy JF, Conlon KC. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. *Surgeon* 2009;7(3):174-180.
53. Yanni SE, McCollum GW, Penn JS. Genetic deletion of COX-2 diminishes VEGF production in mouse retinal Muller cells. *Exp Eye Res* 2010;91(1):34-41.
54. Zhu YM, Azahri NS, Yu DC, Woll PJ. Effects of COX-2 inhibition on expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in lung cancer cells. *BMC Cancer* 2008;8:218.
55. Chiang CC, Cheng YW, Lin CL et al. Cyclooxygenase 2 expression in pterygium. *Mol Vis* 2007;13:635-638.
56. Adiguzel U, Karabacak T, Sari A, Oz O, Cinel L. Cyclooxygenase-2 expression in primary and recurrent pterygium. *Eur J Ophthalmol* 2007;17(6):879-884.
57. Karahan N, Baspinar S, Ciris M, Baydar CL, Kapucuoglu N. Cyclooxygenase-2 expression in primary and recurrent pterygium. *Indian J Ophthalmol* 2008;56(4):279-283.
58. Park CY, Choi JS, Lee SJ, Hwang SW, Kim EJ, Chuck RS. Cyclooxygenase-2-expressing macrophages in human pterygium co-express vascular endothelial growth factor. *Mol Vis* 2011;17:3468-3480.
59. Miao R, Liu N, Wang Y et al. Coexpression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in gastrointestinal stromal tumor: possible relations to pathological parameters and clinical behavior. *Hepatogastroenterology* 2008;55(88):2012-2015.
60. Zhang XH, Huang DP, Guo GL et al. Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer* 2008;8:4.
61. Jain S, Chakraborty G, Raja R, Kale S, Kundu GC. Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68(19):7750-7759.
62. Tong L, Li J, Chew J, Tan D, Beuerman R. Phospholipase D in the human ocular surface and in pterygium. *Cornea* 2008;27(6):693-698.
63. Hou A, Lan W, Law KP et al. Evaluation of global differential gene and protein expression in primary Pterygium: S100A8 and S100A9 as possible drivers of a signaling network. *PLoS One* 2014;9(5):e97402.
64. Riau AK, Wong TT, Beuerman RW, Tong L. Calcium-binding S100 protein expression in pterygium. *Mol Vis* 2009;15:335-342.

65. Tong L, Lan W, Lim RR, Chaurasia SS. S100A proteins as molecular targets in the ocular surface inflammatory diseases. *Ocul Surf* 2014;12(1):23-31.
66. Zhou L, Beuerman RW, Ang LP et al. Elevation of human alpha-defensins and S100 calcium-binding proteins A8 and A9 in tear fluid of patients with pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(5):2077-2086.
67. Awdeh RM, DeStafeno JJ, Blackmon DM, Cummings TJ, Kim T. The presence of T-lymphocyte subpopulations (CD4 and CD8) in pterygia: evaluation of the inflammatory response. *Adv Ther* 2008;25(5):479-487.
68. Tekelioglu Y, Turk A, Avunduk AM, Yulug E. Flow cytometrical analysis of adhesion molecules, T-lymphocyte subpopulations and inflammatory markers in pterygium. *Ophthalmologica* 2006;220(6):372-378.
69. Kase S, Osaki M, Sato I et al. Immunolocalisation of E-cadherin and beta-catenin in human pterygium. *Br J Ophthalmol* 2007;91(9):1209-1212.
70. Kato N, Shimmura S, Kawakita T et al. Beta-catenin activation and epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(4):1511-1517.
71. John-Aryankalayil M, Dushku N, Jaworski CJ et al. Microarray and protein analysis of human pterygium. *Mol Vis* 2006;12:55-64.
72. Ribatti D, Nico B, Perra MT et al. Correlation between NGF/TrkA and microvascular density in human pterygium. *Int J Exp Pathol* 2009;90(6):615-620.
73. Peng ML, Tsai YY, Tung JN et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and protein expression in the pathogenesis of pterygium. *Br J Ophthalmol* 2014;98(4):556-561.
74. Tsai YY, Chiang CC, Bau DT et al. Vascular endothelial growth factor gene 460 polymorphism is associated with pterygium formation in female patients. *Cornea* 2008;27(4):476-479.
75. Hong S, Choi JY, Lee HK et al. Expression of neurotrophic factors in human primary pterygeal tissue and selective TNF-alpha-induced stimulation of ciliary neurotrophic factor in pterygeal fibroblasts. *Exp Toxicol Pathol* 2008;60(6):513-520.
76. Aspiotis M, Tsanou E, Gorezis S et al. Angiogenesis in pterygium: study of microvessel density, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1. *Eye (Lond)* 2007;21(8):1095-1101.
77. Lee JK, Song YS, Ha HS et al. Endothelial progenitor cells in pterygium pathogenesis. *Eye (Lond)* 2007;21(9):1186-1193.
78. Labbe A, Gheck L, Iordanidou V, Mehanna C, Brignole-Baudouin F, Baudouin C. An in vivo confocal microscopy and impression cytology evaluation of pterygium activity. *Cornea* 2010;29(4):392-399.
79. Papadia M, Barabino S, Valente C, Rolando M. Anatomical and immunological changes of the cornea in patients with pterygium. *Curr Eye Res* 2008;33(5):429-434.
80. Yang SF, Lin CY, Yang PY, Chao SC, Ye YZ, Hu DN. 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(10):4588-4596.
81. Peiretti E, Dessi S, Mulas MF, Abete C, Galantuomo MS, Fossarello M. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit altered lipid metabolism characteristics. *Exp Eye Res* 2006;83(3):536-542.
82. Woods M, Chow S, Heng B et al. Detecting human papillomavirus in ocular surface diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(13):8069-8078.
83. Chen YF, Hsiao CH, Ngan KW et al. Herpes simplex virus and pterygium in Taiwan. *Cornea* 2008;27(3):311-313.
84. Tsai YY, Chang CC, Chiang CC et al. HPV infection and p53 inactivation in pterygium. *Mol Vis* 2009;15:1092-1097.

85. Anguria P, Kitinya J, Ntuli S, Carmichael T. The role of heredity in pterygium development. *Int J Ophthalmol* 2014;7(3):563-573.
86. Chui J, Di GN, Coroneo MT, Wakefield D. The role of substance P in the pathogenesis of pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(10):4482-4489.
87. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy findings of Thygeson superficial punctate keratitis. *Cornea* 2011;30(6):675-680.
88. Bock F, Onderka J, Dietrich T et al. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(6):2545-2552.
89. Mauro J, Foster CS. Pterygia: pathogenesis and the role of subconjunctival bevacizumab in treatment. *Semin Ophthalmol* 2009;24(3):130-134.
90. Kandavel R, Kang JJ, Memarzadeh F, Chuck RS. Comparison of pterygium recurrence rates in Hispanic and white patients after primary excision and conjunctival autograft. *Cornea* 2010;29(2):141-145.
91. Ramalho FS, Maestri C, Ramalho LN, Ribeiro-Silva A, Romao E. Expression of p63 and p16 in primary and recurrent pterygia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244(10):1310-1314.
92. Kuo CH, Miyazaki D, Nawata N et al. Prognosis-determinant candidate genes identified by whole genome scanning in eyes with pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(8):3566-3575.
93. Kaufman SC, Jacobs DS, Lee WB, Deng SX, Rosenblatt MI, Shtein RM. Options and adjuvants in surgery for pterygium: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2013;120(1):201-208.
94. Ozer A, Yildirim N, Erol N, Yurdakul S. Long-term results of bare sclera, limbal-conjunctival autograft and amniotic membrane graft techniques in primary pterygium excisions. *Ophthalmologica* 2009;223(4):269-273.
95. Ozulken K, Koc M, Ayar O, Hasiripi H. Topical cyclosporine A administration after pterygium surgery. *Eur J Ophthalmol* 2012;22 Suppl 7:S5-10.
96. Turan-Vural E, Torun-Acar B, Kivanc SA, Acar S. The effect of topical 0.05% cyclosporine on recurrence following pterygium surgery. *Clin Ophthalmol* 2011;5:881-885.
97. Fallah MR, Golabdar MR, Amozadeh J, Zare MA, Moghimi S, Fakhraee G. Transplantation of conjunctival limbal autograft and amniotic membrane vs mitomycin C and amniotic membrane in treatment of recurrent pterygium. *Eye (Lond)* 2008;22(3):420-424.
98. Ibanez M, Eugarríos MF, Calderon DI. Topical cyclosporin A and mitomycin C injection as adjunctive therapy for prevention of primary pterygium recurrence. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2009;40(3):239-244.
99. Golub LM, Lee HM, Stoner JA et al. Subantimicrobial-dose doxycycline modulates gingival crevicular fluid biomarkers of periodontitis in postmenopausal osteopenic women. *J Periodontol* 2008;79(8):1409-1418.
100. Lipowsky HH, Lescanic A. The effect of doxycycline on shedding of the glycocalyx due to reactive oxygen species. *Microvasc Res* 2013;90:80-85.
101. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 2012;24(6):1297-1305.
102. Munoz-Pinedo C. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Adv Exp Med Biol* 2012;738:124-143.
103. Vega-Naredo I, Cunha-Oliveira T, Serafim TL, Sardao VA, Oliveira PJ. Analysis of pro-apoptotic protein trafficking to and from mitochondria. *Methods Mol Biol* 2015;1241:163-180.
104. Renault TT, Floros KV, Elkholi R et al. Mitochondrial shape governs BAX-induced membrane permeabilization and apoptosis. *Mol Cell* 2015;57(1):69-82.
105. Funk JA, Schnellmann RG. Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302(7):F853-F864.

106. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299(3):C539-C548.
107. Dan L, Shi-long Y, Miao-li L et al. Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Curr Eye Res* 2008;33(8):653-660.
108. Hourri-Haddad Y, Halabi A, Soskolne WA. Inflammatory response to chlorhexidine, minocycline HCl and doxycycline HCl in an in vivo mouse model. *J Clin Periodontol* 2008;35(9):783-788.
109. Smith VA, Khan-Lim D, Anderson L, Cook SD, Dick AD. Does orally administered doxycycline reach the tear film?. *Br J Ophthalmol* 2008;92(6):856-859.
110. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H et al. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics* 2010;26(22):2927-2928.
111. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101-1108.
112. Coroneo M. Ultraviolet radiation and the anterior eye. *Eye Contact Lens* 2011;37(4):214-224.
113. Dushku N, John MK, Schultz GS, Reid TW. Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Arch Ophthalmol* 2001;119(5):695-706.
114. Landers J, Henderson T, Craig J. Prevalence of pterygium in indigenous Australians within central Australia: the Central Australian Ocular Health Study. *Clin Experiment Ophthalmol* 2011;39(7):604-606.
115. Stieger K, Mendes-Madeira A, Meur GL et al. Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases. *Gene Ther* 2007;14(23):1668-1673.
116. Chhipa RR, Singh S, Surve SV, Vijayakumar MV, Bhat MK. Doxycycline potentiates antitumor effect of cyclophosphamide in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;202(3):268-277.
117. Welch MN, Reilly CD, Kalwerisky K, Johnson A, Waller SG. Pterygia measurements are more accurate with anterior segment optical coherence tomography - a pilot study. *Nepal J Ophthalmol* 2011;3(1):9-12.
118. Morin R, Bainbridge M, Fejes A et al. Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *Biotechniques* 2008;45(1):81-94.
119. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 2008;5(7):621-628.
120. Bullard JH, Purdom E, Hansen KD, Dudoit S. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 2010;11:94.
121. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4(2):249-264.
122. Tarazona S, Garcia-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res* 2011;21(12):2213-2223.
123. Tong L, Chew J, Yang H, Ang LP, Tan DT, Beuerman RW. Distinct gene subsets in pterygia formation and recurrence: dissecting complex biological phenomenon using genome wide expression data. *BMC Med Genomics* 2009;2:14.
124. Riau AK, Wong TT, Lan W et al. Aberrant DNA methylation of matrix remodeling and cell adhesion related genes in pterygium. *PLoS One* 2011;6(2):e14687.

125. Olgun A, Akman S. Mitochondrial DNA-deficient models and aging. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:241-245.
126. Sagar J, Sales K, Taanman JW, Dijk S, Winslet M. Lowering the apoptotic threshold in colorectal cancer cells by targeting mitochondria. *Cancer Cell Int* 2010;10:31.
127. Lai HC, Yeh YC, Ting CT et al. Doxycycline suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and cellular apoptosis in mouse hearts. *Eur J Pharmacol* 2010;644(1-3):176-187.
128. Yeh YC, Lai HC, Ting CT et al. Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. *Biochem Pharmacol* 2007;74(7):969-980.
129. Arnsburg K, Kirstein-Miles J. Interrelation between protein synthesis, proteostasis and life span. *Curr Genomics* 2014;15(1):66-75.
130. Gutierrez T, Simmen T. Endoplasmic reticulum chaperones and oxidoreductases: critical regulators of tumor cell survival and immunorecognition. *Front Oncol* 2014;4:291.
131. Kennedy D, Samali A, Jager R. Methods for Studying ER Stress and UPR Markers in Human Cells. *Methods Mol Biol* 2015;1292:3-18.
132. Walter F, Schmid J, Dussmann H, Concannon CG, Prehn JH. Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBP1 and PERK/ATF4 signalling rather than a switch between signalling branches determine cell survival. *Cell Death Differ* 2015.
133. Hu MC, Gong HY, Lin GH et al. XBP-1, a key regulator of unfolded protein response, activates transcription of IGF1 and Akt phosphorylation in zebrafish embryonic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359(3):778-783.
134. Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* 2010;327(5969):1135-1139.
135. Cabodi S, Di SP, Leal MP et al. Integrins and signal transduction. *Adv Exp Med Biol* 2010;674:43-54.
136. Bon G, Folgiero V, Di CS, Sacchi A, Falcioni R. Involvement of alpha6beta4 integrin in the mechanisms that regulate breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2007;9(1):203.
137. Parkash V, Lindholm P, Peranen J et al. The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDNF explains why they are bifunctional. *Protein Eng Des Sel* 2009;22(4):233-241.
138. Henderson MJ, Richie CT, Airavaara M, Wang Y, Harvey BK. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors. *J Biol Chem* 2013;288(6):4209-4225.
139. Lai PB, Chi TY, Chen GG. Different levels of p53 induced either apoptosis or cell cycle arrest in a doxycycline-regulated hepatocellular carcinoma cell line in vitro. *Apoptosis* 2007;12(2):387-393.

ANEXO I

Oral Doxycycline Reduces Pterygium Lesions; Results from a Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Trial

Oscar Rúa¹*, Ignacio M. Larráyo², María T. Barajas³, Sara Velilla¹, Alfredo Martínez^{2*}

1 Ophthalmology Service, Hospital San Pedro, Logroño, Spain, **2** Oncology Area, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain, **3** Pharmacy, Hospital San Pedro, Logroño, Spain

Abstract

Purpose: To determine whether oral doxycycline treatment reduces pterygium lesions.

Design: Double blind, randomized, placebo controlled clinical trial.

Participants: 98 adult patients with primary pterygium.

Methods: Patients were randomly assigned to receive 100 mg oral doxycycline twice a day (49 subjects), or placebo (49 subjects), for 30 days. Photographs of the lesion were taken at the time of recruitment and at the end of the treatment. Follow-up sessions were performed 6 and 12 months post-treatment. Statistical analyses for both continuous and categorical variables were applied. *p* values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Main Outcome Measures: The primary endpoint was the change in lesion size after 30 days of treatment.

Results: The primary endpoint was not met for the whole population but subgroup analysis showed that doxycycline was effective in patients of Caucasian origin while other ethnicities, mostly Hispanic, did not respond to the treatment. Moreover, there was a correlation between age and better response (*p* = 0.003). Adverse events were uncommon, mild, and in agreement with previous reports on short doxycycline treatments.

Conclusions: Oral doxycycline was superior to placebo for the treatment of primary pterygia in older Caucasian patients. These findings support the use of doxycycline for pterygium treatment in particular populations.

Trial Registration: European Union Clinical Trials Register EudraCT 2008-007178-39

Citation: Rúa O, Larráyo IM, Barajas MT, Velilla S, Martínez A (2012) Oral Doxycycline Reduces Pterygium Lesions; Results from a Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Trial. *PLoS ONE* 7(12): e52696. doi:10.1371/journal.pone.0052696

Editor: Bang V. Bui, Univeristy of Melbourne, Australia

Received: August 2, 2012; **Accepted:** November 19, 2012; **Published:** December 19, 2012

Copyright: © 2012 Rúa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Supported by a Grant from Spain's Ministry of Health, Social Policy, and Equality, No. DIN-021. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: amartinezr@riojasalud.es

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Pterygia are common, benign, tumor-like growths of the cornea [1–3]. The condition is characterized by an advancing edge of epithelial cell overgrowth with squamous metaplasia, goblet cell hyperplasia, and abnormal p53 expression [4,5]. The underlying stroma presents abundant fibrosis and rampant angiogenesis [6,7]. Without surgical intervention, these characteristically wing-shaped lesions can migrate over the central cornea and distort or obscure vision. Human pterygia express, among other factors, fibronectin, which is associated with cell adhesion and migration, as well as pro-inflammatory cytokines, angiogenic, and fibrogenic growth factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor β (TGF β), interleukin 6, interleukin 8, versican, and CD31 antigen [2,8–10]. The relevance of

angiogenesis in primary and recurrent pterygium has been recently used to conduct clinical trials with topical treatments using anti-VEGF agents [11–14]. On the other hand, no systemic treatment has been developed for this disease.

Doxycycline is an affordable bacteriostatic antibiotic that has been used safely for decades in the clinic. It has been shown that, independently of its antimicrobial effect, doxycycline can suppress the catalytic activity of many matrix metalloproteinases (MMP), including gelatinases and collagenases, and through this mechanism reduce cell migration and angiogenesis [15]. In a study using human endothelial cells, doxycycline was able to inhibit MMP activity, protein synthesis, and mRNA expression [16]. Doxycycline has also been used in several animal models of neovascularisation or tumorigenesis with very promising results [17–20]. Recently, we developed a mouse model of pterygium and

demonstrated that oral doxycycline drastically reduced pterygium lesions in this experimental model [21]. In addition, treatment of short-term pterygium cultures with doxycycline for 24 h resulted in a sharp change in expression of mitochondrial genes, activation of the endoplasmic reticulum stress response and profound changes in the expression of extracellular matrix proteins, adhesion molecules, and growth factors [22]. The very affordable economic value of this drug together with its safety profile made doxycycline a promising therapeutic candidate for the treatment of pterygium and other ocular diseases.

Here we present the results of a double blind, randomized, placebo controlled clinical trial in patients suffering from primary pterygium comparing 30 days of treatment with oral doxycycline vs. placebo. Results were very influenced by the race and age of the patients, with Caucasian and older people benefiting most from the treatment.

Materials and Methods

Ethical issues

All procedures were approved by the local review board (Comité Ético de Investigación Clínica de La Rioja, CEICLAR) and the Spanish Agency for Drugs and Medical Products (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS). All described procedures adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki. Moreover, the trial was registered in the European Union Clinical Trials Register with code number EudraCT 2008-007178-39. The protocol for this trial and supporting CONSORT checklist are available as supporting information; see Checklist S1, Protocol S1 (in Spanish), and Protocol S2 (in English).

Patients

The study was designed as a unicentric trial with patients diagnosed with primary pterygium at the Ophthalmology Service of the Hospital San Pedro (Logroño, Spain). Ninety-eight consecutive patients fulfilling inclusion criteria signed the informed consent documents and were recruited into the trial. Inclusion criteria called for patients suffering from untreated primary pterygium producing at least one of the following symptoms: i) astigmatism with no other cause, ii) foreign body sensation, and/or iii) corneal involvement threatening the visual axis. In addition, patients had to be at least 18 years old. Exclusion criteria encompassed pregnant or lactating women, fertile women not following a contraceptive plan, allergies to doxycycline, conditions where doxycycline is contraindicated such as lupus eritematosus or miastemia gravis, treatment with doxycycline incompatible drugs, and patients whose characteristics would prevent proper follow-up.

The number of patients needed on each arm of the study was estimated assuming a mean reduction of the pterygium lesion in the placebo group of 5% vs. a 15% reduction for the doxycycline group, and a maximum standard deviation of 15%. Using a Student's *t* test for 2 independent samples, a two-sided alpha level of 5%, and a power of 90%, 49 patients are needed on each arm to detect a significant difference between groups of 10% in pterygium surface reduction.

Experimental drug and placebo

Doxycycline was provided as Vibracina® 100 mg (Invicta Farma, Madrid, Spain). Capsules were extracted from their blisters and repackaged by the Hospital's Pharmacy in brown-glass bottles containing 60 capsules/each. The placebo was prepared by the Hospital's Pharmacy using empty Vibracina® capsules, that were generously provided by Invicta Farma. These capsules were filled up with lactose solution, desiccated, closed, and packaged in

brown-glass bottles (60 capsules/bottle). Each bottle (doxycycline or placebo) was assigned a randomly generated trial code and issued to patients accordingly, thus guaranteeing a double-blind masking of the trial. The dose of 200 mg/day was chosen based on the study by Smith et al. where they described this dose as the most efficient in reducing MMP activity in patients [23].

Study design and procedures

Each patient completed 4 visits to the Ophthalmology Department. On the first visit, a diagnosis of the pterygium was made and clinical history data were collected. If the patient fulfilled the inclusion criteria and none of the exclusion criteria applied to him/her, he/she was asked to be included in the trial. After signing the informed consent forms, a code was assigned to this patient for the duration of the trial. To estimate the size of the lesions, the diameter of the cornea was first measured with a compass, then a photograph was taken of the affected eye (or both in the case of bilateral pterygia) with a Zeiss FF 450 plus I.R. camera (Carl Zeiss, Meditec AG, Berlin, Germany) attached to a retinographer. The size of the pterygium lesion lining the cornea was calculated with the camera's image software package (Visupac™, Carl Zeiss), taking into consideration the compass measurement. Pterygia were classified as T1, T2 or T3, according to Tan's grading system [24]. Using his/her code, the patient was given a bottle of capsules by the Hospital's Pharmacy and the pertinent contact information in case adverse events may occur. Patients were asked to take 2 capsules a day, in the morning and the evening, for 30 consecutive days.

The second visit was scheduled 31 days after the first one, just as the patient had finished the treatment. At this time a second photograph was taken of the affected eye(s) and a general evaluation was made. After this point, the ophthalmologists performed surgical resections of the pterygia whenever the procedure was clinically indicated. In these cases, the procedure consisted in a simple resection followed by autologous conjunctival transplant and application of a fibrin-based biological glue (Tissucol, Baxter, Valencia, Spain).

The third and fourth visits occurred 6 and 12 months after the second one. The ophthalmologists performed follow-up observations and paid special care to record potential recurrences.

Objectives and outcomes

The main objective of this study was to determine whether oral doxycycline treatment can reduce pterygium growth. Thus, the primary outcome was the variation in the surface area occupied by the pterygium lesion when comparing the photographs taken during the second and the first visit. Photographs were processed with Visupac™ and ImageJ (NIH, Bethesda, MD) and the area occupied by the lesion calculated. As secondary outcome, the number of recurrences at the end of the study (4th visit) were also considered.

