

**Reviglio, Víctor Eduardo**

## **Inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI), su expresión en procesos cicatrizales, inflamatorios e infecciosos de la cornea y estructuras intra- oculares**

---

**Tesis para la obtención del título de posgrado de  
Doctor en Medicina**

Director: Sambuelli, Rubén Horacio

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



**Universidad Católica de Córdoba  
Facultad de Medicina**

**Tesis Doctoral**

*“Inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI),  
su expresión en procesos cicatrizales, inflamatorios e  
infecciosos de la cornea y estructuras intra-oculares”*

**Víctor E. Reviglio**

**Año 2006**

***“Inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI),  
su expresión en procesos cicatrizales, inflamatorios e  
infecciosos de la cornea y estructuras intra-oculares”***

**Universidad Católica de Córdoba  
Facultad de Medicina**

***“Inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI),  
su expresión en procesos cicatrizales, inflamatorios e  
infecciosos de la cornea y estructuras intra-oculares”***

**Tesis Doctoral**

**Agosto 2006**

Director: Dr. Rubén Sambuelli

Doctorando: Dr. Víctor E. Reviglio

Comisión de Tesis: Dr. Carlos E. Remonda  
Dr. Víctor Croce  
Dr. Alejandro Lozano

Virgen Maria de la Inmaculada Concepción.

A mi familia, Paulina, Virginia, Nicolás y nuestro ángel Matías, por el amor y apoyo incondicional brindado todos los días.

A mis padres y hermanos por la inquebrantable guía espiritual y calidez humana.

## **Agradecimientos**

A la Facultad de Medicina por haberme brindado una formación completa, cristiana y profesional.

Al director de tesis, Dr. Rubén Sambuelli por ser quien despertó el anhelo de la investigación y la docencia en mis años de alumno de medicina y supo transmitir su experiencia como maestro.

A la comisión de tesis por sus sugerencias, consejos y enseñanzas durante mi formación académica

Al Dr. Terrence P. O'Brien, por su solidez científica y humana, quien supo transmitirme todo sus conocimientos académicos en la investigación y la oftalmología.

Al Dr. Tayyib Rana por su calidez humana, solidez científica y constante colaboración en la investigación.

Al Dr. Patrick Tong, por sus enseñanzas en el inicio de la investigación básica y molecular.

A la Dra. Micaela Falco y Dra. Alejandra Olmedo por su invaluable ayuda en el desarrollo de los modelos animales experimentales y el inquebrantable apoyo en el progreso de la tesis.

Al Dr. Alejandro Berra, por calidez humana y constante colaboración científica.

Al Dr. Hugo Lujan, por su colaboración científica y guía en los diseños y modelos experimentales.

Al Dr. Claudio P. Juárez y Juan C. Muiño por su aporte científico en ciencias básicas oftalmológicas.

<b>Índice de Contenidos</b>	<b>Página</b>
Prólogo	7
Resumen	8
Abreviaturas	10
Capítulo I	11
Introducción	
1a. Estructura anatómica de la cornea	11
1b. Matriz extracelular corneal	13
1c. Mecanismos de remodelado tisular corneal	19
1d. Cicatrización corneal luego de una queratectomía por excimer láser	24
Capítulo II	
2a. Proteasas y remodelado de la matriz extracelular	27
2b. Factores inhibidores de proteasas	31
2c. Degradación tisular corneal	32
2d. Inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI)	33
2e. Anatomía y fisiología de la retina y vítreo	34
Capítulo III	
3a. Hipótesis de trabajo	39
Objetivos	
3b. Materiales y métodos	40
Diseño metodológico	40
Población en estudio	40
Criterios de inclusión	40
Criterios de exclusión	42
Modelos animales experimentales	43
Modelo de cicatrización corneal normal	
Modelo de queratitis por HSV I	44
Modelo de queratitis por S. aureus	
Modelo de endoftalmitis por S. aureus	45
Estudio histopatológico de los tejidos oculares	
Metodología del procesado de muestras	46
Estudio histopatológico	
Técnicas de Inmunohistoquímica	
Western blot.	
Análisis estadístico	49
Resultados	50
Discusión	55
Conclusión	59
Anexo I Tablas	61
Anexo II Gráficos	66
Anexo III Figuras	83
Bibliografía	97

## **Prologo**

La cicatrización corneal es uno de los puntos más significativos en la investigación oftalmológica. Esta se basa en una secuencia de complejos eventos moleculares bien regulados, comprendidos entre las células nativas y migratorias de la cornea con la matriz extracelular. La naturaleza de la cicatrización corneal es el resultado del preciso balance entre la regeneración tisular y el mantenimiento de la homeostasis tisular. El excesivo proceso de cicatrización lleva a la fibrosis y a la formación de una cicatriz que finalmente puede implicar a pérdida de la función del tejido corneal y de la visión del paciente.



## Resumen

El balance y control del proceso de degradación y regeneración de la matriz extracelular es crucial para un correcto proceso de reparación tisular y mantenimiento de la arquitectura normal corneal y su transparencia.

La principal función de síntesis del queratocito corneal es la de reparar la matriz extracelular dañada. Las células epiteliales y queratocitos corneales son los responsables de la síntesis de metaloproteinasas y otras proteasas que van a contribuir a la degradación y remodelado tisular corneal. Estas proteasas están bajo un estricto control regulador de la activación e inhibición de su actividad proteolítica. Un inhibidor natural de proteasas es el SLPI (inhibidor de proteasas secretado por leucocitos). Trabajos de biología molecular realizados con el péptido SLPI indicaron que su función antiproteasa como componente protector y modulador de procesos inflamatorios y degenerativos residía en el dominio terminal carboxilo. Nuevos estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que este péptido presentaba una carga molecular altamente catiónica, descubriendo así la función de péptido antimicrobiano de amplio espectro (bacterias-hongos-virus).

El presente trabajo de tesis doctoral determinó la presencia del inhibidor de proteasas secretado por leucocitos en tejido corneal y otras estructuras oculares asociado a procesos inflamatorios e infecciosos oculares. Los ojos normales de animales sin patología asociada fueron procesados por técnicas de histología e Inmunohistoquímica, éstos revelaron una ausencia de expresión del SLPI en las estructuras oculares normales estudiadas. Los animales estudiados en las primeras horas posteriores a la ablación corneal con excimer láser o en las

infecciones corneales e intraoculares por *S. aureus* mostraron en los cortes histológicos una inmunotinción positiva para SLPI. Los estudios de cuantificación por Western Bot. demostraron una expresión elevada de SLPI en los homogenatos de los tejidos oculares en los animales con procesos inflamatorios e infecciosos asociados. Esto confirma que al iniciarse el proceso inflamatorio - cicatrizal se produce una regulación positiva del SLPI como factor modulador del remodelado tisular corneal. Por el contrario, el análisis de las muestras oculares normales del grupo control, se observó una inmunotinción negativa para el SLPI, confirmado por los resultados obtenidos por técnicas de Western blots. El conocido rol del SLPI como péptido antimicrobiano y antiproteasa sugieren la regulación activa de la expresión en los procesos inflamatorios oculares como lo demuestran los resultados aquí presentes. Futuros estudios de investigación básica basados en complejas técnicas de biología molecular y genética demostrarán las múltiples vías de regulación del SLPI en los mecanismos moduladores de la cicatrización y de la inmunidad innata del ojo.

## Abreviaturas

SLPI: Iniciales en ingles, texto en ingles "Secretory leukocyte protease inhibitor"

MEC: Matriz extracelular

KSPG: queratán sulfato

EGF: Factor de crecimiento epitelial

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

TGF: Factor de crecimiento transformador

KGF: Factor de crecimiento queratinocitos

HGF: Factor de crecimiento del hepatocito

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMN: Polimorfo nucleares neutrófilos

µm: micras

IL-1: Interleukina 1

TGF-β: Factor de crecimiento transformador beta

TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

HA: Ácido hialurónico

MMPs: Metaloproteinasas

TIMPs: Inhibidores titulares de metaloproteinasas

ARVO: Asociación para la investigación en visión y oftalmología

BSS: Solución salina balanceada estéril

S. aureus: Estafilococos aureus

HSV I: Virus herpes simple tipo I

## Capítulo I

### Introducción

#### ***1.a. Estructura anatómica de la cornea.***

La cornea, es un tejido avascular y transparente que está constituido por cinco capas: la primera de ellas, la más superficial, está constituida por aproximadamente cinco capas de epitelio escamoso estratificado no queratinizado de 50µm de espesor. Este epitelio descansa sobre la segunda capa tisular corneal, la membrana basal, la cual forma una barrera entre el epitelio y la capa colágena del estroma corneal por debajo. Las células epiteliales se van diferenciando gradualmente desde la membrana basal y se hacen más chatas al llegar a la superficie corneal en contacto con el film lagrimal. La capa de Bowman es un especializado complejo extracelular de macromoléculas que aparece tempranamente en el desarrollo embrionario y juega un rol muy importante en la diferenciación, crecimiento y adherencia celular. Esta también cumple una importante función como barrera a la invasión corneal por microorganismos. Las macromoléculas citadas consisten en fibras de colágeno tipo IV organizadas en forma randomizada, laminina, como así también de colágeno tipo I, III, V, XII y proteoglicanos (condroitín sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato)<sup>1</sup> Estructuras de adhesión celular, como los hemidesmosomas y filamentos de anclaje compuestos por colágeno tipo VII, unen la basal de las células epiteliales al estroma.<sup>1,2</sup>

El estroma corneal es una estructura avascular compuesta por queratocitos y componentes de matriz extracelular que en conjunto conforman la estructura

llamada matriz extracelular (MEC). Está compuesta de proteínas que incluyen también colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas. Los queratocitos son fibroblastos diferenciados del mesenquima corneal que producen las macromoléculas de la matriz extracelular, como así también las enzimas encargadas del remodelado y degradación tisular. Estos queratocitos están interconectados por procesos planos y anchos, los filamentos finos, y también por uniones tipo de hendidura que permiten la libre difusión de pequeñas moléculas.<sup>3</sup> Las fibras de colágeno corneal que componen la MEC, se orientan en forma laminar y paralelas a la superficie de la misma, con un espacio regular entre ellas y un diámetro uniforme. El tamaño y la estructura laminar es crucial para mantener la transparencia corneal. Estas estructuras laminares están conformadas por copolímeros de colágeno tipo I y V.<sup>4</sup> El colágeno tipo VI, se encuentra a través del tejido estromal corneal y también juega un rol importante en generar la estructura laminar corneal.<sup>5</sup> El principal rol de los proteoglicanos es el de proveer una estructura fuerte a la matriz corneal. Los proteoglicanos corneales más importantes son: queratán sulfato (KSPG), dermatán sulfato (decorin), y el condroitín sulfato.<sup>6</sup> Estos proteoglicanos están en íntima relación con las fibras de colágeno, en particular con el colágeno tipo VI, como reguladores del espacio inter fibrilar del colágeno.<sup>7</sup>

Al separar la porción posterior del estroma corneal del endotelio corneal se encuentra la membrana de Descemet. Esta membrana de 8-12 micras de espesor representa una modificación de la membrana basal del endotelio corneal y se encuentra compuesta por laminina, fibronectina y colágeno tipo IV, V y VIII. Tiene la función de protección contra infecciones e injurias. El endotelio corneal desempeña un rol crítico en prevenir la acumulación de agua en el estroma corneal

y por lo tanto, en el mantenimiento de la transparencia corneal. Posee una bomba endotelial de Na/K ATPase y HCO<sub>3</sub> ATPase, que transporta agua fuera del estroma corneal hacia la cámara anterior del ojo. El número de células que conforman el endotelio corneal cambia significativamente con la edad del ser humano. De un promedio de 3-4000 cel/mm<sup>2</sup> al nacimiento caen a 2500/mm<sup>2</sup> a mediana edad y para luego caer a 2000/mm<sup>2</sup> en la edad senil. Las células endoteliales corneales no se regeneran y cuando por diversos motivos caen por debajo de 800/mm<sup>2</sup>, se presenta un edema corneal que produce una falta de transparencia de la misma.<sup>8</sup> Si esto sucede, se desencadena una disminución de la agudeza visual del paciente en cuyo caso puede derivar en un trasplante corneal como único tratamiento.

### **I.b. Matriz extracelular corneal.**

#### ***Proteoglicanos***

Los proteoglicanos están formados por uniones altamente cargadas de glicosaminoglicanos unidos a un centro proteico, formando grandes macromoléculas hidrofílicas. Sus funciones biológicas y químicas son derivadas de las características fisicoquímicas de los glicosaminoglicanos con un centro proteico que tiene interacción con componentes de la matriz extracelular.<sup>9</sup> (Tabla I). El estroma corneal posee el condroitín sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato, el más abundante e importante en la transparencia corneal.

TABLA I

## Proteoglicanos y cicatrización corneal

PROTEOGLICANO	FUNCION PRIMARIA	CARACTERISTICAS ADICIONALES
Queratán Sulfato (KPSG)	Transparencia corneal	El mas abundante en la cornea
Condroitín Sulfato	Regulación de la hidratación del tejido	Responsable de la apariencia vacuolada durante la cicatrización
Heparán Sulfato (Perlecan)	Propiedades adhesivas vitales	Capacidad de unirse a los factores de crecimiento
Dermatan Sulfato (Decorin)	Regulador de la formación de colágeno	Regulador natural de la actividad del TGF-B

**Laminina**

La laminina es una glicoproteína de muchos dominios, localizada en la lámina lúcida de la membrana basal. Cada molécula esta compuesta por tres cadenas de polipéptidos, que forman una estructura cruzada con un brazo largo y tres brazos cortos.<sup>10</sup> Esta favorece la adhesión celular, la migración, el crecimiento y la diferenciación, jugando un papel muy importante en la cicatrización corneal.<sup>11</sup> En este proceso, la laminina aparece por debajo de las células que migran para

cerrar un defecto epitelial. La laminina y el colágeno tipo IV son esenciales para el mantenimiento de la estructura epitelial durante el proceso de cicatrización.<sup>12</sup>

### **Fibronectina**

La Fibronectina se encuentra en la región subepitelial corneal en relación al estroma corneal normal.<sup>13</sup> Su rol principal es el de dar un soporte estructural a las células para que se unan a la matriz extracelular colágena y así guiar su migración.<sup>14</sup> Cada cadena está compuesta por seis dominios específicos para unirse con integrinas, proteoglicanos, colágeno y otras moléculas de la matriz extracelular como la heparina.<sup>15</sup> La fibronectina y la tecnascina sirven de una importante membrana basal temporaria que se forma sobre el estroma corneal cuando el epitelio corneal se halla ausente. Esta membrana basal permite que las células epiteliales migren sobre la superficie corneal dañada. La fibronectina también permite que las células se unan por medio de la interacción con las integrinas. A su vez, esta estimula a las células epiteliales a producir el activador de plasminógeno, para convertir finalmente el plasminógeno en plasmina, que modulará junto a otros factores y las enzimas proteolíticas la degradación de la matriz extracelular.<sup>16</sup>

### **Factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento son elementos que conforman un lenguaje de señales biológicas complejas que provee las bases para la comunicación intercelular. Estos son péptidos con gran poder de regulación que coordinan la proliferación, migración y diferenciación celular, como así también la síntesis y el remodelado de la matriz extracelular. En corneas normales, los factores de



crecimiento controlan el balance entre la producción y la pérdida celular.<sup>27</sup> En corneas con defecto epitelial, estos factores regulan la cicatrización ocular.<sup>28</sup>

Muchos factores de crecimiento se han detallado como: EGF, FGF, TGF, KGF, HGF, PDGF y sus receptores, expresados en el tejido corneal. (Tabla II).

**TABLA II**  
**Factores de crecimiento**

FACTOR DE CRECIMIENTO	EFEECTO CELULA BLANCO
Factor de crecimiento transformador $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )	Re-epitelización
Factor de crecimiento transformador $\beta$ (TGF- $\beta$ 1- $\beta$ 2)	Quemotaxis fibroblastos , remodelado MEC y inhibidor de proteasas
Factor de crecimiento epitelial (EGF)	Re epitelización corneal, proliferación fibroblastos y síntesis MEC.
Factor de crecimiento fibroblasto (FGF)	Proliferación célula epitelial y deposito de MEC
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Proliferación de fibroblastos y epitelio
Factor de crecimiento del hepatocito (HGF)	Proliferación del queratocito y epitelio
Factor de crecimiento del Queratocito (KGF)	Proliferación del queratocito y epitelio

El proceso normal de recambio epitelial corneal está bajo el control y producción autócrino y parácrino de los factores de crecimiento, como por ejemplo, el factor de crecimiento transformador (TGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento epitelial.<sup>29,30</sup> El EGF y FGF estimulan la proliferación tanto de las células del limbo corneal como también del epitelio corneal. El factor de crecimiento del hepatocito (HGF) y EGF han demostrado estimular la proliferación y migración de las células epiteliales corneales mientras que, al mismo tiempo, inhiben la diferenciación de las células epiteliales a nivel terminal. El factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) también estimula la proliferación epitelial corneal pero no la migración o diferenciación terminal de estas.<sup>31</sup> El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) estimula la proliferación de las células epiteliales del limbo corneal, de las células fibroblásticas y de las endoteliales corneales.<sup>32,33</sup> El HGF y el KGF son secretados por los queratocitos residentes en el estroma corneal y están involucrados en la regulación de la proliferación de las células corneales.<sup>34</sup>

Por su parte, el TGF b inhibe la proliferación de las células del limbo como las células epiteliales corneales, pero aumenta la diferenciación de éstas. También demostró tener la capacidad de inhibir la producción de metaloproteinasas por fibroblastos.<sup>4</sup> Estos factores de crecimiento se caracterizan por influir en la migración celular en base a diferentes patrones de respuesta según su concentración tisular. Un ejemplo es el FGF, que alcanza el máximo estímulo de migración celular cuando llega a un plateau en contraste, el EGF disminuye el estímulo celular al aumentar su concentración<sup>35</sup>

### Interacción célula-matriz

La matriz extracelular juega un papel activo y complejo en la regulación celular, influyendo en su desarrollo, migración, proliferación, forma y funciones metabólicas; además, provee un sustento estructural para la estabilidad del tejido corneal. Las moléculas de la matriz extracelular son constantemente remodeladas, degradadas y re-sintetizadas durante el desarrollo.<sup>16-17</sup> El balance y control del proceso de degradación y regeneración de la matriz extracelular es crucial para un correcto proceso de reparación tisular y mantenimiento de la arquitectura normal corneal y transparencia. Las células epiteliales, endoteliales, queratocitos y otras células residentes en el tejido corneal son las células involucradas en los procesos regenerativos. Por su parte, los mecanismos degenerativos son llevados a cabo por colagenasas, gelatinasa y otras proteinasas que se encuentran presentes en el tejido corneal en formas activas e inactivas. De este crítico y correcto equilibrio de citoquinas, factores de crecimiento y otros mediadores locales en la cornea, como así también en lágrimas, humor acuoso y circulación sanguínea a nivel del limbo corneal, depende el complejo proceso de cicatrización corneal.<sup>18</sup>

Finalmente la función celular y las proteínas extracelulares están en gran parte mediadas por las integrinas, que están presentes en casi todas las células.<sup>17</sup> Estas integrinas son heterodímeros que tienen dos componentes de transmembrana, una subunidad **a** y otra **b**. Ambas subunidades se unen a las proteínas de la matriz extracelular, interactúan con dominios intracelulares, como la actina del citoesqueleto y modulan las funciones celulares. (Tabla III)

TABLA III

## Integrinas corneales

SUB UNIDADES	LIGANDOS ASOCIADOS	CELULAS BLANCO
$\alpha 2\beta 1$	Colágeno, laminina	Células epiteliales
$\alpha 3\beta 1$	Fibronectina, laminina	Células epiteliales
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectina	Células epiteliales
$\alpha 4\beta 1$	Fibronectina	Queratocitos
$\alpha 6\beta 4$	Hemidesmosomas	Células epiteliales basales
$\alpha v\beta 3$	Colágeno	Queratocitos

**I.c. Mecanismos de remodelado tisular corneal.**

En comparación con el proceso de cicatrización de la piel, la cicatrización de la cornea es un complejo y organizado proceso de cicatrización avascular que resulta en una estructura y organización tisular especializada única con respecto a otros tejidos.

