

**Urrets Zavalía, Julio Alberto**

# Queratopatía climática en la Argentina

---

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

Director: Serra, Horacio Marcelo

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**.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.

Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5

# *Queratopatía Climática en la Argentina*

*Tesis de doctorado en Medicina*

*Autor*

*Sr. Médico Julio Alberto Urrets Zavalía*



*Facultad de Medicina*

*Universidad Católica de Córdoba*

*Argentina*

*2007*

**Director de tesis:**

***Prof. Dr. Horacio Marcelo Serra***

**Comisión de tesis:**

***Prof. Dr. Carlos A. Remonda***

***Prof. Dr. Rubén Sambueli***

***Prof. Dr. Alejandro Lozano***

Este trabajo fue realizado con la ayuda económica proveniente de recursos propios, de recursos aportados por el Centro de la Visión Urrets Zavalía de la Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidad Católica de Córdoba, y de subsidios para la investigación otorgados por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT), del Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) (PIP 5073), del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONCYT), la Sigrid Juselius Foundation, Finlandia, la Osk. Huttunen Foundation, Finlandia, la Academia de Ciencias de Finlandia, y el Helsinki University Central Hospital EVO (subsidios TYH-5306, TYH-6104, y TI020Y0002).

*A Gabriela,  
a Pilar, Javier, María y Luz.*

# Agradecimientos

*La experiencia de realizar esta tesis de doctorado ha sido intensa, con momentos de gran entusiasmo y alegría, pero también de desasosiego y crisis. No ha sido una tarea fácil, pero siento que todos los sacrificios dieron sus frutos, no solamente en lo académico y profesional, sino también en lo personal.*

*Muchas personas me han ayudado a crecer de una u otra manera en este arduo pero generoso camino, por lo que las tendré siempre en mi corazón y en mis pensamientos.*

*Este trabajo es el fruto de muchos años de esfuerzo, en el que han participado en forma directa e indirecta muchas personas, por lo que el fruto es también de todos ellos.*

*Va mi agradecimiento especial a mi director de tesis, el Dr. Horacio M. Serra, por su amistad, su guía desinteresada y abierta en este desafío, por su confianza, su paciencia y, a la vez, sus exigencias y rigor en el trabajo. Por su vastedad de conocimientos, su honestidad intelectual y humana, y su franqueza sin tapujos, que me permitieron hacer de este camino un aprendizaje constante y un crecer como persona.*

*A los miembros de mi comisión de tesis, Dr. Carlos A. Remonda, por su sabiduría y a la vez su sencillez, su humildad, su rectitud e imparcialidad; Dr. Rubén Sambueli, por su seriedad, su experiencia como investigador, y su tiempo y aportes puestos al servicio de nuestro trabajo; y al Dr. Alejandro Lozano, por su amistad y apoyo expresados a través de un estímulo constante para llevar a buen puerto nuestro trabajo sin prisa pero sin pausa, y por sus aportes científicos precisos y valiosos.*

*Al padre Miguel A. Petty, S.J., por mostrarnos a través de su Proyecto de Evangelización y Promoción Humana el espíritu jesuítico imperecedero en donde se mezclan amor a Dios y al prójimo, vocación educadora y capacidad organizativa; por introducirnos en la comunidad de Aguada Guzmán, Pcia. de*

*Río Negro, y permitirnos llevar a cabo una tarea humanitaria que ha marcado nuestras vidas y nuestra forma de ejercer la medicina.*

*A la Sra. Graciela Franchini, Coordinadora General del Voluntariado de la Universidad Católica de Córdoba, por su enorme espíritu de servicio, por su simpatía y amabilidad, su organización y colaboración codo-a-codo en cada campaña realizada a la Patagonia, su comprensión para con el proyecto y su apoyo.*

*A todos los miembros del voluntariado que, anónimamente y con gran sentido solidario, colaboraron con la atención de los pacientes en Aguada Guzmán.*

*A nuestros queridos pacientes de Aguada y alrededores, Sumampa y Cieneguillas, por confiar en nosotros y en nuestra atención médico-oftalmológica, por enseñarnos tanto con su modo de vida sencillo, silencioso y sufrido.*

*A mi primo y amigo Enrique A. Urrets Zavalía, por su amistad, su candidez, sus notas de buen humor, sus enormes condiciones humanas y profesionales y su apoyo constante en toda nuestra actividad a lo largo de todos estos muchos años.*

*A todos los médicos residentes del Centro de la Visión de la Clínica Universitaria Reina Fabiola que han participado de las diferentes campañas oftalmológicas en la Patagonia, Dr. Juan A. Dalmagro (h) y Mariano Irós, con quienes realizamos nuestra primera campaña oftalmológica a Aguada Guzmán en la Semana Santa de 1997 que se constituyó en una experiencia única, y con quienes observamos por primera vez en esta región de América Latina la queratopatía climática en pacientes de esa región patagónica; el Dr. Juan Pablo Maccio por su presencia y disposición en casi todas las campañas realizadas hasta el presente, y por sus metódicos y cuidadosos estudios de ojo externo; la Dra. Erna G. Knoll por su vocación de servicio y sus incomparables condiciones personales e intelectuales que nos enriquecieron, y por llevar a cabo la enorme tarea de recopilar la gran mayoría de los datos de los pacientes observados en todos estos años, generando además numerosas ideas para el proyecto; el Dr. José Saad, el Dr. Julio Kohan, el Dr. Ignacio Tártara, el Dr. Joaquín Mercado, el Dr. Fernando Espósito y el Dr. Juan Ignacio Torrealday, por su cooperación generosa y eficaz, y la “buena onda” puesta en cada campaña. Al Dr. Omar Alé, por su participación en la campaña de Cieneguillas, y por su colaboración en el*

*análisis de los datos correspondientes a los pacientes examinados en dicha campaña.*