Statistical analysis

The variation of surface area occupied by the pterygium lesion, a continuous variable, was compared between the two experimental groups with the Student-Fisher *t* test. Normalcy was determined by the Shapiro-Wilk test. Subgroup analysis was performed using logistic regression tests. Interactions among variables were studied with backward models based on likelihood ratios. Categorical variables were compared using chi-square test. Correlation tests (Spearman's correlation coefficient) were used to compare age and response to the drug. *p* values lower than 0.05 were considered statistically significant. All these analyses were

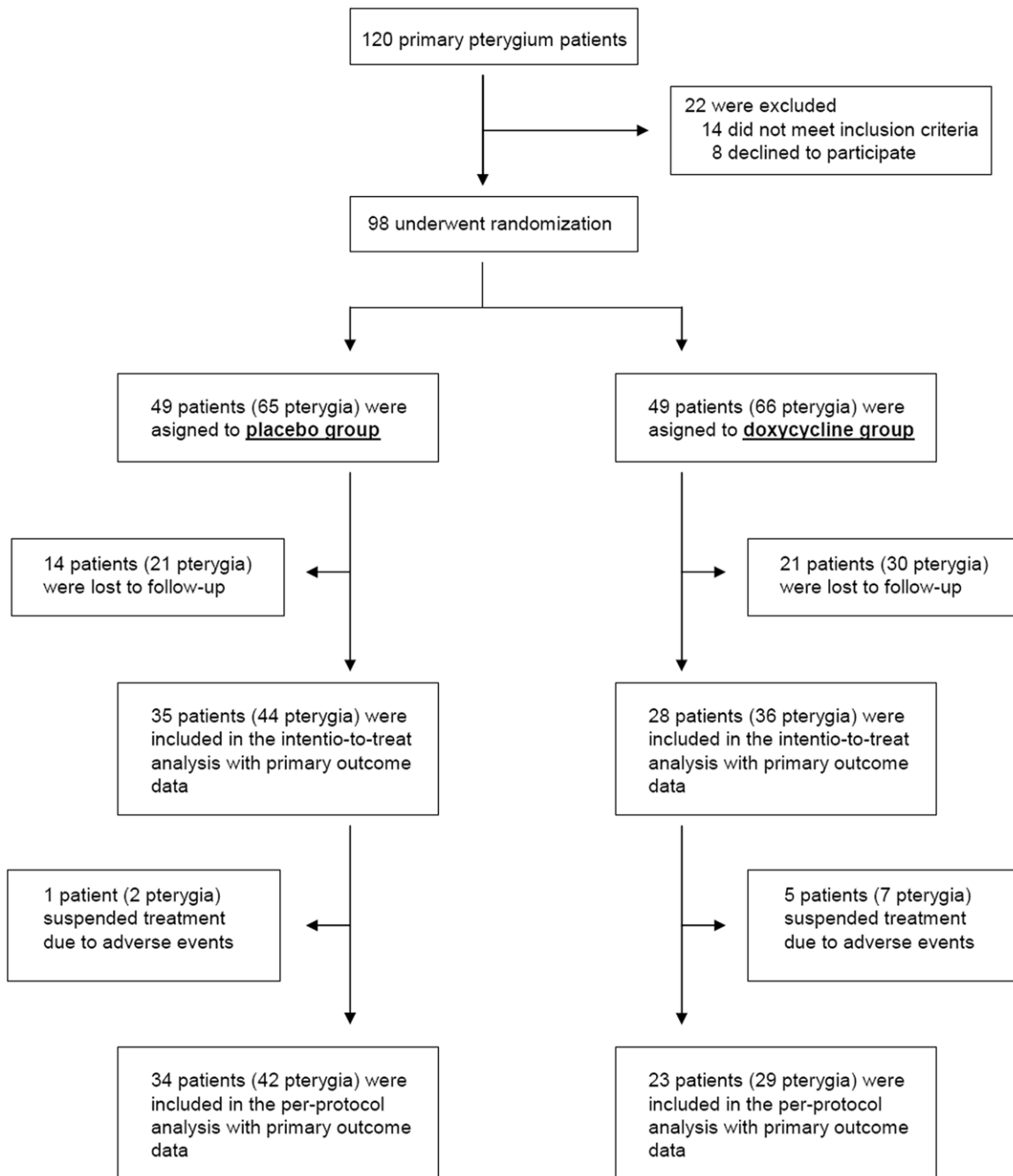


Figure 1. Consort flow diagram. The major reasons for not meeting the inclusion criteria were pregnancy (8) and being on a treatment with doxycycline incompatible drugs (6). Many patients were lost to follow-up probably due to the high number of immigrants, a very mobile population, that were enrolled in the trial. Six patients had to suspend treatment due to mild adverse events. Several patients had more than one pterygium, so the total number of pterygia is also included.
doi:10.1371/journal.pone.0052696.g001

carried out with SPSS 17.0. Both per-protocol and intention-to-treat analyses were performed.

Results

Study population and group assignments

Between October 2009 and May 2010, a total of 98 patients diagnosed with primary pterygium underwent randomization (49 in each group) at the Hospital San Pedro (Logroño, Spain). In the

per-protocol analysis, primary outcome data were available for 34 patients in the placebo group and 23 in the doxycycline-treated group (Fig. 1). Demographic and clinical characteristics at baseline were similar between the two groups (Table 1).

Adverse events

As expected for doxycycline, adverse events were minimal and resolved quickly after medication was suspended. These included 5 cases of nausea and vomit (1 placebo, 4 doxycycline), 2 cases of

Table 1. Baseline demographic and clinical characteristics of the patients enrolled in the trial.

	Placebo (n = 49)	Doxycycline (n = 49)	Statistical test	p value
Sex (male/female)	28/21	27/22	χ^2	1.00
Race or ethnic group* (Caucasian/Hispanic/Other)	19/24/6	19/25/5	χ^2	0.95
Age† [range]	51.29±1.98 [29–80]	49.71±2.14 [20–86]	t	0.59
Initial size of pterygium‡ [range]	4.65±0.39 [1.07–14.48]	5.25±0.48 [0.71–17.49]	t	0.34
Initial pterygium morphology§ (T1/T2/T3)	(9/21/19)	(6/22/21)	χ^2	0.69

*Race or ethnic group was self-reported.

†Plus-minus values are means ± E.

‡Pterygium size is expressed in mm².

§As classified by Tan et al. [24].

doi:10.1371/journal.pone.0052696.t001

eczema (1 placebo, 1 doxycycline), and 1 case of phototoxicity (in the placebo group).

Outcomes

Photographs of the pterygium lesions were taken in the first two visits (Fig. 2). After a month of treatment, the overall data showed that pterygia that had been treated with oral doxycycline experienced a relative change (size measured in the second visit divided by size in the first visit) of 0.98±0.05, whereas in those receiving placebo the relative change was 1.01±0.03. These differences were not statistically significant when analyzing either the per-protocol (p=0.225) or the intention-to-treat (p=0.191) populations (Student’s t test).

Subgroup analysis was performed through logistic regression to investigate whether doxycycline had a beneficial effect on particular groups defined by age, sex, race, or initial lesion size and morphology. Pterygia whose relative change was ≥1 (did not change size or grew) were given the value “0” whereas those with a relative change <1 (growth reduction) were labeled as “1”. For race, patients of Caucasian origin were labeled “0”, and all others as “1”. Other variables included sex, age, initial pterygium morphology, and initial size of the pterygium lesion. A multivariate enter logistic regression (also called simultaneous regression) revealed that only “age” had an independent effect on lesion reduction (p<0.019). To test whether interactions occurred among

all these variables, a backward logistic regression model, where all independent variables are entered at one time and then they are removed one at a time based on a preset significance value, based on likelihood ratios was performed (Table 2). On the third step, age, race, and treatment were the only significant variables. When we tried to estimate the particular odds ratios, the model did not converge due to insufficient sample size, thus only the statistical significance is shown. In summary, doxycycline effect on pterygium is heavily dependent on the race and age of the patient, being more efficient on people of Caucasian descent and older age.

The effect of age on the efficacy of the doxycycline treatment was further investigated by correlation analysis. There was a positive correlation (Spearman’s r = -0.4783, 95% CI -0.7025 to -0.1678, p = 0.003) between increasing age and larger reduction of the pterygium lesion on the treated individuals. Obviously, no such correlation occurred in patients receiving placebo (Fig. 3).

The contribution of race is represented through a waterfall graph (Fig. 4) where the effect of doxycycline is clearly seen in Caucasians (Fig. 4B) but is undistinguishable from placebo in Hispanic patients (Fig. 4D). Something unexpected was the wide variation in pterygium size we observed in the placebo-treated patients (Fig. 4 A, C). Only 15 patients underwent corrective surgery during the trial period and none of these presented a relapse during the 12 months following the end of the treatment,

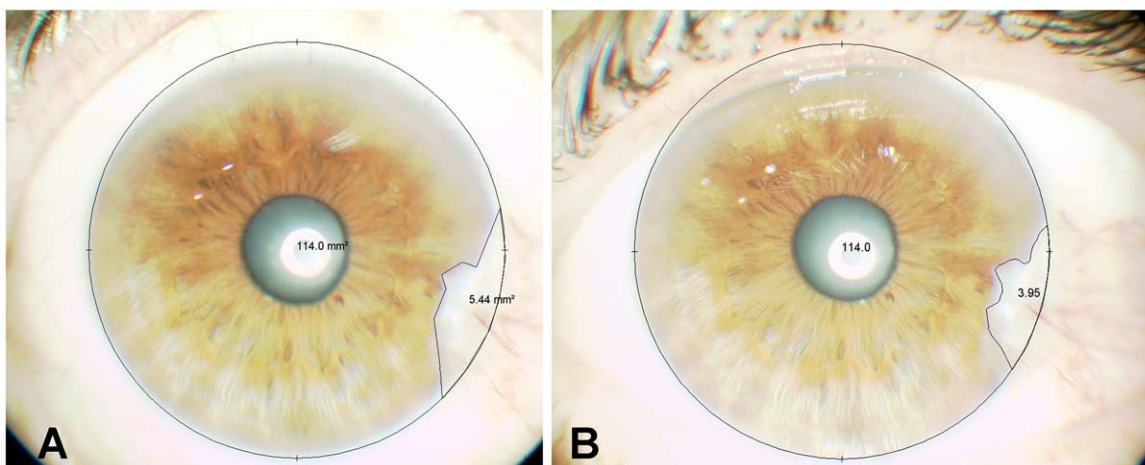


Figure 2. Photographs of the eye of patient number 20 (male, 61 year-old, Caucasian) before (A) and after (B) the treatment with doxycycline for 30 days. A clear reduction of the lesion’s size can be appreciated, from 5.44 mm² to 3.95 mm². doi:10.1371/journal.pone.0052696.g002

Table 2. Statistically significant variables in the backward logistic regression model based on likelihood ratio.

Variable	Significance level
Treatment	<0.001
Age by treatment	<0.001
Race by treatment	0.002
Age by race by treatment	0.002

doi:10.1371/journal.pone.0052696.t002

therefore not enough data was available to evaluate whether the treatment had any influence on recurrence frequency.

Discussion

In this study we have shown that oral doxycycline, given during 30 days at 200 mg/day, does modify the growth pattern of pterygium lesions in Caucasian patients, a result which is in agreement with previous observations in a mouse model [21]. Moreover, older patients responded better to the treatment.

We were surprised by the low compliance seen in this trial. In fact, only 64% of patients came back for their second visit, which was needed to allow measurement of the primary outcome. Two reasons may explain this behavior. First, not being a life-threatening disease, pterygium is often viewed as a cosmetic problem rather than a serious condition. Second, pterygium is

more prevalent in subtropical regions of the world, probably in relation with a higher UV light exposure [25]. In consequence, a large proportion of all diagnosed cases in Spain corresponds to South- and Central-American immigrants, which is a very mobile population, often depending on temporary employment. This issue should be taken into consideration for the design of future clinical trials on pterygium patients.

One of the most predictive variables of doxycycline response was race. Hispanic patients did not respond to doxycycline treatment whereas their Caucasian counterparts did. Broad differences have been reported in the prevalence of pterygium in various ethnic backgrounds [26–28]. There are also reports on different recurrence rates between Hispanic and white patients [29]. In addition, doxycycline has been shown to influence up to 332 genes when applied to pterygium cells, involving relevant cellular pathways such as mitochondrial gene expression, endoplasmic reticulum stress, integrins, extracellular matrix components, cell cycle regulators, and growth factors [21]. Any differences in these pathways among races may be responsible for their differential responses to the drug. Gene profiling studies comparing pterygia originated in Caucasian and Hispanic patients may shed some light on this unexpected behavior. In addition, studies can be designed for the study of pterygium tissue collected after surgical removal to see the differences elicited by doxycycline treatment in these patients.

There is a significant correlation between pterygium incidence and age [28,30,31] but an explanation is needed for the observation that doxycycline treatment was more efficient in older patients. Perhaps the eye of older patients becomes more

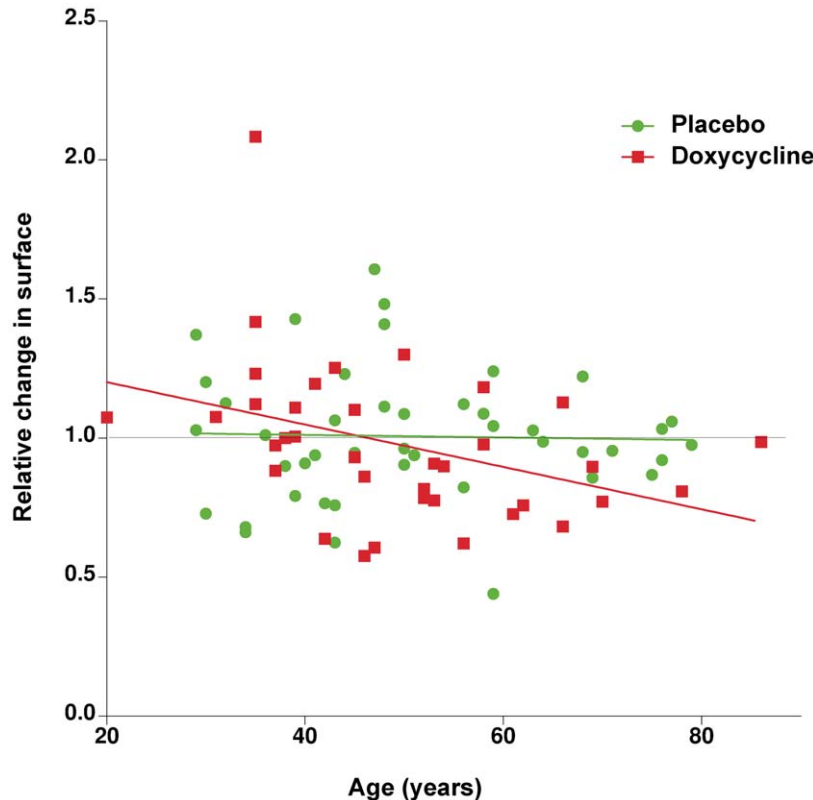


Figure 3. Correlation plot between patient’s age (abscises) and relative response to treatment (ordinates) for patients that received either placebo (green circles) or doxycycline (red squares). The green and red lines represent the correlation slope for each set. There is a significant correlation for doxycycline treatment (Spearman’s $r = -0.4783$, 95% CI -0.7025 to -0.1678 , $p = 0.003$). Relative change in surface is the quotient between the size of the lesion in the second visit divided by the size in the first visit.
doi:10.1371/journal.pone.0052696.g003

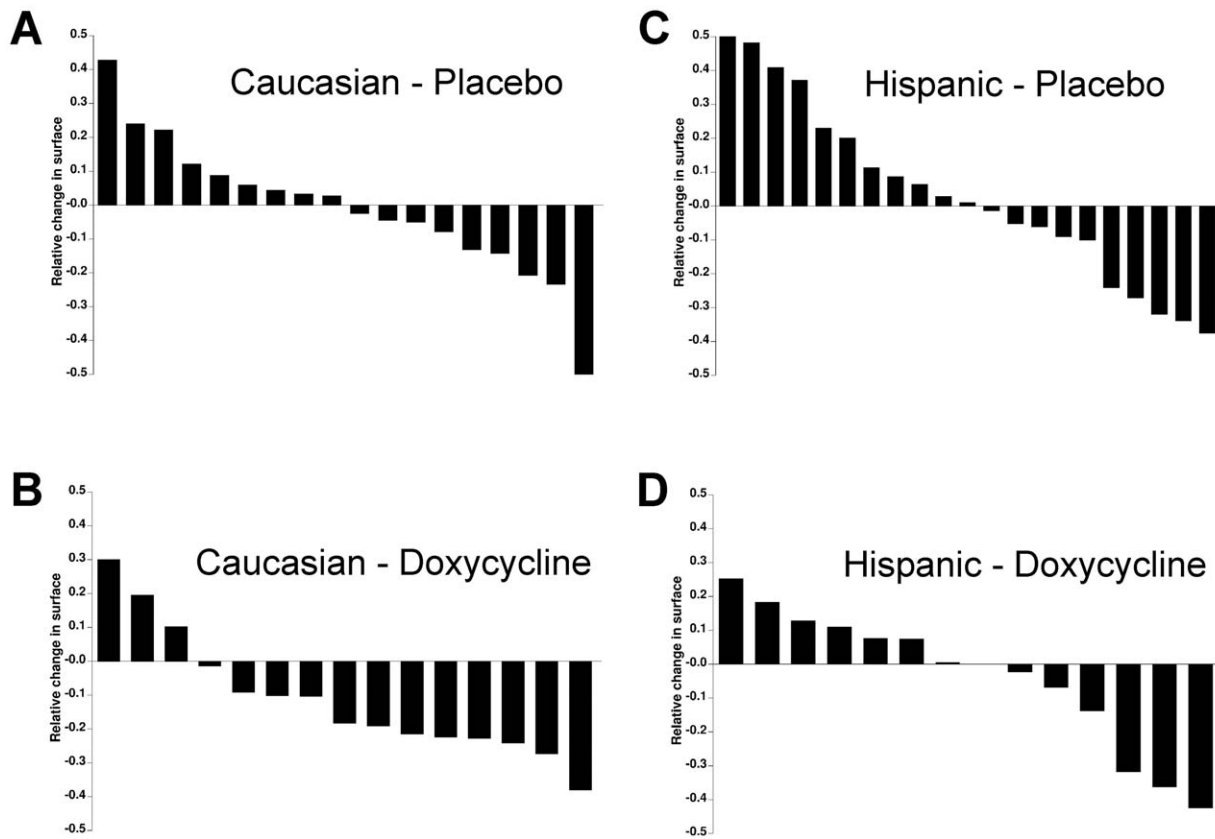


Figure 4. Waterfall representation of the relative changes in pterygium surface for all intention-to-treat patients treated with placebo (A, C) or with doxycycline (B, D), according to race. Each bar represents an individual pterygium. To comply with waterfall representation conventions, values are represented as relative change in surface minus 1, so that positive values represent lesion growth and negative values represent lesion reduction.
doi:10.1371/journal.pone.0052696.g004

permeable to systemic doxycycline, thus allowing a higher dosage on the eye surface. This may be in connection with the fact that the beneficial effect of doxycycline was much larger in mice [21] than in humans, which may be due to several reasons. First of all, the anatomy and physiology of mouse and human eyes are very different [32]. These differences include size, diurnal vs. nocturnal habits, and histological features such as a rudimentary Bowman's membrane in the mouse [33], and might influence the pharmacokinetics of an orally administered drug. There are some discrepancies on the amount of orally administered doxycycline that can reach the eye surface. For instance, in a set of patients and healthy individuals which were given oral doxycycline, the drug was easily found in the blood but the tear film was devoid of it [34]. A similar result was found in horses [35]. Nevertheless, an experiment performed in macaques found that oral administration of doxycycline was enough to induce transgene activation in the eye of these animals [36]. In the same direction, oral doxycycline was able to reduce angiogenesis in the rat cornea [19]. Therefore, there seems to be an inverse correlation between eye size and doxycycline ability to reach the outer surface of the eye. Other antibiotics encounter also some difficulties to cross the hemato-ocular barrier in humans [37]. There may be an age-dependent relaxation of this barrier or just an increase on doxycycline sensitivity in older patients.

Another unexpected observation was the ample variation in pterygium size modifications seen in placebo-treated patients. A small part of this variation may be due to measurement errors and

the difficulty to properly measure the size of pterygium lesions has been previously recognized [38]. But, apart from that, there were real changes in size in the four weeks between photographs, including both increases and decreases of the total affected area. This may represent an intrinsic feature of the biology of pterygium which had not been previously recognized. There may exist an unstable equilibrium between factors promoting pterygium growth and host defence mechanisms trying to reduce it, which results in this “wobbling” behavior. This fact should be taken into consideration for the design of future clinical trials.

In conclusion, oral doxycycline reduces pterygium lesion size in white patients and could be used as a treatment for pterygium symptoms or as a means to delay surgical resection. In this trial we have used a systemic treatment to follow our previous experience on an animal model [21] but topical application of doxycycline may be even more efficient in controlling pterygium size. Larger clinical trials are needed to better characterize this effect and to investigate the efficiency of doxycycline on other ethnic backgrounds.

Supporting Information

Checklist S1 CONSORT Checklist.

(DOC)

Protocol S1 Trial protocol (in Spanish).

(DOC)

Protocol S2 Trial protocol (in English). (DOC)

Acknowledgments

We are very grateful to Dr Enrique Ramalle-Gómara (Epidemiology and Health Prevention Service, Logroño, Spain) for his help with the statistical analysis.

References

- Dushku N, John MK, Schultz GS, Reid TW (2001) Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Arch Ophthalmol* 119: 695–706. els00070 [pii].
- Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D (2004) Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res* 23: 195–228. 10.1016/j.preteyeres.2004.02.002 [doi]; S1350946204000126 [pii].
- Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT (2008) The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications. *Ocul Surf* 6: 24–43.
- Dushku N, Reid TW (1997) P53 expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Curr Eye Res* 16: 1179–1192.
- Weinstein O, Rosenthal G, Zirkin H, Monos T, Lifshitz T, et al. (2002) Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye (Lond)* 16: 619–621. 10.1038/sj.eye.6700150 [doi].
- Papadia M, Barabino S, Valente C, Rolando M (2008) Anatomical and immunological changes of the cornea in patients with pterygium. *Curr Eye Res* 33: 429–434. 793435893 [pii];10.1080/02713680802130354 [doi].
- Aspiotis M, Tzanou E, Gorezis S, Ioachim E, Skyras A, et al. (2007) Angiogenesis in pterygium: study of microvessel density, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1. *Eye (Lond)* 21: 1095–1101. 6702495 [pii];10.1038/sj.eye.6702495 [doi].
- Khalifaoui T, Mkannez G, Colin D, Imen A, Zbiba W, et al. (2009) Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 expression in pterygium from Tunisian patients. *Pathol Biol (Paris)*. S0369-8114(09)00046-7 [pii];10.1016/j.patbio.2009.04.006 [doi].
- John-Aryankalayil M, Dushku N, Jaworski CJ, Cox CA, Schultz G, et al. (2006) Microarray and protein analysis of human pterygium. *Mol Vis* 12: 55–64. v12/a6 [pii].
- Jaworski CJ, Aryankalayil-John M, Campos MM, Fariss RN, Rowsey J, et al. (2009) Expression analysis of human pterygium shows a predominance of conjunctival and limbal markers and genes associated with cell migration. *Mol Vis* 15: 2421–2434.
- Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A (2008) Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization in recurrent pterygium. *Curr Eye Res* 33: 23–28. 789914637 [pii];10.1080/02713680701799101 [doi].
- Teng CC, Patel NN, Jacobson L (2009) Effect of subconjunctival bevacizumab on primary pterygium. *Cornea* 28: 468–470. 10.1097/ICO.0b013e31818d382d [doi];00003226-200905000-00020 [pii].
- Razeghinejad MR, Hosseini H, Ahmadi F, Rahat F, Eghbal H (2010) Preliminary results of subconjunctival bevacizumab in primary pterygium excision. *Ophthalmic Res* 43: 134–138. 000252980 [pii];10.1159/000252980 [doi].
- Fallah MR, Khosravi K, Hashemian MN, Beheshtnezhad AH, Rajabi MT, et al. (2010) Efficacy of topical bevacizumab for inhibiting growth of impending recurrent pterygium. *Curr Eye Res* 35: 17–22. 10.3109/02713680903395273 [doi].
- Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, et al. (1998) Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 12: 12–26.
- Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, et al. (1997) Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor- α and doxycycline. *J Biol Chem* 272: 31504–31509.
- Lee CZ, Xu B, Hashimoto T, McCulloch CE, Yang GY, et al. (2004) Doxycycline suppresses cerebral matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis induced by focal hyperstimulation of vascular endothelial growth factor in a mouse model. *Stroke* 35: 1715–1719. 10.1161/01.STR.0000129334.05181.b6 [doi];01.STR.0000129334.05181.b6 [pii].
- Chhipa RR, Singh S, Surve SV, Vijayakumar MV, Bhat MK (2005) Doxycycline potentiates antitumor effect of cyclophosphamide in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 202: 268–277. S0041-008X(04)00336-9 [pii];10.1016/j.taap.2004.06.025 [doi].
- Dan L, Shi-long Y, Miao-li L, Yong-ping L, Hong-jie M, et al. (2008) Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Curr Eye Res* 33: 653–660. 901525287 [pii];10.1080/02713680802245772 [doi].
- Aydin E, Kivilcim M, Peyman GA, Esfahani MR, Kazi AA, et al. (2008) Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by various doses of doxycycline and combination of triamcinolone acetonide with low-molecular-weight heparin and doxycycline. *Cornea* 27: 446–453. 10.1097/ICO.0b013e3181605ff9 [doi];00003226-200805000-00011 [pii].
- Cox CA, Amaral J, Salloum R, Guedez L, Reid TW, et al. (2010) Doxycycline's effect on ocular angiogenesis: an in vivo analysis. *Ophthalmology* 117: 1782–1791. S0161-6420(10)00110-7 [pii];10.1016/j.ophtha.2010.01.037 [doi].
- Larrayoz IM, de Luis A, Rua O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular effects of doxycycline treatment on pterygium as revealed by massive transcriptome sequencing. *PLoS ONE* 7: e39359.
- Smith GN, Jr., Yu LP, Jr., Brandt KD, Capello WN (1998) Oral administration of doxycycline reduces collagenase and gelatinase activities in extracts of human osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol* 25: 532–535.
- Tan DT, Chee SP, Dear KB, Lim AS (1997) Effect of pterygium morphology on pterygium recurrence in a controlled trial comparing conjunctival autografting with bare sclera excision. *Arch Ophthalmol* 115: 1235–1240.
- Coroneo M (2011) Ultraviolet radiation and the anterior eye. *Eye Contact Lens* 37: 214–224. 10.1097/ICL.0b013e318223394e [doi].
- Nemesure B, Wu SY, Hennis A, Leske MC (2008) Nine-year incidence and risk factors for pterygium in the barbados eye studies. *Ophthalmology* 115: 2153–2158. S0161-6420(08)00742-2 [pii];10.1016/j.ophtha.2008.08.003 [doi].
- Shiroma H, Higa A, Sawaguchi S, Iwase A, Tomidokoro A, et al. (2009) Prevalence and risk factors of pterygium in a southwestern island of Japan: the Kumejima Study. *Am J Ophthalmol* 148: 766–771. S0002-9394(09)00406-1 [pii];10.1016/j.ajo.2009.06.006 [doi].
- Ang M, Li X, Wong W, Zheng Y, Chua D, et al. (2012) Prevalence of and Racial Differences in Pterygium: A Multiethnic Population Study in Asians. *Ophthalmology*. S0161-6420(12)00129-7 [pii];10.1016/j.ophtha.2012.02.009 [doi].
- Kandavel R, Kang JJ, Memarzadeh F, Chuck RS (2010) Comparison of pterygium recurrence rates in Hispanic and white patients after primary excision and conjunctival autograft. *Cornea* 29: 141–145. 10.1097/ICO.0b013e3181b1630 [doi].
- Landers J, Henderson T, Craig J (2011) Prevalence of pterygium in indigenous Australians within central Australia: the Central Australian Ocular Health Study. *Clin Experiment Ophthalmol* 39: 604–606. 10.1111/j.1442-9071.2011.02532.x [doi].
- Viso E, Gude F, Rodriguez-Ares MT (2011) Prevalence of pinguecula and pterygium in a general population in Spain. *Eye (Lond)* 25: 350–357. eye2010204 [pii];10.1038/eye.2010.204 [doi].
- Kobayashi H, Kohshima S (1997) Unique morphology of the human eye. *Nature* 387: 767–768. 10.1038/42842 [doi].
- Haustein J (1983) On the ultrastructure of the developing and adult mouse corneal stroma. *Anat Embryol (Berl)* 168: 291–305.
- Smith VA, Khan-Lim D, Anderson L, Cook SD, Dick AD (2008) Does orally administered doxycycline reach the tear film? *Br J Ophthalmol* 92: 856–859. bjo.2007.125989 [pii];10.1136/bjo.2007.125989 [doi].
- Gilmour MA, Clarke CR, Macallister CG, Dedeo JM, Caudell DL, et al. (2005) Ocular penetration of oral doxycycline in the horse. *Vet Ophthalmol* 8: 331–335. VOP00422 [pii];10.1111/j.1463-5224.2005.00422.x [doi].
- Stieger K, Mendes-Madeira A, Meur GL, Weber M, Deschamps JY, et al. (2007) Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases. *Gene Ther* 14: 1668–1673. 3303034 [pii];10.1038/sj.gt.3303034 [doi].
- Verbraeken H, Verstraete A, Van de Velde E, Verschraegen G (1996) Penetration of gentamicin and ofloxacin in human vitreous after systemic administration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234 Suppl 1: S59–S65.
- Welch MN, Reilly CD, Kalwerisky K, Johnson A, Waller SG (2011) Pterygia measurements are more accurate with anterior segment optical coherence tomography – A pilot study. *Nepal J Ophthalmol* 3: 9–12. 10.3126/nejoph.v3i1.4271 [doi].