Luego de que el epitelio corneal es dañado, el estroma corneal expuesto se hidrata como resultado de la pérdida de la barrera epitelial, lo que finalmente lleva a la pérdida de la transparencia característica del tejido corneal, si éste no cicatriza normalmente. Dentro de las primeras 12-48 horas posteriores al defecto epitelial, las células epiteliales adyacentes al defecto tisular comienzan a migrar sobre la herida bajo la acción de diferentes sustancias estimuladoras.<sup>36</sup> (Tabla IV).

TABLA IV

## Rol de células epiteliales corneales en la cicatrización.

ACTIVIDAD	EFFECTOS
Migración y proliferación	Re-epitelización
Producción de MEC	Formación provisional de MEC
Liberación de proteasas	Remodelado de la MEC
Producción de factores de crecimiento	Estimulación autocrina y paracrina
Formación de uniones estrechas	Función de barrera

La herida es así recubierta por células epiteliales, la mitosis celular ayuda a que se formen múltiples capas de células epiteliales corneales. La adhesión celular es mediada por la fibronectina, la cual provee una matriz extracelular o membrana celular temporaria. Inicialmente, las nuevas capas de células epiteliales están débilmente adheridas al nuevo estroma por debajo, hasta que los hemidesmosomas, fibras de anclaje y la membrana basal retornen a su normal funcionamiento.<sup>37</sup>

El cito-esqueleto de las células basales que se localizan en el borde de migración celular es reorganizado y los hemidesmosomas se recambian. Se forman adhesiones focales en las células basales de la córnea y se substituyen los complejos de adherencia. La aparición de la membrana basal, hemidesmosomas y fibras de anclaje se hace en forma sincrónica.<sup>11, 38</sup> El rol preciso de la capa de Bowman en la cicatrización corneal no es del todo bien conocido. Esta capa, sin embargo, juega un rol importante en la interacción epitelio–estroma corneal.

Dentro de la primera hora de producido el defecto epitelial corneal, la fibronectina es depositada sobre el estroma corneal en forma lineal. Esta provee un soporte provisorio para la adhesión y migración celular. El factor de crecimiento derivado de la epidermis y la interleuquina 6, también estimula la adhesión y migración celular por un mecanismo dependiente de fibronectina, posiblemente por un incremento de la expresión de los receptores de fibronectina.<sup>39</sup>

Los leucocitos neutrófilos (PMN) pueden modular las funciones biosintéticas de las células corneales luego de una injuria. Los PMN son las primeras células en migrar en tejidos dañados. En injurias corneales, tales como el defecto epitelial corneal o, quemaduras por álcalis, los PMN se encuentran en el limbo corneal y el área lesionada en los primeros 2 días.<sup>40</sup> Gan y colaboradores demostraron que el índice de cicatrización corneal está reducido y aparece adelgazado con la falta de leucocitos en cornea.<sup>40</sup> Esto sugiere que los leucocitos que normalmente infiltran el tejido corneal dañado actúan como mensajeros para la activación de las células nativas del tejido. Los PMN fagocitan los desechos celulares en el área del daño, proceso que provee una superficie más lisa para la migración de las células corneales epiteliales. Los leucocitos están también involucrados en la liberación de citoquinas y factores de crecimiento en el área comprometida. Los macrófagos producen factor de crecimiento fibroblástico básico, factor de crecimiento transformador alfa, factor de crecimiento derivado de plaquetas, y factor de crecimiento tipo insulina. Los PMN producen factor de crecimiento transformador beta y otros factores quimiotácticos. El TGF- $\beta$  es un estimulante para la proliferación de queratocitos además de la existencia de otros factores estimulantes.<sup>40</sup> También se han notado efectos negativos por parte de los leucocitos: el daño causado por la liberación aumentada de citoquinas que

producen apoptosis, y la liberación de radicales libres y proteinasas que degradan la matriz extracelular.<sup>41</sup> El estroma corneal se vuelve edematoso y libera mediadores inflamatorios.<sup>42</sup> La respuesta principal del estroma corneal es la activación y migración de los queratocitos al área de lesión. Cuando estos queratocitos se activan se transforman en fibroblastos, migran al área de daño tisular e inician la síntesis de colágeno, glicoproteínas y otros componentes de la matriz extracelular corneal.<sup>43</sup>

### **Activación del queratocito**

Luego de una lesión estromal corneal, los queratocitos desaparecen y dejan un área acelular de 200 a 300  $\mu\text{m}$  desde el borde de la lesión. Aproximadamente seis horas después, los queratocitos adyacentes a la lesión aumentan de tamaño e incrementan en número y tamaño de sus nucleolos, vesículas y fagosomas. A veinticuatro horas del daño corneal, los queratocitos comienzan a migrar al borde de la lesión con típicas características de fibroblastos, incluyendo la forma fusiforme, múltiples nucleolos y la falta de gránulos citoplasmáticos. A estas células se las llama fibroblastos de reparación.<sup>3</sup> La principal función de síntesis del fibroblasto es la de reparar la matriz extracelular dañada. Esta matriz extracelular está alterada en su composición de proteoglicanos como así también en el tipo de fibras de colágeno. Los fibroblastos son los responsables de la síntesis de metaloproteinasas y otras proteasas que van a contribuir a la degradación y remodelado tisular corneal. Este remodelado de la matriz extracelular continúa hasta que se han constituido, en forma y espacio apropiado, las fibras de colágeno corneal. Los fibroblastos de reparación están bajo el control de varias citoquinas, las más importantes a mencionar son la IL-1 y el TGF-B. La IL-1 es un estimulador

de la producción de colagenasas y está asociada a la estimulación de procesos inflamatorios y de degradación tisular, mientras que el TGF- $\beta$ , por el contrario, estimula el depósito de nueva matriz extracelular. Tanto la IL-1 como el TGF-B están bajo un delicado mecanismo regulador con influencia en el fenotipo de los queratocitos y finalmente, en los procesos de cicatrización corneal.

### **Apoptosis en la cicatrización corneal**

Muchos estudios han demostrado la desaparición de los queratocitos corneales luego de una lesión epitelial corneal.<sup>55</sup> Este fenómeno es mediado por apoptosis, también llamada muerte celular programada. La apoptosis de los queratocitos es acompañada por cambios morfológicos que incluyen disminución del volumen celular, condensación de la cromatina y fragmentación, con mínimas alteraciones o daños a las células vecinas. La apoptosis es modulada por medio de un complejo y balanceado proceso de interacción de citoquinas y receptores específicos (Fas/Fas ligando, IL-1, TNF $\alpha$ ) y la activación de enzimas llamadas caspasas. Esta acción es liberada desde el epitelio corneal al estroma y acompañada por factores como el NF Kappa  $\beta$  y el Bcl2.

El sistema Fas/Fas ligando está también expresado por células del endotelio corneal, del tracto uveal anterior, retina y células inflamatorias como los macrófagos, neutrófilos y monocitos.<sup>56</sup> La apoptosis juega un rol muy importante en los procesos de cicatrización corneal como así también en otras patologías corneales como el queratocono y la distrofia endotelial de Fuch's.<sup>57, 58</sup>



**I.d. Cicatrización corneal luego de una queratectomía con excimer láser.**

La cicatrización corneal es un factor muy importante en la agudeza visual final luego de un tratamiento con excimer láser. El excimer láser produce una ablación del tejido corneal de 0.20-0.50  $\mu\text{m}$  con cada pulso del láser. Luego de realizada la queratectomía, el epitelio y el estroma corneal comienzan a realizar una serie de cambios anatómicos y fisiológicos que continúa en las semanas o meses posteriores a la cirugía. Este tipo de cirugía con láser permite estudiar el proceso de cicatrización corneal normal ya que se pueden realizar y reproducir infinitamente úlceras corneales de dimensiones y profundidad exacta.

**Epitelio corneal**

La re-epitelización corneal, luego de una ablación con excimer láser, en general lleva aproximadamente de 2 a 4 días, con un espesor epitelial celular de 2 a 3 células. Estudios realizados con microscopia confocal muestran una variabilidad en el tamaño celular, irregularidad que aumenta en células epiteliales superficiales. El epitelio, continúa engrosándose durante los siguientes 6 a 18 meses posteriores a la ablación corneal con excimer láser.<sup>36</sup> Estudios estructurales muestran un epitelio corneal con una variabilidad en su espesor. La hiperplasia epitelial corneal es uno de los cambios mas vistos en los primeros 3 a 6 meses y sería uno de los factores responsables de la regresión refractiva en el tratamiento con excimer láser. También hay variabilidad en la membrana basal epitelial, donde en ciertas zonas hay una discontinuidad de ésta.<sup>44</sup> En dichas áreas, el epitelio corneal se proyecta hacia el estroma con el fin de llenar estos defectos estromales.<sup>45</sup> En los estudios histológicos, la membrana basal aparece con una estructura semejante a la normal.

En modelos experimentales en animales, se acepta que las estructuras de adhesión celular entre el epitelio y el estroma corneal estén restauradas entre la sexta y octava semana posterior a la injuria o lesión corneal. Sin embargo, estas estructuras de adhesión epitelial pueden presentar anomalías en los 15 meses post-láser, si bien hay otros factores que pueden influir en el normal proceso de cicatrización.<sup>36</sup>

### **Capa de Bowman**

Luego de una ablación con excimer láser, es típico observar la ausencia de la capa de Bowman en el centro de la lesión. La capa de Bowman no se regenera luego de ser dañada y esto sugiere que esta capa no es esencial para la transparencia corneal, como se evidencia luego de tratamientos con excimer láser.

### ***Estroma***

La cicatrización estromal corneal está directamente influenciada por la interacción del epitelio y el estroma corneal. Inmediatamente luego de la ablación con excimer láser, se produce un edema del estroma corneal. Dentro de las primeras 24 horas, el proceso de cicatrización corneal comienza con la invasión de células inflamatorias en el estroma corneal desde el film lagrimal y desde la periferia de la cornea. Fibrina y fibronectina, desde el film lagrimal, actúan como soporte para la adhesión de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Los niveles de plasmina en lágrimas se elevan marcadamente y se activa el sistema del factor activador del plasminógeno el cual facilita la degradación, limpieza y reparación del colágeno y matriz extracelular.<sup>46,47</sup> El ácido hialurónico (HA) no se encuentra normalmente en el estroma corneal, pero se ha informado de su presencia luego

de la ablación con excimer láser.<sup>11</sup> La aplicación exógena de ácido hialurónico promueve la re-epitelización y cicatrización corneal.<sup>53</sup>

Luego de realizar una ablación con excimer láser, los queratocitos que se encuentran en las 40 micras anteriores del estroma corneal desaparecen y no se produce material extracelular.<sup>49</sup> Esto se debe, principalmente, al proceso de apoptosis definido anteriormente. El epitelio libera citoquinas con el fin de activar los queratocitos estromales. Los queratocitos periféricos comienzan a activarse y se transforman en una forma fibroblástica que ayuda a la síntesis y depósito del nuevo colágeno y proteoglicanos.

Tras la ablación y en los siguientes meses, la hiperplasia epitelial, el depósito y remodelado de colágeno, dentro de las 10-20  $\mu\text{m}$  del centro de ablación, será colágeno tipo III, tipo que no se encuentra normalmente en corneas humanas y de otros animales. La transparencia corneal depende principalmente del diámetro y espacio correcto de las fibras de colágeno. La desorganización del colágeno corneal lleva a la formación de una cicatriz corneal que se manifiesta en la disminución de la cantidad y calidad de visión del paciente en el post-operatorio.<sup>50</sup> Inicialmente, las nuevas fibras de colágeno depositadas son más gruesas que las normales debido a la alta concentración de condroitín sulfato y dermatán sulfato, no presentando una disposición paralela. Bajo microscopía de fluorescencia (dichlorotriazinyl aminofluorescein, DTAF) se puede observar el depósito del nuevo colágeno a medida que transcurre el proceso de cicatrización corneal. Otros componentes de la matriz extracelular pueden contribuir a la formación de una cicatriz corneal, cuando éstos son depositados en forma anormal o alterada. Los glicosaminoglicanos son extremadamente hidrófilos y juegan un rol muy importante en la regulación de la hidratación del tejido corneal, diámetro de las fibras de

colágeno y su espaciado. Todos estos factores son claves en la transparencia corneal normal. Luego de la ablación con excimer láser, la zona afectada presenta proteoglicanos de mayor tamaño del normal corneal, como el condroitín sulfato y el dermatán sulfato, con muy bajo nivel del normalmente presente queratán sulfato.<sup>7</sup> Estos proteoglicanos altamente sulfatados, como el dermatán y el condroitín sulfato, hacen al incremento del contenido de agua en el estroma corneal con una apariencia vacuolada. Con el tiempo, el remodelado estromal ocurre y se evidencia una disminución gradual del colágeno tipo III con un aumento del queratán sulfato. La reabsorción del colágeno es un componente clave en la cicatrización corneal, y es llevada a cabo por enzimas proteolíticas reguladas por citoquinas y factores de crecimiento liberados por las células nativas de la cornea y por células inflamatorias.<sup>51, 52</sup>

Con el continuo remodelado y reabsorción tisular, los fibroblastos y las fibras de colágeno alteradas desaparecen y conforman una estructura similar a la cornea normal. Con el correr de los meses los queratocitos retornan a su forma normal.<sup>54</sup>

### **Membrana de Descemet y endotelio**

No se han reportado cambios relevantes en dichas estructuras corneales luego de una ablación con excimer láser.

## **Capítulo II**

### **II. a. Proteasas y remodelado de la matriz extracelular**

El término remodelado describe cambios transitorios o permanentes en la arquitectura tisular que involucra las barreras histológicas como son las membranas basales, lámina basal y el estroma intersticial. Este remodelado de la

matriz extracelular es muy importante en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Un factor en común en el remodelado tisular, es la producción y presencia de altos niveles de actividad proteolítica por células presentes en la matriz extracelular.

### **Metaloproteinasas (MMPs)**

Partiendo de la base que en el cuerpo humano tenemos más de 60.000 tipos diferentes de proteínas, el remodelado y degradación de éstas debe estar bajo un estricto equilibrio y control.<sup>59</sup> La degradación de la matriz extracelular (MEC) es un evento normal del proceso de remodelado fisiológico en la morfogénesis y el crecimiento, como así también en procesos de cicatrización, migración celular y angiogenesis. El proceso de cicatrización requiere de una degradación de la matriz extracelular en forma ordenada, con una migración celular y la síntesis de una matriz extracelular provisoria consistente en fibronectina, fibrina y colágeno con el fin de que el remodelado final lleve al tejido comprometido a la normalidad estructural y funcional.<sup>53, 59</sup> La habilidad de las células para proliferar y migrar en respuesta a factores mitógenos del tejido conectivo es, en parte, regulada por los componentes de la matriz extracelular.<sup>59</sup> De esto último podemos concluir que la degradación y remodelado de la MEC es un requisito esencial para las respuestas de proliferación y migración celular. Esta degradación esta regulada por células residentes e infiltrativas del tejido conectivo. En este remodelado extracelular, las diferentes endopeptidasas (metalo, serina, cisteina, aspartato-proteinasas) han sido implicadas directamente en numerosos procesos fisiológicos (cicatrización, angiogenesis, embriogénesis) como así también en situaciones patológicas inflamatorias,

neoplásicas, etc.<sup>60</sup> Las metaloproteinasas, sintetizadas por las células del tejido conectivo y secretadas al espacio extracelular, poseen la capacidad de degradar en forma sinérgica la mayoría de los componentes del tejido extracelular.<sup>61</sup> Una comprensión completa de los mecanismos que regulan la expresión de las MMPs y su actividad enzimática es de gran valor para los futuros desarrollos de nuevos tratamientos y terapias alternativas de ciertas enfermedades.

### **Clasificación de MMPs:**

Al presente, las MMPs son reconocidas como miembros de una gran familia de proteinasas llamadas "Matrixin".<sup>60, 61</sup> Los más de veinte miembros de la subfamilia de las metaloproteinasas han sido clasificados en cinco grupos tomando como criterio de clasificación la especificidad a un sustrato de la MEC.

(Figura A)

- I. - Colagenasas: MMP-1, MMP-8 y MMP-13;
- II. - Gelatinasas o tipo IV colagenasas: MMP-2 y MMP-9;
- III. - Estromelisininas: MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-7;
- IV. – Metaloproteinasas tipo membrana (MT-MMPs): MMP-14, MMP-15, MMP-16;
- V. - Elastasa: MMP-12.

Específicamente, las metaloproteinasas son una familia de endopeptidasas que se caracterizan por contener zinc ( $Zn^{2+}$ ) en su estructura molecular, por ser

secretadas por numerosos tipos celulares y por la capacidad de degradar todos los componentes (proteínas, proteoglicanos) de la matriz extracelular.<sup>61</sup> Una enzima debe cumplir con los siguientes criterios para ser incluida dentro de la familia de las MMPs. 1) Tener capacidad de hidrolizar una proteína o proteoglicano del componente extracelular, 2) contener los átomos de  $Zn^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  necesarios para su actividad catalítica, 3) ser secretadas o estar inserta en la membrana en forma latente con posibilidad de ser activada, 4) ser inhibida por inhibidores endógenos de MMPs, 5) presentar una secuencia y estructura homologa a la colagenasa intersticial.