*Al Dr. Eduardo Frank, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba, y a la Sra. Susana Maidana, de Cieneguillas, Pcia. de Jujuy, por su inestimable colaboración en la campaña en Cieneguillas.*

*A Eloi Sepúlveda, por su colaboración en las diferentes campañas a Aguada Guzmán y también a Cieneguillas.*

*A la Ing. Agrónoma María Florencia Barbero, por su generosidad y buena disposición en el análisis de los datos sobre el agua de Aguada Guzmán.*

*Al personal administrativo del Centro de la Visión Urrets Zavalía de la Clínica Universitaria Reina Fabiola, Sr. Eduardo Soria, Sra. Mercedes Ortega, Sra Liliana Bachini, Sra. Marcia Zelaya, Srta. Flavia Robles, Sr. Raúl Bachini y Raúl González, los que, pendientes de nuestros resultados en las diferentes campañas, velaban porque todo siguiera en orden en el servicio de oftalmología durante nuestra ausencia.*

*Al Dr. Juka Moilanen, de la Universidad de Helsinki, Finlandia, por sus aportes y colaboración en la campaña realizada a Cieneguillas, Altiplano Jujeño en Diciembre de 2005, y por su hospitalidad al igual que la ofrecida por el Dr. Timo Tervo y el Dr. Juha Holopainen, en ocasión de nuestra visita a la Universidad de Helsinki, Finlandia, como parte de nuestro proyecto de investigación y cooperación científica con la Academia de Ciencias de Finlandia, en Septiembre de 2005.*

*A la Dra. Thamara Cafaro por su valiosa ayuda en las campañas y en la realización de pruebas de laboratorio, obtención y análisis de datos imprescindibles para nuestro trabajo.*

*A mi maestra en la Oftalmología, la Prof Dra. Mireille Bonnet, de la Universidad de Lyon, Francia, quien verdaderamente hizo germinar en mí la pasión por la oftalmología, y que sigue siendo uno de mis principales modelos de vida profesional por su honestidad intelectual, su rigor científico, su energía y su pasión puestos al servicio de sus pacientes y de la medicina, llevadas a la par de una vida personal solitaria y sufrida.*

*A mi tío el Prof Dr. Alberto Urrets Zavalía, quien puso a la oftalmología argentina en los niveles más elevados de la oftalmología mundial, con lo que, a la vez del enorme peso y responsabilidad que significa llevar su mismo apellido,*



*es ello motivo de un orgullo inmenso. De él he aprendido no sólo oftalmología sino también esfuerzo y renunciamentos, método, rigor, honestidad intelectual, sentido crítico y observación aguda, siendo siempre un modelo importante en mi vida profesional. Va por él mi respeto y admiración.*

*A mis hermanos, en especial Mariana y Esteban quienes estuvieron muy cerca mío en todos estos años, por regalarme su calidez y afecto, por sus ejemplos de esfuerzo y superación en incontables ocasiones.*

*A mis padres, a quienes debo parte de lo que soy y de lo que he logrado.*

*A mi suegro el Dr. Félix E. Sarría Deheza, a quien extraño entrañablemente por no tenerlo hoy físicamente, por regalarme su ejemplo de vida, su caballerosidad y su hombría de bien.*

*A mi suegra Susy Allende Posse de Sarría, por regalarme su cariño, dulzura y bondad sin límites, y por su ejemplo de vida único.*

*A mi esposa Gabriela, a quien debo tanto, por ser mi estímulo constante, mi sol, mi fuerza, mi apoyo incondicional, mi confidente, mi amiga. Por tu confianza ilimitada, por sostenerme los brazos en alto cuando yo los quería bajar. Por amarme.*

*A mis hijos Pilar, Javier, María y Luz, por ser el sentido de mi vida, por regalarme tantos momentos y tantas vivencias que me sirvieron para seguir pensando “la vida, sí que vale la pena ser vivida”, por cederme tan generosamente incontables momentos en que trabajé arduamente en desmedro de sus momentos, de una charla o de un simple estar.*

# ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1: Introducción y Objetivos</b>	<b>10</b>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<b>11</b>
<b>I. La Córnea Normal</b>	<b>11</b>
<b>I.1. Estructura</b>	<b>11</b>
<b>I.2. Inervación</b>	<b>16</b>
<b>I.3. Reparación tisular</b>	<b>19</b>
<b>II. Las Metaloproteinasas de Matriz.</b>	<b>21</b>
<b>II.1. La matriz extracelular</b>	<b>21</b>
<b>II.2. Las metaloproteinasas</b>	<b>22</b>
<b>II.3. Clasificación de las metaloproteinasas</b>	<b>23</b>
<b>II.4. Activación de las metaloproteinasas</b>	<b>25</b>
<b>II.5. Inhibidores endógenos de las metaloproteinasas</b>	<b>25</b>
<b>II.6. Metaloproteinasas en enfermedades de la córnea y la             superficie ocular</b>	<b>26</b>
<b>III. La Queratopatía Climática</b>	<b>29</b>
<b>III.1. Definición de la enfermedad y características clínicas</b>	<b>29</b>
<b>III.2. Denominaciones</b>	<b>29</b>
<b>III.3. Distribución geográfica</b>	<b>32</b>
<b>III.4. Diagnósticos diferenciales</b>	<b>33</b>
<b>III.5. Anatomía patológica</b>	<b>37</b>
<b>III.6. Etiología</b>	<b>39</b>
<b>III.7. Tratamiento</b>	<b>39</b>
<b>IV. El Polimorfismo Genético:</b>	<b>42</b>
<b>IV.1. Grupos sanguíneos eritrocitarios. El sistema ABO</b>	<b>42</b>
<b>IV.2. El sistema mayor de histocompatibilidad</b>	<b>43</b>