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SV AM. Performed the experiments: OR IML MTB. Analyzed the data: IML AM. Contributed reagents/materials/analysis tools: OR IML AM. Wrote the paper: AM.

ANEXO II

Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing

Ignacio M. Larráyoz¹, Alberto de Luis², Oscar Rúa³, Sara Velilla³, Juan Cabello¹, Alfredo Martínez^{1*}

¹ Oncology Area, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain, ² Ultrasequencing and Bioinformatics Core Facility, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain, ³ Ophthalmology Service, Hospital San Pedro, Logroño, Spain

Abstract

Pterygium is a lesion of the eye surface which involves cell proliferation, migration, angiogenesis, fibrosis, and extracellular matrix remodelling. Surgery is the only approved method to treat this disorder, but high recurrence rates are common. Recently, it has been shown in a mouse model that treatment with doxycycline resulted in reduction of the pterygium lesions. Here we study the mechanism(s) of action by which doxycycline achieves these results, using massive sequencing techniques. Surgically removed pterygia from 10 consecutive patients were set in short term culture and exposed to 0 (control), 50, 200, and 500 µg/ml doxycycline for 24 h, their mRNA was purified, reverse transcribed and sequenced through Illumina's massive sequencing protocols. Acquired data were subjected to quantile normalization and analyzed using cytoscape plugin software to explore the pathways involved. False discovery rate (FDR) methods were used to identify 332 genes which modified their expression in a dose-dependent manner upon exposure to doxycycline. The more represented cellular pathways included all mitochondrial genes, the endoplasmic reticulum stress response, integrins and extracellular matrix components, and growth factors. A high correlation was obtained when comparing ultrasequencing data with qRT-PCR and ELISA results. Doxycycline significantly modified the expression of important cellular pathways in pterygium cells, in a way which is consistent with the observed efficacy of this antibiotic to reduce pterygium lesions in a mouse model. Clinical trials are under way to demonstrate whether there is a benefit for human patients.

Citation: Larráyoz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, et al. (2012) Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. PLoS ONE 7(6): e39359. doi:10.1371/journal.pone.0039359

Editor: Pedro Gonzalez, Duke University, United States of America

Received: March 29, 2012; **Accepted:** May 21, 2012; **Published:** June 19, 2012

Copyright: © 2012 Larráyoz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Supported by a Grant from Spain's Ministry of Health, Social Policy, and Equality, No. DIN-021. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: amartinezr@riojasalud.es

Introduction

Pterygium is a very common ocular surface lesion attributed to chronic ultraviolet light exposure which typically afflicts a younger population, adding tremendous burden, both human and financial, in many countries [1]. At the cellular level, pterygium is characterized by proliferation of limbal cells, inflammatory infiltrates, fibrosis, angiogenesis, and extracellular matrix breakdown [2–4]. Traditionally regarded as a degenerative condition, pterygia also display tumor-like features, such as propensity to invade normal tissue and high recurrence rates following resection [5]. The mechanism of pterygium formation is not completely understood but several processes have been suggested as part of the pathogenesis of this disease, including genetic predisposition, anti-apoptotic mechanisms, cytokines, growth factors, extracellular matrix remodelling, immunological mechanisms, and viral infections [6].

Currently, the only approved treatment for pterygium is surgery [7], a group of different procedures that, in some cases, result in high recurrence rates [8]. Recently, based on the profuse irrigation of the pterygium lesion, bevacizumab-mediated antiangiogenic therapies have been tested, but these protocols have produced inconclusive results [9,10].

In a recent article, it was shown that doxycycline, a common oral antibiotic, was able to dramatically reduce pterygium-like lesions in a mouse model [11]. The same antibiotic was responsible for reducing neovascularisation in a burn model of the rat cornea [12]. Apparently, doxycycline and other tetracyclines possess numerous properties which are independent of their antibiotic activity [13]. Specifically, the antiangiogenic effects of doxycycline seem to be related with the inhibition of matrix metalloproteinases [14,15], although alternative and/or synergistic mechanisms cannot be excluded.

In the present study we decided to investigate the molecular effects of doxycycline on short-term primary cultures of pterygium cells, using ultrasequencing techniques, to better understand all the pathways affected by the antibiotic in pterygium.

Results

Primary cultures were established from pterygia surgically removed from 10 patients. To identify the cell population present in these cultures, immunofluorescence for different markers was performed. Confocal microscopy of these samples showed that the predominant cell population is composed of vimentin-positive cells, with a fibroblast-compatible morphology (Fig. 1).

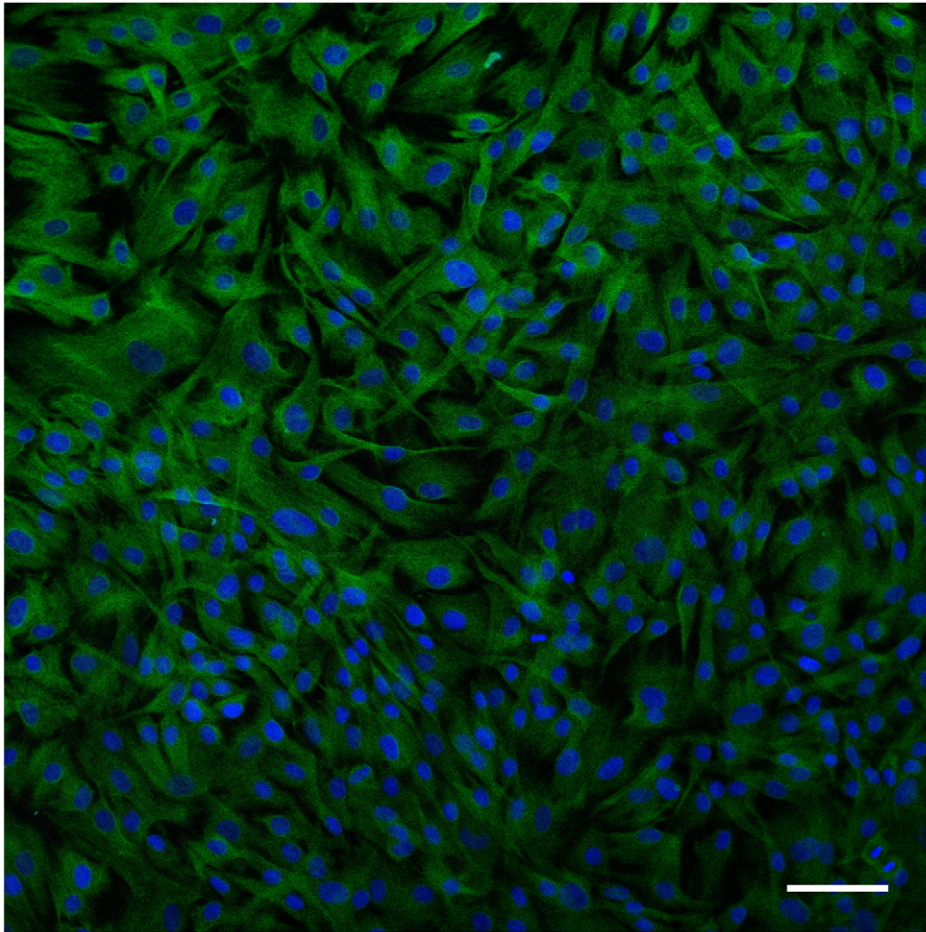


Figure 1. Confocal image of pterygium cells in culture stained with antibodies against vimentin (green), CD31 (white), and keratin 4 (red). DAPI was used as a nuclear counterstain (blue). All cells were vimentin-positive and no immunoreactivity was found for markers of epithelial or endothelial lineages. Bar = 20 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0039359.g001

The cultures were treated with doxycycline and RNA from these samples was analyzed through massive sequencing. Due to the characteristics of the multiplexing protocol and other technical reasons, there was a broad variability on the number of sequence readings per sample, ranging from 82,040 to more than 7.5 million reads (Fig. 2). To deal with this variability, ultrasequencing data were normalized in all samples. To test the efficacy of our normalization protocol, several predictions were made and checked on the data pool. One of the tests consisted in the prediction of the patient's gender by analyzing expression of genes coded by the Y chromosome (Fig. 3A,B) or other genes whose expression is linked to the sex of the individual, such as XIST or RPS4Y1 (not shown). The gender of all patients was correctly predicted. A second test consisted in the analysis of genes whose expression was not modified by doxycycline treatment. In these cases, the genetic background of each patient was very homogeneous in comparison with the expression in other patients, which was more variable (Fig. 3C-H).

Following normalization, the first observation was a confirmation of the predominant cell type in the cultures. Several fibroblast markers, including fibronectin 1, collagen type1 α and β , vimentin, and collagen type 3, were found among the 10 most represented transcripts of the study, whereas markers for endothelial and epithelial cells were very scarce.

Then, gene expression of samples treated with doxycycline was compared with untreated controls. A Manhattan-type heatmap for the 332 genes whose expression experimented the largest variation after antibiotic treatment shows that treatments tend to group together, indicating that for these genes variations due to the treatment are larger than those due to individual idiosyncrasies (Fig. 4).

To investigate which cellular pathways are involved in the response of pterygium cells to doxycycline, ultrasequencing results were analyzed with specialized software. The group of genes that experiment larger variations after treatment with the antibiotic are the ones expressed by the mitochondrial genome. Eukaryotic mitochondrial DNA codes for 15 major genes; of these, a single gene (MT-ATP8) did not change, expression for the 2 genes coding for ribosomal RNA was highly upregulated in a dose-dependent manner after treatment, whereas expression for the other 12 genes was downregulated, also in a dose-dependent fashion (Table 1).

Another pathway whose expression was deeply modified (all genes in this pathway were upregulated) upon doxycycline treatment includes almost all the proteins involved in the endoplasmic reticulum (ER) stress response (Fig. 5). This pathway is implicated at all levels, from the docking of the ribosome to the ER (SSR2, RRBP1, SEC61A1), to proteins involved in protein

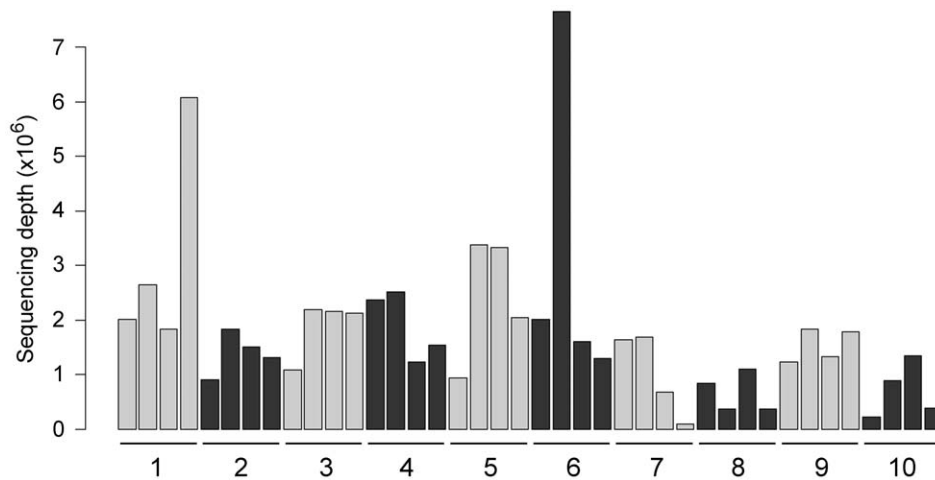


Figure 2. Histogram showing the number of sequences aligned for each of the 40 experimental samples (sequencing depth). Numbers represent individual donors and the 4 bars from each donor correspond to untreated control, and pterygium cells treated for 24 h with 50, 200, and 500 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline (left to right). There is a large variation in sequencing depth ranging from 82,040 reads for the less represented (cells from patient number 7, treated with 500 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline) to 7,653,010 reads for the best represented (cells from patient number 6, treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline). doi:10.1371/journal.pone.0039359.g002

folding (PPIB, PDIA1 to 6, etc), quality control proteins (BiP, SIL1, HSP47), members of the unfolded protein response (ATF6, IRE1, PERK), and the ER-associated protein degradation (ERAD) process (EDEMI, SEC61, ubiquitin ligase complex, etc). When the unfolded protein response (UPR) is activated, several mediator signals are sent to the nucleus to activate UPR responsive genes and to promote apoptosis. One of these is CHOP, which is also upregulated in doxycycline treated cells.

Another set of genes affected by doxycycline treatment includes several integrins, integrin-interacting proteins, collagens, and other extracellular matrix components (Table 2), indicating that doxycycline has a significant impact on matrix remodelling. In addition, several growth factors including VEGF and MANF, cytokines such as IL-6, and cell cycle related factors (TP53, CDKN1A, CDK2AP2) had also modified expression in the doxycycline treated cells.

Sequencing results were confirmed through quantitative real time PCR (qRT-PCR) for those pathways with higher degrees of variation upon treatment. In all cases, the direction and magnitude of the change in expression was confirmed by the amplification technique (Fig. 6). For all the chosen genes, there was a tight correlation between data obtained through ultrasequencing and those collected by real time PCR (Fig. 7), indicating the efficiency of our normalization method.

For some genes that generate secretory proteins, such as MANF, IL-6, and VEGFA, a further confirmation was performed through ELISA protein determination in the supernatant of the treated and untreated cultures. Again, a high correlation was observed among sequencing data, qRT-PCR quantification, and ELISA protein levels (Fig. 8).

Discussion

In this study we have shown through ultrasequencing analysis that pterygium cells respond to doxycycline treatment by modifying the expression levels of a broad number of genes responsible for important cellular functions. Among the pathways that were modified the most, we found the mitochondrial genes, the ER stress cascade, growth factors, interleukins, cell cycle regulators, integrins, and components of the extracellular matrix.

Data Normalization

Massive transcriptome sequencing is a relatively new technique and, as such, needs some time and a series of additional developments before its complete potential can be achieved. In this regard, data normalization is one of the most relevant problems in current papers dealing with ultrasequencing data. Initially it was presumed that RNA-seq techniques were free of the nonlinear distortions that plagued hybridization techniques. Hence expression values were derived directly from the total number of alignments for a particular exon divided by its length [16]. Later on, that measurement was improved by the Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads (RPKM) method [17]. Still, these and similar methods were affected by an important sequencing depth bias. Nowadays, novel normalization methods are appearing to deal with all these problems [18].

Our normalization protocol uses the broad experience accrued in the last years from microarray analysis, where quantile normalization has been the gold standard [19]. This approach does not introduce substantial biases in either genes with low expression nor in those with high expression levels. Confirmation of the quality of our approach is provided by a series of biological evidences. First, our data predicted correctly the gender of all the patients based on the expression of genes coded by the Y chromosome. Second, genes whose expression is bound to the sample genetic background were clearly differentiated with this method. In addition, expression data obtained by addition of sequencing alignments presented a high correlation with data obtained from the same samples by qRT-PCR. An outstanding advantage of this methodology is that samples with very different sequencing depth (from 80,000 to more than 7,000,000 reads, Fig. 1) can be used for the analysis whereas in other methodologies they need to be discarded in order to avoid biases [20].

Previous High-throughput Studies in Pterygium

A few previous studies had applied high-throughput techniques to study the transcriptomics of pterygium. For instance, the gene expression of pterygium was compared to that of normal autologous conjunctiva, finding a significant increase of fibronectin, CD24, MIP-4, and NGAL in the pterygium lesions [21,22].

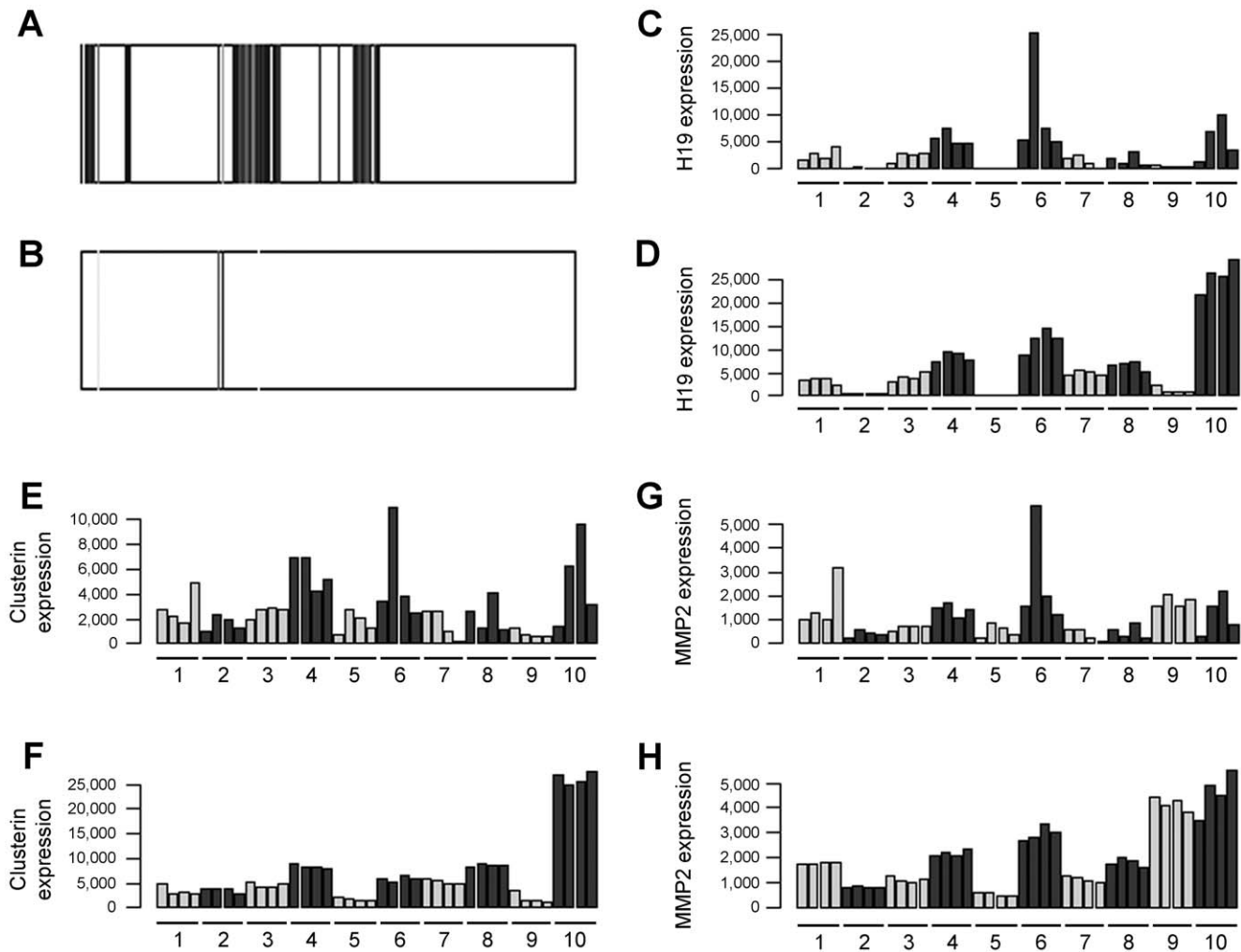


Figure 3. Experimental demonstration that a correct normalization protocol was applied to ultrasequencing data. Representation of the expression levels in the Y chromosome in a male (A) and a female (B) patient. Each dark line represents expression of a particular exon along the length of the chromosome. The few lines observed in females correspond to repetitive regions of the genome. Expression levels for 3 representative genes: H19 (C,D), clusterin (E,F), and matrix metalloproteinase 2 (G,H) as they appear before (C,E,G) and after (D,F,H) application of our normalization protocol. Labeling of the 40 samples is the same as in Fig.1. Normalization success can be appreciated since individual variations are larger than treatment-induced changes in these genes.
doi:10.1371/journal.pone.0039359.g003

Another study compared the gene expression pattern of pterygium with pre-existing data on human cornea, limbus, and conjunctiva, finding that pterygium markers closely resemble those of conjunctival and limbal cells [23]. A recent paper has shown that pterygium presents aberrant DNA methylation patterns in regions close to matrix remodelling genes such as TGM-2, MMP-2 and CD24 [24]. Our study is the first to analyze mRNA and protein changes produced by a drug treatment on pterygium cells.

Our cultured cells were positive for vimentin and negative for epithelial and endothelial markers. Therefore our first impulse was to classify them as fibroblasts. Nevertheless, Dushku and Reid showed that pterygium originates from altered limbal epithelial basal cells which express vimentin but do not stain for keratins [25], so our primary cultures seem to represent the characteristic cells of pterygium.

Doxycycline Action on the Mitochondria

Doxycycline has been used in the past as a reversible inhibitor of mitochondrial translation [26–28]. Doxycycline occupies an

important tRNA binding site on the 30S ribosome subunit, thus preventing the attachment of amino acyl tRNAs and terminating the translation process. Depending on the cell type, different mechanisms are activated [29]. This translation inhibition has been associated with cell arrest, apoptosis/necrosis, and cell detachment due to activation of caspase 3, 8, and 9, but also to caspase-independent mechanisms [29–32]. Interestingly, doxycycline concentrations achievable in serum seem to be more toxic for tumors than for normal cells [33]. To the best of our knowledge, our study provides the first evidence of doxycycline acting as a selective inhibitor of mitochondrial genes' transcription. The inhibition is potent and raises the question of whether the recognized effect of doxycycline as an inhibitor of mitochondrial protein synthesis is due, at least in part, to the inhibition of the transcription of mitochondrial encoded genes rather than to its binding to the ribosomes' active site.