Las MMPs presentan diferentes dominios. El dominio  $NH_2$ - terminal pro-peptídico (residuo de 80 aminoácidos) tiene por función mantener el estado de latencia de la enzima hasta que es activada por un proceso de clivaje proteolítico. La enzima activada contiene al dominio catalítico (residuo de 180 aminoácidos), que se une a los átomos de zinc y calcio, y al dominio terminal  $COOH$ , involucrado en la especificidad al sustrato de la MEC.<sup>60, 61</sup>

A nivel corneal las metaloproteinasas más estudiadas son las colagenasas, que incluyen MMP-1 y MMP-8. Estas colagenasas están involucradas en la degradación del colágeno tipo I, II, y III. El segundo grupo es el de las gelatinasas el cual incluye la MMP-2 (gelatinasa-A) y MMP-9 (gelatinasa-B).<sup>4, 52</sup> La MMP-9 es producida por células epiteliales corneales mientras que la MMP-2 es producida también por los queratocitos estromales superficiales durante los procesos de cicatrización corneal. Este grupo de gelatinasas es el encargado de degradar colágeno tipo IV, V, VII, X como así también la fibronectina, la laminina y la elastina.<sup>4, 52, 53</sup> Finalmente otros grupos de MMPs han sido estudiadas en la

cicatrización corneal, tales como el grupo de las matrisilina y las de tipo membrana.

### **II. b. Factores inhibidores de proteasas.**

Las metaloproteinasas son reguladas a diferentes niveles, a nivel de la expresión de sus genes: Factores de transcripción esenciales para el inicio de la transcripción: AP-1 (activating protein 1), PEA-3 (polyoma enhancer A-binding protein-3) y NF-kB) activación del zimogeno (forma activa), y la inactivación por inhibidores de proteinasas a nivel MEC.<sup>61</sup> La mayoría de las células sintetizan muy poca cantidad de MMPs. La sobre expresión de genes de MMPs resultan en una destrucción marcada del tejido conectivo, siendo de vital importancia la estrecha regulación de dichos genes para el normal mantenimiento de la homeostasis tisular. Normalmente estos genes no son expresados en forma constitutiva y sus ARNm pueden ser inducidos por muchos agentes, tales como hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, estímulos a una herida o lesión, etc.<sup>18, 25, 26</sup> Brevemente, podemos detallar que las colagenasas son activadas ante IL-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , EGF, bFGF, PDGF y las gelatinasa B por EGF, IL-1- $\beta$  y TNF- $\alpha$ . El TGF- $\beta$  suprime la liberación de colagenasa, pero aumenta la de gelatinasa A y B.<sup>25, 26, 61</sup> Inmediatamente luego de la expresión del ARNm, la enzima es trasladada al espacio extracelular en su forma de pro-enzima (a excepción de la neutrófilo colagenasa que se acumula en los gránulos hasta su posterior liberación). A nivel extracelular, se produce el clivaje enzimático del pro-péptido terminal NH<sub>2</sub>, el cual desestabiliza la interacción cisteína-Zn y así, pasa de su forma latente a su forma activa, la cual a su vez, se encuentra bajo un control estricto de sus inhibidores tisulares de MMPs como por ejemplo los (TIMPs). Los TIMPs (TIMP-1, TIMP-2,



TIMP-3, TIMP-4) se unen fuertemente (unión no covalente) a cada MMP activada con una relación 1:1.

Otros inhibidores o moduladores endógenos de la expresión de metaloproteinasas que han sido poco estudiados en patologías oftalmológicas son:

- 1- Alfa macroglobulina.
- 2- Defensinas.
- 3- Catelicidinas.
- 4- Inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI).
- 5- Elafina.
- 6- Aprotinina

Estos inhibidores o moduladores de proteasas se caracterizan por inhibir la actividad de ciertas enzimas que degradan la matriz extracelular por medio de una unión covalente, como lo hace la alfa macro-globulina, o por medio de una modulación de la respuesta inflamatoria de las células nativas de los tejidos y de los leucocitos. A su vez, se caracterizan algunos de ellos por ser polipéptidos altamente catiónicos capaces de modular las respuestas inflamatorias e inmunológicas de los leucocitos, presentando así una capacidad antimicrobiana.

### **II. c. Degradación tisular corneal.**

El termino “melting” corneal describe la rápida gelatinización y licuefacción del tejido corneal que ocurre generalmente en casos de extrema ulceración corneal.

Este proceso de degradación del colágeno por enzimas colágeno líticas fue sospechado en 1968 por Gross y colegas. Numerosos estudios descubrieron a las células responsables de la secreción de estas enzimas, desde leucocitos a células epiteliales, fibroblastos y otros, si bien esta expresión es determinada por el tejido y

especie estudiada. Sobre la cicatrización corneal se han realizado numerosos estudios donde se demuestra que muchas de estas metaloproteinasas están bajo un control estricto de citoquinas y factores de crecimiento, siendo más estudiados la IL-1-a, TGF y el TNF-a. La expresión corneal de metaloproteinasas aumenta en las primeras cuatro semanas luego de un defecto epitelial corneal y luego, en forma gradual, desciende hasta la semana 10<sup>ma</sup>, cuando se encuentran los niveles mínimos.

La ulceración corneal severa es un proceso devastador que responde débilmente a los tratamientos actuales. Se realizarán estudios en modelos animales previamente publicados:

- 1- procesos cicatrizales corneales normales como los que se realizan con excimer láser en cornea,
- 2- procesos patológicos como los infecciosos / inflamatorios por microorganismos (Estafilococos aureus, HSV-II). Estos modelos permiten estudiar la expresión y mecanismo de acción de las proteasas y sus inhibidores naturales, dando lugar de esta forma, al desarrollo de futuras opciones terapéuticas.

#### **II. d. Inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI)**

El término anglosajón "Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), se utilizó para definir a esta proteína de 12 kDa de peso molecular cuya única función conocida hasta hace unos años era la de ser secretada por leucocitos para inhibir proteasas de la matriz extracelular<sup>62</sup>. Futuros estudios permitieron demostrar que este péptido era producido no sólo por células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos, sino también por otros tipos celulares epiteliales y glandulares. Se demostró también su presencia en secreciones bronquiales, nasales, salivales,

seminales y cervicales como mecanismo de regulación de proteasas<sup>63-64</sup>. Trabajos de biología molecular realizados con el péptido SLPI indicaron que su función antiproteasa, como componente protector y modulador de procesos inflamatorios y degenerativos, residía en el dominio terminal COOH<sup>65</sup>. Sorprendentemente, los resultados *in vivo e in vitro* demostraron que este péptido presentaba una carga molecular altamente catiónica, descubriendo así su función de péptido antimicrobiano de amplio espectro (bacterias-hongos-virus)<sup>66-67</sup>. Estos hallazgos de nuevas funciones del SLPI ante procesos fisiológicos y patológicos de inhibición y modulación de la degradación tisular, asociadas a la capacidad antimicrobiana como parte de la inmunidad innata, lo transforman en un importante objeto de estudio con miras a que se convierta en un futuro agente farmacológico.

### **II. e. Anatomía y fisiología de la retina y vítreo**

La retina recubre el interior de la pared ocular, desde la ora serrata hasta la papila. En el centro de la retina se encuentra un área de forma circular u oval que mide aproximadamente 2 x 1.5 mm. Esta zona se denomina Papila y corresponde al Nervio Optico. Desde la porción central de la papila emergen los vasos sanguíneos que llegan a la retina (arteria central de la retina). A unos 17 grados (4.5-5 mm) del lado temporal de la papila se encuentra una zona también ovoidea, con una coloración rojiza, que carece de vasos sanguíneos y se denomina fovea (área de mayor visión). Se denomina región central (mácula) de la retina a la porción que se encuentra alrededor de la fovea (unos 6 mm alrededor de la misma). El resto es retina periférica y llega hasta la zona de la ora serrata (que esta a unos 21 mm desde el centro de la papila). El diámetro total de la retina es aproximadamente de 42 mm.

La retina es una estructura fina, transparente que consta de una capa externa (epitelio pigmentario) y una capa interna (neurosensorial).

### Epitelio pigmentario de la retina (EPR)

Consiste en una monocapa de células hexagonales que se extiende anteriormente desde el disco óptico hasta la ora serrata, donde se une con el epitelio pigmentario del cuerpo ciliar.

Posee múltiples funciones:

- Interviene en el metabolismo de la vitamina A
- Interviene en el mantenimiento de la barrera hemato-retinal externa
- Realiza fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores
- Absorbe la luz
- Produce intercambio de calor
- Interviene en la formación de la lamina basal
- Produce la matriz de mucopolisacáridos que rodea los segmentos externos de los fotorreceptores
- Realiza transporte activo dentro y fuera de las células

Estas células están firmemente adheridas entre sí por complejos laterales intercelulares. Las zonulas ocludentes y adherentes proveen estabilidad estructural y juegan un rol importante en el mantenimiento de la barrera hemato-retinal externa.

Existen diferencias regionales importantes en el EPR. Las células varían de tamaño de 10 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro. Son más altas y finas y contienen mayor

cantidad de melanosomas en el área foveolar, mientras que en la periferia son bajas, anchas y menos pigmentadas.

### Retina neurosensorial

Consta de varias capas de externo a interno:

- Membrana limitante externa
- Capa nuclear externa
- Capa plexiforme externa
- Capa nuclear interna
- Membrana limitante media
- Capa plexiforme interna
- Capa de células ganglionares
- Capa de fibras nerviosas
- Membrana limitante interna

Está compuesta por elementos neuronales, gliales y vasculares.

Elementos neuronales: la capa de foto-receptores está formada por células neuroepiteliales especializadas llamadas conos y bastones. Cada foto-receptor posee un segmento externo y uno interno. Los segmentos externos, rodeados de una matriz de muco polisacáridos, tienen contacto con los procesos apicales del EPR. No existen uniones o conexiones intercelulares entre los fotorreceptores y el EPR. Se puede evidenciar una mayor concentración de conos a nivel de la fovea mientras que de bastones a nivel de la periferia de la retina.

Las células horizontales hacen sinapsis con los conos y bastones y extienden horizontalmente procesos celulares a través de la capa plexiforme externa.

Las células bipolares se orientan verticalmente. Sus dendritas hacen sinapsis tanto con conos como con bastones y sus axones con las células ganglionares y amácrinas en la capa plexiforme interna.

Los axones de las células ganglionares tienden a estar paralelos a la superficie interna de la retina para formar la capa de fibras nerviosas y luego sus axones en el nervio óptico.

Los elementos neuronales de más de 120 millones de bastones y 6 millones de conos están interconectados y procesados dentro de la retina neurosensorial antes de ingresar a las más de 1 millón de fibras del nervio óptico.

Los fotorreceptores son las células que detectan el estímulo lumínico, las demás células realizan el proceso de la señal. Los fotorreceptores contienen en su segmento externo proteínas llamadas pigmentos visuales, los mismos son los encargados de absorber la luz para que de esta manera comience la excitación visual. Una vez iniciado este proceso el resto de las neuronas retinales genera y conduce señales bioeléctricas a través de sus membranas para de esta forma transmitirlo al cerebro por medio del nervio óptico.

Elementos gliales: las células de Muller, se extienden verticalmente desde la membrana limitante externa hasta la membrana limitante interna. Su núcleo está localizado en la capa nuclear interna. Estas células proveen soporte estructural y nutricional junto con los otros elementos gliales: astrocitos, microglia y oligodendrocitos.

Elementos vasculares: la porción interna de la retina está irrigada por ramas de la arteria central de la retina. En el 30% de los ojos también es irrigada en parte por la arteria cilioretinal.

Los vasos sanguíneos retinales son análogos a los del cerebro ya que son responsables del mantenimiento de la barrera hemato-retinal interna. Esta barrera fisiológica es una capa simple de células endoteliales no fenestradas con uniones firmes.

Los vasos sanguíneos retinales no se extienden más allá de la membrana limitante media.

### **H. Vítreo**

La cavidad vítrea ocupa las cuartas quintas partes del volumen ocular. El humor vítreo es un gel transparente que juega un rol importante en el metabolismo de los tejidos intraoculares ya que provee el pasaje de metabolitos usados por el cristalino, el cuerpo ciliar y la retina. El mismo pesa 4 grs y su volumen es cercano a los 4 ml. Consiste en 99% agua. Su viscosidad es dos veces la del agua ya que posee mucopolisacáridos, principalmente ácido hialurónico.

A nivel ultra estructural se han identificado: células (hialocitos) y finas fibras de colágeno. El vítreo se adhiere a la retina periféricamente a nivel de la base del vítreo. La base anterior del vítreo se extiende 2 mm anterior a la ora serrata mientras que la base posterior lo hace a 4 mm posterior a la ora serrata. Existen adherencias adicionales a nivel del margen del disco óptico, en la región perifoveal y sobre la cápsula posterior del cristalino.

Tiene dos funciones básicas:

- Sirve de medio transparente ocupando el mayor volumen del globo ocular
- Absorbe y redistribuye las fuerzas aplicadas a los tejidos que rodean el globo ocular

## Capítulo III

### III. a. Hipótesis de Trabajo

Los Inhibidores naturales endógenos de proteasas son mecanismos reguladores esenciales de la degradación tisular de la cornea y de otros tejidos oculares. El presente trabajo de tesis doctoral determinará la presencia y rol del “inhibidor de proteasas secretado por leucocitos” en tejido corneal y otras estructuras oculares normales, como así también su asociación a procesos inflamatorios e infecciosos del ojo.

### Objetivos

Los objetivos de este proyecto de tesis son los siguientes:

- Investigar si el inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI) está presente en el tejido corneal normal y en las estructuras oculares.
- Tratar de establecer la localización tisular ocular y tiempo de expresión del inhibidor de proteasas secretado por leucocitos en diferentes modelos experimentales con animales.
- Estudiar la presencia del SLPI en relación con el remodelado cicatrizal de la matriz extracelular de la cornea y otras estructuras intra oculares, como así también su expresión en relación a procesos inflamatorios e infecciosos del ojo.



### **III. b. Materiales y métodos**

#### **Diseño metodológico**

#### **Población en estudio**

En el trabajo de tesis se realizaron cuatro modelos experimentales con animales a través de los cuales se analizaron los procesos de cicatrización normal y los procesos inflamatorios e infecciosos oculares más frecuentes en la clínica oftalmológica, los cuales fueron distribuidos de acuerdo al desarrollo de la tesis.

- a- Modelo de cicatrización corneal normal post Excimer láser
- b- Modelo de queratitis infecciosa por Herpes Simplex Virus
- c- Modelo de queratitis infecciosa por Estafilococos Aureus.
- d- Modelo de Endoftalmitis por Estafilococos Aureus

#### **Criterios de inclusión**

##### **Manejo de los animales:**

Los estudios realizados se rigieron por la “declaración para el uso de animales en la investigación oftalmológica de la asociación para la investigación en visión y oftalmología de los EEUU (ARVO) y por las guías de uso y cuidados de animales de laboratorio de la Universidad Johns Hopkins y del Consejo Nacional de Investigación de los EEUU. <sup>68-70</sup>

Los animales utilizados en esta tesis doctoral son ratas cepas Lewis obtenidas de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina, con un peso por animal de 200 ~ 250 gramos, hembras y machos. Los animales fueron ubicados en el bioterio de la Fundación VER, Córdoba, Argentina, especialmente acondicionado para el desarrollo de los modelos experimentales con animales de investigación.

Los animales se subdividieron en cajas individuales, expuestas al aire ambiental y alimentadas con alimento balanceado y agua, bajo iluminación a concentración de 12L:12<sup>o</sup> de 200 lux, respetando el ritmo circadiano del animal. Durante el desarrollo de la tesis, los animales fueron monitoreados diariamente por personal especializado proporcionándoles agua y alimento bajo los protocolos de regulación de aporte de agua, dieta y requerimientos nutricionales del animal.<sup>71, 72</sup>

Se formaron cuatro (4) subgrupos de reproducción en una proporción de cuatro hembras por macho. Brevemente, cada rata hembra reproductora tiene un periodo de gestación de entre 20 y 24 días, con un promedio de 10 crías viables al término de cada gestación y una capacidad de ocho reproducciones anuales.

Estos animales reproductores y sus posteriores crías (aisladas del animal reproductor macho) fueron monitoreados diariamente por personal especializado con el fin de aportarles los requerimientos nutricios necesarios para el normal desarrollo, controlando una vez a la semana el normal aumento de peso de los animales hasta que llegaron al peso ideal para ser incluidos en los grupos experimentales definitivos en forma randomizada.<sup>73</sup>

La anestesia, analgesia y cuidados del animal se realizaron en base a publicaciones previas y protocolos estandarizados internacionalmente.<sup>74-78</sup>

Brevemente, cada procedimiento quirúrgico se realizo con material quirúrgico estéril (caja de cirugía experimental) acompañado de materiales descartables y bolsas de residuos patológicos específicamente dispuestos para investigación.

La anestesia y analgesia del animal se realizo con una inyección intramuscular de 0.5 ml/kg del peso corporal a una mezcla de 1:1 de 100 mg/ml ketamina y 20 mg/ml xylazina. Previo al procedimiento quirúrgico, se le aplico a cada ojo del animal una

gota de anestesia tópica (proparacaina 0.5%, Anestalcon, Alcon Labs.) y al finalizar se aplicó una gota de un antiinflamatorio y analgésico tópico (ketorolac T.)

Todos los animales fueron monitoreados en los periodos post quirúrgicos a fin de evaluar estrés o sufrimiento del animal en forma anormal a los protocolos internacionales.<sup>79</sup>

Los animales fueron sacrificados por medio de una sobredosis de barbitúricos evitando cualquier signo de sufrimiento o estrés animal. Esta intervención se realizó en el tiempo convenido en material y métodos detallados en cada modelo experimental.

### **Criterios de exclusión**

Los animales que durante el desarrollo de los modelos experimentales presentaron signos de estrés y sufrimiento significativos (Tabla criterios de exclusión) asociados a la presencia de signos de enfermedad sistémica o local, previa o a posterior del inicio del modelo experimental y no relacionado a la investigación en curso, fueron excluidos de la población en estudio para su tratamiento específico por personal idóneo.

#### **Tabla: Criterios de exclusión animal por sufrimiento y estrés**

Disminución del consumo de agua y alimento

Perdida de peso (mayor o igual al 20 %, comparación con población en estudio)

Auto mutilación

Auto aislamiento

Aumento de la frecuencia respiratoria

Respiración con boca abierta

Rechinar los dientes

Agresión y mordeduras

Disminución o aumento de los movimientos

Posición anormal

Rigidez o flacidez muscular

Signos de deshidratación, diarrea

Temblor

Supuración o signos infecciosos locales / sistémicos

### **Modelos animales experimentales**

#### **a. Modelo de cicatrización corneal normal.**

Luego de realizada la anestesia general más la aplicación adicional de anestesia tópica (proparacaina 0.5%, Anestalcon, Alcon, USA) en el ojo derecho, se realizó un defecto epitelial corneal de 2 milímetros de diámetro y 150 micras de profundidad con un excimer láser (LaserSight 200). Finalizado el procedimiento, se aplicó una gota de antibiótico tópico por única vez a fin de evitar sobre infección local (eritromicina, Oftalmolets, Alcon, USA) y se situó el animal en el grupo correspondiente al estudio experimental. Los animales fueron evaluados diariamente y en su totalidad a fin de documentar la evolución del estudio experimental. Una vez llegado al tiempo de sacrificio, los animales fueron sacrificados según el protocolo y los ojos en estudio se fijaron en medio de conservación para la realización de estudios patológicos, inmunopatológicos e histoquímicos.