<b>V. Radiación ultravioleta y queratopatía climática</b>	<b>47</b>
V.1. La radiación solar	47
V.2. Factores que influyen la irradiación UV sobre la superficie terrestre	49
V.3. Radiación UV y su acción nociva en el ojo. La córnea como filtro de radiación UV	51
<b>VI. El Ácido Ascórbico y su Posible Rol en la Queratopatía Climática</b>	<b>54</b>
VI.1. Introducción	54
VI.2. Generalidades acerca del ácido ascórbico	54
VI.3. Absorción del ácido ascórbico	55
VI.4. Degradación del ácido ascórbico	56
VI.5. Funciones generales del ácido ascórbico	56
VI.6. El ácido ascórbico en estructuras oculares	57
<b>OBJETIVOS</b>	<b>59</b>
a) Objetivos Generales	59
b) Objetivos Específicos	59
<b>CAPÍTULO 2: Materiales y Métodos</b>	<b>61</b>
<b>I. ESTUDIOS CLÍNICOS OFTALMOLÓGICOS EN DIFERENTES REGIONES DE LA ARGENTINA</b>	<b>62</b>
<b>I.1. Región de Aguada Guzmán</b>	<b>62</b>
I.1.1. Contexto	62
I.1.2. Características geográficas del área	63
I.1.3. Individuos	65
I.1.4. Agua de consumo	66
I.1.5. Examen clínico oftalmológico	67
I.1.6. Exámenes complementarios de ojo externo	68
I.1.7. Registro fotográfico de casos clínicos	70
I.1.8. Análisis estadísticos	71
<b>I.2. Región de Sumampa</b>	<b>71</b>

1.2.1. <i>Contexto</i>	71
1.2.2. <i>Características geográficas del área</i>	71
1.2.3. <i>Individuos</i>	71
1.2.4. <i>Examen clínico oftalmológico</i>	72
1.2.5. <i>Exámenes complementarios</i>	72
<b>1.3. <i>Región de Cieneguillas</i></b>	<b>72</b>
1.3.1. <i>Contexto</i>	72
1.3.2. <i>Características geográficas del área</i>	73
1.3.3. <i>Individuos</i>	73
1.3.4. <i>Examen clínico oftalmológico</i>	73
1.3.5. <i>Exámenes complementarios</i>	74
<b>1. <i>Región de Aguada Guzmán</i></b>	<b>38</b>
<b>II. <i>ESTUDIO DE POLIMORFISMO GENÉTICO</i></b>	<b>75</b>
II.1. <i>Estudio del Sistema AB0</i>	76
II.2. <i>Estudio del CMH clase II (HLA-DR<math>\beta</math>1)</i>	76
II.3. <i>Análisis estadístico.</i>	77
<b>III. <i>ROL DE LAS METALOPROTEINASAS EN LA</i></b> <b><i>QUERATOPATÍA CLIMÁTICA. Estudio de Gelatinasas, Colagenasas</i></b> <b><i>e Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas en Lágrima de Pacientes</i></b> <b><i>con Queratopatía Climática</i></b>	<b>78</b>
III.1. <i>Individuos</i>	78
III.2. <i>Examen clínico oftalmológico</i>	78
III.3. <i>Obtención de muestras de lágrima</i>	78
III.4. <i>Determinación de la concentración de proteínas en lágrima</i>	79
III.5. <i>Determinación de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en</i> <i>muestras de lágrima</i>	79
III.6. <i>Colagenasas (MMP-8 y MMP-13) y TIMP-1 y TIMP-2 en</i> <i>lágrima l</i>	79
III.7. <i>Análisis estadístico</i>	79
<b>IV. <i>ESTUDIO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA</i></b>	<b>80</b>
IV.1. <i>Regiones geográficas estudiadas</i>	80
IV.2. <i>Determinación de la densidad de la capa atmosférica de ozono</i>	80
IV.3. <i>Determinación de la irradiación UV-B a nivel de superficie</i>	81

*terrestre*

<b>V. EL ÁCIDO ASCÓRBICO Y SU POSIBLE ROL EN LA QUERATOPATÍA CLIMÁTICA</b>	<b>82</b>
V.1. Individuos	82
V.2. Estudio del ácido ascórbico en suero	82
V.3. Análisis estadístico	82
<b>CAPÍTULO 3: Resultados</b>	<b>82</b>
<b>I. ESTUDIOS CLÍNICOS OFTALMOLÓGICOS EN DIFERENTES REGIONES DE LA ARGENTINA</b>	<b>83</b>
<b>I.1. Región de Aguada Guzmán</b>	<b>83</b>
I.1.1. Demografía	83
I.1.2. Hallazgos clínicos	86
I.1.3. Agudeza visual	95
I.1.4. Estudios de ojo externo	95
I.1.5. Otras alteraciones oculares asociadas	97
I.1.6. Análisis del agua	98
<b>I.2. Región de Sumampa</b>	<b>10</b>
I.2.1. Demografía	0
I.2.2. Hallazgos clínicos	10
<b>I.3. Región de Cieneguillas</b>	<b>1</b>
I.3.1. Demografía	1
I.3.2. Hallazgos clínicos	2
<b>II. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO</b>	<b>10</b>
II.1. Sistema ABO	3