Nonetheless, doxycycline pretreatment has been shown to counteract the apoptosis and ER stress responses induced by doxorubicin in mouse heart and testis [34,35], probably through a

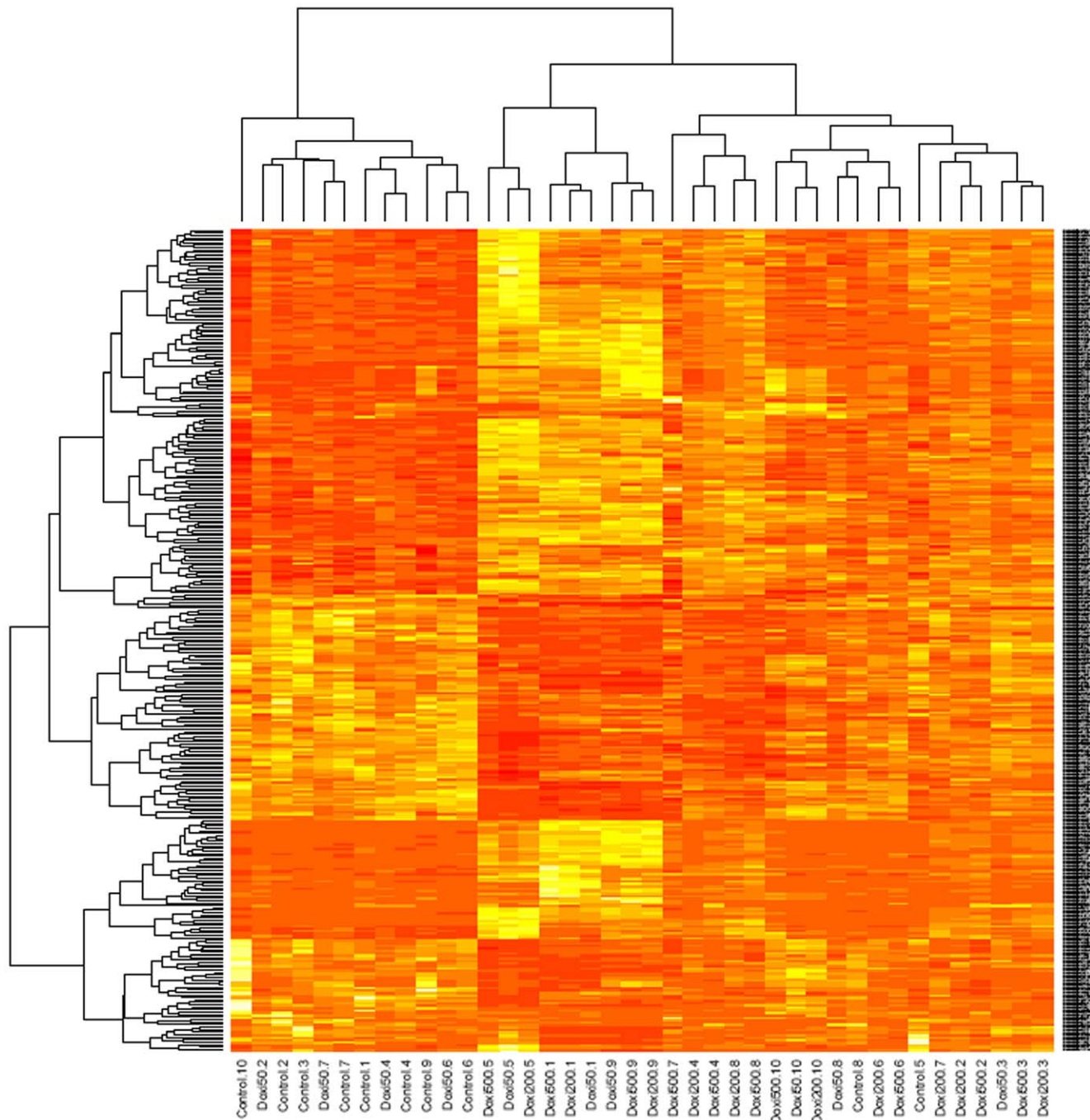


Figure 4. Hierarchical clustering (Manhattan plot) of all samples (columns) and the 332 genes which experienced larger changes upon treatment with doxycycline (lines). All the controls tend to cluster together (left hand side) indicating a good normalization technique. Red color expresses low expression levels and yellow designates high expression levels.
doi:10.1371/journal.pone.0039359.g004

preconditioning mechanism. This is in agreement with our data showing an increase in pro-survival molecules such as IL6, VEGFA, p21, or RelA. A short time exposure to doxycycline would provoke a transient mitochondrial damage and ER stress that would stimulate those survival factors that may protect the cells from the following doxorubicin insult. However in our experimental paradigm those survival factors seem to be overwhelmed by the production of proapoptotic factors such as CHOP, BAX, and caspase activation.

Endoplasmic Reticulum Stress Response Pathway

ER stress is a cellular response to disturbances in the normal function of the ER which is conserved in all mammalian species, as well as in yeast and worms [36]. Accumulation of unfolded proteins in the ER lumen results in activation of a common response to this stress situation called the unfolded protein response (UPR), which is aimed initially at compensating for damage trying to restore normal function of the cell by halting protein translation and activating the signaling pathways that lead

Table 1. Ultrasequencing values for mitochondrial genes.

Gene name	Ensembl number	Fold change		
		50 µg/mL Doxycycline	200 µg/mL Doxycycline	500 µg/mL Doxycycline
MT-ATP6	ENSG00000198899	-1.27	-1.45	-1.75
MT-CO1	ENSG00000198804	-2.04	-2.56	-2.94
MT-CO2	ENSG00000198712	-1.20	-1.56	-1.96
MT-CO3	ENSG00000198938	-1.49	-1.72	-2.38
MT-CYB	ENSG00000198727	-1.75	-2.33	-2.86
MT-ND1	ENSG00000198888	-1.67	-1.92	-2.50
MT-ND2	ENSG00000198763	-1.32	-1.39	-1.92
MT-ND3	ENSG00000198840	-1.72	-2.27	-2.70
MT-ND4	ENSG00000198886	-1.64	-1.89	-2.38
MT-ND4L	ENSG00000212907	-1.56	-2.00	-2.38
MT-ND5	ENSG00000198786	-1.47	-1.79	-2.27
MT-ND6	ENSG00000198695	-1.54	-1.92	-2.44
MTRNR1	ENSG00000211459	2.60	3.08	3.33
MTRNR2	ENSG00000210082	1.28	1.36	1.64

Values are represented as the mean fold change of 10 patients with respect to untreated controls.
doi:10.1371/journal.pone.0039359.t001

to increasing production of molecular chaperones involved in protein folding, but can eventually trigger cell death if ER stress is severe or prolonged [37]. There are three main signaling systems initiated by UPR through ER stress sensors, including Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3 (eIF2AK3), Activating transcription factor 6 (ATF-6 alpha), and Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (IRE1) [36]. In normal conditions these proteins are inactivated by Heat shock 70 kDa protein 5 (GRP78). Accumulation of unfolded proteins leads to GRP78 binding to them, resulting in release and activation of eIF2AK3, ATF-6 alpha and IRE1 [37–40].

Activation of eIF2AK3 induces translation of Activating transcription factor 4 (ATF-4), which is able to induce transcription of Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 (HERP), DNA-damage-inducible transcript 3 (C/EBP zeta), GRP78 and Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A (GADD34). All of them were upregulated by doxycycline treatment.

Moreover, ATF-6 has been shown to translocate to the nucleus and induce transcription of ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1 (EDEM), HERP, C/EBP zeta, X-box binding protein 1 (XBP1), GRP78, and DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3 (DNAJC3). Again all of them were upregulated by doxycycline treatment.

In addition, active IRE1 splices XBP1 mRNA to promote translation of XBP1, which translocates to the nucleus and activates transcription of GRP78, Endoplasmic reticulum chaperone protein 5 (GRP78), EDEM, HERP, C/EBP zeta, Der1-like domain family, members 1, 2 and 3 (Derlin1, Derlin-2 and Derlin-3). EDEM, HERP, Derlin1, Derlin-2 and Derlin-3 promote ER-associated protein degradation, ERP5, Endoplasmic reticulum chaperone protein 5 (GRP78) stimulate protein folding. Doxycycline treatment augmented the expression of all these genes.

In agreement with the results shown above, we also found an increase in the transcription of GADD34 and DNAJC3, which promote negative feed-back loops leading to restoration of protein translation. However, when the restoration of homeo-

stasis is not achieved within a certain time lapse the UPR switches to apoptosis promotion. Despite the translational block produced by PERK activation, certain genes can bypass this block. An example is the proapoptotic protein CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein) which is upregulated by ATF4 (activating transcription factor 4). CHOP causes downregulation of the anti-apoptotic mitochondrial protein Bcl-2 [41], favoring a pro-apoptotic drive at the mitochondria by proteins that cause mitochondrial damage, cytochrome c release, and caspase 3 activation. The doxycycline-mediated increase on the transcription of CHOP suggests that the proapoptotic switch has been produced. Moreover, C/EBP zeta, which is activated by IRE1 and leads to decreased Bcl-2 transcription [42], is also upregulated by doxycycline. Consistently, the expression of the pro-apoptotic molecule BAX is also increased, supporting the idea of activation of apoptosis in pterygium cells by doxycycline.

Extracellular Matrix and Integrins

Integrins and integrin receptors regulate many aspects of cell physiology, being of particular importance in cell adhesion and migration. These two processes depend on packing of actin cytoskeleton into adhesive and protrusive organelles in response to extracellular signals. In normal epithelia, alpha/beta integrins function as receptors for the laminin family of extracellular matrix proteins (such as laminin 1 and laminin 5) and mediate the stable attachment of epithelial cells to the underlying basement membrane [43].

The function of some integrins, such as alpha-6/beta-4 integrin, is altered substantially as normal epithelia undergo malignant transformation and progress to invasive carcinoma [44]. Cooperative signaling between integrins and v-Erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homologs 2 and 3 (ErbB2 and ErbB3) is required to promote PI3K activation. This activation is mediated through GAB1 [45]. Alpha-6/beta-4 integrin can also form signaling complexes with specific growth factor receptors that act synergistically to activate PI3K [44,46]. A signaling pathway involving EGFR, ErbB2, ErbB3, phosphatidylinositol 3-kinase

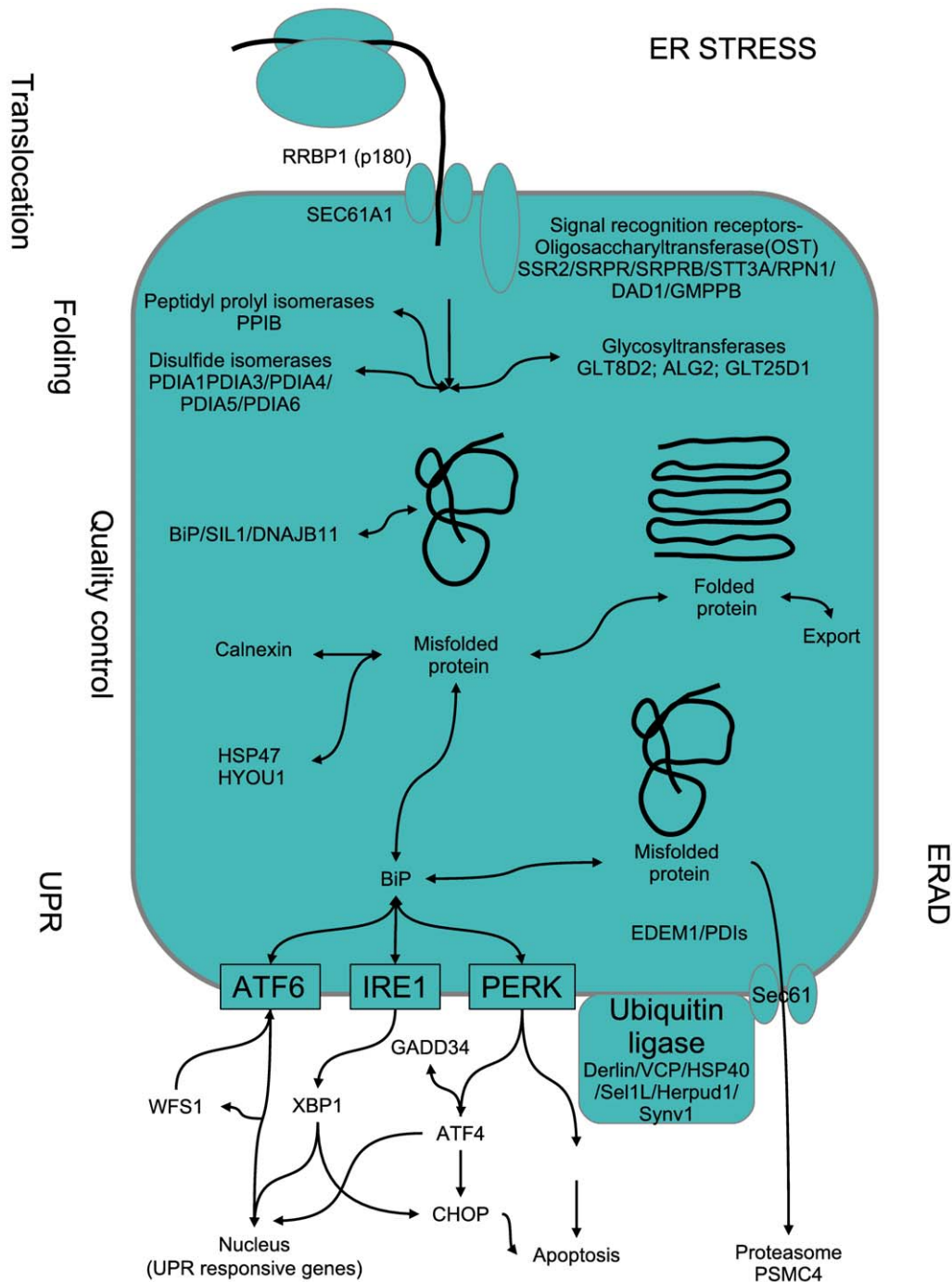


Figure 5. Schematic cartoon of the main pathways involved in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. Proteins are translocated directly from the ribosome into the ER and protein folding takes place with the help of specific chaperones. If folding is correct, the proteins follow their path to the Golgi complex and the secretory pathway. If misfolded proteins accumulate in the ER lumen, the UPR can be triggered and signals will be sent to the nucleus and apoptosis could be induced through CHOP. All the proteins represented in the cartoon are significantly upregulated by doxycycline treatment.
doi:10.1371/journal.pone.0039359.g005

(PI3K), Akt, glycogen synthase kinase 3- β (GSK3- β), and cyclin D1 is essential for the maintenance of survival, mitosis, and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell lines as well as to evade apoptosis [47].

In our experiments, doxycycline treatment decreased the expression of multiple members involved in the interaction between the cell and the extracellular membrane, including

ligands such as laminin 1, laminin 5, and THBS1, integrins such as β 1 and ErbB3, intracellular mediators such as vinculin, GAB1, PI3K p85, and EIF4E3, suggesting that anoikis may be another mechanism by which doxycycline exerts its actions on pterygium cells.

Table 2. Ultrasequencing values for integrins and extracellular matrix-related genes.

Gene family	Gene name	Ensembl number	Fold change		
			50 µg/mL Doxyc.	200 µg/mL Doxyc.	500 µg/mL Doxyc.
Integrins	CTGF	ENSG00000118523	-2.04	-2.70	-4.55
	CRELD1	ENSG00000163703	2.60	3.40	3.47
	CYR61	ENSG00000142871	-1.82	-1.92	-2.33
	ICAM1	ENSG00000090339	2.13	3.40	3.89
	ITGA4	ENSG00000115232	-1.33	-2.04	-1.64
	ITGA5	ENSG00000161638	1.87	2.26	2.31
	ITGB1	ENSG00000150093	-1.16	-1.69	-1.35
	ITGB8	ENSG00000105855	-1.54	-2.50	-1.89
	ITGBL1	ENSG00000198542	-1.43	-1.72	-2.13
Integrin-interacting proteins	SLC3A2	ENSG00000168003	2.75	3.22	3.15
	THBS1	ENSG00000137801	-1.39	-1.67	-1.85
	SVEP1	ENSG00000165124	-1.44	-1.71	-2.06
Collagens	COL12A1	ENSG00000111799	-1.32	-1.92	-1.82
	COL5A2	ENSG00000204262	-1.25	-1.47	-1.61
Extracellular matrix	LAMB1	ENSG00000091136	-1.52	-2.04	-2.33
	LAMA3	ENSG00000053747	-1.47	-1.41	-1.32
	LAMA4	ENSG00000112769	-1.33	-1.82	-1.79
	SPARC	ENSG00000113140	-1.09	-1.18	-1.37

Values are represented as the mean fold change of 10 patients with respect to untreated controls.

doi:10.1371/journal.pone.0039359.t002

Growth Factors and Interleukins

Several growth factors such as VEGF and MANF and interleukins such as IL-6 were elevated in pterygium cells exposed to doxycycline.

VEGF has attracted much attention in the study of pterygium lesions since they are highly vascularised and upregulation of VEGF has been reported in pterygia when compared to normal conjunctiva [48]. In addition, women with a polymorphism in the VEGF gene (VEGF-460) have a 2.5-fold increased risk of developing pterygium [49]. These observations were instrumental in designing clinical trials where bevacizumab, the humanized blocking antibody against VEGF, was applied to pterygium lesions [9,10]. The fact that doxycycline treatment results in a higher expression of VEGF suggests that this may be a compensatory reaction of the cells whose survival is compromised by the decrease in mitochondrial protein synthesis and elevated ER stress.

In the same line of thought, MANF acts as a growth factor for astrocytes and other neural cells but also as a protective factor against ER stress [50]. Since we have reported a huge increase in genes related to the ER stress response upon doxycycline treatment, MANF expression may be increased to try to compensate for these deleterious circumstances.

IL-6 is a proinflammatory cytokine which is upregulated in pterygium by UV light exposure and might be part of the pathological pathway leading to the formation of the lesion [51]. Elevation of this cytokine is related to increases in angiogenesis, cell proliferation, invasion potential, and inflammation. The upregulation of IL-6 after treatment with doxycycline may be also part of the survival program of the pterygium cells faced by the harsh conditions created by the antibiotic.

Cell Cycle Arrest

Doxycycline has been shown to induce cell cycle arrest, although this effect is dependent on the cell line studied [29,52]. Likewise, induction of p53 gene expression in cancer cells can lead to both cell cycle arrest and apoptosis. In addition, the expression of the proapoptotic molecule Bax is up-regulated following an increase on p53 levels [53]. In our hands, doxycycline treatment on pterygium culture increased the expression of p53 and several others CDKs (CDKN1A, CDK2AP2), as well as the proapoptotic protein Bax, providing an additional mechanism to the observed changes.

In conclusion, we have shown that doxycycline elicits a strong dose-dependent response in pterygium cells inducing a number of intracellular pathways such as mitochondrial gene expression, the ER stress pathway, genes related to the extracellular matrix environment, growth factors, interleukins, and cell cycle related proteins. These changes can explain the reduction in pterygium growth previously reported in a mouse model for this antibiotic [11] and provide the theoretical basis to pursue treatment of pterygium patients with doxycycline. Current clinical trials are under way to test whether this treatment is efficient in humans.

Materials and Methods

Patients and Primary Culture

Use of pterygium specimens was approved by our Institutional Review Board (Comité Ético de Investigación Clínica de La Rioja, CEICLAR). All patients provided written informed consent and the specimens were handled in accordance with the Declaration of Helsinki. Ten consecutive patients that underwent surgical removal of their primary pterygium were recruited. These included 6 males and 4 females with a medium age of 44.3 ± 7.8

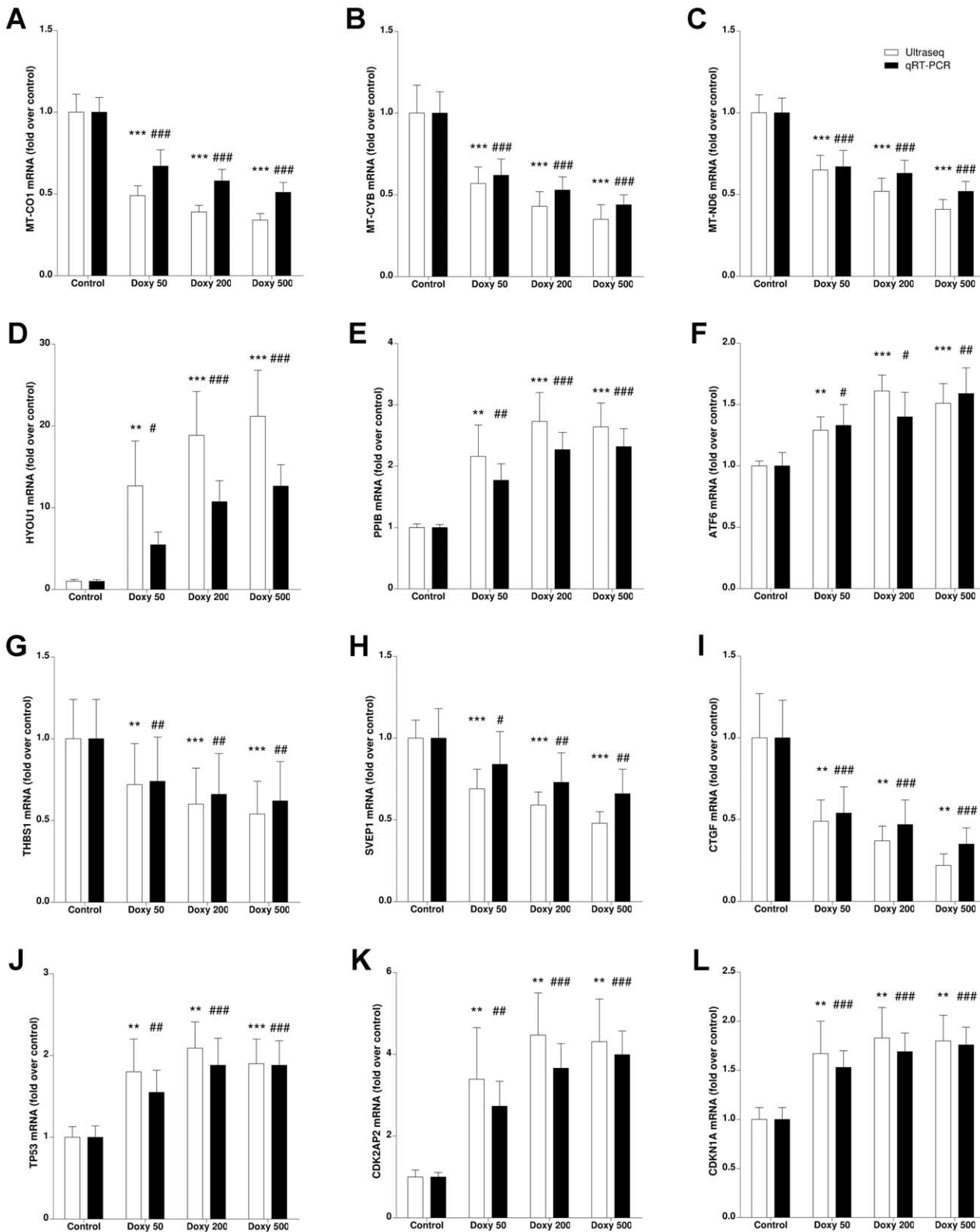


Figure 6. Gene expression quantification by ultrasequencing (open bars) and qRT-PCR (solid bars) for several sample genes involved in different pathways such as mitochondrial genes (A-C), endoplasmic reticulum stress response (D-F), members of the integrin family (G-I), and genes related with the cell cycle (J-L). Bars represent fold increase (or decrease) with respect to untreated controls ± SEM for 10 independent samples. Statistically significant differences with untreated controls are represented by asterisks (for ultrasequencing data) or the pound sign (for qRT-PCR). **: p<0.01; *: p<0.001; #: p<0.05; ##: p<0.01; ###: p<0.001.**
doi:10.1371/journal.pone.0039359.g006

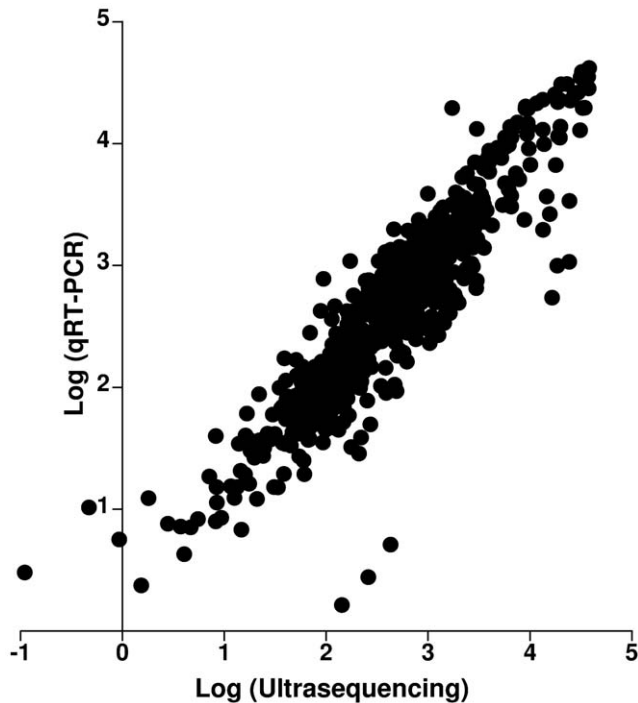


Figure 7. Correlation analysis between values obtained through ultrasequencing (abscises) and through qRT-PCR (ordinates). Pearson's coefficient is 0.9110 and $R^2 = 0.8299$; $p < 0.0001$. doi:10.1371/journal.pone.0039359.g007

years (range 30–55). Of these, 2 patients were Spanish citizens (both women) and 8 were immigrants from South America. The excised pterygia were transferred to the laboratory for establishing cell cultures as previously described [11]. Briefly, the pterygium specimen was minced into small pieces and cultured for 3 days in DMEM/F-12 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 200 mM L-glutamine, 0.5% DMSO, and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin (all culture reagents are from Invitrogen, Carlsbad, CA). Once the cells had migrated from the explants and attached to the dish surface, the explant fragments were removed and the medium changed to keratinocyte-serum free medium with 5% fetal calf serum, and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin. When the cells reached 80% confluency, they were passed to fresh dishes using 0.25% trypsin. Medium was renewed every 2–3 days and replaced with fresh medium 24 h before adding the antibiotic. All experiments were performed with cells on passages 3 to 5. For each patient, cells were subjected to 4 treatments: 0 (control), 50, 200, and 500 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline (Vibravenosa, Pfizer, Alcobendas, Spain) for 24 h.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Prior to doxycycline treatment, some cells were cultured in glass coverslips overnight, fixed with 10% buffered formalin for 10 min, permeabilized with 0.1% triton X-100 in PBS for 10 min, and exposed to a mix of 3 primary antibodies overnight at 4°C. These primary antibodies included mouse anti-vimentin (1:40, Sigma, Madrid, Spain), rabbit anti-cytokeratin 4 (1:100, Abcam, Cambridge, UK), and goat anti-CD31 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Following vigorous washes, the second layer was added for 2 h at room temperature. Conjugated antibodies in this second layer included Alexa 633 donkey anti-goat, Alexa 546 donkey anti-rabbit, and Alexa 488 donkey anti-mouse (1:200, Invitrogen). After another series of washes, the coverslips were

mounted with DAPI-containing ProLong mounting medium (Invitrogen). Paraffin sections of human uterus and appendix were processed in parallel as positive controls. A confocal microscope (Leica TCS SP5, Leica, Badalona, Spain) was used to visualize the slides.