**b. Modelo experimental de queratitis por Herpes Simple Virus Tipo I.**

Luego de realizada la anestesia general y aplicada la anestesia tópica, se realizó en el ojo derecho de cada animal el defecto epitelial con una aguja 25G. Cinco microlitros de  $2.5 \times 10^4$  PFU de HSV tipo I fueron aplicados en el fondo de saco de cada animal del grupo experimental. El grupo control sólo recibió solución salina estéril. La severidad de la queratitis se evaluó durante los 14 días de la inoculación, momento en que se presentó una reacción inflamatoria significativa, neovascularización de la cornea y del segmento anterior del ojo con posibilidad de perforación ocular.

**c. Modelo experimental de queratitis por S. Aureus.**

Inicialmente, cepas bacterianas de S. Aureus fueron procesadas por técnicas de microbiología (Universidad Nacional de Córdoba, Departamento de bioquímica clínica, Facultad de Ciencias Químicas) donde este microorganismo, previamente tipificado, se cultivó en placas de agar sangre. Posteriormente, se sub-cultivo en “tryptic soy broth” para la obtención de la cepa específica en estudio. El cultivo fue centrifugado y resuspendido en solución salina estéril para ser subdividido en tubos de Eppendorf (Fremont, CA) para su conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posterior aplicación al momento del estudio.

En síntesis, en las corneas derechas de cada rata en estudio, fueron creadas úlceras epiteliales corneales con una aguja 27G y luego se les aplicó 50 microlitros de una suspensión de 85 CFU de Staphylococcus A. en el fondo de saco del ojo. Luego del procedimiento, los animales fueron ubicados y rotulados en subgrupos hasta la recuperación de la anestesia.

**d. Modelo experimental de Endoftalmítis por S. Aureus.**

El procedimiento de cultivo, tipificación y suspensión bacteriana fue similar al utilizado para el modelo animal de queratitis por Staphylococcus A.

Brevemente, luego de realizada la anestesia general, se aplicó una gota de anestesia tópica en el ojo derecho de cada animal a estudiar, y se procedió a realizar una paracentesis (jeringa y aguja de tuberculina) previa a la inyección intravitrea a fin de evitar el aumento elevado de la presión intraocular posterior a la inoculación. El procedimiento de inoculación intravitrea se realizó por pars-plana del ojo utilizando una jeringa Hamilton de 50 microlitros. La solución inyectada tiene una concentración final de 65 CFU/50ul. En forma adicional, se realizó un cultivo en agar sangre de 50ul de la misma suspensión bacteriana utilizada.

Se utilizó solución salina estéril (BSS), sobre el segundo grupo en estudio, con el fin de evaluar la expresión intraocular del SLPI luego de una inyección intraocular de 50 µl. Los ojos control (ojos izquierdos) no recibieron inoculación alguna. Luego del procedimiento, los animales fueron ubicados y rotulados en subgrupos hasta la recuperación de la anestesia.

**e. Estudio histopatológico de tejidos oculares.**

Luego de la extracción, los ojos se colocaron en una solución de paraformaldeido al 4% durante toda la noche en 4° C y luego se los procesó para el parafinado. Se realizaron cortes de unos 4 a 5 µm y se tiñeron con hematoxilina eosina.

Con algunos anticuerpos, fue necesario el uso de tejidos procesados por congelación, por lo que en el momento de enucleación de los ojos de los animales fue necesario embeberlos en una solución de OCT y se los congeló a -80° C. Mas

tarde, sobre ellos se realizaron cortes 10  $\mu\text{m}$  con criostato para poder realizar las tinciones.

## **Metodología general para el procesado de las muestras**

### **Laboratorios utilizados para el desarrollo de la tesis doctoral:**

#### a- Estudio histopatológico de los ojos e inmunohistoquímica.

Los estudios histopatológicos fueron realizados y procesados en el laboratorio de patología, Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba y en el laboratorio de investigaciones oculares, departamento de patología de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

#### b- Análisis de Western Blot

Los estudios de Western blots fueron realizados en el laboratorio del Dr. Hugo D. Lujan, Instituto Mercedes y Martín Ferreira, UNCOR, INIMEC -CONICET, en el laboratorio de investigaciones oculares, departamento de patología de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina y en el laboratorio de enfermedades externas e infecciosas oculares, The Wilmer Eye Institute, Johns Hopkins University, Baltimore, EEUU.

#### c- Microbiología

Los estudios de microbiología y aportes de los microorganismos utilizados durante la tesis doctoral fueron aportados por el Laboratorio 119, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

**d- Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron luego de obtener los valores finales de todas las muestras estudiadas en cada grupo experimental. Las formulas estadísticas aplicadas fueron seleccionadas de acuerdo al número de muestras en estudio (n= numero de ratas analizadas, ojos derechos e izquierdos), a la comparación entre los diferentes grupos y sub. grupos en estudio y los tiempos de expresión de los valores en análisis.

**e- Estudio Histopatológico**

Los métodos utilizados en los procesos de ablación, extracción, fijación, montaje y procesado de los tejidos como así también estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos y de biología molecular se basaron en los protocolos de publicaciones internacionales previas del autor Víctor E. Reviglio y de los laboratorios de biología molecular del Wilmer Eye Institute de la Universidad y Hospital “The Johns Hopkins”, Baltimore, MD, USA, lugar donde el autor Víctor E. Reviglio desarrolló durante el periodo 1999-2001 un post grado en investigación en oftalmología.<sup>80-83</sup>

Brevemente, los ojos enucleados se procesaron para la ablación del anillo esclero corneal y se conservaron inicialmente en formalina neutra al 10%. El tejido ablacionado se procesó en diferentes concentraciones crecientes de alcohol para ser embebido en parafina para su posterior estudio histológico. Los cortes en parafina se realizaron a un promedio de 4 a 6  $\mu\text{m}$  (micrómetros). Los cortes efectuados, adecuadamente individualizados (nombre del protocolo y número de muestra), se tiñeron posteriormente con hematoxilina eosina y se efectuaron inmunotinciones con los anticuerpos correspondientes.



Los tejidos analizados por Western blot fueron homogenizados según técnicas previamente publicadas. Muestras de cornea, vítreo y retina fueron recolectadas bajo microscopio de disección y homogenizadas por separado en una solución buffer fosfato (PBS Dulbecco's; Invitrogen-Gibco/BRL, Paisley, UK) y luego centrifugadas a 12.000 g por 30 minutos. Tras lo cual se rotularon y depositaron a -80 ° C para su posterior utilización.

#### **f- Técnicas de Inmunohistoquímica**

Las técnicas de inmunotinción fueron realizadas utilizando el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa. Los cortes de parafina montados en portaobjetos especiales para inmunotinción fueron incubados con peróxido de hidrógeno – metanol al 0.6% y luego del bloqueo de la actividad peroxidasa endógena con suero de cabra al 10%. El anticuerpo primario consistió en un anticuerpo policlonal anti cabra “goat anti-SLPI “de las empresas (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA y de R&D system, USA) a una dilución de 1/100. Este anticuerpo fue aplicado en los cortes histológicos e incubados a temperatura ambiente por una hora. A posteriori, fue lavado con TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), y se utilizó un anticuerpo secundario biotinizado conejo anti-cabra “biotin-labeled rabbit anti-goat IgG” del laboratorio Vector (Burlingame, CA, USA). Finalmente, luego de la incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa del laboratorio Vector (Burlingame, CA), los portaobjetos fueron procesados con 3,3' diaminobenzidina. Los cortes histológicos seleccionados como controles fueron incubados sin el anticuerpo primario y se aplicó suero anti-cabra (normal goat serum). Todas las muestras fueron procesadas en paralelo para evitar variaciones de las que fueron objeto de estudio, fueron analizadas para la intensidad de tinción por un especialista patólogo.

### **g- Western Blot**

Los niveles de expresión del SLPI de las muestras procesadas fueron analizados por la técnica de Western Blot. Los blots fueron realizados utilizando los mismos anticuerpos primarios que se usaron en las inmunotinciones. Se utilizó un marcador de peso molecular para localizar las bandas de SLPI de 12 kDa y como marcador positivo se utilizó suero de un modelo de sepsis por staphylococcus aureus en las ratas. Brevemente, se utilizaron 15 microlitros de cada homogenato y se los corrió electroforéticamente, bajo condiciones reductoras y no reductoras, a temperatura ambiente, usando el método Laemmli. Las muestras fueron corridas en geles (polyacrylamide SDS gel) a diferentes concentraciones (10-15%) a 100 voltios por 2 horas, y luego transferidas a membranas (de Bio-Rad Richmond, CA). Las membranas luego fueron expuestas a un buffer bloqueador a temperatura ambiente (PBS, 0.05% Tween 20, 0.5% non-fat dry milk) por una hora aproximadamente. Las aplicaciones de los anticuerpos, el primario y el secundario, fueron de una hora en cada caso respectivamente. Luego de tres lavados TBS-T (TBS, 0.05% Tween-20), las membranas fueron incubadas en una solución luminiscente (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) proceso seguido de la exposición al film radiográfico.

### **h- Análisis estadístico**

Los resultados de los estudios de Western blots fueron analizados individualmente por densitometría posterior al escaneado del film (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Cada uno de los experimentos fue realizado en duplicado a fin de corroborar los resultados. El método estadístico utilizado sobre los estudios, muestras y resultados fue el de Mann Whitney. Los valores menores de  $p= 0.05$  fueron considerados

estadísticamente significativos al compararse los resultados de cada uno de los grupos en estudio.

## **Resultados**

### **Grupo control:**

Los ojos normales de animales sin patología presente fueron procesados por técnicas de histología (n=10 ratas) e Inmunohistoquímica (n=10 ratas). Estas muestras revelaron una ausencia de expresión del SLPI en las estructuras oculares estudiadas.

A nivel de segmento anterior del ojo, los cortes histológicos de la cornea expusieron una falta de expresión del SLPI en todo el tejido como el del epitelio, el estroma y el endotelio corneal. Asimismo, tanto el estudio del cristalino como el de las estructuras zonulares y del ángulo esclero corneal demostraron no expresar el SLPI en condiciones normales (Figura 1). Coincidentemente con los resultados histológicos de cornea y segmento anterior, el tejido neuro-retinal no expresó tinción positiva para el SLPI (Figura 2 a-c). Llamativamente, se detectó una expresión positiva del SLPI en los vasos sanguíneos, como los presentes en la retina y coroides confirmados por inmunotinción del endotelio vascular (Figura 2 d). Los estudios de análisis cuantitativos de Western Bot., demostraron una ausencia de expresión del SLPI en vítreo normales, pero fueron ligeramente positivos en las muestras de tejido corneal y retinal. Esto resulta de una insuficiente capacidad de inmuno-marcación significativa con los anticuerpos utilizados (comercialmente disponibles) en los cortes histológicos en parafina para detectar una expresión basal del SLPI y a su vez se explica por la asociación de vasos sanguíneos incluidos en el proceso de los homogenatos retinales. La figura 3 a, muestra la

expresión basal del SLPI corneal en las líneas de bandas 1 a 3 del Western blot, comparadas a la fuerte expresión positiva del SLPI en la banda número 4 de una muestra del grupo de queratitis bacteriana. Nótese, que la expresión del SLPI de homogenatos de vítreos normales es negativa en todas las líneas de bandas del Western blot (Figura 3b). Finalmente, la expresión del SLPI en homogenatos retinales normales fue débilmente positiva como lo muestran las bandas de la figura 3 c.

#### **Cicatrización corneal post excimer láser:**

Los animales estudiados en las primeras 24 horas posteriores a la ablación corneal con excimer láser (n=10) mostraron en los cortes histológicos un defecto epitelial corneal claramente evidente (Figura 4). Se observó con la hematoxilina eosina, células inflamatorias adyacentes al área de ablación y el lecho estromal corneal ulcerado (Figura 4). La inmunotinción con SLPI demostró una expresión positiva en el área involucrada de la cornea, principalmente en el epitelio corneal dañado y el estroma adyacente. Se evidenció que la expresión del SLPI fue sólo a nivel del estroma superficial y no en la profundidad del estroma junto al endotelio corneal (Figura 5).

Los cortes histológicos de 48 horas (n=10) de evolución revelaron un epitelio cicatrizal con una mayor respuesta inflamatoria. Esto se asoció a una expresión más uniforme del SLPI en el epitelio corneal y estroma involucrado, presentando una diferencia estadística significativa entre los ojos tratados a las 24 y 48 horas comparados a los controles. (Tabla E).

La cuantificación de los Western blots demostró en forma semejante a la inmunotinción una expresión aumentada de SLPI en tejido corneal a las 24 horas

(n=10) y a las 48 horas (n=10) posteriores a la ablación corneal, existiendo significancia estadística al análisis comparativo entre el tejido cicatrizal y el corneal normal (Figura 6).

Esta significancia se mantuvo estable a las 24 y 48 horas posteriores a la ablación, y demostró una activa expresión del SLPI en procesos cicatrizales corneales (Gráficos O, P).

#### **Queratitis bacteriana por *S. aureus*:**

Luego de la inoculación de las cepas de *S. aureus* en el estroma corneal, se obtuvo una reacción inflamatoria e infecciosa a las 24 horas en todas las muestras analizadas. Se observó, en su histología, un infiltrado inflamatorio provocado principalmente por neutrófilos y asociado a una alteración de la arquitectura normal de epitelio corneal y estroma (Figura 7). La inmunotinción (n=20) expuso una marcación positiva para el SLPI, fundamentalmente en epitelio corneal y estroma superficial comprometido. Esta tinción fue destacadamente intensa al progresar la infección en el tejido corneal, indicando una regulación positiva del SLPI al avance del proceso inflamatorio – infeccioso (Figura 8 a, b). En los estudios de Western blot (n=20), las bandas de expresión del SLPI fueron fuertemente positivas en las líneas 1,2 (queratitis bacteriana de 24 horas de evolución) y en las líneas 4,5 respectivamente (48 horas de evolución), comparadas con la línea numero 3 de un homogenato corneal normal (Figura 9). Los resultados de los análisis cuantitativos de inmunohistoquímica y Western blot demostraron una expresión positiva significativa del SLPI ante el proceso inflamatorio – infeccioso corneal, comparado al tejido corneal normal. (Tabla C, Gráficos M, N).

### **Queratitis viral por Herpes simple tipo I**

El examen histológico de las muestras (14 días post inoculación) de las corneas infectadas con HSV tipo I (n=20), demostraron una intensa reacción inflamatoria de todo el tejido corneal con un infiltrado leucocitario, principalmente linfocitos-neutrófilos (Figura 10). Debido a la gran reacción inflamatoria y degradación del tejido corneal, se demostró por inmunotinción, una expresión intensa del SLPI con desorganización del colágeno corneal involucrado (Figura 11 a). El tejido corneal estromal se evidenció invadido por neovasos sanguíneos llegando en algunos casos a la perforación corneal y degradación tisular avanzada, mostrando una intensa y uniforme expresión del SLPI en el tejido comprometido.

### **Endoftalmitis bacteriana por S. aureus:**

El análisis de los cortes histológicos (n=16) y homogenatos (n=16) de los animales inoculados con cepas de S. aureus demostró una expresión significativa del SLPI ante el avance del proceso inflamatorio – infeccioso. Si observamos las inmunotinciones de las primeras horas post inyección intravítrea, se evidencia un infiltrado inflamatorio inicialmente en el polo posterior del ojo, vítreo y retina adyacentes sin que se comprometan estructuras titulares del segmento anterior del ojo (Figura 12 a, b). Así, el tejido corneal y del iris se presentan libres de infiltrado inflamatorio con una tinción negativa para el SLPI (Figura 13 a, b).

Por el contrario, el avance de la infección bacteriana muestra un incremento de la reacción inflamatoria tisular con desorganización de las estructuras intraoculares, principalmente del tejido retinal. Cabe mencionar que, en los casos en que el proceso inflamatorio se extendió a otras estructuras oculares, la expresión tisular

del SLPI fue positiva, como por ejemplo a nivel del nervio óptico (Figura 14 c) y estructuras retinales adyacentes (Figura 14 a, b).

La fuerte expresión del SLPI a la inmunotinción y a la cuantificación por Western blot fue directamente relacionada a la reacción inflamatoria e infecciosa intraocular.

Las bandas de expresión del SLPI en vítreo del grupo inoculado con *S. aureus* fueron estadísticamente significativas a las 24 y 48 horas de evolución en comparación con el grupo control y el grupo BSS (Figura 15 a-d).

A diferencia de lo que ocurrió a las 24 horas iniciales de la inoculación, el compromiso inflamatorio del segmento anterior del ojo, a las 48 horas, demostró una expresión positiva del SLPI en cámara anterior del ojo y del tejido corneal involucrado, como resultado del proceso de endoftalmitis avanzado (Figura 16 a-c).

Los resultados de inmunotinción (n=16) y Western blots (n=16) del grupo inyectado con solución fisiológica estéril (BSS), demostraron una tinción histológica negativa del SLPI en todos los cortes realizados con una falta de reacción inflamatoria intraocular. Confirmando estos resultados, los homogenatos indicaron una falta de expresión del SLPI, similar a los del grupo control de ojos normales. Se realizaron comparaciones estadísticas entre todos los grupos en estudio, que pusieron en evidencia una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo *S. aureus* vs. los grupos BSS y control (Tablas a, b y los Gráficos a-l).

**Detalles análisis estadístico:**

Se realizó el estudio estadístico de las inmunotinciones y homogenatos de las muestras analizadas de los diferentes grupos en estudio.