<b>II.2. HLA-DR<math>\beta</math>1</b>	<b>10</b>
	<b>5</b>
<b>III. ROL DE METALOPROTEINASAS EN QUERATOPATÍA CLIMÁTICA</b>	<b>10</b>
	<b>8</b>
<b>III.1. Demografía</b>	<b>10</b>
	<b>8</b>
<b>III.2. Hallazgos clínicos</b>	<b>10</b>
	<b>8</b>
<b>III.3. Concentración de proteínas en lágrima</b>	<b>11</b>
	<b>0</b>
<b>III.4. Detección de gelatinasas y su grado de activación en lágrima</b>	<b>11</b>
	<b>0</b>
<b>III.5. Niveles y formas moleculares de colagenasas y grado de activación en lágrima de pacientes con queratopatía climática</b>	<b>11</b>
	<b>2</b>
<b>III.6. TIMPs en lágrima de pacientes con queratopatía climática e individuos sanos</b>	<b>11</b>
	<b>3</b>
<b>III.7. Relación MMP/TIMP</b>	<b>11</b>
	<b>4</b>
<b>IV. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y QUERATOPATÍA CLIMÁTICA</b>	<b>12</b>
	<b>0</b>
<b>IV.1. Niveles de densidad de la capa de ozono</b>	<b>12</b>
	<b>0</b>
<b>IV.2. Niveles de radiación ultravioleta</b>	<b>12</b>
	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO 4: Discusión</b>	<b>13</b>
	<b>0</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>14</b>
	<b>6</b>
<b>Anexos</b>	<b>15</b>
	<b>1</b>

<b>Anexo 1: 1. Extracción de ADN: método del “salting out”</b>	<b>15</b>
	<b>2</b>
2. Tipificación HLA-DR $\beta$ 1	<b>15</b>
	<b>3</b>
<b>Anexo 2: 1. Método para la determinación de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en muestras de lágrima</b>	<b>15</b>
	<b>6</b>
2. Método para la determinación de colagenasas (MMP-8 y MMP-13 y TIMP-1 y TIMP-2 en lágrima	<b>15</b>
	<b>6</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>15</b>
	<b>8</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## FIGURAS

- Figura 1:** *Esquema de la composición del espectro electromagnético, en donde se muestran de izquierda a derecha las ondas de menor a mayor longitud de onda, expresadas en la figura en micras (1 micra= 1000 nanómetros).* 47
- Figura 2:** *Vista del Poblado de Aguada Guzmán, Pcia. de Río Negro.* 63
- Figuras 3 A y B:** *Mapa político de la región norte de la Patagonia Argentina.* 64
- Figura 4:** *Meseta sobre la cual está emplazada la región correspondiente a Aguada Guzmán, Pcia. de Río Negro.* 64
- Figura 5:** *Vista típica de zonas aledañas a Aguada Guzmán, en la que se pueden observar las características del suelo arenoso/arcilloso cubierto escasamente por vegetación arbustiva achaparrada.* 65
- Figura 6:** *Casa de adobe habitada por pobladores de la región de Aguada Guzmán, Pcia. de Río Negro.* 66
- Figura 7:** *Examen biomicroscópico y fotografía con lámpara de hendidura.* 70
- Figura 8:** *Relación entre grupo etario y pacientes sin y con queratopatía climática.* 84
- Figura 9:** *Distribución por género en el total de pacientes examinados, y en los pacientes sin y con queratopatía climática.* 85
- Figura 10:** *Distribución por género según grupo etario en pacientes con queratopatía climática.* 86
- Figura 11 A:** *Ojo con grado 1, con discreto velamiento periférico en los meridianos horizontales.* 87
- Figura 11 B:** *Mismo ojo, en el que se observa a mayor aumento y retroiluminación con la lámpara de hendidura, microgotitas que producen el aspecto de empañamiento de la córnea afectada, y la franja prelimbar de córnea aparentemente indemne.* 87
- Figura 12:** *Ojo con queratopatía climática grado 2, en el que se observa un velamiento difuso de la mitad inferior de la córnea.* 88



- Figura 13:** *Ojo izquierdo con queratopatía climática grado 3, en el que se observan múltiples vesículas amarillentas subepiteliales agrupadas en el cuadrante temporal inferior de la córnea, y distribuidas en un área extensa de velamiento que compromete la mitad inferior de la córnea.* **89**
- Figura 14:** *Ojo izquierdo con queratopatía climática grado 3, en el que se observan múltiples vesículas amarillentas confluentes, distribuidas sobre un área de opacidad estromal con vasos sanguíneos provenientes del limbo esclero-corneal entre hora 4 y 5.* **90**
- Figura 15:** *Ojo izquierdo con grado 2, con pequeño espacio claro redondo paracentral nasal, a través del cual puede observarse con más nitidez el iris.* **91**
- Figura 16:** *Fotografía de conjuntiva bulbar nasal, en donde se observan pequeñas gotitas amarillas en un paciente sin queratopatía climática.* **92**
- Figura 17:** *Atrofia discreta del iris en un caso con queratopatía climática grado 3.* **57**
- Figura 18:** *Atrofia moderada del iris en un caso con queratopatía climática grado 2.* **93**
- Figura 19:** *Atrofia marcada del estroma anterior del iris inferior en un caso con queratopatía climática grado 3.* **94**
- Figura 20:** *Zimografía representativa de muestras de lágrima de pacientes con QPC y controles.* **110**
- Figura 21:** *Análisis densitométrico relativo de MMPs en lágrima.* **111**
- Figura 22:** *Western blots representativos de lágrimas de pacientes con queratopatía climática (QPC) y controles para MMP-8 (A), MMP-13 (B), TIMP-1 (C) and TIMP-2 (D). Líneas 1 a 3 lágrimas de QPC y líneas 4 a 6 lágrimas de controles.* **116**
- Figura 23:** *Niveles anuales medios de la densidad de la capa de ozono de los ocho años estudiados en las regiones de Aguada Guzmán (Pcia. de Río Negro), Cienequillas (Pcia. de Jujuy), y Sumampa (Pcia. de Santiago del Estero).* **121**
- Figura 24:** *Niveles medios de la densidad de la capa de ozono de los años estudiados (1998 a 2005), en las regiones correspondientes a* **121**