RNA Extraction

Total RNA was isolated from pterygium cell cultures using TRIzol (Invitrogen), purified using an RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA), and treated with DNase I (Qiagen) following manufacturer's instructions.

cDNA Library Preparation and Ultrasequencing

Library preparation and ultrasequencing were performed following Illumina's (San Diego, CA) protocols. Most reagents were also from Illumina.

First, the integrity and quality of total RNA were assessed with the Experion Automated Electrophoresis system (BioRad, Hercules, CA). Then, mRNA was isolated from 1 μg of total RNA using poly-T oligo-attached magnetic beads. This mRNA was fragmented into pieces of approximately 200 bp using divalent cations under elevated temperature. The cleaved RNA fragments were reverse transcribed into first strand cDNA using reverse transcriptase and random primers. Next, the second strand was synthesized using DNA polymerase I and RNase H. These double-stranded cDNA fragments were end-repaired by T4 DNA polymerase and Klenow DNA polymerase, and phosphorylated by T4 polynucleotide kinase. The cDNA products were incubated with Klenow DNA polymerase to generate 3' Adenine overhangs, therefore allowing ligation to Illumina indexing adapters to the double stranded cDNA ends. The adapter-ligated products were purified with Ampure XP magnetic beads (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, MA, USA) and libraries were amplified by 15 cycles of PCR with Phusion DNA polymerase (Finnzymes Reagents, Vantaa, Finland). Constructed libraries were validated and quantified using BioRad's automated electrophoresis system Experion and qPCR respectively. Pools of 6 indexed libraries were mixed (multiplexed) at equimolar ratios to yield a total oligonucleotide mix concentration of 10 nM. Finally the resulting libraries were sequenced on the Genome Analyzer IIx platform (Illumina) to generate 150 bp single reads. Six pooled indexed libraries were sequenced in each flow cell lane.

Data Treatment

Raw sequence data in fastq format were processed through a number of sequential steps:

1. Aggressive adapter removal: adapter sequences were removed from the raw sequences with an ad-hoc script using a non-conservative approach. Thus, even the shortest representations (one nucleotide) were eliminated.
2. mRNA alignment to DNA: alignment was performed by Tophat (an intron aware wrapper of Bowtie DNA aligner). Results were sorted and indexed using Samtools.
3. Coverage vectors for each sample were extracted under R statistical environment using Rsamtools library. Human GTF annotation from Ensembl was applied as reference for the exon genomic ranges, parsed into R data structures. Exon expression was calculated as the median coverage for every exon genomic range as stated by annotation. Exon expression data from our 40 different samples were normalized by quantile normalization and locus expression was calculated by simple addition of

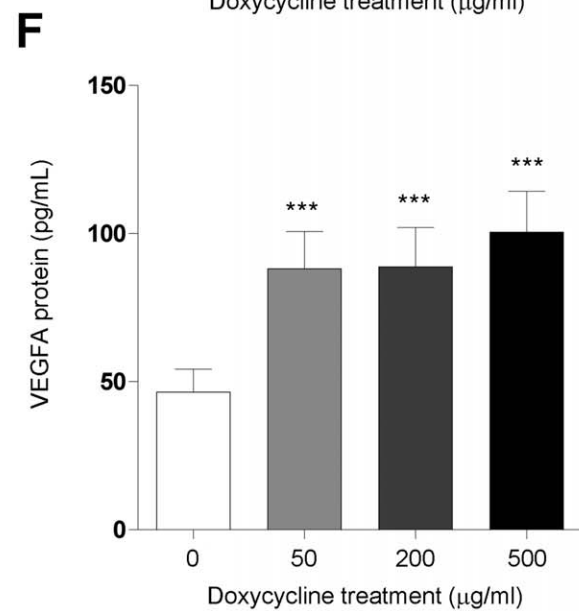
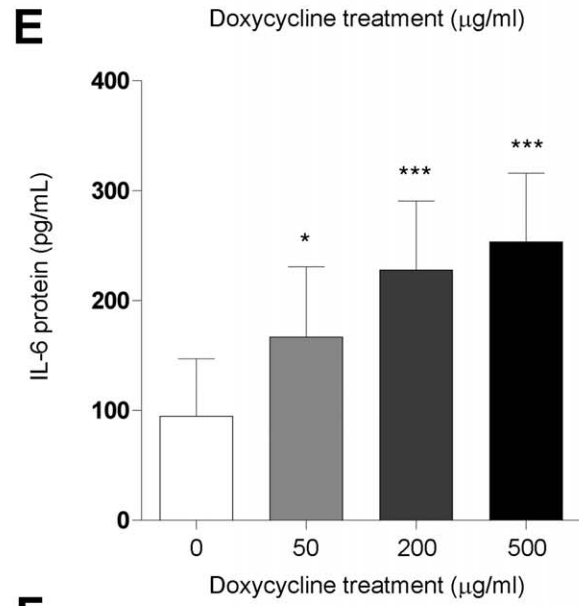
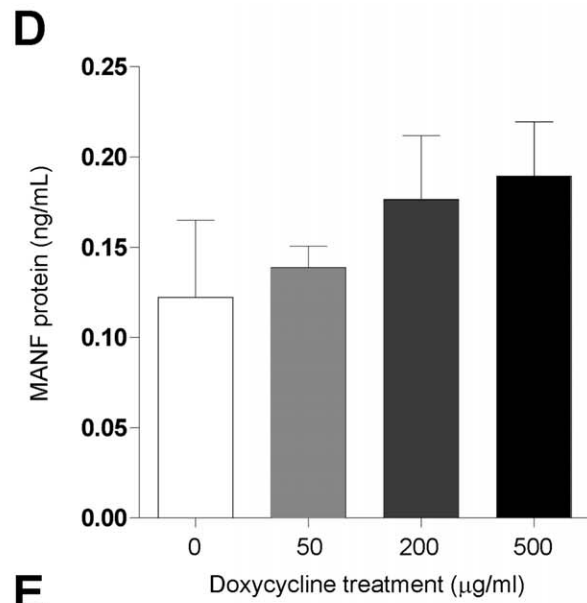
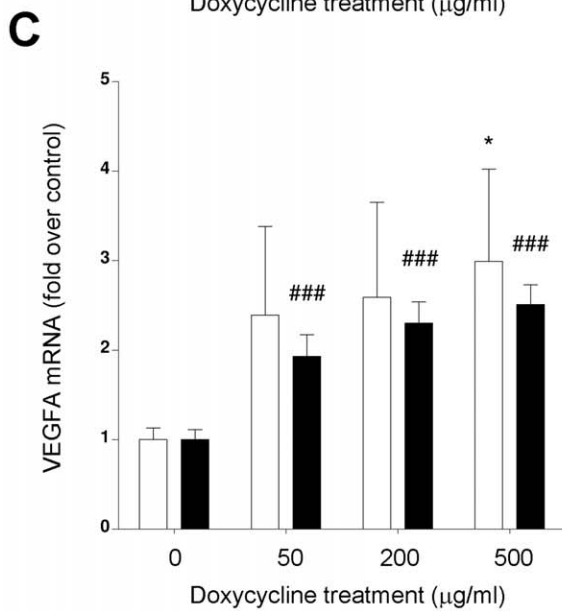
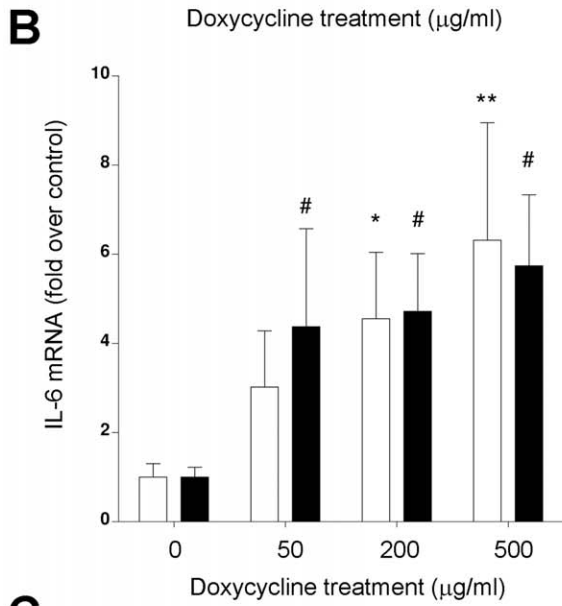
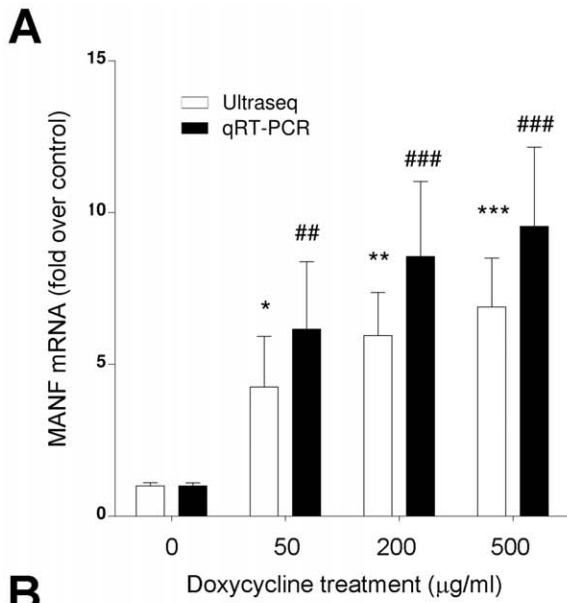


Figure 8. Correlation among values obtained through ultrasequencing, qRT-PCR, and ELISA for 3 secretory proteins whose expression varies with doxycycline treatment. These include MANF (A,D), IL-6 (B,E), and VEGFA (C,F). For mRNA quantification (A,B,C), all bars represent fold increase with respect to untreated controls \pm SEM for 10 independent samples. For protein quantification (D,E,F), bars represent the mean \pm SEM for 10 independent samples. Statistically significant differences with untreated controls are represented by asterisks (for ultrasequencing and protein data) or the pound sign (for qRT-PCR). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; #: $p < 0.05$; ##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0039359.g008

all the expression hits from distinct exons annotated to a single locus.

- Samples were grouped by patient and every locus expression in the group was scaled in the interval [0,1] in order to correct for the different response ranges observed for the same gene in different genetic backgrounds.
- Library signatures in R was applied to select the differentially expressed loci using the FDR-based SAM method.

Resulting data were submitted to GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) and are available with accession number GSE34736.

Heatmaps

The 332 genes whose expression was most regulated by doxycycline, with a FDR lower than 0.005, were represented as a heatmap by using a Manhattan method for dissimilarity and a ward method for hierarchical clustering, calculated in an R environment.

Pathway/Network Analysis

The Reactome FI cytoscape plugin (www.reactome.org) and the Genemania cytoscape plugin (www.genemania.org) [54] were used to identify enriched pathways and networks regulated by doxycycline treatment.

Statistics

GraphPad Prism v5 was used for all statistics. Two-way ANOVA was used to analyze qRT-PCR and ultrasequencing data. Correlation analysis was used to compare ultrasequencing and qRT-PCR data. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Confirmation of the Sequencing Results

Gene products whose expression was significantly changed upon application of doxycycline were chosen for further confirmation. cDNA was synthesized by reverse transcription of 1 μ g of total RNA using the SuperScript III First-Strand Synthesis kit (Invitrogen) in a total volume of 20 μ l according to the manufacturer's instructions and was amplified by qRT-PCR using Taqman probes (Table 3) in a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) and their gene expression calculated using absolute quantification by interpolation into a standard curve [55]. All values were divided by the expression of the house keeping gene, GAPDH, to avoid potential pipetting errors. Some secreted proteins such as IL-6, MANF and VEGF-A were quantified in the supernatant of the cultures by commercially available ELISA kits (Uscn, Life Science, Inc. Wuhan, China).

References

- Coroneo M (2011) Ultraviolet radiation and the anterior eye. *Eye Contact Lens* 37: 214–224. doi:10.1097/ICL.0b013e318223394e [doi].
- Bradley JC, Yang W, Bradley RH, Reid TW, Schwab IR (2010) The science of pterygia. *Br J Ophthalmol* 94: 815–820. doi:10.1136/bjo.2008.151852 [pii];10.1136/bjo.2008.151852 [doi].
- Chui J, Di GN, Wakefield D, Coroneo MT (2008) The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications. *Ocul Surf* 6: 24–43.

Table 3. TaqMan probes used for the quantification of gene expression by qRT-PCR.

Gene family	Gene	TaqMan catalog number
ER stress	HYOU1	Hs00197328
	PDIA4	Hs01115905
	PPIB	Hs00168719
	HSPA5	Hs00946084
	ATF4	Hs00909569
	ATF6	Hs00232586
	VCP	Hs00200205
Integrins	ICAM1	Hs00164932
	THBS1	Hs00962908
	SVEP1	Hs00295944
	CTGF	Hs00170014
Cell cycle	TP53	Hs01034249
	CDK2AP2	Hs00366670
	CDKN1A	Hs00355782
Oligotransferases	SRPR	Hs01112418
	SEC61A1	Hs01037684
Mitochondria	MT-ND6	Hs02596879
	MT-CO1	Hs02596864
	MT-CYB	Hs02596867
Other	VEGFA	Hs00900055
	MANF	Hs00180640
	IL6	Hs00985639
House keeping	GAPDH	Hs99999905

Thermocycler parameters were 10 min denaturation at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Values were interpolated into a standard curve to calculate absolute expression. These values were then divided by the expression of GAPDH in the same samples to correct for potential pipetting errors.

doi:10.1371/journal.pone.0039359.t003

Acknowledgments

We are very grateful to Dr María Íñiguez (Ultrasequencing Platform, CIBIR) for her invaluable help on setting the Illumina protocols.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IML AM. Performed the experiments: IML AL OR. Analyzed the data: IML AL OR SV JC AM. Contributed reagents/materials/analysis tools: OR SV AM. Wrote the paper: AM.

4. Dzunic B, Jovanovic P, Veselinovic D, Petrovic A, Stefanovic I, et al. (2010) Analysis of pathohistological characteristics of pterygium. *Bosn J Basic Med Sci* 10: 307–313.
5. Chui J, Coroneo MT, Tat LT, Crouch R, Wakefield D, et al. (2011) Ophthalmic pterygium: a stem cell disorder with premalignant features. *Am J Pathol* 178: 817–827. S0002-9440(10)00133-1 [pii];10.1016/j.ajpath.2010.10.037 [doi].
6. Di GN, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D (2004) Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res* 23: 195–228. 10.1016/j.preteyeres.2004.02.002 [doi];S1350946204000126 [pii].
7. Marcovich AL, Bahar I, Srinivasan S, Slomovic AR (2010) Surgical management of pterygium. *Int Ophthalmol Clin* 50: 47–61. 10.1097/IIO.0b013e3181e218f7 [doi];00004397-201005030-00006 [pii].
8. Kandavel R, Kang JJ, Memarzadeh F, Chuck RS (2010) Comparison of pterygium recurrence rates in Hispanic and white patients after primary excision and conjunctival autograft. *Cornea* 29: 141–145. 10.1097/ICO.0b013e3181b11630 [doi].
9. Mauro J, Foster CS (2009) Pterygia: pathogenesis and the role of subconjunctival bevacizumab in treatment. *Semin Ophthalmol* 24: 130–134. 911113760 [pii];10.1080/08820530902801106 [doi].
10. Besharati MR, Manaviat MR, Souzani A (2011) Subconjunctival bevacizumab injection in treatment of pterygium. *Acta Med Iran* 49: 179–183. 18268 [pii].
11. Cox CA, Amaral J, Salloum R, Guedez L, Reid TW, et al. (2010) Doxycycline's effect on ocular angiogenesis: an in vivo analysis. *Ophthalmology* 117: 1782–1791. S0161-6420(10)00110-7 [pii];10.1016/j.ophtha.2010.01.037 [doi].
12. Dan L, Shi-long Y, Miao-li L, Yong-ping L, Hong-jie M, et al. (2008) Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Curr Eye Res* 33: 653–660. 901525287 [pii];10.1080/02713680802245772 [doi].
13. Sapadin AN, Fleischmajer R (2006) Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol* 54: 258–265. S0190-9622(05)03231-7 [pii];10.1016/j.jaad.2005.10.004 [doi].
14. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, et al. (1998) Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 12: 12–26.
15. Lee CZ, Xu B, Hashimoto T, McCulloch CE, Yang GY, et al. (2004) Doxycycline suppresses cerebral matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis induced by focal hyperstimulation of vascular endothelial growth factor in a mouse model. *Stroke* 35: 1715–1719. 10.1161/01.STR.0000129334.05181.b6 [doi];01.STR.0000129334.05181.b6 [pii].
16. Morin R, Bainbridge M, Fejes A, Hirst M, Krzywinski M, et al. (2008) Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *Biotechniques* 45: 81–94. 000112900 [pii];10.2144/000112900 [doi].
17. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5: 621–628. nmeth.1226 [pii];10.1038/nmeth.1226 [doi].
18. Bullard JH, Purdom E, Hansen KD, Dudoit S (2010) Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 11: 94. 1471-2105-11-94 [pii];10.1186/1471-2105-11-94 [doi].
19. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, et al. (2003) Exploration, normalization, and summarization of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249–264. 10.1093/biostatistics/4.2.249 [doi];4/2/249 [pii].
20. Tarazona S, Garcia-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A (2011) Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res* 21: 2213–2223. gr.124321.111 [pii];10.1101/gr.124321.111 [doi].
21. John-Aryankalayil M, Dushku N, Jaworski CJ, Cox CA, Schultz G, et al. (2006) Microarray and protein analysis of human pterygium. *Mol Vis* 12: 55–64. v12/a6 [pii].
22. Tong L, Chew J, Yang H, Ang LP, Tan DT, et al. (2009) Distinct gene subsets in pterygia formation and recurrence: dissecting complex biological phenomenon using genome wide expression data. *BMC Med Genomics* 2: 14. 1755-8794-2-14 [pii];10.1186/1755-8794-2-14 [doi].
23. Jaworski CJ, Aryankalayil-John M, Campos MM, Fariss RN, Rowsey J, et al. (2009) Expression analysis of human pterygium shows a predominance of conjunctival and limbal markers and genes associated with cell migration. *Mol Vis* 15: 2421–2434.
24. Riau AK, Wong TT, Finger SN, Chaurasia SS, Hou AH, et al. (2011) Aberrant DNA methylation of matrix remodeling and cell adhesion related genes in pterygium. *PLoS One* 6: e14687. 10.1371/journal.pone.0014687 [doi].
25. Dushku N, Reid TW (1994) Immunohistochemical evidence that human pterygia originate from an invasion of vimentin-expressing altered limbal epithelial basal cells. *Curr Eye Res* 13: 473–481.
26. Ugalde C, Vogel R, Huijbens R, Van Den Heuvel B, Smeitink J, et al. (2004) Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum Mol Genet* 13: 2461–2472. 10.1093/hmg/ddh262 [doi];ddh262 [pii].
27. Olgun A, Akman S (2007) Mitochondrial DNA-deficient models and aging. *Ann N Y Acad Sci* 1100: 241–245. 1100/1/241 [pii];10.1196/annals.1395.025 [doi].
28. Pello R, Martin MA, Carelli V, Nijtmans LG, Achilli A, et al. (2008) Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 17: 4001–4011. ddn303 [pii];10.1093/hmg/ddn303 [doi].
29. Sourdeval M, Lemaire C, Brenner C, Boisvieux-Ulrich E, Marano F (2006) Mechanisms of doxycycline-induced cytotoxicity on human bronchial epithelial cells. *Front Biosci* 11: 3036–3048. 2031 [pii].
30. Wu J, Liu T, Xie J, Xin F, Guo L (2006) Mitochondria and calpains mediate caspase-dependent apoptosis induced by doxycycline in HeLa cells. *Cell Mol Life Sci* 63: 949–957. 10.1007/s00018-005-5565-6 [doi].
31. Sagar J, Sales K, Taanman JW, Dijk S, Winslet M (2010) Lowering the apoptotic threshold in colorectal cancer cells by targeting mitochondria. *Cancer Cell Int* 10: 31. 1475-2867-10-31 [pii];10.1186/1475-2867-10-31 [doi].
32. Onoda T, Ono T, Dhar DK, Yamanoi A, Nagasue N (2006) Tetracycline analogues (doxycycline and COL-3) induce caspase-dependent and -independent apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Cancer* 118: 1309–1315. 10.1002/ijc.21447 [doi].
33. Rubins JB, Charboneau D, Alter MD, Bitterman PB, Kratzke RA (2001) Inhibition of mesothelioma cell growth in vitro by doxycycline. *J Lab Clin Med* 138: 101–106. S0022-2143(01)29869-2 [pii];10.1067/mlc.2001.116591 [doi].
34. Lai HC, Yeh YC, Ting CT, Lee WL, Lee HW, et al. (2010) Doxycycline suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and cellular apoptosis in mouse hearts. *Eur J Pharmacol* 644: 176–187. S0014-2999(10)00707-7 [pii];10.1016/j.ejphar.2010.07.010 [doi].
35. Yeh YC, Lai HC, Ting CT, Lee WL, Wang LC, et al. (2007) Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. *Biochem Pharmacol* 74: 969–980. S0006-2952(07)00407-8 [pii];10.1016/j.bcp.2007.06.031 [doi].
36. Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2007) Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22: 193–201. 22/3/193 [pii];10.1152/physiol.00050.2006 [doi].
37. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115: 2656–2664. 10.1172/JCI26373 [doi].
38. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2: 326–332. 10.1038/35014014 [doi].
39. Patil C, Walter P (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 13: 349–355. S0955-0674(00)00219-2 [pii].
40. Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, et al. (2006) Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 312: 572–576. 312/5773/572 [pii];10.1126/science.1123480 [doi].
41. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 273: 33741–33749.
42. Wang XZ, Ron D (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272: 1347–1349.
43. Borradori L, Sonnenberg A (1999) Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 112: 411–418. 10.1046/j.1523-1747.1999.00546.x [doi].
44. Lipscomb EA, Mercurio AM (2005) Mobilization and activation of a signaling competent alpha6beta4 integrin underlies its contribution to carcinoma progression. *Cancer Metastasis Rev* 24: 413–423. 10.1007/s10555-005-5133-4 [doi].
45. Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM (1997) Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 91: 949–960. S0092-8674(00)80486-9 [pii].
46. Bon G, Folgiero V, Di CS, Sacchi A, Falcioni R (2007) Involvement of alpha6beta4 integrin in the mechanisms that regulate breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 9: 203. bcr1651 [pii];10.1186/bcr1651 [doi].
47. Sithanandam G, Smith GT, Fields JR, Fornwald LW, Anderson LM (2005) Alternate paths from epidermal growth factor receptor to Akt in malignant versus nontransformed lung epithelial cells: ErbB3 versus Gab1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 490–499. 2005-0049OC [pii];10.1165/rccb.2005-0049OC [doi].
48. Jin J, Guan M, Sima J, Gao G, Zhang M, et al. (2003) Decreased pigment epithelium-derived factor and increased vascular endothelial growth factor levels in pterygia. *Cornea* 22: 473–477.
49. Tsai YY, Chiang CC, Bau DT, Cheng YW, Lee H, et al. (2008) Vascular endothelial growth factor gene 460 polymorphism is associated with pterygium formation in female patients. *Cornea* 27: 476–479. 10.1097/ICO.0b013e3181644581 [doi];00003226-200805000-00015 [pii].
50. Parkash V, Lindholm P, Peranen J, Kalkinen N, Oksanen E, et al. (2009) The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDFN explains why they are bifunctional. *Protein Eng Des Sel* 22: 233–241. gzn080 [pii];10.1093/protein/gzn080 [doi].
51. Di GN, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D (2002) UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 3430–3437.
52. Onoda T, Ono T, Dhar DK, Yamanoi A, Fujii T, et al. (2004) Doxycycline inhibits cell proliferation and invasive potential: combination therapy with cyclooxygenase-2 inhibitor in human colorectal cancer cells. *J Lab Clin Med* 143: 207–216. 10.1016/j.lab.2003.12.012 [doi]; S0022214304000083 [pii].