Los resultados señalados con \* indican diferencia estadística significativa entre los grupos en estudio y el control normal. Tablas A – E: Inmunotinción para SLPI

Gráficos A – Q: Western blots para SLPI

## Discusión

La localización anatómica de la cornea, conjuntiva y el segmento anterior del ojo determinan un rol protagónico en el sistema de barrera y defensa ocular. La inmunidad innata del ojo se conforma como un complejo sistema biológico que protege al individuo de numerosos agentes patógenos y de procesos de destrucción celular. Avances en la inmunología, particularmente en la ocular, han contribuido a comprender y tratar numerosas patologías de la cornea y superficie ocular. La respuesta inmune y la inflamación no sólo destruye el patógeno invasor, sino también puede producir un daño en los tejidos que lo rodean. Por lo tanto, muchos mecanismos reguladores como son las citoquinas, factores de crecimiento, proteasas y sus inhibidores endógenos están involucrados en la regulación y modificación de la respuesta inflamatoria a fin de causar el mínimo daño al huésped.<sup>84</sup>

Anatómicamente la cornea es una estructura avascular, carente de sistema linfático y de macrófagos en la región central. Desarrollos en técnicas de biología molecular han permitido revelar la capacidad de las células corneales residentes (epitelio y queratocito) para defenderse, por si mismas, de factores agresores externos de numerosas formas.<sup>85</sup> La capacidad de las células nativas, residentes en la cornea, de secretar péptidos antimicrobianos y antiproteasas ante el estímulo de citoquinas producidas por células del sistema inmune, han sido extensamente estudiadas.<sup>86</sup>

El preciso control de estos mecanismos es crucial para el mantenimiento de la integridad tisular corneal, y su disfunción resulta en una destrucción y remodelado anormal del tejido ocular con una pérdida de la función y agudeza visual. En la última década, numerosos trabajos científicos se esforzaron en comprender los mecanismos de acción de péptidos endógenos, capaces de presentar propiedades



antimicrobianas como efectores de la inmunidad innata del huésped y a la vez, de ser inhibidores de proteasas como parte del mecanismo de remodelado tisular.<sup>87</sup> Dentro de los péptidos mencionados, se encuentran las defensinas, catelicidinas y el inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI). Este último mencionado, denominado por las siglas "SLPI", es una proteína no glicosilada de bajo peso molecular (12 kDa) y altamente catiónica que originalmente se aisló del epitelio de la mucosa respiratoria.<sup>88</sup> Molecularmente el SLPI está compuesto por dos dominios que le otorgan diferentes mecanismos de acción, el terminal antiproteasa "COOH" y el terminal antimicrobiano "NH<sub>2</sub>".<sup>89</sup> El SLPI tiene por lo tanto funciones antimicrobianas de amplio espectro recibiendo la denominación "péptido tipo defensina" y funciones reguladoras de la inflamación por su actividad antiproteasa.<sup>90</sup> En la actualidad, no se han descrito reportes del SLPI en procesos inflamatorios o infecciosos oculares. De nuestro conocimiento, éste es el primer estudio en localizar el SLPI en estructuras oculares relacionado a procesos inflamatorios e infecciosos asociados. En base a previos reportes de otros trabajos de investigación y basados en los resultados obtenidos en el desarrollo de la tesis doctoral, el SLPI estaría respondiendo como mecanismo regulador de la inmunidad innata del ojo, promoviendo la erradicación del microorganismo invasor y protegiendo de la destrucción tisular asociada al proceso inflamatorio.<sup>91</sup> La detección de la expresión del SLPI en los estudios de inmunohistoquímica y Western blots de muestras oculares analizadas de procesos inflamatorios e infecciosos, corroboran previos reportes en otros tejidos extra oculares, en los cuales el SLPI actúa como factor modulador de la cicatrización e inmunidad innata del huésped.<sup>92</sup>

En el estudio de la cicatrización corneal normal, una clara regulación positiva se observó en el proceso inflamatorio cicatrizal asociado al defecto epitelial corneal post excimer láser. El SLPI se localizó a la inmunotinción preferentemente en el epitelio corneal y estroma superficial, y no se halló en las zonas no comprometidas de la cornea. Esto confirma que al iniciarse el proceso cicatrizal se produce una regulación positiva del SLPI como factor modulador del remodelado tisular corneal, y que su expresión positiva persiste aun hasta las 48 horas de iniciado el proceso cicatrizal. Por el contrario, en el análisis de las muestras oculares normales del grupo control, se observó una inmunotinción negativa para el SLPI con los anticuerpos utilizados, tanto en muestras del segmento anterior del ojo como el tejido corneal y humor acuoso, como así también en polo posterior, conformado por el humor vítreo y el tejido neuro-retinal. Los estudios cuantitativos de Western blot confirmaron los resultados histológicos, presentando una expresión negativa del SLPI en los homogenatos de muestras vítreas de ojos normales y una débil expresión basal en cornea y retina normal; a diferencia de una alta expresión en los grupos experimentales asociados a procesos inflamatorios. La actividad del SLPI en situaciones inflamatorias como en la cicatrización corneal post excimer láser, se localizó en el área comprometida y aumentó en forma paralela al proceso cicatrizal como lo demuestran las inmunotinciones y Western blots. Cuando se analizaron los grupos experimentales infecciosos, queratitis por herpes simple tipo I y por *S. aureus*, la respuesta inflamatoria fue mayor y llegó a comprometer estructuras anexas al inicio del proceso infeccioso. La expresión del SLPI fue claramente positiva en todas las estructuras oculares comprometidas. Cuando el proceso infeccioso viral o bacteriano se desarrolló en cornea, al inicio se localizó el SLPI en

la superficie corneal epitelial y estromal. Con el avance del proceso inflamatorio e infeccioso, el SLPI se expresó en forma uniforme en todo el tejido corneal.

Así mismo, al realizar el análisis del grupo infeccioso de endoftalmitis por *S. aureus*, patología inflamatoria e infecciosa intra ocular, demostró que, inicialmente en las primeras 24 horas de evolución, el proceso inflamatorio e infeccioso se localizó en el polo posterior del ojo (retina y vítreo), sin comprometer el humor acuoso u otras estructuras oculares del segmento anterior. Con la inmunotinción se evidenció una tinción positiva sólo en retina y vítreo comprometidos, y una tinción negativa en las estructuras anatómicas del segmento anterior del ojo. Con la evolución de la endoftalmitis, los controles con lámpara de hendidura en los animales de 48 horas de evolución, revelaron un compromiso significativo inflamatorio del globo ocular infectado. Esto se confirmó en los cortes histológicos, donde el proceso inflamatorio e infeccioso comprometió las estructuras oculares del segmento anterior del ojo, como cornea y humor acuoso, que se mostraron positivas a la tinción para el SLPI. El proceso infeccioso a las 48 horas de evolución, resultó en una desorganización y necrosis marcada de la estructura retinal, con un infiltrado inflamatorio vítreo y retinal evidente. Así mismo, el análisis histológico de los globos oculares infectados demostró que el SLPI se expresó positivamente en estructuras oculares anexas como el tejido conectivo y el nervio óptico, comprometidas por el proceso inflamatorio avanzado.

Contrariamente, los resultados histológicos y de Western blots de los ojos inoculados con solución salina estéril (BSS) intra vítrea, demostraron no presentar reacción inflamatoria de los tejidos intra oculares, mostrando una falta de expresión del SLPI en los tejidos analizados, y así confirmando la regulación positiva de la expresión del SLPI ante procesos inflamatorios o infecciosos.

Por lo tanto, basados en el conocido rol del SLPI como péptido antimicrobiano y antiproteasa, los resultados obtenidos en el presente trabajo, demuestran una capacidad de regulación y expresión activa asociada a procesos inflamatorios e infecciosos oculares. Futuros estudios de investigación, fundados en complejas técnicas de biología molecular y genética, demostrarán las múltiples vías de regulación del SLPI en el mecanismo modulador de la cicatrización y defensa innata del ojo. Estudios actuales demuestran su futura aplicación terapéutica como agente protector modulador de la inflamación y remodelado tisular, desarrollando sinergia como antimicrobiano de amplio espectro.

Podemos concluir que el hallazgo del SLPI en las estructuras oculares abre numerosas vías de investigación clínica y básica en la oftalmología. Futuros trabajos con péptidos naturales endógenos formaran parte de nuevas estrategias terapéuticas en modulación de la cicatrización, inflamación y terapia antimicrobiana, como llave de la defensa innata del huésped.

### **Conclusión**

Los nuevos avances científicos en biología molecular crean la necesidad de una actualización permanente en la oftalmología con el fin de comprender y resolver los problemas biomédicos de forma multidisciplinaria.

Los Inhibidores naturales endógenos de proteasas son mecanismos reguladores esenciales de la degradación de la matriz extracelular de la cornea y de otros tejidos oculares. El termino “inhibidor de proteasas secretado por leucocitos” (SLPI), se utilizó para definir a una proteína de bajo peso molecular cuya función conocida es la de ser secretada principalmente por leucocitos y otras células no inflamatorias para inhibir proteasas de la matriz extracelular. Además, los

resultados *in vivo* e *in vitro* demostraron que este péptido presentaba una carga molecular altamente catiónica, descubriendo así su función de péptido antimicrobiano de amplio espectro (bacterias-hongos-virus).

En el presente estudio, los análisis inmunohistoquímicos de las muestras oculares normales, mostraron una falta de expresión significativa del SLPI en condiciones normales, presentando solo en los Western blots de los homogenatos de cornea y retina una débil expresión basal del SLPI.

Por el contrario, los estudios de inmunohistoquímica de los grupos experimentales demostraron la presencia y expresión fuertemente positiva del SLPI en procesos cicatrizales, inflamatorios e infecciosos oculares. Los análisis estadísticos de los resultados confirmaron la expresión positiva del SLPI en los procesos patológicos oculares, mostrando una diferencia estadísticamente significativa en los estudios comparativos realizados entre el grupo control y los grupos experimentales. La expresión del SLPI fue claramente positiva en todas las estructuras oculares comprometidas del segmento anterior y posterior del ojo con procesos inflamatorios o infecciosos. A partir del conocido rol del SLPI como péptido antimicrobiano y antiproteasa tisular y de los resultados aquí presentes, se expone la existencia de una regulación positiva de su expresión en los tejidos oculares, principalmente asociados a procesos inflamatorios e infecciosos como parte de los mecanismos reguladores endógenos.

**ANEXO I**  
**TABLAS**

**Tabla A**

**Expresión del SLPI en Tejidos Oculares**

**Resultados de Técnica de Inmunotinción Histológica**

		<b>24 Horas</b>	<b>48 Horas</b>	
<b>Grupo Experimental</b>				
<b>Endoftalmitis</b>				
Cornea	OD	2/8	6/8**	p< 0.05
	OI	0/8	0/8	ns
Vítreo	OD	8/8**	8/8**	p< 0.05
	OI	0/8	0/8	ns
Retina	OD	8/8**	8/8**	p< 0.05
	OI	0/8	0/8	ns

Resultados obtenidos por valoración de observador enmascarado, se determino el total de inmunotinciones positivas de cada grupo experimental.  
Inmunotinción positiva / total de ojos estudiados.

\*\* Diferencia estadísticamente significativa comparando ojos tratados OD vs. ojos control OI. (p< 0.05 análisis Test de Fisher's).

ns: no diferencia estadística

**Tabla B****Expresión del SLPI en Tejidos Oculares****Resultados de Técnica de Inmunotinción Histológica****24 Horas****48 Horas*****Grupo Experimental***

<b>BSS</b>				
Cornea	OD	0/8	0/8	ns
	OI	0/8	0/8	ns
Vítreo	OD	0/8	0/8	ns
	OI	0/8	0/8	ns
Retina	OD	0/8	0/8	ns
	OI	0/8	0/8	ns

Resultados obtenidos por valoración de observador enmascarado, se determino el total de inmunotinciones positivas de cada grupo experimental.

Inmunotinción positiva / total de ojos estudiados.

\*\* Diferencia estadísticamente significativa comparando ojos tratados OD (BSS) vs. ojos control OI. ( $p < 0.05$  análisis Test de Fisher's)

ns: no diferencia estadística.

**Tabla C****Expresión del SLPI en Tejidos Oculares****Resultados de Técnica de Inmunotinción Histológica****24 Horas****48 Horas*****Grupo Experimental*****Queratitis S. aureus**

		24 Horas	48 Horas	
Cornea	OD	10/10**	10/10**	p< 0.05
	OI	1/10	0/10	ns

Resultados obtenidos por valoración de observador enmascarado, se determino el total de inmunotinciones positivas de cada grupo experimental.

Inmunotinción positiva / total de ojos estudiados.

\*\* Diferencia estadísticamente significativa comparando ojos tratados OD vs. ojos control OI. (p< 0.05 análisis Test de Fisher's).

ns: no diferencia estadística



**Tabla D****Expresión del SLPI en Tejidos Oculares****Resultados de Técnica de Inmunotinción Histológica****14 Días****Grupo Experimental****Queratitis HSV**

Cornea	OD	10/10**	p< 0.05
	OI	0/10	ns

Resultados obtenidos por valoración de observador enmascarado, se determino el total de inmunotinciones positivas de cada grupo experimental.

Inmunotinción positiva / total de ojos estudiados.

\*\* Diferencia estadísticamente significativa comparando ojos tratados OD vs. ojos control OI. (p< 0.05 análisis Test de Fisher's).

ns: no diferencia estadística

**Tabla E****Expresión del SLPI en Tejidos Oculares****Resultados de Técnica de Inmunotinción Histológica**

		24 Horas	48 Horas	
<b>Grupo Experimental</b>				
<b>PRK</b>				
Cornea	OD	10/10**	10/10**	p< 0.05
	OI	0/10	1/10	ns

Resultados obtenidos por valoración de observador enmascarado, se determino el total de inmunotinciones positivas de cada grupo experimental.  
Inmunotinción positiva / total de ojos estudiados.

\*\* Diferencia estadísticamente significativa comparando ojos tratados OD vs. ojos control OI. (p< 0.05 análisis Test de Fisher's).

ns: no diferencia estadística

**ANEXO II**

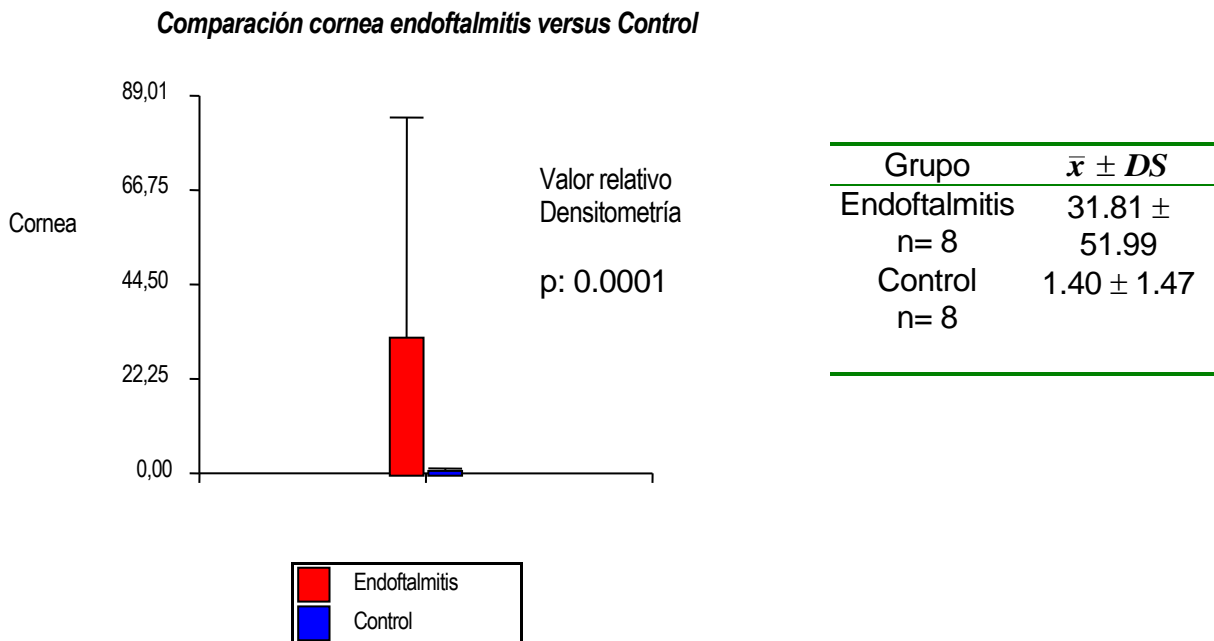
**GRAFICOS**

**Resultados Densitometría Western Blots**

**Gráfico A:**

**Grupo Experimental  
Endoftalmitis**

**Análisis muestra: Cornea endoftalmitis vs. Control 24 horas**

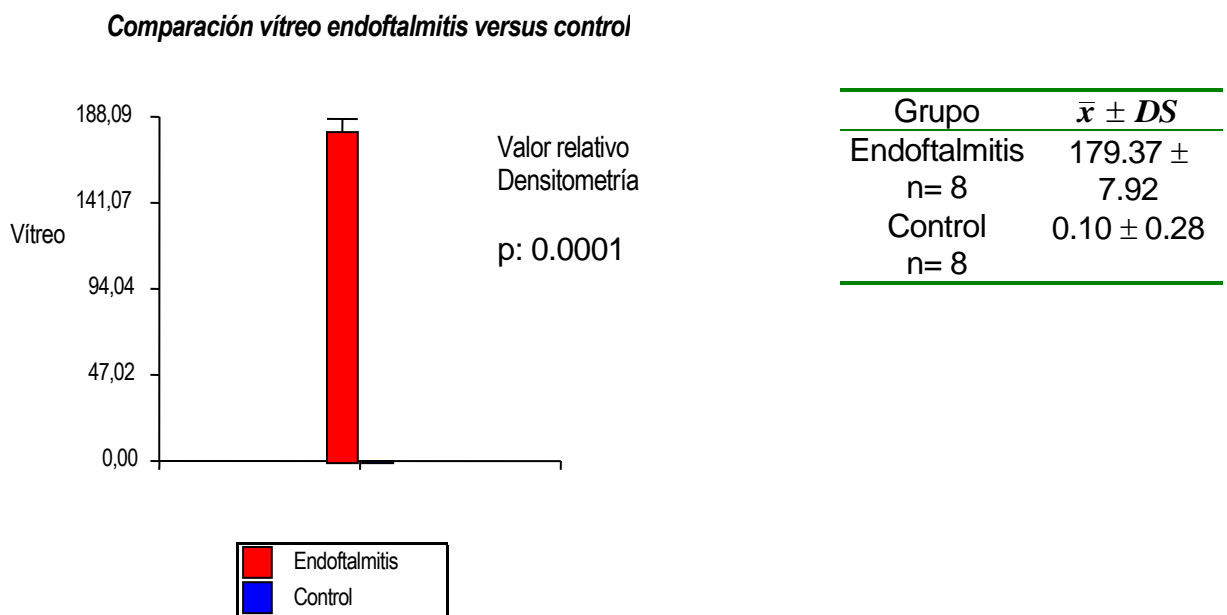


Se efectuó un test no parametrico de Mann Whitney dando como resultado que el promedio en cornea en endoftalmitis es significativamente mayor que en control (p = 0.0001).