- Aguada Guzmán, Pcia. de Río Negro, Cieneguillas, Pcia. de Jujuy, y Sumampa, Pcia. de Santiago del Estero.*
- Figura 25:** Niveles anuales medios de la irradiación UV-B en los años estudiados (1998 al 2005), en las regiones correspondientes a Aguada Guzmán (Pcia. de Río Negro), Cieneguillas (Pcia. de Jujuy) y Sumampa (Pcia. de Santiago del Estero). **123**
- Figura 26:** Niveles medios de 8 años (1998 a 2005) de la irradiación UV-B en las regiones de Aguada Guzmán (Pcia. de Río Negro), Sumampa (Pcia. de Santiago del Estero) y Cieneguillas (Pcia. de Jujuy). **123**
- Figura 27.** Utilización de sombrero alado en adultos mayores de Cieneguillas (Pcia. de Jujuy). **124**
- Figura 28:** Gráfico en donde se compara la concentración sérica de ácido ascórbico en individuos urbanos de la ciudad de Córdoba (Urbanos) e individuos rurales de la región del Departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro (Rurales) **125**
- Figura 29:** Gráfico en donde se compara la concentración sérica de colesterol total en individuos urbanos de la ciudad de Córdoba (Urbanos) e individuos rurales de la región del Departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro (Rurales). **126**
- Figura 30:** Gráfico en donde se compara la concentración sérica de triglicéridos en individuos urbanos de la ciudad de Córdoba (Urbanos) e individuos rurales de la región del Departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro (Rurales). **127**
- Figura 31:** Gráfico en donde se compara la concentración sérica de ácido úrico en individuos urbanos de la ciudad de Córdoba (Urbanos) e individuos rurales de la región del Departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro (Rurales). **128**
- Figura 32:** Gráfico en donde se compara la concentración sérica de proteínas totales en individuos urbanos de la ciudad de Córdoba (Urbanos) e individuos rurales de la región del Departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro (Rurales). **129**
- Figura 33** Fotografía del ojo izquierdo de un paciente con queratopatía climática en su ojo derecho, en la que se observa la córnea **131**

*completamente opacificada, con umbilicación retráctil y vascularizada en región paracentral temporal, en el que se observan pequeñas gotitas por retroiluminación con lámpara de hendidura.*

**Figura 34:** *Visualización con luz ultravioleta de una placa de gel luego de la corrida electroforética.* **155**

## TABLAS

**Tabla 1:** *Albedo ultravioleta de diversas superficies sobre las que incide la radiación UV en la superficie terrestre.* **51**

**Tabla 2:** *Clasificación de la dureza del agua para consumo humano.* **67**

**Tabla 3:** *Diferentes variantes alélicas del HLA- DR  $\beta$ 1.* **77**

**Tabla 4:** *Prevalencia de queratopatía climática (QPC) por año de campaña.* **84**

**Tabla 5:** *Prevalencia de queratopatía climática según grupo etario.* **85**

**Tabla 6:** *Grados de enfermedad corneal según grupo etario.* **90**

**Tabla 7:** *Relación entre grado evolutivo de la queratopatía climática y sensibilidad corneal.* **96**

**Tabla 8:** *Resultados de las pruebas de ojo externo en ojos de pacientes con queratopatía climática y ojos de individuos controles.* **97**

**Tabla 9:** *Combinaciones obtenidas en base a los análisis realizados a diferentes muestras de agua de consumo de Aguada Guzmán y zonas aledañas, y a agua potable de red de la ciudad de Córdoba.* **98**

**Tabla 10:** *Distribución según grupo etario de los pacientes examinados en Sumampa, Pcia. de Santiago del Estero.* **100**

**Tabla 11:** *Distribución según grupo etario de los pacientes examinados en Cieneguillas, Pcia. de Jujuy.* **101**

**Tabla 12:** *Distribución de grupos sanguíneos O, A, B y AB en pacientes con QPC y controles de la región de El Cuy de la Patagonia Argentina.* **103**

**Tabla 13:** *Distribución de los grupos sanguíneos agrupados como O y No O en pacientes con QPC y controles de la región de El Cuy de la Patagonia Argentina.* **104**

**Tabla 14:** *Distribución de grupos sanguíneos O, A, B y AB en individuos de la región de Cieneguillas, Puna Jujéna.* **104**

<b>Tabla 15:</b> <i>Distribución de los grupos sanguíneos agrupados como O y No O en individuos de la región de Cieneguillas, Puna Jujeña.</i>	<b>105</b>
<b>Tabla 16:</b> <i>Alelos HLA-DRβ1 en pacientes con queratopatía climática (QPC) e individuos controles de la región de El Cuy de la Patagonia Argentina.</i>	<b>105</b>
<b>Tabla 17:</b> <i>Distribución de alelos HLA-DRβ1 en pacientes con queratopatía climática (QPC) e individuos controles de la región de El Cuy de la Patagonia Argentina.</i>	<b>106</b>
<b>Tabla 18:</b> <i>Alelos HLA-DRβ1 en individuos de la región de Cieneguillas, Puna Jujeña.</i>	<b>107</b>
<b>Tabla 19:</b> <i>Distribución de alelos HLA-DRβ1 estudiados en individuos controles de la región de Cieneguillas, Puna Jujeña y en individuos controles de la región patagónica de El Cuy.</i>	<b>107</b>
<b>Tabla 20:</b> <i>Distribución de los diferentes grados de compromiso corneal en relación a la edad en pacientes con queratopatía climática.</i>	<b>10</b>
<b>Tabla 21:</b> <i>Actividades de gelatinasas medida en pacientes con QPC e individuos controles.</i>	<b>9</b>
<b>Tabla 22:</b> <i>Niveles de colagenasa en lágrima medidos por ECL® Western blot.</i>	<b>11</b>
<b>Tabla 23:</b> <i>Niveles de inhibidor de metaloproteinasas de matriz (TIMP) medidos por ECL® Western blot en pacientes con QPC y controles.</i>	<b>1</b>
<b>Tabla 24:</b> <i>Relaciones entre las diferentes MMPs / TIMPs totales (TIMP total= TIMP-1 libre + complejo TIMP-1 + TIMP-2 libre + complejo TIMP-2)</i>	<b>113</b>
<b>Tabla 25:</b> <i>Relaciones entre Gelatinasas y Colagenasas / TIMP libre (TIMP libre= TIMP-1 + TIMP-2).</i>	<b>117</b>
<b>Tabla 26:</b> <i>Densidades medias anuales y desviación estándar (DE) de la capa de ozono correspondientes a las regiones de Aguada Guzmán (Pcia. de Río Negro), Sumampa (Pcia. de Santiago del Estero) y Cieneguillas (Pcia. de Jujuy).</i>	<b>118</b>
<b>Tabla 27:</b> <i>Niveles medios (expresados en KiloJoules/m<sup>2</sup>) y desviación estándar (DE) de la irradiación UV-B en las regiones de Aguada Guzmán, Sumampa y Cieneguillas, entre los años 1998 y 2005.</i>	<b>119</b>
	<b>120</b>
	<b>122</b>