53. Lai PB, Chi TY, Chen GG (2007) Different levels of p53 induced either apoptosis or cell cycle arrest in a doxycycline-regulated hepatocellular carcinoma cell line in vitro. *Apoptosis* 12: 387–393. 10.1007/s10495-006-0571-1 [doi].
54. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Kazi F, Wright G, et al. (2010) GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics* 26: 2927–2928. btq562 [pii];10.1093/bioinformatics/btq562 [doi].
55. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108.

ANEXO III

Transcriptomic Profiling Explains Racial Disparities in Pterygium Patients Treated With Doxycycline

Ignacio M. Larrayoz,¹ Óscar Rúa,² Sara Velilla,² and Alfredo Martínez¹

¹Oncology Area, Center for Biomedical Research of La Rioja, Logroño, Spain

²Ophthalmology Service, Hospital San Pedro, Logroño, Spain

Correspondence: Alfredo Martínez, Oncology Area, Center for Biomedical Research of La Rioja, C/Piqueras 98, 26006 Logroño, Spain; amartinezr@riojasalud.es.

Submitted: June 5, 2014

Accepted: October 1, 2014

Citation: Larrayoz IM, Rúa Ó, Velilla S, Martínez A. Transcriptomic profiling explains racial disparities on pterygium patients treated with doxycycline. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:7553–7561. DOI:10.1167/iov.14-14951

PURPOSE. To understand the differential responses to doxycycline between Caucasian and Hispanic patients observed in a previous clinical trial.

METHODS. Primary cultures were established using pterygia excised from male Caucasian ($n = 3$) and Hispanic ($n = 6$) patients. The response of these cells to doxycycline was tested in a toxicity assay. In addition, a complete transcriptome was obtained from the nine samples, and the results were analyzed using false discovery rate statistics. Results were confirmed by quantitative RT (qRT)-PCR and Western blotting for a limited set of genes.

RESULTS. Caucasian pterygium cells underwent apoptosis upon exposure to doxycycline, whereas Hispanic cells survived the treatment. Transcriptomic analysis showed profound differences between cells of both ethnicities, even before treatment, implicating important cellular pathways such as the mitochondrial oxidative phosphorylation chain, the proteasome, and the components of the extracellular matrix. Following exposure to doxycycline, there was a significant increase in proapoptotic proteins, regulators of the cell cycle, and components of the mitochondrial membrane in Caucasian cells but not in their Hispanic counterparts. There was a good correlation between data obtained by ultra-sequencing and those generated by qRT-PCR or Western blotting.

CONCLUSIONS. The lack of response to doxycycline observed in Hispanic pterygium patients in a previous clinical trial can be explained by the genetic protection afforded to the cells in this ethnic background against apoptosis and cell death. New therapeutic options must be devised for these patients.

Keywords: doxycycline, pterygium, racial disparities, transcriptomic analysis

Pterygium is a common eye disease characterized by abnormal growth of conjunctival and/or limbal cells that migrate toward the cornea, accompanied by an increase in fibrotic material and angiogenesis, and causing obvious vision distortions.^{1–3} The pathogenesis of pterygium is not completely understood, but it seems that exposure to ultraviolet light, age, and sex play important roles^{4–6}; moreover, human papilloma virus infection may be a cofactor in susceptible hosts.⁷ Current treatment of the disease includes surgical removal of the lesion followed by conjunctival or limbal autografts in the presence of different adjuvants,⁸ yet the recurrence rate remains high.⁹ Experimental antiangiogenic therapies are being used but, so far, the results have been inconclusive.^{10–12}

In a recent article, it was shown that doxycycline (Vibramvenosa; Pfizer, Alcobendas, Spain), a common oral antibiotic, was able to dramatically reduce pterygium-like lesions in a mouse model through inhibition of matrix metalloproteinases and angiogenesis.¹³ Further investigation using massive transcriptome sequencing revealed that doxycycline affects pterygium cells by regulating up to 332 genes involved in mitochondrial metabolism, endoplasmic reticulum stress response, and pathways related to integrins, extracellular matrix components, and growth factors.¹⁴ A phase II clinical trial showed that oral doxycycline was able to reduce pterygium size in Caucasians but not in patients of Hispanic ethnicity.¹⁵

We decided to study the cause of this differential response to doxycycline by using whole-genome transcriptomic techniques to explore new pharmacological approaches to overcome the lack of response in Hispanic pterygium patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Primary Culture

Use of pterygium specimens was approved by our Institutional Review Board (Comité Ético de Investigación Clínica de La Rioja). All patients provided written informed consent, and specimens were handled in accordance with Declaration of Helsinki regulations. Nine male patients who underwent surgical removal of their primary pterygia were recruited. These included three Caucasian (76.7 ± 1.1 years of age) and six Hispanic (39.0 ± 8.2 years of age) patients. Excised pterygia were transferred to the laboratory for establishing primary cell cultures as described previously.¹⁴ Briefly, each pterygium specimen was minced into small pieces and cultured for 3 days in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 200 mM L-glutamine, 0.5% DMSO, and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin (all culture reagents are from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Once the cells had migrated from the explants and attached to the dish, the medium was changed to keratinocyte-serum free medium

TABLE. TaqMan Probes (Invitrogen) Used for the Quantification of Gene Expression by qRT-PCR

Gene Family	Gene	TaqMan Catalog Number
ER stress	<i>PPIB</i>	Hs00168719
	<i>HSPA5</i>	Hs00946084
Cell cycle	<i>TP53</i>	Hs01034249
Oligotransferases	<i>SEC61A1</i>	Hs01037684
Cytokines	<i>VEGFA</i>	Hs00900055
	<i>IL6</i>	Hs00985639
Housekeeping gene	<i>GAPDH</i>	Hs99999905

Thermocycler parameters were as follows: 10 minutes of denaturation at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and for 1 minute at 60°C. Values were interpolated into a standard curve to calculate absolute expression. These values were then divided by the expression level of GAPDH in the same samples to correct for potential pipetting errors.

with 5% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin. These cells have been previously characterized as fibroblast-like cells due to their immunoreactivity to vimentin and to the expression of fibroblast genetic markers.¹⁴ When cells reached 80% confluency, they were passed to fresh dishes using 0.25% trypsin. Medium was renewed every 2 to 3 days and replaced with fresh medium 24 hours before treatment of 50, 200, or 500 µg/mL doxycycline or the same volume of vehicle (PBS) for 24 hours. All experiments were performed with cells at passages 3 to 5.

Toxicity Assay

Responses to doxycycline of primary cultures of pterygium cells from Hispanic or Caucasian patients were studied in 96-well plates as described previously.¹⁶ Cells were seeded at a density of 25,000 cells/well and allowed to attach to the substrate for 4 hours. After that, 500 µg/mL doxycycline or the same volume of vehicle (PBS) was added to the wells, and cell numbers were estimated after 24 hours by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Promega, Madison, WI, USA). Results are presented as percentage of viability over untreated controls.

RNA Extraction and Transcriptomic Analyses

Total RNA was isolated from pterygium cell cultures using TRIzol (Invitrogen), purified using the RNeasy mini-kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), and treated with DNase I (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) library preparation and ultrasequencing were performed according to the manufacturer's protocols and using their reagents (Illumina, San Diego, CA, USA) as described previously.¹⁴ Briefly, the integrity and quality of total RNA were assessed with an automated electrophoresis system (Experion; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Then, mRNA was isolated from 1 µg of total RNA using poly-T oligonucleotide-attached magnetic beads. This mRNA was fragmented into approximately 200 base pair (bp) pieces by using divalent cations under elevated temperature. Cleaved RNA fragments were reverse transcribed into first-strand cDNA using reverse transcriptase and random primers. Next, the second strand was synthesized using DNA polymerase I and RNase H. These double-stranded cDNA fragments were end-repaired by T4 DNA polymerase and Klenow DNA polymerase, phosphorylated by T4 polynucleotide kinase, and ligated to Illumina indexing adapters. These adapter-tagged libraries were amplified by using 15 cycles of PCR with DNA polymerase (Phusion; Finnzymes Reagents, Vantaa, Finland) and

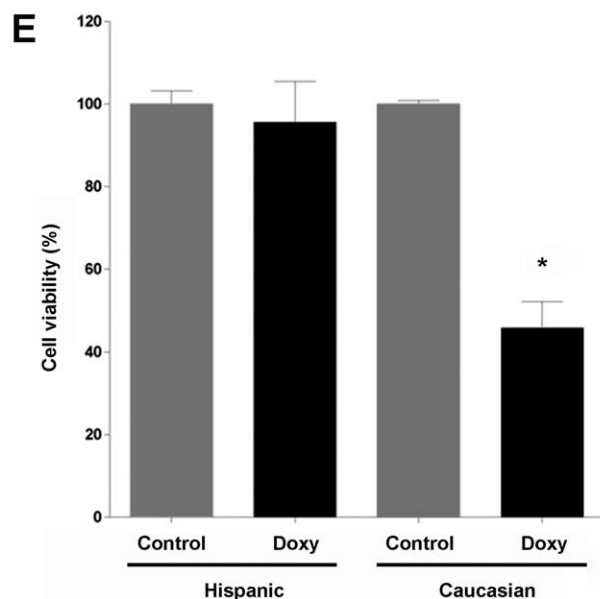
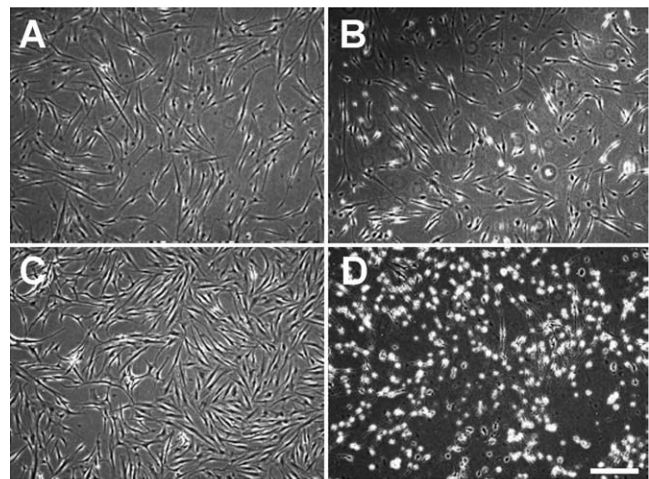


FIGURE 1. Phase-contrast views of pterygium cells obtained from Hispanic (A, B) or Caucasian (C, D) patients treated with PBS as a control (A, C) or with 500 µg/mL doxycycline (B, D) for 24 hours. (D) Dead cells can be distinguished by their round shape. (E) Quantification of the same experiment from the MTT assay. Asterisk: Statistically significant differences from PBS-treated controls ($P < 0.01$). Scale Bar: 100 µm.

validated and quantified by electrophoresis and quantitative PCR (qPCR). Pools of six indexed libraries were mixed (multiplexed) at equimolar ratios to yield a total oligonucleotide mixture concentration of 10 nM. Finally, the resulting libraries were sequenced with the Genome Analyzer IIX platform (Illumina) to generate 150-bp single reads. Six pooled indexed libraries were sequenced in each flow cell lane.

Data Treatment and Statistical Analysis

Raw sequence data in FASTQ software (<http://sourceforge.net/projects/maq>, in the public domain) format were processed through a number of sequential steps¹⁴ including adapter removal, mRNA alignment to DNA, gene expression quantification using the Tuxedo software suite (Oracle Corporation, Redwood Shores, CA, USA), and selection of differentially

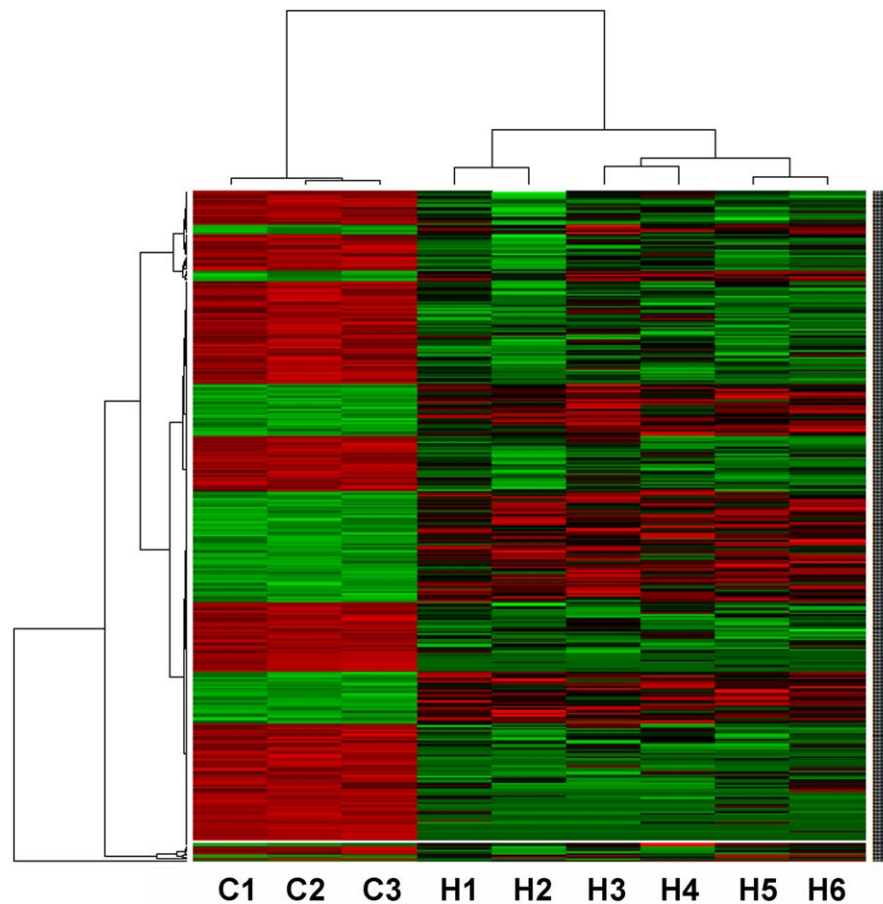


FIGURE 2. Hierarchical clustering (Manhattan plot) of the nine samples (*columns*) and the 3000 genes (*rows*) which showed larger differences between races. Notice that pterygium cells from Caucasian (C1-C3) or Hispanic (H1-H6) origin cluster together. *Red* indicates high expression levels, and *green/black* designate low expression levels.

expressed loci using the false discovery rate (FDR)-based significance analysis of microarrays (SAM) method. Resulting data were submitted to Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, in the public domain) under accession numbers GSE34736 and GSE58441.

The genes whose expression levels were most regulated by doxycycline for each racial group with a P value of <0.005 and an FDR lower than 0.2 were represented as heatmaps by using the Manhattan method for dissimilarity and the Ward method for hierarchical clustering, calculated in an R software environment (www.r-project.org, in the public domain). The Reactome FI cytoscape plugin (Reactome database; www.reactome.org, in the public domain) and the GeneMania cytoscape plugin (GeneMania; University of Toronto, Toronto, ON, Canada; www.genemania.org, in the public domain) were used to identify enriched pathways and networks regulated by doxycycline treatment in both racial backgrounds.¹⁷

qRT-PCR

Gene products whose expression levels were significantly different between the two were chosen for further confirmation. Complementary DNA was synthesized by reverse transcription of 1 μ g of total RNA, using the SuperScript III first-strand synthesis kit (Invitrogen) in a total volume of 20 μ L according to the manufacturer's instructions and was amplified by qRT-PCR by using TaqMan probes (Invitrogen; Table) with a model 7300 real time-PCR system (Applied Biosystems,

Carlsbad, CA, USA), and their gene expression levels were calculated using absolute quantification by interpolation into a standard curve.¹⁴ All values were divided by the expression value of the house keeping gene GAPDH to avoid potential pipetting errors.

Western Blotting

Some of the pterygium cells treated with doxycycline or PBS, as described above, were processed for protein analysis. Cells were homogenized in lysis buffer (PBS, pH 7.4, containing complete protease inhibitor cocktail [Roche, Madrid, Spain]) and centrifuged to eliminate solid debris. Total protein in the supernatants was calculated with the BCA kit (Pierce, Rockford, IL, USA). A 5 \times SDS sample buffer (Invitrogen) was added to all samples. Extracts were boiled for 10 minutes and run on standard 10% SDS polyacrylamide gels (Invitrogen). The antibodies tested in this study were as follows: mouse anti-CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP; Abcam, Cambridge, UK), 1:1000 dilution; rabbit anti-TIMP2 (Abcam), 1:1000 dilution; rabbit anti-TIMP3 (Abcam), 1:1000 dilution; and mouse anti- β -tubulin (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), 1:40,000 dilution. Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (1:6000 dilution) or donkey anti-mouse (1:30,000 dilution) antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) and Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA, USA), respectively. Peroxidase activity was detected with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare,

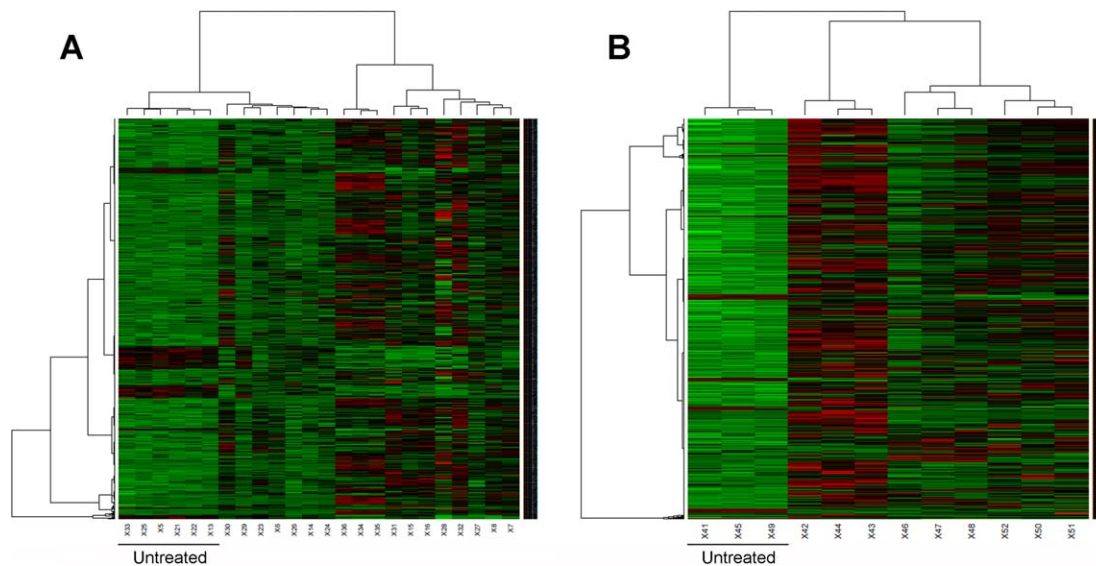


FIGURE 5. Hierarchical clustering (Manhattan plot) of the Hispanic (A) and Caucasian (B) pterygium cells treated with and without doxycycline. With an FDR = 0.2 cut-off there are 839 differentially expressed genes in Hispanics and 785 genes in Caucasians. *Red* indicates high expression levels, and *green/black* designate low expression levels.

Buckinghamshire, UK) and subsequently exposed on x-ray films (GE Healthcare). All experiments were repeated at least three times.

RESULTS

Pterygium Cell Sensitivity to Doxycycline in Primary Cultures

Primary cultures were successfully established from surgical specimens of pterygia obtained from three Caucasian and six Hispanic patients. When these cells were treated with doxycycline, we observed a behavior that confirmed previous descriptions in a clinical trial,¹⁵ with cells of Hispanic origin not responding to doxycycline (Figs. 1A, 1B, 1E), whereas cells of Caucasian origin suffered apoptosis and cell demise (Figs. 1C-E).

Hispanic and Caucasian Pterygium Cells Express Different Genes Even Before Treatment

The complete transcriptomes of the nine pterygium specimens were analyzed, and important differences in gene expression were observed between cells of the two races. At an FDR cutoff of 0.2, 5342 genes were found to be differentially expressed between the races. A heatmap of the 3000 most differentially expressed genes (Fig. 2) shows a clear genetic signature differentiating Caucasian from Hispanic samples. To investigate which cellular pathways were differentially expressed, ultrasequencing results were analyzed with specialized software (Genemania; Reactome) and shown with Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). The three pathways best represented among the genes that showed the largest variations between races were (1) those genes expressing mitochondrial proteins involved in the oxidative phosphorylation cascade (Fig. 3); (2) those regulating the proteasome (Fig. 4); and (3) genes related to extracellular matrix (collagen, laminin, and tenascin). In addition, many ribosome-encoding genes and some cytoskeleton-related genes were also included. TIMP2 and TIMP3 were more highly expressed in Hispanic than in Caucasian cells.

Doxycycline Treatment Alters Different Pathways in Hispanic and Caucasian Cells

All pterygium cells were exposed to three concentrations of doxycycline for 24 hours, and their transcriptomes were compared to untreated cells. Heatmaps of differentially expressed genes in treated or untreated Hispanic (Fig. 5A) and Caucasian (Fig. 5B) cells showed a large number of genes whose expression was modulated by doxycycline (839 in Hispanics and 785 in Caucasians). When these genes were organized into pathways, there were some pathways which were regulated in the same way in both racial backgrounds. These included vesicle targeting, protein folding, endoplasmic reticulum stress, and some mitochondrial components such as cytochrome c oxidase subunits. Other pathways were statistically significantly activated by doxycycline in Caucasians but not in Hispanics, including regulatory proteins of the execution phase of apoptosis (BCL2L1, CHOP, FADD, FXN, NKX3-1, HTRA2, TRAF2, ZNF205, ZNF622, and others), cell cycle arrest (CDK9, CDK10, CDK20, HRAS, MYC, NKX3-1, PSMA4, PSMA5, PSMD8, PSME2, RRP8, GAK, CCNB1IP1, and others), and proteins of the mitochondrial membrane (AK2, BNIP3, CCDC90A, CHCHD3, CHCHD4, COX18, DHODH, FLCN, FXC1, HSPA9, LONP1, MRPL18, NDUFS8, TIMM44, TMEM70, and others). On the other hand, there were some pathways that were statistically significantly upregulated in Hispanics but not in Caucasians. This happened with genes involved in tRNA synthesis (CARS, GARS, KARS, SARS, WARS, YARS, and others) and some genes involved in protein N-linked glycosylation (ALG2, ALG3, ALG5, ALG12, EDEM1, GANAB, MPI, OSTC, PMM2, ST6GALNAC4, SYVN1, and others).