**Gráfico B:**

**Grupo Experimental  
Endoftalmitis**

**Análisis muestra: Vítreo vs. Control 24 horas**

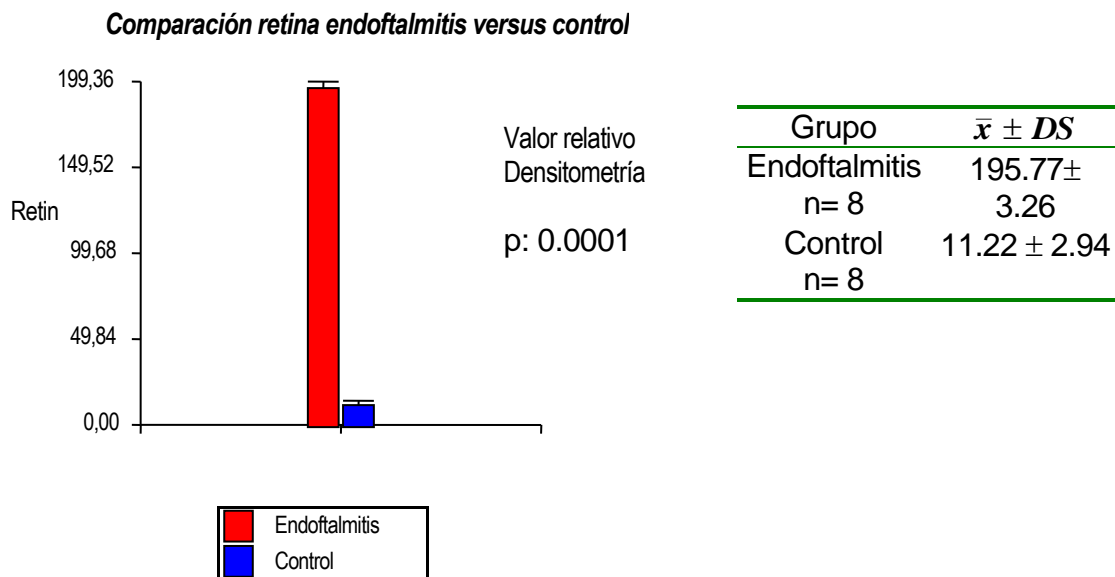


Se efectuó un test no parametrico de Mann Whitney dando como resultado que el promedio en vítreo en endoftalmitis es significativamente mayor que en control (p = 0.0001).

**Gráfico C:**

**Grupo Experimental  
Endoftalmitis**

**Análisis muestra: Retina vs. Control 24 Horas**



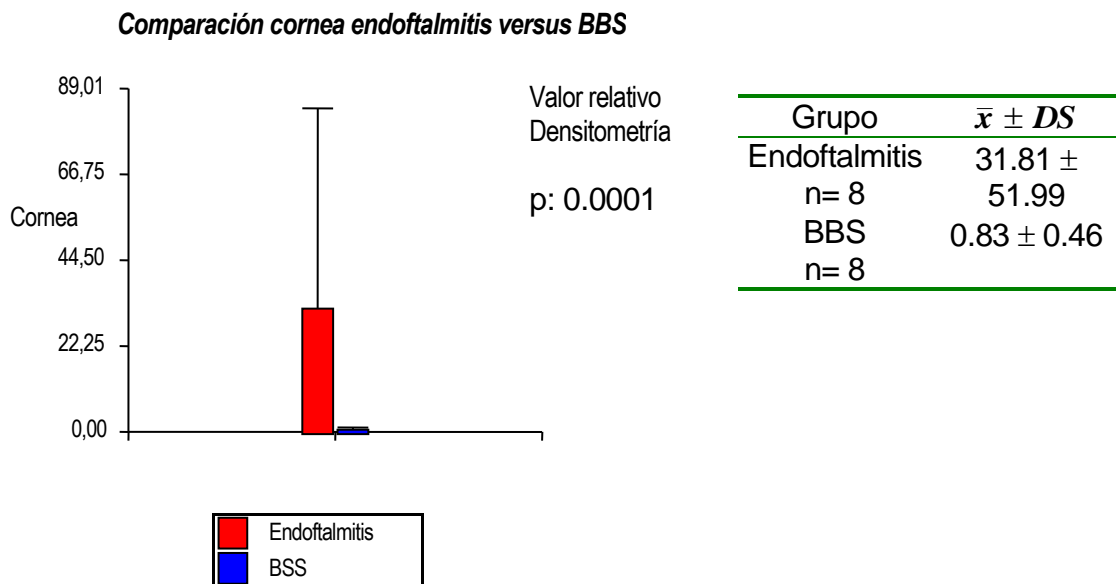
Se efectuó un test no parametrico de Mann Whitney dando como resultado que el promedio en retina en endoftalmitis es significativamente mayor que en control (p = 0.0001).

**Gráfico D:**

**Grupo Experimental  
Endoftalmitis**

**Análisis muestra: Endoftalmitis versus BBS 24 horas**

**Cornea Endoftalmitis OD vs. BBS OD**



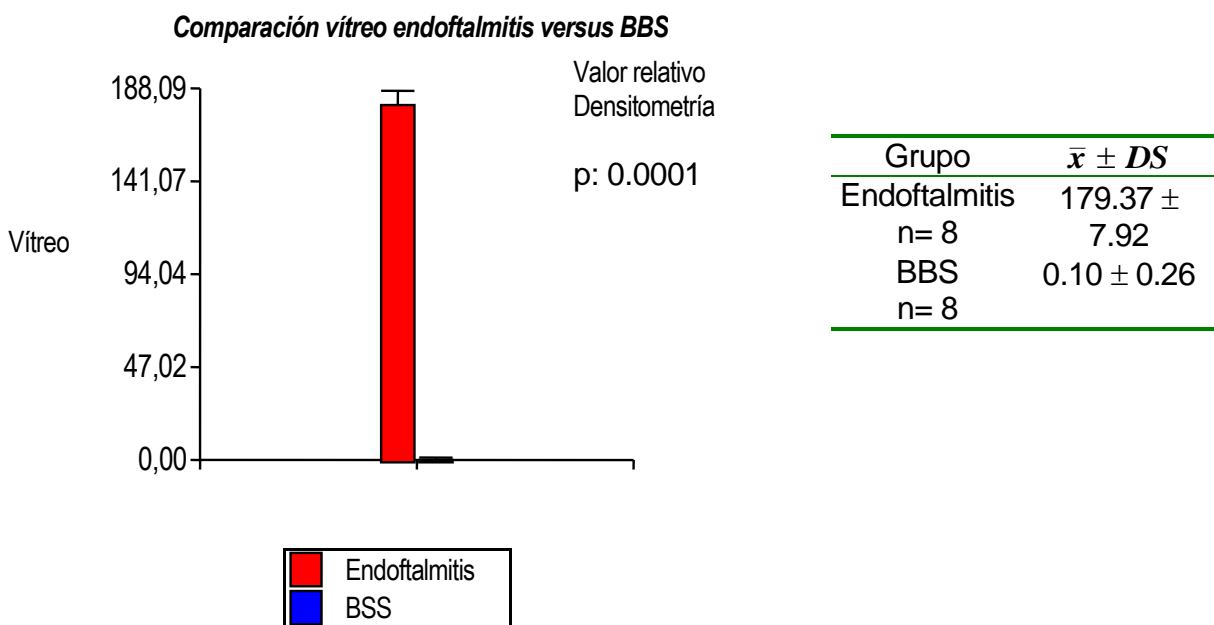
Se efectuó un test no parametrico de Mann Whitney dando como resultado que el promedio en cornea en endoftalmitis es significativamente mayor que en BBS (p = 0.0001).

**Gráfico E:**

**Grupo Experimental  
Endoftalmitis**

**Análisis muestra: Endoftalmitis versus BBS 24 horas**

**Vítreo Endoftalmitis OD vs. BBS OD**



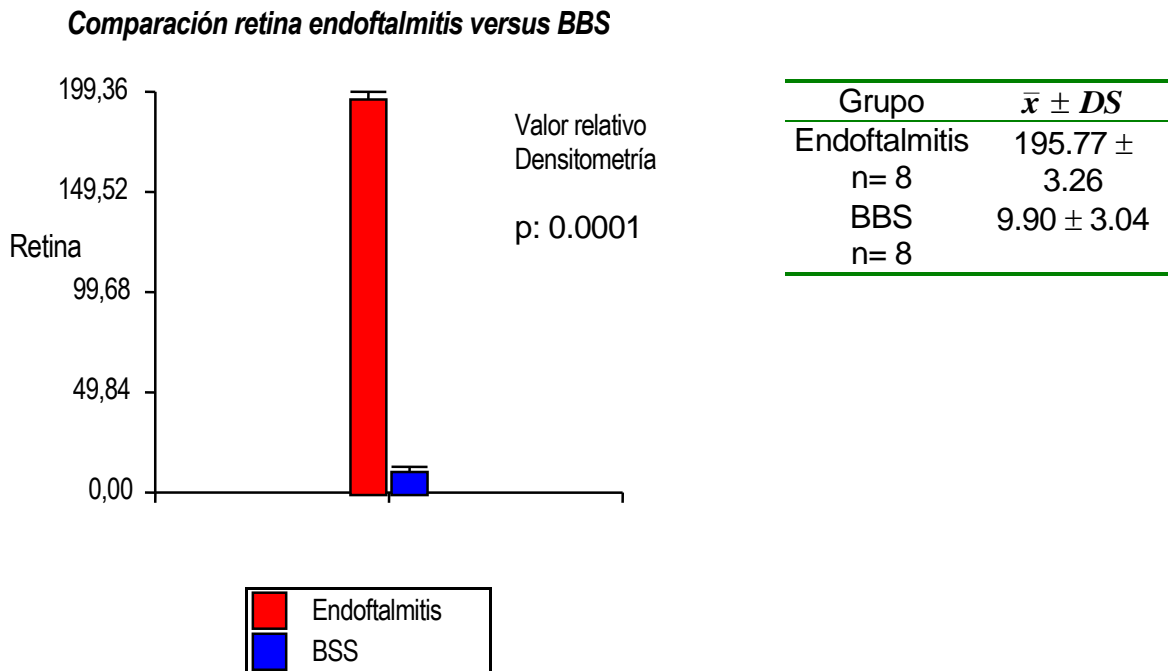
Se efectuó un test no parametrico de Mann Whitney dando como resultado que el promedio en vítreo en endoftalmitis es significativamente mayor que en BBS (p = 0.0001).

**Gráfico F:**

**Grupo Experimental  
Endoftalmitis**

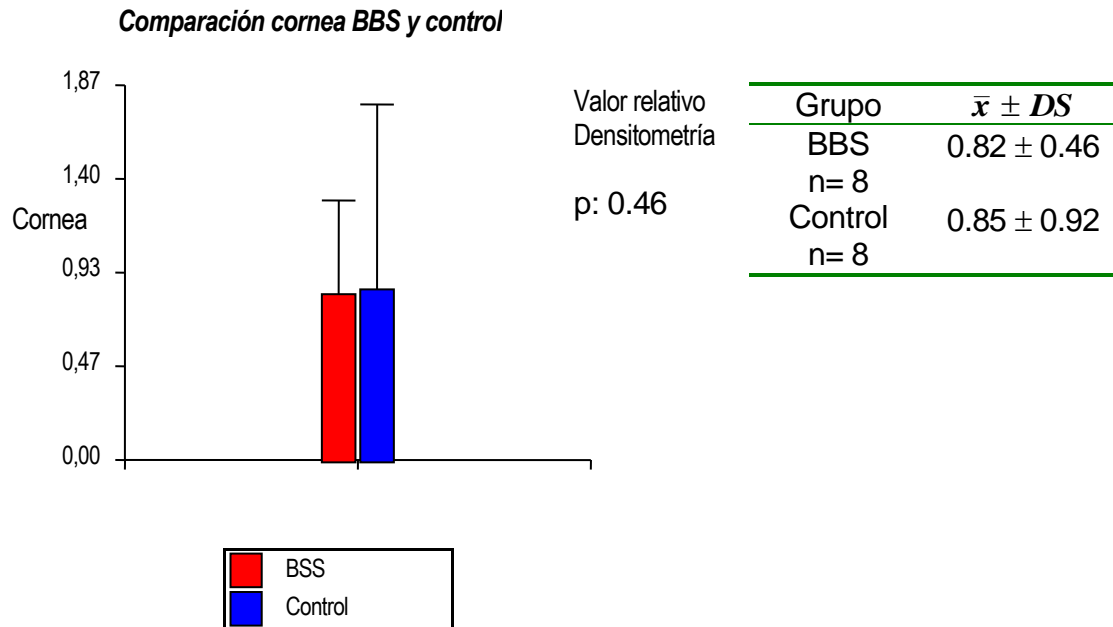
**Análisis muestra: Endoftalmitis versus BBS 24 horas**

**Retina Endoftalmitis OD vs. BSS OD**



Se efectuó un test no parametrico de Mann Whitney dando como resultado que el promedio en retina en endoftalmitis es significativamente mayor que en BBS (p = 0.0001).



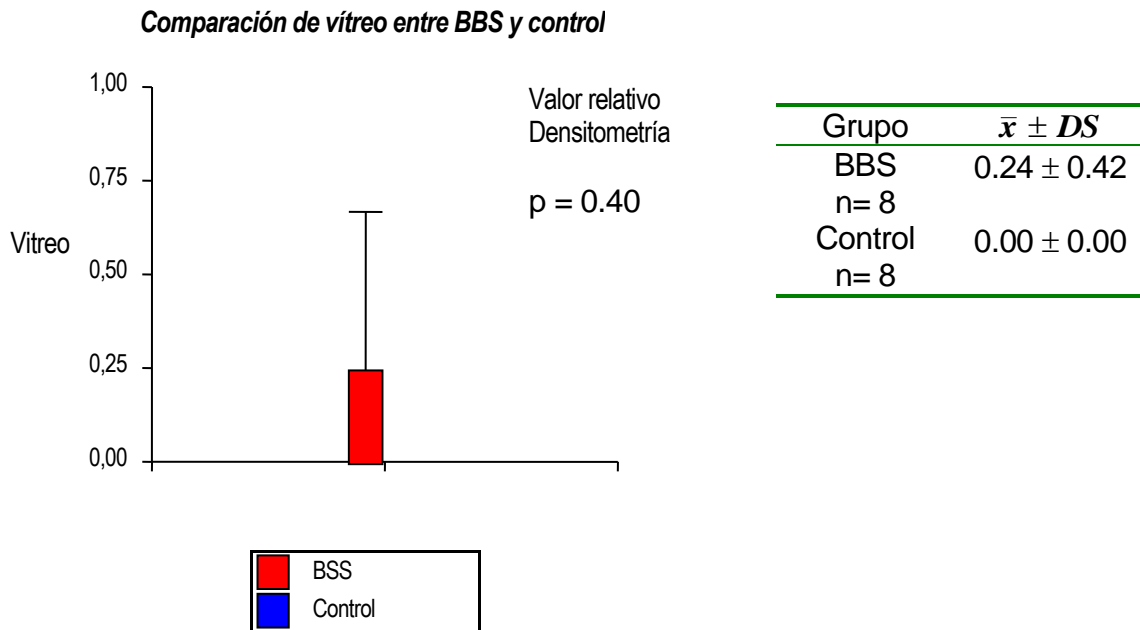
**Gráfico G:****Análisis muestra: BSS versus Control 24 horas****Cornea OD BSS vs. Control OD**

No existen diferencias significativas entre los promedios de cornea de BBS y control ( $p = 0.46$ ).

**Gráfico H:**

**Análisis muestra: BSS versus Control 24 horas**

**Vítreo OD BSS vs. Control OD**

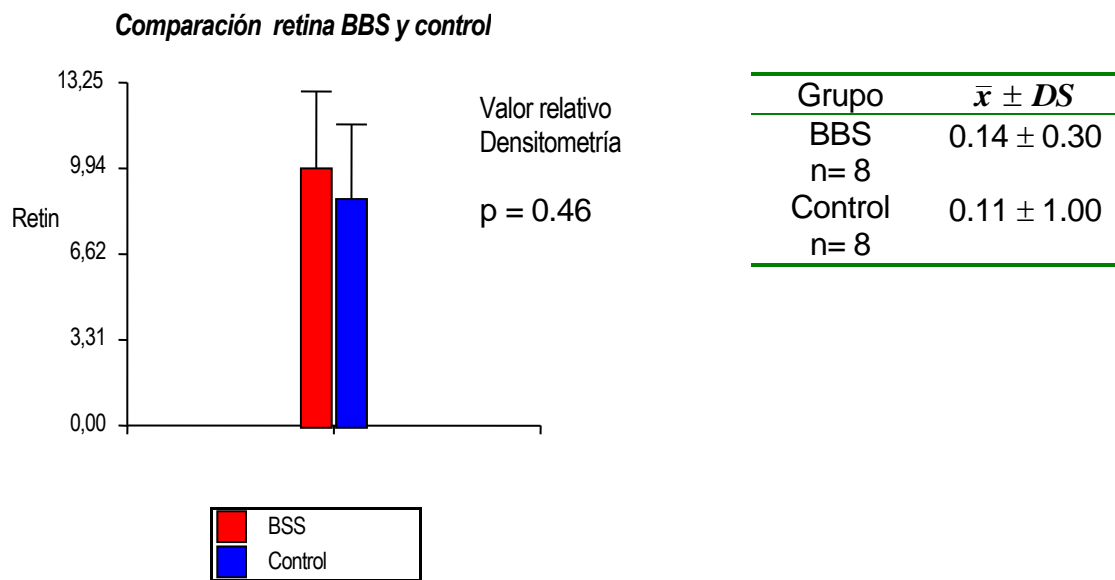


No existen diferencias significativas entre los promedios de vítreo de BBS y control ( $p = 0.40$ ).

**Gráfico I:**

**Análisis muestra: BSS versus Control 24 horas**

**Retina OD BSS vs. Control OD**

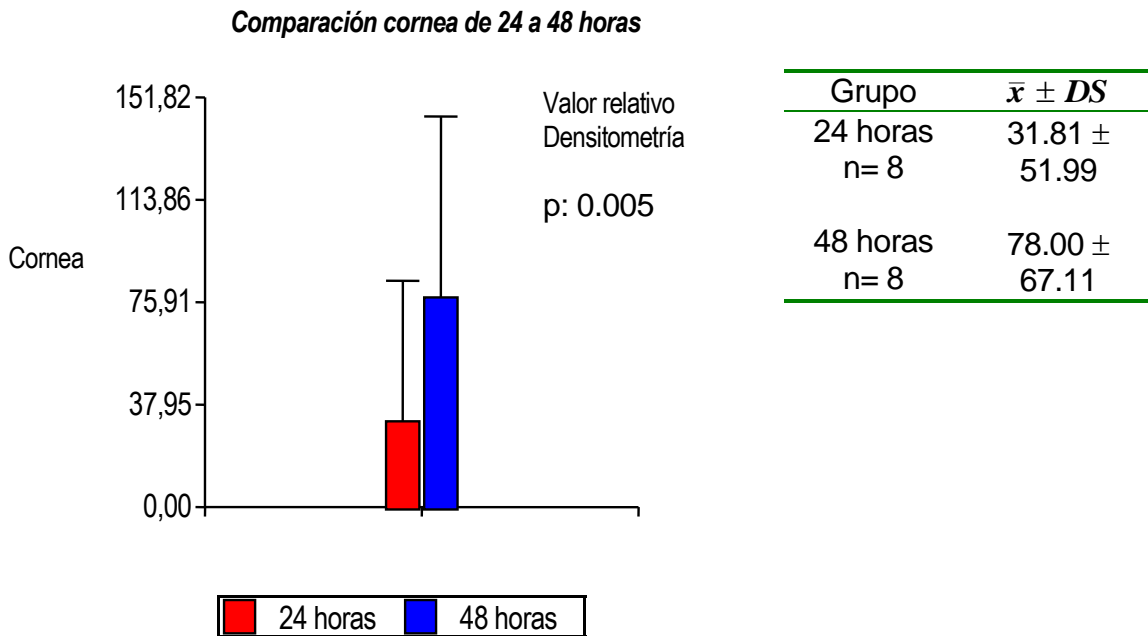


No existen diferencias significativas entre los promedios de retina de BSS y control (p = 0.46).