## ABREVIATURAS

- AA:** ácido ascórbico
- ADA:** ácido L-dehidroascórbico
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- bFGF:** del inglés basic Fibroblast Growth Factor (factor básico de crecimiento del fibroblasto)
- BMC:** biomicroscopía
- CEL:** N-(carboxietil)-L-lisina
- cm:** centímetro/s
- CMH:** complejo mayor de histocompatibilidad
- CML:** N-(carboximetil)-L-lisina
- Col.:** colaboradores
- DE:** desviación estándar
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- EGF:** del inglés Epidermal Growth Factor (factor de crecimiento epidérmico)
- ERO:** especies reactivas del oxígeno
- GCAA:** glaucoma crónico de ángulo abierto
- g/dl:** gramos por decilitro
- GLO:** L-gulono  $\gamma$  lactona oxidasa
- GLUT1:** del inglés Glucose Transporter 1 (transportador de glucosa 1)
- HGF:** del inglés Hepatocyte Growth Factor (factor de crecimiento del hepatocito)
- HLA:** del inglés Human Leucocyte Antigen (antígeno leucocitario humano)
- IL-1:** interleukina uno
- IL-6:** interleukina seis
- IL-10:** interleukina diez
- kDa:** kiloDalton/s
- KGF:** del inglés Keratocyte Growth Factor (factor de crecimiento del queratocito)
- kJ/m<sup>2</sup>:** kiloJoules por metro cuadrado

- km/h:** kilómetros por hora
- MEC:** matriz extracelular
- mm:** milímetro/s
- mmHg:** milímetros de mercurio
- MMP:** metaloproteinasa de matriz
- MT:** membrane type (tipo membrana)
- nm:** nanómetro/s
- OBI:** oftalmoscopia binocular indirecta
- OD:** odds ratio
- PAGE:** del inglés Polyacrylamide Gel Electroforesis (electroforesis en gel de poliacrilamida)
- Pcia.:** provincia
- PCR:** del inglés Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
- PFGA:** productos finales de glicosidación avanzada
- PI:** del inglés Phosphatidil-inositol (fosfatidilinositol)
- PKC:** del inglés Protein-kinase (proteinoquinasa)
- PLC:** del inglés Phosphorilase C (fosforilasa C)
- QPC:** queratopatía climática
- RePIS:** Registro Provincial de Investigación en Salud
- rpm:** revoluciones por minuto
- SDS:** Lauril Sulfato de Sodio o dodecil sulfato de sodio.
- SVTC:** del inglés Sodium-dependant vitamin C transporter (transportador sodio-dependiente de vitamina C)
- TE:** Tris EDTA
- TFG- $\beta$ :** del inglés Transforming Growth Factor  $\beta$  (factor de crecimiento transformador  $\beta$ )
- TIMP:** del inglés Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase (inhibidor tisular de metaloproteinasa de matriz)
- TNF- $\alpha$ :** del inglés Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ )
- TOC:** tensión ocular
- tPA:** del inglés tissue-type Plasminogen Activator (activador de tipo tisular del plasminógeno)
- TRP:** tiempo de ruptura de la película lagrimal precorneal

**µg:** microgramo/s

**µl:** microlitro/s

**uD:** unidad/es Dobson

**u/µl:** unidades por microlitro

**UV:** ultravioleta/s

# RESUMEN

## Introducción

La QPC es una afección degenerativa de la córnea, caracterizada por la aparición de un velamiento progresivo de sus capas más anteriores, pudiendo llegar a la opacidad subtotal de la misma. En los estadios iniciales comienza con la aparición de múltiples finísimos depósitos translúcidos en las regiones yuxtalímbicas horizontales (*grado 1*), extendiéndose progresivamente en forma de banda hacia el centro de la córnea (*grado 2*), apareciendo en etapas avanzadas gotas o vesículas más grandes y amarillentas, que protruyen bajo el epitelio corneal (*grado 3*).

La QPC es una enfermedad que afecta a individuos de cuarenta o más años, predominantemente varones, que se dedican a tareas rurales o trabajos a la intemperie, y provoca una lenta pero severa disminución de la visión del ojo afectado.

De etiología incierta, ha sido descripta previamente en diversas regiones del mundo caracterizadas por condiciones geográfico-climáticas rigurosas como aridez, sequedad ambiental, vientos intensos, alta irradiación ultravioleta (UV), tanto en climas cálidos como fríos.