Confirmation of Differential Expression by qRT-PCR and Western Blotting

To confirm some of the results obtained by ultrasequencing, qRT-PCR was performed with specific probes, providing very parallel results (Fig. 6). In fact, a correlation between qRT-PCR and ultrasequencing values rendered a Pearson's coefficient $r^2 = 0.87$. Some relevant proteins such as CHOP, TIMP2, and TIMP3 were also studied in parallel by ultrasequencing and

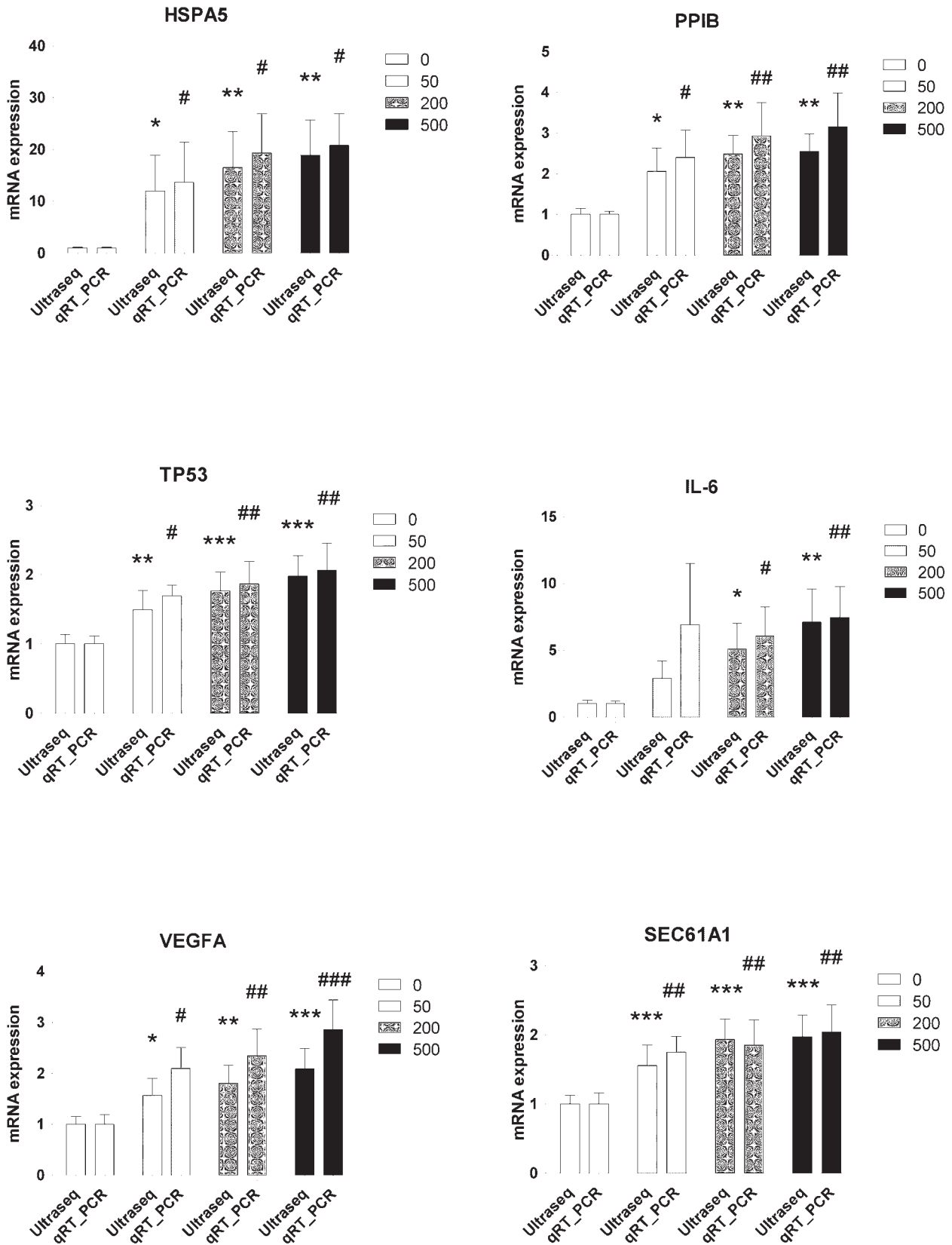


FIGURE 6. Gene expression quantification by ultrasequencing and qRT-PCR for six sample genes whose expression was regulated by the treatment (0, 50, 200, and 500 µg/mL doxycycline). Bars: means ± SEM of the nine samples used in the study. Symbols: statistically significant differences from PBS-treated controls (* or #: $P < 0.05$; ** or ##: $P < 0.01$; *** or ###: $P < 0.001$).

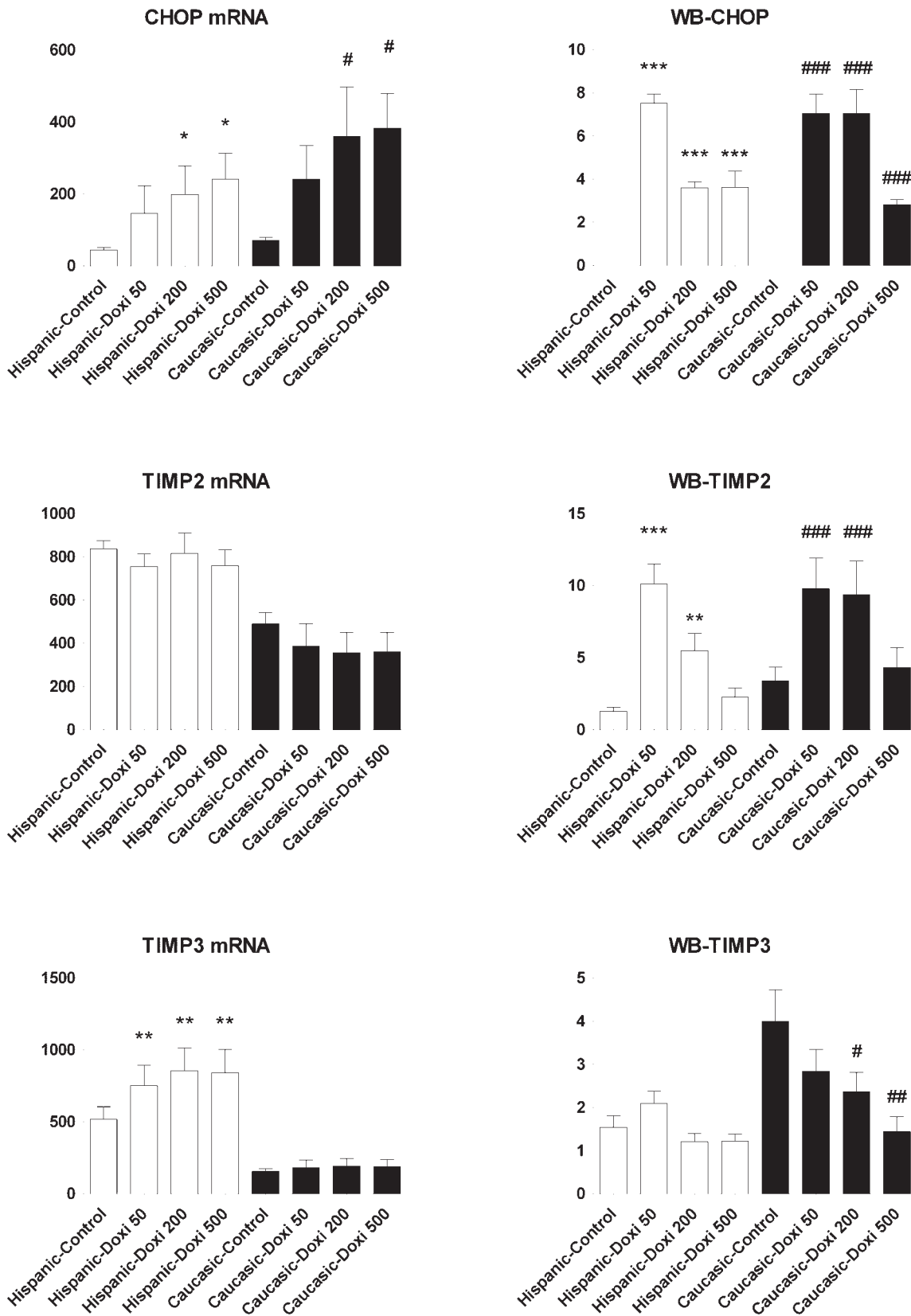


FIGURE 7. Comparison of ultrasequencing (mRNA) values (*left*) and Western blotting (WB [*right*]) for CHOP, TIMP2, and TIMP3. CHOP mRNA shows a dose-dependent increase due to doxycycline treatment, which is higher in Caucasian cells than in Hispanic counterparts. This also can be appreciated in the Western blot. TIMP2 and TIMP3 mRNA expression levels are higher in Hispanic cells, but the protein levels are higher in Caucasian cells. Tubulin was used as a housekeeping protein. Bars: mean \pm SEM of the six to eight samples used in the study. Symbols: statistically significant differences from PBS-treated controls (* or #: $P < 0.05$; ** or ##: $P < 0.01$; *** or ###: $P < 0.001$).

Western blotting (Fig. 7). Interestingly, TIMP2 and TIMP3 mRNAs were lower in Caucasian cells (Figs. 7B, 7C), but the proteins behaved in the opposite way (Fig. 7E, 7F).

DISCUSSION

According to the out-of-Africa theory of human migration, Caucasian and Hispanic populations are almost as distant from each other as is possible, both geographically and genetically.¹⁸ Obviously, following the colonization of America by Europeans in the 15th century, a certain degree of genetic admixture has occurred,¹⁹ yet there is a high level of genetic variation between these two populations. It has been known for quite some time that pterygium has a high prevalence among Hispanics and Latinos^{20,21} and that these patients present with a high recurrence rate,^{9,22} but many authors have attributed these characteristics to higher exposure to ultraviolet (UV) light and a larger dedication to outside activities.^{4,5} In view of our results, we propose that most of these differences may have a genetic origin, although we cannot preclude environmental influences.

One of the shortcuts of the present report is the wide age differences between the two racial groups, with Caucasian patients being much older than the Hispanic ones. Nevertheless, this is a faithful representation of the clinical reality found in ophthalmologic services across Spain. Hispanic patients requiring pterygium excision in this context are always younger. Until now, we blamed a longer exposure to UV light during their childhood/youth in their countries of origin, although now we know that deep genetic differences may be at the root of this observation. In contrast, Caucasian patients (Spain's nationals in this case) tend to develop pterygia at a more advanced age and with a much lower incidence; thus, it was impossible to obtain age-matched pterygia for this racial group.

In our present study, we have shown that Caucasian pterygium cells in culture respond to doxycycline treatment by becoming apoptotic, whereas Hispanic cells do not. This confirms our previous observations in a clinical trial,¹⁵ but at that time, we did not know whether the observed disparities were due to different rates of doxycycline transport from the blood to the cornea or to other pharmacodynamic factors. Now we can affirm that pterygium cells are intrinsically different between these two populations and that the lack of response in the Hispanic cells are due to genetic reasons.

When the genetic backgrounds were studied in untreated cells, we found a great number of genes (5342 genes) with significantly different expressions between the races. These included genes with very important roles in maintaining cell homeostasis, such as those involved in the oxidative phosphorylation chain, the proteasome, or the extracellular matrix. Of course, these three pathways are paramount in triggering either apoptosis or cell survival.^{23,24} Two of the genes that were differentially expressed were TIMP2 and TIMP3. Although we did not find a metalloproteinase (MMP) gene altered when comparing races, TIMP mRNAs were higher in Hispanic cells, although when investigated by Western blotting, TIMP proteins were higher in Caucasian cells.

The importance of MMPs and TIMPs in pterygium pathogenesis has been known for some time, especially as they relate to invasion and migration of the advancing cells.²⁵⁻²⁷

The analysis of gene expression after doxycycline treatment was very informative. First, we found some pathways that were activated in both races and which coincided with previous studies.¹⁴ However, more interesting were those pathways that became activated in one race or the other. One of these

included the genes involved in tRNA synthesis, which is upregulated in Hispanic cells but not in Caucasian ones. The mechanism of action by which doxycycline acts on prokaryotic cells includes targeting bacterial aminoacyl-tRNA synthetase.²⁸ Accepting a similar mechanism in eukaryotes, Hispanic pterygium cells would be more protected against the drug because they produce more active enzymes.

Apoptosis regulation is one of the major mechanisms by which doxycycline reduces pterygium growth.¹⁴ In this study, we found many regulatory proteins of the execution phase of apoptosis that are upregulated by doxycycline in Caucasian cells but not in Hispanic ones. For instance, ZNF205 (also known as Rhit) is related with the generation of intracellular oxidative stress through the production of H₂O₂.²⁹ This molecule is upregulated in Caucasians following application of doxycycline, but its expression does not change in Hispanics. Therefore, Caucasian cells would be more sensitive to oxidative stress and initiation of the mitochondrial apoptotic cascade. The proteasome is also related to apoptosis and oxidative stress.³⁰ As happens with so many other genes, critical components of the proteasome are upregulated upon doxycycline treatment in Caucasians but not in Hispanics, making the former more susceptible to apoptotic cell death.

The cell cycle is another obvious pathway whose regulation may result in differential cell survival. Here we saw that several cyclin-dependent kinases (CDK9, CDK10, CDK20) and proto-oncogenes (MYC, HRAS) were upregulated in doxycycline-treated Caucasian cells but not in their Hispanic counterparts.

Other genes overexpressed in Caucasian but not in Hispanic cells included MT2A, a molecule that inhibits cell growth through apoptosis, G2/M arrest, and negative regulation of NFκB,³¹ and many components of the chemokine family such as CXCL1, CXCL2, CXCL3, and CCL5. Chemokines have been described previously as molecules that are upregulated in pterygium compared with normal conjunctiva²⁴ and can act as chemoattractants for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, thus fighting the excessive growth of pterygium cells.³²

This is not the first time that differential pharmacological responses have been described depending on the patient's race. Some examples include pharmacokinetic changes,³³ varying tolerance to the drug,³⁴ or different side effects.³⁵ Nevertheless, this is the first time this has been reported for pterygium.

Other studies have also found racial disparities as an explanation for the prevalence of pterygium.^{36,37} These differences have often been explained by variations in lifestyle, but given our results, those studies should be revisited, looking for potential genetic diversity. The present study also underscores the importance of including patients from different ethnic backgrounds in clinical trials, as a drug can be active in some people but not in others.

Acknowledgments

The authors thank Judit Narro for excellent technical assistance and María Íñiguez (Ultrasequencing Platform, Center for Biomedical Research of La Rioja) for invaluable help with setting the Illumina protocols.

Supported by Fundación Rioja Salud. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Disclosure: **I.M. Larrayoz**, None; **Ó. Rúa**, None; **S. Velilla**, None; **A. Martínez**, None

References

- Bradley JC, Yang W, Bradley RH, Reid TW, Schwab IR. The science of pterygia. *Br J Ophthalmol*. 2010;94:815-820.

2. Dzunic B, Jovanovic P, Veselinovic D, Petrovic A, Stefanovic I, Kovacevic I. Analysis of pathohistological characteristics of pterygium. *Bosn J Basic Med Sci.* 2010;10:307-313.
3. Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D. Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23:195-228.
4. Yam JC, Kwok AK. Ultraviolet light and ocular diseases. *Int Ophthalmol.* 2014;34:383-400.
5. Liu L, Wu J, Geng J, Yuan Z, Huang D. Geographical prevalence and risk factors for pterygium: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2013;3:e003787.
6. Chen J, Maqsood S, Kaye S, Tey A, Ahmad S. Pterygium: are we any closer to the cause? *Br J Ophthalmol.* 2014;98:423-424.
7. Di Girolamo N. Association of human papilloma virus with pterygia and ocular-surface squamous neoplasia. *Eye (Lond).* 2012;26:202-211.
8. Kaufman SC, Jacobs DS, Lee WB, Deng SX, Rosenblatt MI, Shtein RM. Options and adjuvants in surgery for pterygium: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology.* 2013;120:201-208.
9. Kandavel R, Kang JJ, Memarzadeh F, Chuck RS. Comparison of pterygium recurrence rates in hispanic and white patients after primary excision and conjunctival autograft. *Cornea.* 2010;29:141-145.
10. Mauro J, Foster CS. Pterygia: pathogenesis and the role of subconjunctival bevacizumab in treatment. *Semin Ophthalmol.* 2009;24:130-134.
11. Besharati MR, Manaviat MR, Souzani A. Subconjunctival bevacizumab injection in treatment of pterygium. *Acta Med Iran.* 2011;49:179-183.
12. Hu Q, Qiao Y, Nie X, Cheng X, Ma Y. Bevacizumab in the treatment of pterygium: a meta-analysis. *Cornea.* 2014;33:154-160.
13. Cox CA, Amaral J, Salloum R, et al. Doxycycline's effect on ocular angiogenesis: an in vivo analysis. *Ophthalmology.* 2010;117:1782-1791.
14. Larrayoz IM, de Luis A, Rua O, Velilla S, Cabello J, Martinez A. Molecular effects of doxycycline treatment on pterygium as revealed by massive transcriptome sequencing. *PLoS One.* 2012;7:e39359.
15. Rua O, Larrayoz IM, Barajas MT, Velilla S, Martinez A. Oral doxycycline reduces pterygium lesions; results from a double blind, randomized, placebo controlled clinical trial. *PLoS One.* 2012;7:e52696.
16. Martinez A, Zudaire E, Portal-Nunez S, et al. Proadrenomedullin NH2-terminal 20 peptide is a potent angiogenic factor, and its inhibition results in reduction of tumor growth. *Cancer Res.* 2004;64:6489-6494.
17. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, et al. GeneMANIA cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics.* 2010;26:2927-2928.
18. Jakobsson M, Scholz SW, Scheet P, et al. Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature.* 2008;451:998-1003.
19. Bryc K, Velez C, Karafet T, et al. Colloquium paper: genome-wide patterns of population structure and admixture among Hispanic/Latino populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(suppl 2):8954-8961.
20. West S, Munoz B. Prevalence of pterygium in Latinos: proyecto VER. *Br J Ophthalmol.* 2009;93:1287-1290.
21. Taylor SL, Coates ML, Vallejos Q, et al. Pterygium among Latino migrant farmworkers in North Carolina. *Arch Environ Occup Health.* 2006;61:27-32.
22. Huerva V, March A, Martinez-Alonso M, Muniesa MJ, Sanchez C. Pterygium surgery by means of conjunctival autograft: long term follow-up. *Arq Bras Oftalmol.* 2012;75:251-255.
23. Buron N, Guery L, Creuzot-Garcher C, et al. Trefoil factor TFF1-induced protection of conjunctival cells from apoptosis at premitochondrial and postmitochondrial levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:3790-3798.
24. Hou A, Lan W, Law KP, et al. Evaluation of global differential gene and protein expression in primary pterygium: S100A8 and S100A9 as possible drivers of a signaling network. *PLoS One.* 2014;9:e97402.
25. Seet LF, Tong L, Su R, Wong TT. Involvement of SPARC and MMP-3 in the pathogenesis of human pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:587-595.
26. Nubile M, Curcio C, Lanzini M, et al. Expression of CREB in primary pterygium and correlation with cyclin D1, Ki-67, MMP7, P53, P63, survivin and vimentin. *Ophthalmic Res.* 2013;50:99-107.
27. Tsai YY, Chiang CC, Yeh KT, Lee H, Cheng YW. Effect of TIMP-1 and MMP in pterygium invasion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:3462-3467.
28. Xu ZQ, Flavin MT, Flavin J. Combating multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;23:163-182.
29. Iida R, Ueki M, Yasuda T. Identification of Rhit as a novel transcriptional repressor of human Mpv17-like protein with a mitigating effect on mitochondrial dysfunction, and its transcriptional regulation by FOXD3 and GABP. *Free Radic Biol Med.* 2012;52:1413-1422.
30. Paniagua SG, De Bruin G, Overkleeft HS, Florea BI. Toward understanding induction of oxidative stress and apoptosis by proteasome inhibitors. *Antioxid Redox Signal.* In press.
31. Pan Y, Huang J, Xing R, et al. Metallothionein 2A inhibits NF-kappaB pathway activation and predicts clinical outcome segregated with TNM stage in gastric cancer patients following radical resection. *J Transl Med.* 2013;11:173.
32. Siak JJ, Ng SL, Seet LF, Beuerman RW, Tong L. The nuclear-factor kappaB pathway is activated in pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:230-236.
33. Cherala G, Munar MY, Naher A, Al-Uzri A. Tacrolimus pharmacokinetics in hispanic children after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2011;43:3708-3712.
34. Han HS, Reis IM, Zhao W, et al. Racial differences in acute toxicities of neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in patients with early-stage breast cancer. *Eur J Cancer.* 2011;47:2537-2545.
35. Jimenez N, Anderson GD, Shen DD, et al. Is ethnicity associated with morphine's side effects in children? Morphine pharmacokinetics, analgesic response, and side effects in children having tonsillectomy. *Paediatr Anaesth.* 2012;22:669-675.
36. Moran DJ, Hollows FC. Pterygium and ultraviolet radiation: a positive correlation. *Br J Ophthalmol.* 1984;68:343-346.
37. Ang M, Li X, Wong W, et al. Prevalence of and racial differences in pterygium: a multiethnic population study in Asians. *Ophthalmology.* 2012;119:1509-1515.
38. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D199-D205.39.
39. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:27-30.

ANEXO IV

ANEXO IV

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: Estudio unicéntrico de fase II, doble ciego, randomizado, comparando doxiciclina administrada oralmente frente a placebo en pacientes con pterigión.

CÓDIGO DEL PROMOTOR: CIBIR001
PROMOTOR: CIBIR
INVESTIGADOR PRINCIPAL: Sara Velilla Osés
CENTRO: Hospital San Pedro

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

El pterigión es un crecimiento anormal de las células de la conjuntiva (el blanco del ojo) generado, en la mayoría de los casos, por una exposición excesiva a la luz ultravioleta. Es muy abundante en personas que viven o han vivido en lugares muy soleados, cercanos al ecuador. Si no se hace una intervención médica, estas células pueden seguir creciendo ilimitadamente y cubrir la córnea (parte transparente del centro del ojo) dificultando o llegando a impedir completamente la visión. Hasta el momento, la única intervención aceptada para esta enfermedad es la eliminación quirúrgica (mediante una operación) de las células del pterigio. Uno de los problemas asociados al pterigio es su alta probabilidad de recidiva (volver a crecer) después de haber sido extirpado.

Comité Ético de Investigación Clínica de La Rioja (CEICLAR)

Siguiendo una serie de experimentos realizados en el CIBIR y en otras instituciones de investigación sobre animales de experimentación, se ha identificado un fármaco (doxiciclina) que es muy eficaz en reducir el crecimiento del pterigión e incluso llega a eliminarlo totalmente en animales. Se trata de un fármaco que se ha utilizado durante muchos años en la clínica humana para otras indicaciones y cuyo perfil de seguridad está muy bien determinado.

El OBJETIVO principal de este estudio clínico es comprobar si este medicamento es eficaz para reducir el crecimiento del pterigio, llegando incluso a hacer innecesaria la intervención quirúrgica. Como objetivos secundarios se busca comprobar si el tratamiento con esta sustancia reduce la aparición de recidivas (nuevo crecimiento del pterigión después de la operación), así como identificar las señales celulares que están implicadas en la respuesta al fármaco.

Para llevar a cabo este estudio, los pacientes que voluntariamente decidan participar en él serán divididos en dos grupos. Uno de los grupos recibirá el medicamento que se está investigando mientras que el otro grupo recibirá un placebo, es decir cápsulas idénticas a las del primer grupo pero que no contendrán la sustancia farmacológicamente activa. Esta distribución se hará al azar mediante un programa de ordenador de forma que ni el médico ni el paciente sabrán cuál es el tratamiento que va a recibir. La proporción de pacientes que se asignen a cada grupo será de 2 a 1, es decir de cada 3 pacientes habrá 2 que reciban el medicamento y sólo 1 que reciba el placebo. El número total de pacientes que participarán en el estudio es de 50.

En la primera visita, además de recavarse los datos pertinentes y hacerse el reconocimiento y diagnóstico oftalmológico, se tomará una fotografía del ojo afectado (o de los dos en su caso). La fotografía será sólo del globo ocular para impedir el reconocimiento del paciente. Una vez que el paciente esté enrolado en el estudio, se le entregará un frasco con 60 cápsulas. El paciente deberá tomar 2 cápsulas diarias, una cada 12 horas aproximadamente, media hora antes de las comidas (desayuno y cena), durante 30 días. Si en algún momento se le olvidara hacer una toma a su hora, deberá hacerlo lo antes posible. Conviene tomar agua para facilitar tragar la cápsula, pero este medicamento no se debe tomar con leche o zumo de frutas, ya que estas bebidas pueden reducir la absorción intestinal del fármaco.

La segunda visita tendrá lugar 30 días después de la primera, una vez que el paciente haya tomado todos los comprimidos. El paciente deberá traer a esta segunda visita el frasco que recibió con las cápsulas que hayan sobrado (de haber alguna). En este momento se tomará otra fotografía del ojo que tuviera el pterigión (o de ambos, en su caso). Después de la evaluación oftalmológica el médico decidirá si el paciente requiere o no tratamiento quirúrgico. En caso de realizarse la extirpación del pterigio, las células eliminadas serán enviadas al CIBIR para su análisis mediante técnicas de biología celular y molecular que ayuden a entender mejor la fisiología de esta enfermedad. En ningún caso los investigadores tendrán acceso a los datos personales del donante ni realizarán análisis que lesionen el derecho a la intimidad genética de éste.

Tanto si se realiza la operación como si no, el paciente acudirá a la consulta 6 y 12 meses después de finalizar el tratamiento para evaluar la evolución del pterigio o su ausencia.

Éstas son precauciones habituales en el tratamiento y seguimiento del pterigión, de forma que la única diferencia con un tratamiento fuera del ensayo clínico es la toma de doxiciclina durante 30 días.

El sujeto de un estudio clínico tiene una serie de responsabilidades. En este caso, éstas incluyen acudir a las 4 visitas siguiendo el calendario que se le indique (se le avisará por teléfono unos días antes para recordarle la cita) y tomar las cápsulas que se le entreguen siguiendo el plan previsto. Además, deberá notificar lo antes posible, al número de contacto que figura al final de este documento, cualquier efecto adverso que pueda ser debido al

tratamiento recibido, así como cualquier cambio en la medicación que toma habitualmente por otros motivos.

Durante los 13 meses que esté en el estudio clínico, el paciente dispondrá de una atención médica prioritaria para todos los temas relacionados o derivados del ensayo.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.

Los beneficios esperados para el sujeto del estudio son una posible reducción de la superficie ocupada por el pterigio y, en algunos casos, incluso una desaparición completa que haría innecesaria la intervención quirúrgica.