**Gráfico J:**

**Análisis muestra: Diferencia en densitometría Endoftalmitis entre las 24 y 48 horas**

**Cornea Endoftalmitis OD**

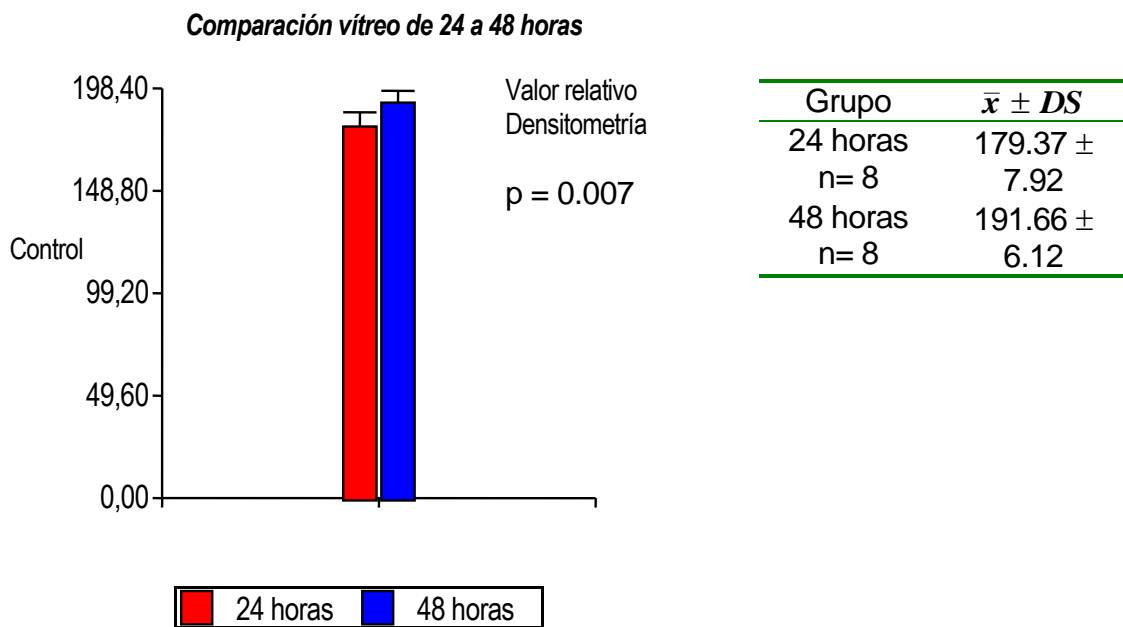


El promedio de densitometría en cornea a las 48 horas es significativamente superior al promedio a las 24 horas ( $p = 0.005$ ).

**Gráfico K:**

**Análisis muestra: Diferencia en densitometría Endoftalmitis entre las 24 y 48 horas**

**Vítreo Endoftalmitis OD**

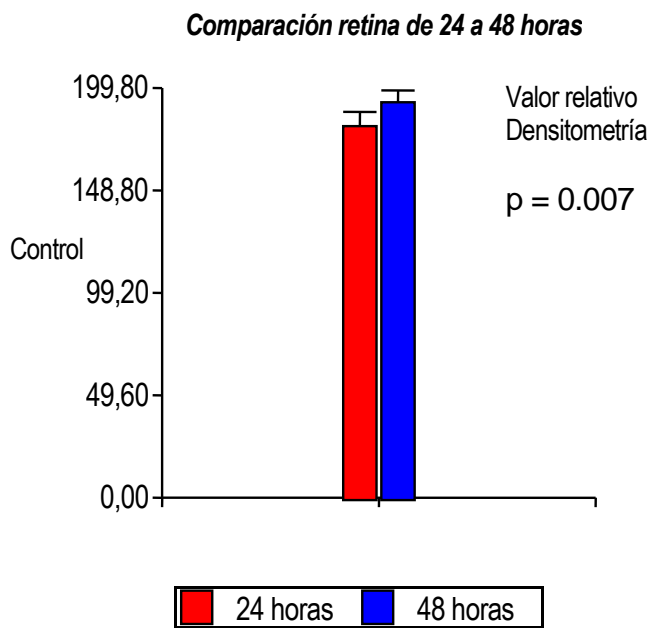


El promedio de densitometría en vítreo a las 48 horas es significativamente superior al promedio a las 24 horas ( $p = 0.007$ ).

**Gráfico L:**

**Análisis muestra: Diferencia en densitometría Endoftalmitis entre las 24 y 48 horas**

**Retina Endoftalmitis OD**



Grupo	$\bar{x} \pm DS$
24 horas n= 8	195.77 $\pm$ 3.26
48 horas n= 8	199.29 $\pm$ 0.95

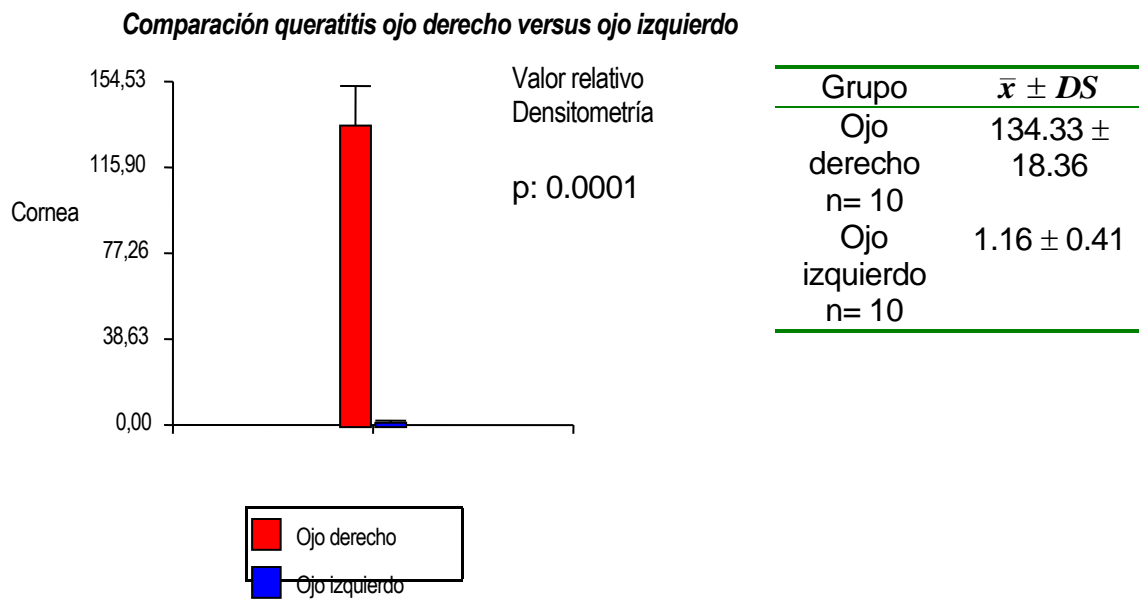
El promedio de densitometría en retina a las 48 horas no es significativamente superior al promedio a las 24 horas ( $p = 0.007$ ).

**Gráfico M:**

**Modelo de Queratitis S. Aureus 24 horas**

**Análisis muestra: Diferencia en densitometría de Tejido Corneal**

*Ojo derecho (inoculación Bacteria) versus ojo izquierdo (Epitelio intacto, control)*



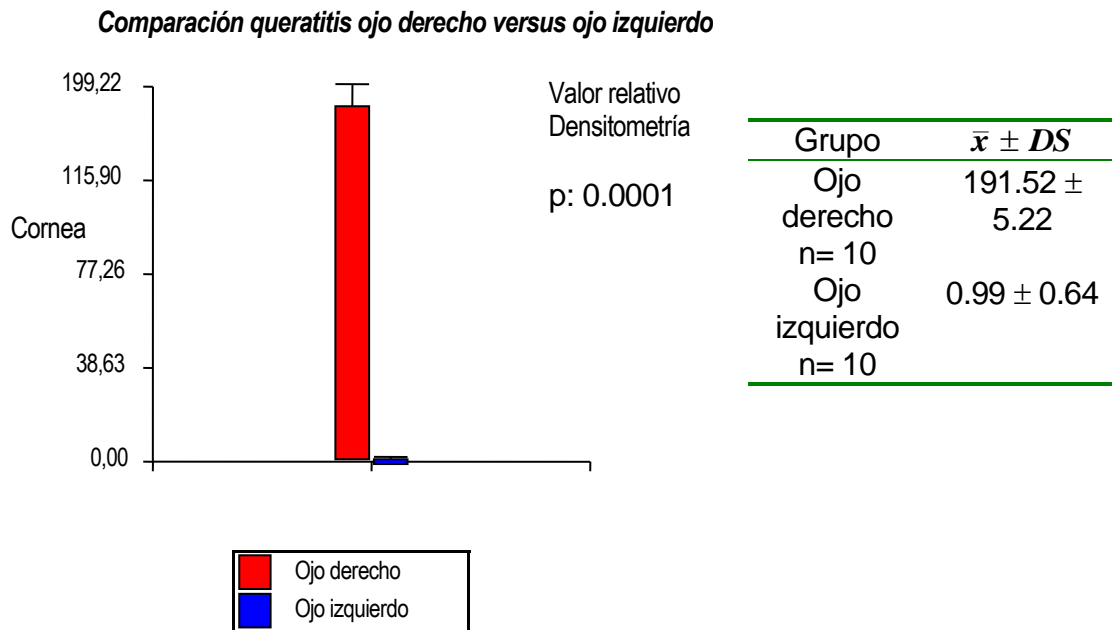
El promedio de densitometría en cornea en ojo derecho es significativamente superior al promedio del ojo izquierdo ( $p = 0.0001$ ).

**Gráfico N:**

**Modelo de Queratitis S. Aureus 48 horas**

**Análisis muestra: Diferencia en densitometría de Tejido Corneal**

*Ojo derecho (inoculación Bacteria) versus ojo izquierdo (Epitelio intacto, control)*



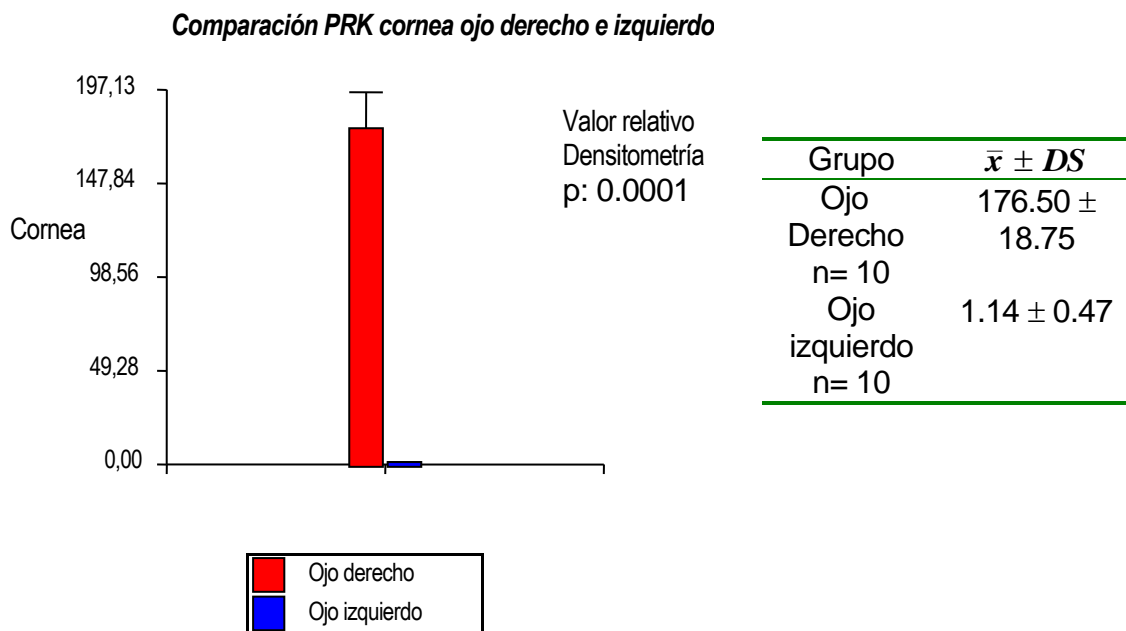
El promedio de densitometría en cornea en ojo derecho es significativamente superior al promedio del ojo izquierdo ( $p = 0.0001$ ).



**Gráfico O:**

**Modelo de Ablación epitelial con Excimer LASER (PRK) a las 24 horas  
Análisis muestra: Diferencia en densitometría de Tejido Corneal**

*Ojo derecho (Defecto epitelial) versus ojo izquierdo (Epitelio intacto)*

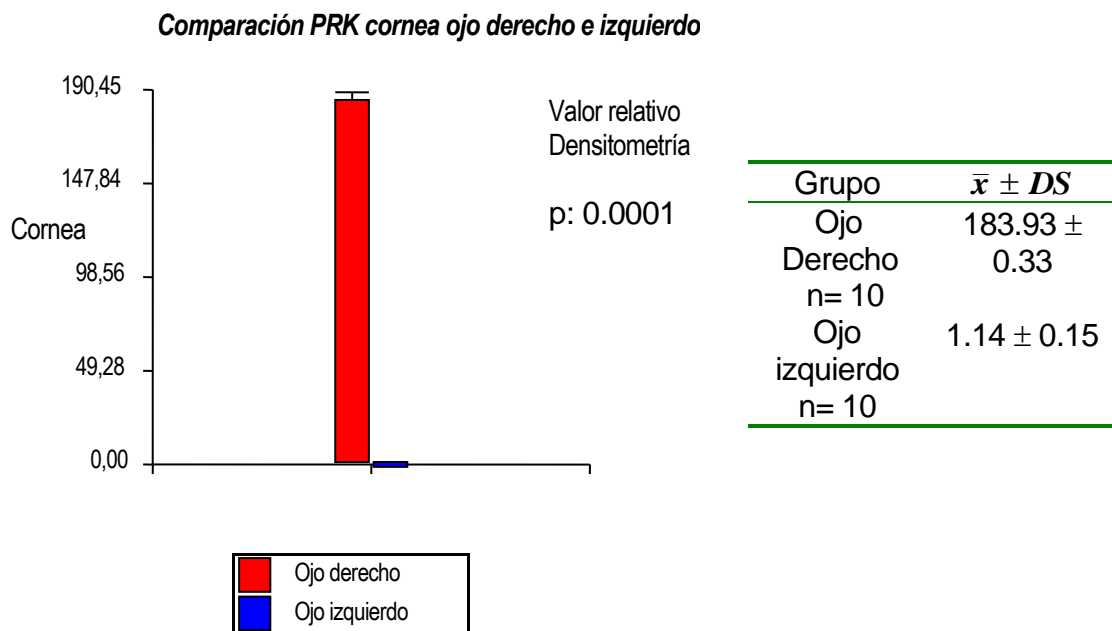


El promedio de densitometría en cornea en ojo derecho es significativamente superior al promedio del ojo izquierdo ( $p = 0.0001$ ).

**Gráfico P:**

**Modelo de Ablación epitelial con Excimer LASER (PRK) a las 48 horas  
Análisis muestra: Diferencia en densitometría de Tejido Corneal**

*Ojo derecho (Defecto epitelial) versus ojo izquierdo (Epitelio intacto)*

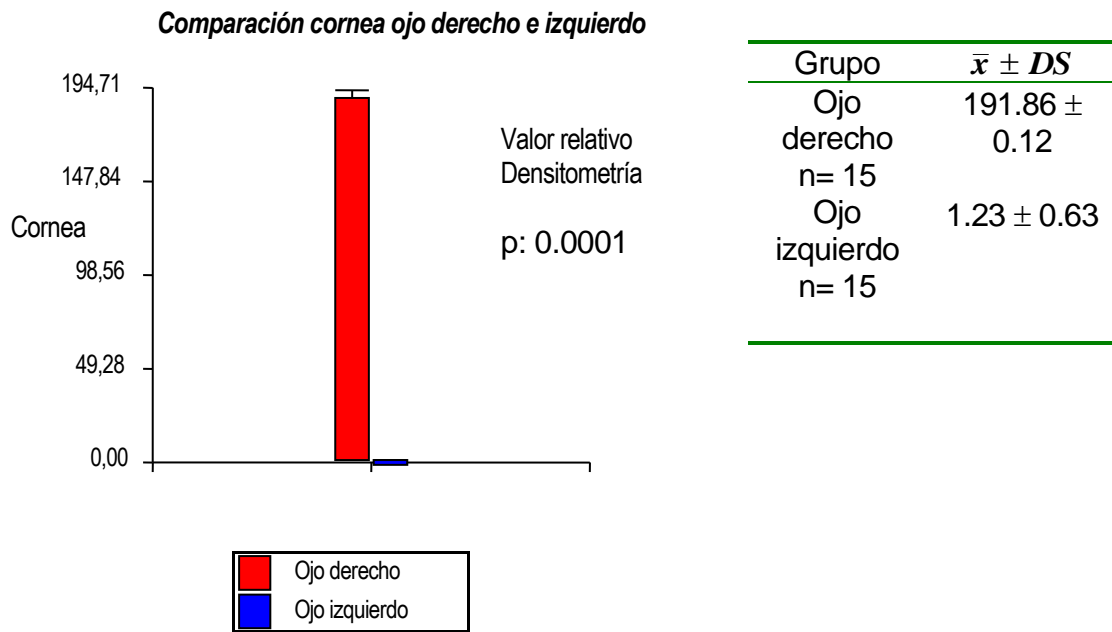


El promedio de densitometría en cornea en ojo derecho es significativamente superior al promedio del ojo izquierdo ( $p = 0.0001$ ).