## Materiales y métodos

Se examinaron 758 individuos de la región noroeste de la Patagonia Argentina, departamento El Cuy, provincia de Río Negro, caracterizada por ser una planicie árida y semidesértica, con un clima seco y ventoso, y un suelo arenoso con escasa vegetación achaparrada. Se examinaron también 154 pacientes de la región de Sumampa, Pcia. de Santiago del Estero, y 152 pacientes en la región de Cieneguillas, en la Puna Jujeña, ambas regiones de condiciones geográfico-ambientales parecidas a las de la primera. A todos los pacientes se les realizó un examen oftalmológico completo. En un grupo de pacientes que presentaban QPC, y en un grupo comparable de pacientes sin la enfermedad (controles), se estudió la sensibilidad corneal, el test de Schirmer II, el tiempo de ruptura de la película lagrimal precorneal (TRP) y la tinción de la superficie ocular con verde de lisamina. En un grupo de pacientes y controles se evaluó el



polimorfismo genético (grupo eritrocitario ABO y alelos HLA-DR $\beta$ 1), las metaloproteinasas (MMP) en lágrima, y el ácido ascórbico (AA), el colesterol, los triglicéridos, el ácido úrico y las proteínas totales en suero. En las 3 regiones estudiadas se evaluó la densidad de la capa de ozono y la radiación UV. Los valores del ozono se obtuvieron mediante el programa TOMS-NASA, obtenido del sitio web de la NASA, y la irradiación UV mediante el programa DayLight versión 2.3.10.

Para los cálculos estadísticos, los resultados fueron evaluados mediante el test de Fisher, el  $\chi^2$ -test, el test de Mann-Whitney, el test de Student y el test de ANOVA. La significación estadística fue establecida en  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

En la región patagónica se encontró que el 10,82 % de la población examinada presentaba diferentes grados de QPC. El 28,78 % de los ojos de los pacientes con QPC presentaban atrofia del estroma anterior e inferior del iris, mientras que no se observó en individuo alguno sin QPC. La estesiometría corneal mostró que a mayor grado de QPC, mayor disminución de la sensibilidad corneal. Los estudios de ojo externo en casos y controles no mostraron diferencias significativas entre ellos. Las asociaciones más significativas con QPC fueron la pinguécua y la catarata.

La QPC no fue observada en individuo alguno de los examinados en Sumampa y Cieneguillas. No obstante, el estudio del ozono y la radiación UV no mostró diferencias significativas entre las 3 regiones estudiadas.

Los estudios de polimorfismo genético demostraron que la QPC no está restringida a individuos grupo O. El estudio de los genes HLA-DR $\beta$ 1 puso en evidencia una mayor frecuencia del alelo DR $\beta$ 1\*14 en los pacientes con QPC con respecto a los controles, pudiendo ello significar mayor riesgo para padecer la enfermedad. Por otra parte, en individuos que no presentaban la enfermedad, tanto en Cieneguillas como en la región de Aguada Guzmán, encontramos con alta frecuencia el alelo HLA-DR $\beta$ 1\*04, lo que podría sugerir un cierto rol protector de dicho alelo en el desarrollo de esta enfermedad.

Tanto el colesterol sérico, como los triglicéridos y el ácido úrico se observaron más elevados en individuos rurales (con y sin QPC) que en los

urbanos, mientras que los niveles séricos del AA fueron inferiores en los individuos rurales.

### **Conclusiones**

La QPC es una enfermedad de la córnea bien definida, y su diagnóstico es sencillo, aún en sus estadios iniciales, siempre y cuando se realice un cuidadoso examen biomicroscópico con lámpara de hendidura. La alta prevalencia de la QPC observada en esta región pobre y marginal de la Argentina genera un problema de salud pública serio y de difícil solución, habida cuenta de la falta de verdaderos programas de salud que contemplen a esas regiones olvidadas.

A pesar de que una alta proporción de los individuos examinados en la patagonia poseen ascendencia Mapuche, los resultados obtenidos en el estudio antigénico ABO demostró que la QPC no está restringida al grupo sanguíneo prevalente en indoamericanos. El estudio de los genes HLA-DR $\beta$ 1 mostró que podría haber genes facilitadores y protectores para QPC.

Los microtraumas crónicos de la superficie ocular que sufren los pobladores de la región de Aguada Guzmán por los vientos intensos vehiculizando partículas puede aumentar la expresión de moléculas que intervienen en el remodelamiento de la matriz extracelular de la córnea, como las metaloproteinasas, algunas de ellas como las gelatinasas (especialmente la proMMP-9) actuando en la progresión de la enfermedad y otras, como la MMP-8, ejerciendo un rol protector para la córnea contra dichas injurias.

El estudio de la irradiación UV en esas tres áreas no mostró diferencias entre ellas, sugiriendo que la radiación UV no es el factor principal en la ocurrencia de la QPC.

Los bajos niveles de AA hallados en los individuos patagónicos aportan un nuevo elemento a tener en cuenta cuando se habla de la génesis de esta enfermedad multifactorial, teniendo en cuenta el rol protector de la córnea del AA contra injurias como la irradiación UV.

# ABSTRACT

## Introduction

Climatic droplet keratopathy (CDK) is an acquired, degenerative disease of the cornea, characterized by the progressive opalescence of its most anterior layers. In the initial stages of the disease the appearance of multiple tiny and translucent droplet-like subepithelial deposits, is observed at the vicinity of the nasal and temporal corneo-scleral limbus (*grade 1*). This opalescence extends slowly throughout the interpalpebral area towards the center of the cornea in a band-shaped fashion (*grade 2*). At this stage yellow vesicles or drops may appear protruding under the corneal epithelium (*grade 3*).

CDK predominantly affects males over 40 years old that perform rural and outdoor labors, causing a progressive and severe decrease of visual acuity of the affected eye.

Of unknown etiology, CDK has been observed in some regions of the world characterized by cold or hot arid climates, intense winds, lack of umber, low humidity and high ultraviolet exposure.