Además, de la interpretación de los resultados de este estudio puede obtenerse un mayor conocimiento de la fisiopatología del pterigión y se pueden derivar beneficios para otros pacientes en el futuro.

Hay que tener en cuenta que es posible que el paciente no obtenga ningún beneficio concreto por razones de haber sido tratado con placebo o de que el medicamento no sea eficaz para esta dolencia.

La doxiciclina ha sido utilizada durante muchos años como un antibiótico de amplio espectro para el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas. En ensayos clínicos de una duración mucho más larga que la requerida en este estudio se han observado porcentajes muy bajos de reacciones adversas. Por ejemplo, en un estudio de la eficacia de la doxiciclina para aliviar la artritis se aplicó la misma dosis que en nuestro ensayo (100 mg de doxiciclina, 2 veces al día) durante 30 meses a 431 voluntarios. Sólo se observaron reacciones adversas en un 16 % de los pacientes y éstas fueron de grado menor. Las reacciones adversas más comunes fueron náuseas, problemas digestivos (dolor de estómago, algún caso de reflujo esofágico) y sensibilidad al sol (Brandt et al., Effects of doxycycline on progression of osteoarthritis. Results of a randomized, placebo-controlled, double blind trial. Arthritis Rheum. 52:2015-2025; 2005).

La doxiciclina está comercializada por diversos laboratorios.

Las mujeres en edad fértil que no estén siguiendo un régimen anticonceptivo y aquellas que estén embarazadas o lactantes no podrán participar en el estudio, ya que la doxiciclina puede tener efectos imprevistos en el desarrollo embrionario y fetal y se ha comprobado que se secreta en la leche materna.

Es importante que durante el tratamiento con doxiciclina no se sometan a una exposición solar intensa sin protección mediante cremas de protección o ropa que cubra la piel, así como gafas con filtro solar.

TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS.

En caso de no participar en el estudio, su pterigión será tratado siguiendo los protocolos habituales en el Servicio de Oftalmología. Estos incluyen la operación para eliminar las células pterigiales y el seguimiento post-operatorio adecuado.

No existe ninguna alternativa farmacéutica para el tratamiento no quirúrgico del pterigión.

Si desea más información sobre las posibles alternativas, el médico que está a cargo del estudio se la facilitará sin ningún compromiso.

SEGURO

El Promotor del estudio dispone de una póliza de seguros que se ajusta a la legislación vigente y que le proporcionará la compensación e indemnización que le corresponda por ley en caso de menoscabo de su salud o de lesiones que pudieran producirse en relación con su participación en el estudio.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), Comunidades Autónomas (inspección), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo. Para la realización del estudio el promotor del mismo ha firmado un contrato con el centro donde se va a realizar y con el médico del estudio.

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto y le serán reintegrados los gastos extraordinarios (p. ejem. Comidas y traslados). Usted no tendrá que pagar por los medicamentos del estudio.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información referente a los fármacos utilizados durante el estudio (como otros antibióticos, anticoagulantes, antihipertensivos, antiepilépticos u otros ...) que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio y que se descubra durante su participación, le será comunicada a su médico lo antes posible.

**Comité Ético de Investigación Clínica
de La Rioja (CEICLAR)**

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Cuando acabe su participación recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado para su enfermedad, pero es posible que no se le pueda seguir administrando la medicación del estudio. Por lo tanto, ni el investigador ni el promotor adquieren compromiso alguno de mantener dicho tratamiento fuera de este estudio.

DATOS DE CONTACTO

En caso de que la medicación le cause cualquier tipo de reacción adversa o que vd. necesite ponerse en contacto con el Servicio de Oftalmología para hacer una consulta o comunicar un cambio en los medicamentos que está tomando, diríjase a la siguiente dirección:

Dr Rúa Galisteo, tel 941298000 ext 81025 (en horario laboral), o al móvil 669044609 (fuera de horario).

MANIPULACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE O BIOLÓGICAS PARA ESTUDIOS GENÉTICOS

consentimiento independiente en el que figure tipo de análisis, finalidad, almacenamiento y anonimización de las muestras.

En caso de que el médico decida que debe hacerse una intervención quirúrgica para eliminar el pterigión, estas células serán enviadas al CIBIR para su análisis. El análisis de estas muestras incluye su cultivo en medios estériles, la extracción de proteínas, ADN y ARN. La finalidad de estos análisis es entender mejor el mecanismo de acción de la doxiciclina sobre las células del pterigio y permitir mejoras futuras en el tratamiento de esta enfermedad. Todas las muestras serán identificadas únicamente por un código, de forma que los investigadores no tengan acceso en ningún momento a la identidad de los pacientes. Los extractos celulares serán guardados en los congeladores del CIBIR hasta que se publiquen los resultados experimentales, momento en que las muestras serán destruidas.

Código del Estudio: CIBIR001

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º.- Cuando quiera.

2º.- Sin tener que dar explicaciones.

3º.- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

**Comité Ético de Investigación Clínica
de La Rioja (CEICLAR)**

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accedo a que las muestras de sangre o tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad o fármacos del estudio no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio):

SÍ
NO

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:
Fecha:

Nombre:
Fecha:

Versión
Fecha:

Código del Estudio:

Yo (nombre y apellidos).....en
calidad de(relación con el participante)
de.....(nombre y apellidos del participante).

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

(nombre del investigador)

Comprendo que la participación del paciente es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

1º.- Cuando quiera.

2º.- Sin tener que dar explicaciones.

3º.- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

**Comité Ético de Investigación Clínica
de La Rioja (CEICLAR)**

- En mi presencia se ha dado a(nombre del participante) toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar. Presto mi conformidad para que.....(nombre del participante) participe en este estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de los datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accedo a que las muestras de sangre o tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad o fármacos del estudio no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio):

SÍ
NO

Firma del representante:

Firma del investigador:

Nombre:
Fecha:

Nombre:
Fecha:

Versión
Fecha

Código del Estudio:

Yo (nombre y apellidos del testigo)
Declaro bajo mi responsabilidad que (nombre y apellidos del participante).....
.....ha leído (o se le ha leído, en el caso en que el paciente no pueda leer), la hoja de información que se le ha entregado.

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha hablado con:

.....

(nombre del investigador)

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

1º.- Cuando quiera.

2º.- Sin tener que dar explicaciones.

3º.- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

**Comité Ético de Investigación Clínica
de La Rioja (CEICLAR)**

- Ha expresado libremente su conformidad para participar en este estudio y da su consentimiento para el acceso y utilización de los datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accede a que las muestras de sangre o tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad o fármacos del estudio no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio):

SÍ

NO

Firma del testigo:

Firma del investigador:

Nombre:

Fecha:

Nombre:

Fecha:

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente.

Versión

Fecha:

ANEXO V

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ _ / _ _ / _ _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

ANEXO V

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

Estudio unicéntrico de fase II, doble ciego, randomizado, comparando doxiciclina administrada oralmente frente a placebo en pacientes con pterigión

CÓDIGO: CIBIR 001

PROMOTOR: CIBIR
Dr. Alfredo Martínez Ramírez
C/ Piqueras, 98; 26006 Logroño (La Rioja)
Teléfono: 941 278 775

INVESTIGADOR
COORDINADOR: Sara Velilla Osés
Servicio de Oftalmología
Hospital San Pedro
C/ Piqueras, 98; 26006 Logroño (La Rioja)
Teléfono: 941 298 000

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ / _ / _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

CONTENIDO

1.	INSTRUCCIONES PARA CUMPLIMENTAR ESTE CRD	3
2.	VISITA 1: DIAGNÓSTICO	4
2.1.-	VISITA DIAGNÓSTICO: ANAMNESIS	4
2.2.-	VISITA DIAGNÓSTICO: Criterios de inclusión/exclusión	5
2.3.-	VISITA DIAGNÓSTICO: Fotografía de la lesión	6
3.	VISITA 2: Visita a los 30 DÍAS de la VISITA 1	7
3.1.-	VISITA 2: Fotografía de la lesión	8
3.2.-	VISITA 2: EVALUACIÓN MÉDICA	9
4.	VISITA 3: Visita a los 6 MESES de la VISITA 2	10
4.1.-	VISITA 3: EVALUACIÓN MÉDICA	10
5.	VISITA 4: Visita a los 6 MESES de la VISITA 3	11
5.1.-	VISITA 4: EVALUACIÓN MÉDICA	11
6.	FINALIZACIÓN ESTUDIO	12
7.	ACONTECIMIENTOS ADVERSOS	13
7.1.-	RECOGIDA DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS	13
7.2.-	NOTIFICACIÓN DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS	14

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ / _ / _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

1. INSTRUCCIONES PARA CUMPLIMENTAR ESTE CRD

- 1) Sólo se permitirá realizar anotaciones en este cuaderno a las personas autorizadas.
- 2) Escriba claramente usando un bolígrafo y presionando lo suficiente para que la información quede registrada en todas las copias de las páginas. Debe escribirse solamente en la página superior y por favor no escriba en las copias una vez que los originales hayan sido recogidos
- 3) Al iniciar cada hoja, completar el encabezado (INVESTIGADOR, PACIENTE, FECHA).
 - Iniciales: Las dos primeras posiciones por la izquierda para las iniciales del primer y segundo nombre y las dos últimas para las del primer y segundo apellido. Al codificar apellidos, se prescindirá de preposiciones y artículos. En caso de apellidos compuestos utilizar sólo las iniciales del primer componente.
 - Fecha: siempre en el formato dd/mm/aa.
- 4) El número de paciente se asigna tras comprobar que cumple los criterios de inclusión/exclusión. Acuérdesse entonces de rellenar las hojas previas.
- 5) Si es necesario hacer algún comentario respecto al contenido de cada hoja, en el pie de página tiene un espacio reservado
- 6) Rellene todos los espacios disponibles. Señale con una [X] las casillas elegidas.

Ejemplo:

correcto



incorrecto



- 7) **Datos numéricos**: Los datos numéricos deben ser escritos comenzando por la izquierda, rellenando con ceros siempre que sea necesario.

Ejemplo:

correcto

0	7	5
---	---	---

incorrecto

7	5	
---	---	--

- 8) Las **correcciones** se realizarán tachando la anotación incorrecta y poniendo la información correcta a su lado. La anotación incorrecta deberá quedar legible. Toda corrección deberá ir **firmada y fechada** por la persona que la ha realizado. Sólo podrán hacer correcciones las personas mencionadas en el primer punto de este apartado debiendo coincidir la persona que comete la equivocación con al que subsana el error.
- 9) **Correcciones**: para cualquier corrección necesaria, debe cruzarse con una línea horizontal el dato incorrecto y a continuación escribir el dato correcto añadiendo la fecha, la firma y las iniciales del investigador principal o de cualquiera de los miembros del equipo que esté autorizado para ello. **No utilizar fluido corrector.**

Ejemplo:

0	7	5
---	---	---

0 7 5 *Firma*

SLB 09/09/99

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ / _ / _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

2. VISITA 1: DIAGNÓSTICO

2.1.- VISITA DIAGNÓSTICO: ANAMNESIS

Fecha nacimiento: _/ _/ _

Género: Masculino

Femenino

Antecedentes familiares

Proceso	Padre	Madre	Hermanos
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Antecedentes personales

Proceso	Año diagnóstico	Tratamiento

COMENTARIOS:

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ / _ / _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

2.2.- VISITA DIAGNÓSTICO: Criterios de inclusión/exclusión

Criterios de inclusión

Antes del comienzo de los procedimientos especificados en el protocolo, deberá obtenerse y documentarse el consentimiento informado.

(Táchese lo que corresponda)

1. Pacientes con pterigión primario no intervenido que produzca alguno de los siguientes síntomas:

a. astigmatismo sin otra causa.	Si	No
b. Sensación de cuerpo extraño.	Si	No
c. Afectación corneal amenazando el eje visual.	Si	No
2. Edad 18 años.	Si	No
3. Capaz de cumplir con el seguimiento programado.	Si	No

Criterios de exclusión*

(Táchese lo que corresponda)

1. Mujeres embarazadas, en periodo de lactancia, o que estando en edad fértil no sigan un plan anticonceptivo.	Si	No
2. Alergia a doxiciclina o presencia de enfermedades que contraindiquen el empleo de doxiciclina como lupus eritematoso sistémico o miastemia gravis.	Si	No
3. Toma de medicamentos incompatibles con doxiciclina o que mengüen la eficacia/absorción de ésta.	Si	No
4. Pacientes que no puedan ser seguidos regularmente por razones psicológicas, sociales, familiares o geográficas.	Si	No

**Para la selección de este paciente todas las respuestas deben ser NEGATIVAS.*

****A los pacientes excluidos se les pedirá el consentimiento informado para utilizar el tejido extirpado en la intervención quirúrgica para establecer cultivos celulares y realizar análisis de biología celular y molecular.**

SI CUMPLE LOS CRITERIOS, ASIGNAR EL NÚMERO DE PACIENTE.

PACIENTE Nº _____

Completar ahora todas las casillas con el Nº PACIENTE

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ _ / _ _ / _ _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

2.3.- VISITA DIAGNÓSTICO: Fotografía de la lesión

A los pacientes incluidos se les realizará una fotografía de la lesión previamente al inicio del tratamiento.

PEGAR FOTOGRAFIA

(identificar la fotografía en la parte posterior con el número de paciente y la fecha)

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ _ / _ _ / _ _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

3. VISITA 2: Visita a los 30 DÍAS de la VISITA 1

¿Ha tomado todas las pastillas?

- SI
 NO. En caso negativo especificar el número de pastillas que no ha tomado ____

¿Ha referido algún acontecimiento adverso (AA) durante el tratamiento?

- SI
 NO

(En caso afirmativo especificar: descripción del AA, inicio y fin, tratamiento precisado y evolución del mismo)

.....

.....

.....

.....

¿Ha padecido algún acontecimiento adverso (AA) que no ha comunicado al médico?

- SI
 NO

(En caso afirmativo especificar: descripción del AA, inicio y fin, tratamiento precisado y evolución del mismo)

.....

.....

.....

.....

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ / _ / _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

3.1.- VISITA 2: Fotografía de la lesión

A los pacientes incluidos se les realizará una fotografía de la lesión al final del tratamiento.

PEGAR FOTOGRAFIA

(identificar la fotografía en la parte posterior con el número de paciente y la fecha)

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ _ / _ _ / _ _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

3.2.- VISITA 2: EVALUACIÓN MÉDICA

Se recomienda intervención quirúrgica

- SI
 NO

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ _ / _ _ / _ _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

4. VISITA 3: Visita a los 6 MESES de la VISITA 2

4.1.- VISITA 3: EVALUACIÓN MÉDICA

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ _ / _ _ / _ _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

5. VISITA 4: Visita a los 6 MESES de la VISITA 3

5.1.- VISITA 4: EVALUACIÓN MÉDICA

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ / _ / _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

6. FINALIZACIÓN ESTUDIO

EL SUJETO:

HA FINALIZADO EL ENSAYO ADECUADAMENTE

HA SIDO RETIRADO POR EL INVESTIGADOR

POR.....

HA ABANDONADO VOLUNTARIAMENTE EL ENSAYO

POR.....

1 Mala tolerancia (reacción adversa grave e inesperada)

2 Falta de cumplimiento

3 Otras

COMENTARIOS:

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _/_/____ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	--

7. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

7.1.- RECOGIDA DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

DESCRIPCIÓN DEL ACONTECIMIENTO ADVERSO	Fecha y hora de inicio	Fecha y hora de fin
	Fecha: _/_/____ Día Mes Año Hora: (00:00 ó no determinado (ND))	Fecha: _/_/____ Día Mes Año Hora: (00:00 ó no determinado (ND))
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		

ACONTECIMIENTO ADVERSO Nº	Intensidad ¹	AA grave o inesperado	Relación con el Tratamiento ²	Evolución	Acción adoptada
	1. Grado 1 2. Grado 2 3. Grado 3 4. Grado 4	1. SÍ 2. NO	0. No relacionada 1. Condicional 2. Posible 3. Probable 4. Altamente probable	0. Resuelto 1. Persistente 2. Muerte 3. Desconocida	1. Ninguna 2. Tratamiento (especificar) 3. Suspensión del tratamiento 4. Otros
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					

ADMINISTRACIÓN DE MEDICACION CONCOMITANTE				
Patología	Medicación	Fecha inicio	Fecha fin	

Escala de Intensidad¹	1. Grado 1	Alteraciones en piel (rash, urticaria), digestivas (nauseas) u otras que no requieran valoración médica.
	2. Grado 2	Alteraciones que requieran valoración médica pero no limitación o incapacidad como anemia, cefaleas, mareos, dolores musculares.
	3. Grado 3	Alteraciones que requieran incapacidad temporal o ingreso hospitalario breve como alteración de la función hepática, severa neutropenia, trombocitopenia, Sd Steven-Johnson, obstrucción bronquial, pericarditis.
	4. Grado 4	Alteraciones que produzcan la muerte, ingreso hospitalario prolongado, riesgo vital o incapacidad permanente.
Escala de causalidad²	0. No relacionada	No cumple ninguno de los criterios abajo mencionados.
	1. Condicional	Secuencia temporal razonable. No coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas. No puede ser explicada por la situación clínica del sujeto.
	2. Posible	Secuencia temporal razonable. Coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas. La reacción mejora o no tras la retirada del fármaco. Puede ser debida a la situación clínica del sujeto o a otros fármacos administrados concomitantemente.
	3. Probable	Secuencia temporal razonable. Coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas. Mejora al interrumpir la administración del fármaco. No se explica por la situación clínica del sujeto.
	4. Altamente probable	Existe una secuencia temporal razonable en relación con la administración del fármaco o con los niveles plasmáticos o titulares del mismo. La manifestación observada coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas del fármaco implicado. Mejora al interrumpir la administración del fármaco. Reaparece al administrarlo de nuevo.

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ / _ / _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

NOTIFICACIÓN DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

INSTRUCCIONES PARA CUMPLIMENTAR LA HOJA DE NOTIFICACIÓN DE REACCIONES ADVERSAS E INESPERADAS

INSTRUCCIONES GENERALES

1. Este formulario se utilizará solamente para comunicar las sospechas de reacciones adversas (RA) graves e inesperadas que ocurran con medicamentos en investigación. Se considera medicamento en investigación tanto el producto específicamente investigado como el control.
2. Las sospechas de reacciones adversas mortales o que entrañen riesgo vital (aquellas que de no haber mediado una intervención terapéutica inmediata hubieran supuesto la muerte del paciente) se comunicarán en el plazo máximo de 7 días naturales; si no se dispusiera de toda la información, ésta podrá completarse en el plazo adicional de 8 días. Las demás sospechas de reacciones adversas graves e inesperadas se comunicarán en el plazo máximo de 15 días.
3. Cuando el espacio disponible sea insuficiente, se añadirá una hoja de información adicional, correctamente identificada con el nombre del promotor y el número asignado a la notificación. En esta información adicional podrá hacerse constar la evaluación de la causalidad realizada por el técnico que informa.

INSTRUCCIONES ESPECÍFICAS

- Ø. El código de protocolo es el asignado por el promotor para identificar el ensayo. El número de notificación del promotor es el que éste utiliza para su archivo. Cuando se trate de información de seguimiento se utilizará el mismo número o bien, si se modifica, se indicará el número de la notificación inicial. Se dejará sin rellenar el espacio "Nº de notificación" que aparece sombreado.
2. La edad se pondrá en años, meses, semanas o días según convenga, pero siempre indicándolo. Si no se conoce con precisión la edad debe referirse, al menos, el grupo de edad al que pertenece (p. ej.: lactante, niño, adolescente, adulto, anciano).
7. Se describirá la reacción adversa en forma completa, indicando la fecha de finalización de la misma e incluyendo los resultados de las exploraciones complementarias o pruebas de laboratorio que se consideren de interés. A esta notificación podrán acompañarse cuantos informes se estimen convenientes para la adecuada interpretación del cuadro clínico sospechoso de ser una reacción adversa.
- 8-13. Las categorías no son mutuamente excluyentes. La asistencia en un Servicio de Urgencias de un Hospital inferior a 24 horas, no se considerará hospitalización.
14. Los medicamentos en investigación se identificarán a ser posible por su nombre genérico (DOE o DCI), indicando cuando esté disponible el nombre comercial, o en su defecto, por el nombre propuesto o código de laboratorio para el producto.
15. En caso de que la administración no sea diaria se intentará describirla con alguna de las siguientes posibilidades: cíclica, semanal, mensual, anual o número de veces que se ha utilizado (poniendo en este caso la dosis de cada toma, no la total).

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ / _ / _ _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

17. Se hará constar el proceso patológico del paciente al que va destinado el producto en investigación, o bien “voluntario sano” en caso de tratarse de tal.

19. Se hará constar la duración del tratamiento hasta el inicio de la reacción adversa.

22. Se indicará explícitamente si no se han tomado fármacos concomitantes. En el caso de considerar sospechoso alguno o algunos de los fármacos concomitantes se marcarán con un asterisco (p.ej.: * AMOXICILINA). Se excluirán los medicamentos utilizados para tratar la reacción adversa.

INVESTIGADOR INICIALES: FIRMA:	PACIENTE INICIALES:	Nº PACIENTE:	FECHA: _ / _ / _ Día Mes Año
---	-------------------------------	---------------------	---

FORMULARIO DE NOTIFICACIÓN DE REACCIÓN ADVERSA GRAVE E INESPERADA OCURRIDA EN ESPAÑA

NOTIFICACIÓN DE SOSPECHA DE REACCIÓN ADVERSA PARA MEDICAMENTOS EN INVESTIGACIÓN Notificación realizada a Eudravigilance <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	CÓDIGO DE PROTOCOLO (Promotor)..... Nº EUDRACT / Nº Protocolo AEMPS PACIENTE Nº	Nº NOTIFICACIÓN (Promotor) Nº NOTIFICACIÓN
--	---	---

I. INFORMACIÓN SOBRE LA REACCIÓN ADVERSA

1a. PAÍS	2. FECHA DE NACIMIENTO			2a. EDAD	3. SEXO	3a. PESO	3b. TALLA	4-6. FECHA DE INICIO DE LA REACCIÓN		
	DÍA	MES	AÑO		<input type="checkbox"/> HOMBRE <input type="checkbox"/> MUJER			DÍA	MES	AÑO
7. DESCRIPCIÓN DE LA REACCIÓN ADVERSA (Incluyendo resultados relevantes de exploración o de laboratorio y la fecha de finalización, si procede).								8-13b. CRITERIOS DE GRAVEDAD/ DESENLACE <input type="checkbox"/> FALLECIMIENTO <input type="checkbox"/> LA VIDA DEL PACIENTE HA ESTADO EN PELIGRO <input type="checkbox"/> HOSPITALIZACIÓN <input type="checkbox"/> PROLONGACIÓN HOSPITALIZACIÓN <input type="checkbox"/> INCAPACIDAD PERMANENTE O SIGNIFICATIVA <input type="checkbox"/> RA CLINICAMENTE RELEVANTE Desenlace <input type="checkbox"/> PERSISTENCIA DE LA RA <input type="checkbox"/> RECUPERACIÓN SIN SECUELAS <input type="checkbox"/> RECUPERACIÓN CON SECUELAS <input type="checkbox"/> DESCONOCIDO		

II. INFORMACIÓN DEL MEDICAMENTO EN INVESTIGACIÓN

14. MEDICAMENTO SOSPECHOSO	15. DOSIS DIARIA	16. VÍA	17. ENFERMEDAD EN ESTUDIO	18. FECHAS DE INICIO	FINAL	19. DURACIÓN DEL TRATAMIENTO
20. ¿REMITIÓ LA REACCIÓN AL SUSPENDER LA MEDICACIÓN? <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> NO PROCEDE		20a. ¿REMITIÓ LA REACCIÓN AL REDUCIR LA DOSIS? <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> NO PROCEDE		20b. ¿REAPARECIÓ LA REACCIÓN AL ADMINISTRAR DE NUEVO LA MEDICACIÓN? <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> NO PROCEDE		

III. MEDICAMENTOS CONCOMITANTES E HISTORIA CLÍNICA

22. MEDICAMENTOS CONCOMITANTES (Márquese con un asterisco el/los medicamentos sospechosos)	22a. DOSIS DIARIA	22b. VÍA	22c. FECHAS DE INICIO	FINAL	22d. MOTIVO DE LA PRESCRIPCIÓN
23. DATOS IMPORTANTES DE LA HISTORIA CLÍNICA (ej. diagnósticos, alergias, embarazos, etc)					

IV. INFORMACIÓN SOBRE PROMOTOR E INVESTIGADOR

24. NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL PROMOTOR		24b. NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL INVESTIGADOR	
24c. CÓDIGO DE LABORATORIO (Nº AEMPS)	25a. TIPO DE INFORME <input type="checkbox"/> INICIAL <input type="checkbox"/> SEGUIMIENTO	24c. TÉCNICO DEL PROMOTOR QUE INFORMA NOMBRE: TELÉFONO: FIRMA:	
24e. FECHA DEL INFORME	24f. FECHA DE ENTRADA AEMPS	25b. SE ADJUNTA INFORME COMPLEMENTARIO	