**Gráfico Q:**

**Modelo de Queratitis Hepética (HSV I) a los 14 días**  
**Análisis muestra: Diferencia en densitometría de Tejido Corneal**

*Ojo derecho (Inoculación epitelial HSV I) versus ojo izquierdo (Control intacto)*

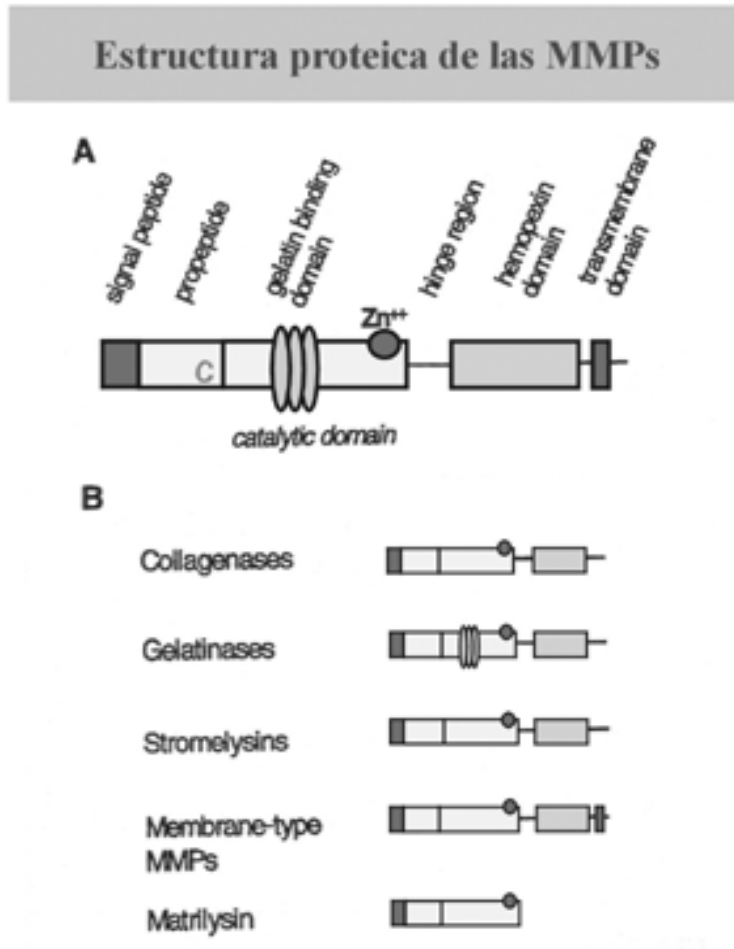


El promedio de densitometría en cornea en ojo derecho es significativamente superior al promedio del ojo izquierdo ( $p = 0.0001$ ).

ANEXO III

FIGURAS

Figura A



Referencias 60, 61





























**ORIGINALIDAD DEL TRABAJO.**

El trabajo de tesis doctoral aquí expuesto se basa en el estudio de los inhibidores endógenos de proteasas, en especial de proteasas de la matriz extra celular asociados a procesos fisiológicos cicatrizales y patológicos de la cornea y el ojo. Se estudió en modelos experimentales en animales de laboratorio. Se realizó un estudio de la presencia del inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI) en tejidos oculares normales y patológicos por medio de técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular. El inhibidores de proteasas secretado por leucocitos (SLPI), estudiado y los respectivos modelos animales y estudios de laboratorio que se realizaron en esta tesis doctoral son de carácter original.

## BIBLIOGRAFIA

1. Yurchenco PD, Schittny JC: Molecular architecture of the basement membranes. *FASEB J.* 4(6):1577-90, 1990.
2. Gipson I.K., Spurr-Michaud S.J., Tisdale A.S. Anchoring fibrils from a complex network in human and rabbit cornea. *Investigative Ophthalmol. Vis. Sci.* 28: 213-220, 1987.
3. Fini M.E. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Progress in Retinal and Eye Research.* 18(4): 529-551, 1999.
4. Fini M.E., Girard M.T., Matsubara M. Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. *Acta Ophthalmologica.* 70(suppl. 202): 26-33, 1992.
5. Murata Y., Yoshioka H., Kitaoka M., Iyama K., Okamura R., Usuku G. Type VI collagen in healing rabbit corneal wounds. *Ophthalmic Res.* 22: 144-151, 1990.
6. Gipson I.K., Inatomi T. Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Current Opinion in Ophthalmology.* 6(4): 3-10, 1995.
7. Hassell JR, Cintron C, Kublin C, Newsome DA: Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars. *Arch Biochem Biophys* 222: 362-69, 1983.
8. Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium normal and pathologic structure and function. 89(6): 531-90, 1982.
9. Yanagishita M: Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn.* 43(6): 283-93, 1993.
10. Kleinman HK, Weeks BS, Schnaper HW, Kibbey MC, Yamamura K, Grant DS: The Laminins: a family of basement membrane glycoproteins important

- in cell differentiation and tumor metastasis. *Vitam Horm.* 47:161-86, 1993.
11. Gipson IK, Spurr-Michaud S J, Tisdale A S, et al: Reassembly of the anchoring structures of the corneal epithelium during wound repair in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30:425-34, 1989.
  12. Murakami J, Nishida T, Ortori T. Coordinated appearance of beta integrins and fibronectin during corneal wound healing. *J Lab Clin Med* 120: 86-93, 1992.
  13. Tervo T, Sulonen J, Valtonen S, Vannas A, Virtanen I: Distribution of fibronectin in human and rabbit corneas. *Exp Eye Res.* 42(4):399-06, 1986.
  14. Lohmann CP, Marshall J. Plasmin and plasminogen activator inhibitor after excimer laser photorefractive keratectomy: *Refractive & Corneal Surgery* (: 300-302, 1993.
  15. Gipson IK, Watanabe H, Zieske JD: Corneal wound healing and fibronectin. *Int Ophthalmol Clin.* 33(4):149-63, 1993.
  16. Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Couchman JR, Wu RR, Ninomiya Y, Manguen E: Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 997-1007, 1996.
  17. Virtanen I, Tervo K, Korhonen M, Paallysaho T, Tervo T: Integrins as receptors for extracellular matrix proteins in human cornea. *ACTA Ophthalmologica* 70:18-21, 1992
  18. Nishida T., Tanaka T. Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Current Opinion in Ophthalmology.* 7(4): 2-11, 1996.
  19. Ye H., Azar D. Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 39(6): 913-921, 1998.

20. Azar D.T., Hahn T.W., Jain S., Yeh Y.C., Stetler-Stevensen W.G. Matrix Metalloproteinases are expressed during wound healing after excimer laser keratectomy. *Cornea*. 15(1): 18-24, 1996.
21. Azar D.T., Pluznik D., Jain S., Khoury J. Gelatinase B and A expression after laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol*. 116: 1206-1208, 1998.
22. Fini M.E., Parks W.C., Rinehart W.B., Girard M.T., Masubara M., Cook J.R., West-Mays J.A., Sadow P.M., Burgeson R.E., Jeffrey J.J., Raizman M.B., Krueger R.R., Zieske J.D. Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. *American Journal of Pathology*. 149(4): 1287-1302, 1996.
23. Tripathi BJ, Tripathi RC, Livingston AM, Borisuth NS: The role of growth factors in the embryogenesis and differentiation of the eye. *Am J Anat*. 192(4):442-71, 1991.
24. Schultz G, Khaw PT, Oxford K, Macauley S, Van Setten G, Chegini N: Growth factors and ocular wounding. *Eye* 8: 184-187, 1994.
25. Bennet NT, Schultz GS: Growth factors and wound healing I. Biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 165: 728-37, 1993.
26. Bennet NT, Schultz GS: Growth factors and wound healing II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 166: 74-81, 1993.
27. Gipson IK, Sugrue SP: Cell Biology of the corneal epithelium. in Albert DM, Jakobiec FA, eds: *Principles and practice of ophthalmology Basic Sciences*. Philadelphia. WB Saunders 1994: 3-16.

28. Sotozono C, He JC, Matsumoto Y, Kita M, Imanishi J, Kinoshita S: Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Curr Eye Res* 16: 670-676, 1997.
29. Wilson SE, He YG, Lloyd SA: EGF, EGF receptor, basic FGF, TGF $\beta$ 1, and IL-1  $\alpha$  messenger RNA production in the human corneal epithelial cells and stromal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33(5):1756-65, 1992.
30. Andresen JL, Ehlers N: Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factors-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin like growth factor-1 and transforming growth factor beta. *Curr Eye Res* 17: 79-87, 1998.
31. Wilson S.E., Lie J.J., Mohan R.R. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog. Retinal Eye Res.* 18: 293-309, 1999.
32. Wilson S.E., Chen L., Mohan R., Liang Q., Liu J. Expression of HGF, KGF, EGF, and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp. Eye Res.* 68: 377-397, 1999.
33. Kamiyama K, Iguchi I, Wang XG, Imanishi J: Effects of PDGF on the migration of rabbit corneal fibroblast and epithelial cells. *Cornea* 17: 315-325, 1998.
34. Wilson SE, Walker JW, Chwang EL, He yg: Hepatocyte growth factor, keratocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor and cells of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34:2544-2561, 1993.
35. Grant MB, Khaw PT, Schultz GS, Adams JL, Shimizu RW: Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33(12): 3292-301, 1992.

- 36.** Fountain TR, de la Cruz Z, Green WR, Stark WJ, Azar DT: Reassembly of corneal epithelial adhesion structures after excimer laser keratectomy in humans. *Arch Ophthalmol.* 112:967-72. 1994.
- 37.** Berman M, Manseau E, Law M, Aiken D: Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:1358-66. 1983.
- 38.** Gipson IK, Spurr-Michaud S J, Tisdale A S, et al: Redistribution of hemidesmosome components during migration of the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:1163A, 1991.
- 39.** Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T: Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *J Cellular Physiology* 153:1-5, 1992.
- 40.** Gan L., Fagerholm P., Kim H. Effect of leukocytes on corneal cellular proliferation and wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 40(3): 575-581, 1999.
- 41.** Pahlitzsch T, Sinha P: The alkali-burned cornea: electron microscopical, enzyme histochemical, and biochemical observations. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 223:298-6, 1985.
- 42.** Eiferman RA, Schultz GS, Nordquist RE, Waring GO: Corneal wound healing and its pharmacologic modification after refractive keratotomy, Waring GO(ed) *Refractive kертotomy for myopia and astigmatism.* St Louis. Mosby Year Book,1992, pg749-79.
- 43.** Kitano S, Goldman JN: Cytologic and histochemical changes in corneal wound repair. *Arch Ophthalmol.* 76:345-54, 1966.

44. Hanna KD, Pouliquen YM, Savoldelli ME, Fantès F, Thompson KP, Waring GO, Samson J: Corneal wound healing in monkeys 18 months after excimer laser photorefractive keratectomy. *Refract. and Corneal Surg.* 6:340-345, 1990.
45. Wu WCS, Stark WJ, Green WR: Corneal wound healing after 193nm excimer laser keratectomy. *Arch Ophthalmol.* 109:1426-1432, 1991.
46. Tervo T, Virtanen T, hokanen N, Harkonen M, Tarkkanen A: Tear fluid plasmin activity after excimer laser photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35: 3045-3050, 1994.
47. Kao WW, Kao LW, Kaufman AH, Kambrin KK KW, Converse RL, Good WV, Bugge TH: Healing of corneal epithelial defects in plasminogen and fibrinogen deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39: 502-508, 1998.
48. Ohji M, SundarRaj N, Thoft RA: Transforming growth factor-beta stimulates collagen and fibronectin synthesis by human corneal stromal fibroblasts in vitro. *Curr Eye Res.* 12(8):703-9,1993.
49. Hanna KD, Pouliquen Y, Waring GO, Savoldelli M, et. al: Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol* 107:895-901,1989.
50. SundarRaj N, Geiss MJ, Fantès F, Hanna K, Anderson SC, Thompson KP, Thoft RA, Waring GO: Healing of excimer laser ablated monkey corneas, an immunohistochemical evaluation. *Arch Ophthalmol* 108:1604-1610, 1990.
51. Strissel KJ, Rinehart WB, Girard MT, Fini ME: Regulation of paracrine cytokine balance controlling collagenase synthesis by corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38: 546-552, 1997.

- 52.** Strissel KJ, Rinehart WB, Fini ME: A corneal epithelial inhibit of stromal cell collagenase synthesis identified as TGFb2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36: 151-162, 1995.
- 53.** Clark RAF,; Wound Repair. Overview and general considerations. In Clark RAF, eds. *The molecular and cellular biology of wound repair.* New York: Plenum press, 1996.
- 54.** Grinnell F: Fibroblast, myofibroblast and wound contraction. *J Cell Biol* 124: 401-404, 1994.
- 55.** Wilson ST, He Y, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EC. Epithelial injury induced keratocyte apoptosis: Hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res.* 62:325-338, 1996.
- 56.** Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand induced apoptosis as a mechanism of immuno privelage. *Science.* 270:1189-1192, 1995.
- 57.** Helena MC, Baerveld F, Kim WJ, Wilson SE. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39(2):276-83, 1998.
- 58.** Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp. Eye Res* 69(5):475-81, 1999.
- 59.** Kreis T, Vale R. *Extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins.* New York; Sambrook & Tooze publications at Oxford University Press, 1999.
- 60.** Massova I., Kotra LP, Fridman R, et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *FASEB J.* 1998; 12:1075-1095.
- 61.** Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK., et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1993; 4(2): 197-250.



62. Abe, T., N. Kobayashi, K. Yoshimura, B. C. Trapnell, H. Kim, R. C. Hubbard, M. T. Brewer, R. C. Thompson, and R. G. Crystal. Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. 1991; *J. Clin. Invest.* 87:2207–2215.
63. Seemüller, U., M. Arnhold, H. Fritz, K. Wiedenmann, W. Machleidt, R. Heinzl, H. Appelhans, H.-G. Gassen, and F. Lottspeich. The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I. antileukoprotease). 1986; *FEBS Lett.* 199:43–48.
64. Ohlsson, K., M. Rosengren, G. Stetler, M. Brewer, K.K. Hale, and R.C. Thompson. Structure, genomic organization and tissue distribution of human Secretory leukocyte-protease inhibitor (SLPI): a potent inhibitor of neutrophil elastase. 1986; In *Pulmonary Emphysema and Proteolysis*. J.C. Taylor and C. Mittman, editors. Academic Press II; Orlando, FL. 307–322.
65. Eisenberg, S.P., K.K. Hale, P. Heimdal, and R.C. Thompson. Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor. 1990.; *J. Biol. Chem.* 265:7976–7981.
66. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* 1996; 64: 4520-4.
67. Fernie-King BA, Seilly DJ, Davies A, Lachmann PJ. Streptococcal Inhibitor of Complement (SIC) inhibits two further components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and lysozyme. *Infect Immun* 2002; 70: 4908-16.

- 68.** NRC (National Research Council). Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C.: National Academy Press 1996.
- 69.** The association for research in vision and ophthalmology (ARVO), Guide for experimental animals, [www.arvo.org](http://www.arvo.org) 2006
- 70.** Guide to the use of experimental animals at Johns Hopkins University, 2002 <http://www.jhu.edu/animalcare>.
- 71.** Toth, L. A., and Gardiner, T. Food and Water Restriction Protocols: Physiological and Behavioral Considerations. Contemporary Topics In Laboratory Animal Science, 2000; 39: 9-17.
- 72.** Claassen, V. Food and Water Intake. In J. P. Huston (ed.) Techniques in the Behavioral and Neural Sciences. Elsevier, New York; 1994;267 -287.
- 73.** Ullman-Cullere MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. Lab. Anim. Sci. 1999; 49: 319-323.
- 74.** Report of the AVMA Panel on Euthanasia, JAVMA, 2001; Vol 218, No. 5, March.
- 75.** Wall PD. Defining pain in animals. In: Short CE, Poznak AV, eds. Animal pain. New York: Churchill-Livingstone Inc, 1992;63–79.
- 76.** Wixon SK, Smiler KL. Anesthesia and analgesia in rodents. In: Kohn DF, Wixson SK, White WJ, et al, eds. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. New York: Academic Press Inc, 1997;165–203.
- 77.** Clifford DH. Preanesthesia, anesthesia, analgesia, and euthanasia. In: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, eds. Laboratory animal medicine. Orlando: Academic Press Inc, 1984;527–562.

- 78.** Hawkins P. Recognizing and assessing, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Lab Anim.* 36: 378-395, 2002.
- 79.** Liles JH, Flecknell PA. The effects of surgical stimulus on the rat and the influence of analgesic treatment. *Br. Vet. J.* 149: 515-525, 1993.
- 80.** Ashraf MF, Li Q, Reviglio VE, Rana TS, Green WR, O'Brien TP: Ulcerative keratolysis with perforation after postoperative diclofenac use: Upregulation of matrix metalloproteinases (MMPS). *Ophthalmology.* 2001 Apr;108(4):656-9.
- 81.** Li QJ, Ashraf FM, Rana TS, Tuli S, Mai EL, Adler RA, Reviglio VE, O'Brien TP. Long-term survival of allogeneic donor cell-derived corneal epithelium in limbal deficient rabbits. *Curr Eye Res.* 2001 Nov;23(5):336-45.
- 82.** Reviglio VE, Rana TS, Li Q, Ashraf MF, Daly MK, O'Brien TP: Effect of topical nonsteroidal anti-inflammatory agents on the expression of matrix metalloproteinases in the cornea. *Cataract & Refractive Surgery.* 2003 May;29(5):989-97.
- 83.** Reviglio VE, Hakim MA, Song JK, O'Brien TP. Effect of topical fluoroquinolones on the expression of matrix metalloproteinases in the cornea. *BMC Ophthalmol.* 2003 Oct 6;3(1):10.
- 84.** Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):835-70. Review.
- 85.** Hazlett LD. Role of innate and adaptive immunity in the pathogenesis of keratitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2005 Apr-Jun;13(2-3):133-8.
- 86.** Akpek EK, Gottsch JD. Immune defense at the ocular surface. *Eye.* 2003 Nov;17(8):949-56.

- 87.** Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;306:27-66.
- 88.** Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond).* 2006 Jan;110(1):21-35.
- 89.** Hiemstra PS, Fernie-King BA, McMichael J, Lachmann PJ, Sallenave JM. Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity as templates for the development of novel anti-infective and immune therapeutics. *Curr Pharm Des.* 2004;10(23):2891-905.
- 90.** Tomee JF, Koeter GH, Hiemstra PS, Kauffman HF. Secretory leukoprotease inhibitor: a native antimicrobial protein presenting a new therapeutic option?. *Thorax.* 1998 Feb;53(2):114-6.
- 91.** Sathe S, Sakata M, Beaton AR, Sack RA. Identification, origins and the diurnal role of the principal serine protease inhibitors in human tear fluid. *Curr Eye Res.* 1998 Apr;17(4):348-62.
- 92.** Jana NK, Gray LR, Shugars DC. Human immunodeficiency virus type 1 stimulates the expression and production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in oral epithelial cells: a role for SLPI in innate mucosal immunity. *J Virol.* 2005 May;79(10):6432-40.