## Materials and methods

758 individuals living in villages and settlements in El Cuy department, province of Río Negro, in the northwest Argentine Patagonia, were examined. This arid semideserted barren plain is characterized by its dry and windy climate and its sandy soil scarcely covered by small bushes. 154 individuals living in the region of Sumampa, province of Santiago del Estero, as well as 152 individuals living in the region of Cieneguillas, Puna region of the province of Jujuy, were also examined. These 2 regions share similar geographic and environmental conditions with the former region. All individuals received a comprehensive ophthalmological examination. In a group of patients presenting CDK and in a comparable control group without CDK corneal sensitivity was evaluated, as well as the Schirmer II test, the break-up time test (BUT) and the ocular surface staining with lisamine green. In a group of patients and controls genetic polymorphism (ABO erythrocytic group and HLA-DRB1 alleles),

metaloproteinases (MMPs) in tear, and seric ascorbic acid, cholesterol, triglycerides, uric acid and total proteins were evaluated. The ozone layer and ultraviolet (UV) irradiation were evaluated in those 3 geographic regions. Ozone values were determined by means of the TOMS-NASA program, obtained from the NASA's web site, and UV irradiation by means of the DayLight program, version 2.3.10.

For statistical analysis, results were analyzed with the Fisher test, the  $\chi^2$ -test, the de Mann-Whitney test, the Student test and the ANOVA test. Statistical significance was established with a  $p < 0,05$ .

## **Results**

Different degrees of CDK were found to affect 10.82 % of the individuals examined in the patagonia region. Atrophy of the anterior inferior iris stroma was found in 28.78 % of eyes from patients with CDK, and in none of the individuals without CDK.

Corneal esthesiometry showed severe decrease of corneal sensitivity in advanced stages of CDK. External eye tests showed no differences between CDK patients and controls. Pinguecula and cataract were the most frequent associations observed in eyes with CDK.

CDK was observed in none of the individuals examined in Sumampa and Cieneguillas. However, ozone and UV radiation studies did not show significant differences between the 3 evaluated regions.

Genetic polymorphism studies demonstrated that CDK is not restricted to group O. The study of HLA-DR $\beta$ 1 aleles evidenced a higher frequency of the DR $\beta$ 1\*14 alele in CDK patients than in controls. This could represent a higher risk to suffer the disease. In contrast, in individuals that not presented CDK in Cieneguillas as well as in Aguada Guzmán a higher frequency of the HLA-DR $\beta$ 1\*04 alele, suggesting a possible protecting role of this alele.

Serum levels of cholesterol, triglycerides and uric acid were found more elevated in rural (with and without CDK) than in urban individuals. In contrast, serum levels of ascorbic acid were lower in the former than in the latter group.

## **Conclusions**

CDK is a well defined corneal disease and its diagnosis is easy even in its initial stages provided a careful biomicroscopic examination is performed.

The high prevalence of CDK observed in this poor and marginal region of Argentina generates a very serious and difficult to solve public health problem, considering the lack of health programs considering those forgotten regions.

Although a high proportion of individuals examined in the patagonia descend from the Mapuche tribes, ABO antigenic studies demonstrated that CDK is not restricted to group O that is prevalent among indoamericans. HLA-DR $\beta$ 1 gene studies showed possible facilitating and protecting roles.

Chronic microtraumas of the ocular surface that suffer individuals from Aguada Guzmán as a consequence of intense winds carrying particles may enhance the expression of molecules participating in corneal extracellular matrix remodeling such as matrix metalloproteinases. Some of them like gelatinases (especially proMMP-9) participate in the progression of the disease, and others like MMP-8 may exert a protective role.

The study of UV radiation in the 3 geographical areas did not show differences between them, suggesting that UV radiation is not the principal factor in the occurrence of CDK.

As ascorbic acid (AA) is recognized as a protector of the cornea from UV radiation, low seric levels of AA found in individuals living in that area of the Argentine Patagonia give new elements to take into account when thinking about the genesis of CDK.

# *CAPÍTULO 1*

*Introducción*

*y*

*Objetivos*

## I. LA CÓRNEA NORMAL

### I.1. Estructura

#### I.1.1. Generalidades

La córnea, del latín cornēa, duro como el cuerno, es un tejido avascular y transparente, formado por 3 capas de tejidos diferentes: una externa o epitelio, una media o estroma y una posterior o endotelio. Cada uno de estos estratos está separado uno de otro por una lámina basal especializada. El epitelio corneal asienta sobre la lámina basal epitelial, y el endotelio sobre la membrana de Descemet. (Sole y col., 1992)

El limbo esclero-corneal es una zona translúcida de transición entre la córnea y la esclera, limitado centralmente por el margen distal de la membrana de Bowman, y periféricamente por el borde escleral. Mide aproximadamente 1 mm de ancho, siendo más ancho en el cuadrante superior y más angosto en el nasal y temporal. (Sole y col., 1992)

El diámetro medio de la córnea es de 11,5 mm, al que se llega a la edad de 6 años. El espesor promedio, incluyendo todas sus capas, es de 550 micras, aumentando desde el centro hacia el limbo esclero-corneal. Su superficie mide 1,3 cm<sup>2</sup> (7 % de la superficie del globo ocular), y su radio de curvatura externo es mayor (7,7 mm vertical y 7,8 mm horizontal) que el interno (6,6 mm vertical y 6,2 horizontal) lo que la convierte en el elemento refractivo más importante del sistema dióptrico ocular, con un poder de 43 dioptrías. (Sole y col., 1992)

#### I.1.2. El epitelio corneal

El epitelio corneal es la capa más superficial. Su función principal es la de constituir una barrera contra la invasión intraocular de microorganismos y otros patógenos, y contra la hidratación del estroma subyacente. Mide aproximadamente 50 micras de espesor, y está constituida por un epitelio plano estratificado no queratinizado y no secretor, de 5 a 7 capas de células. Morfológicamente se divide, a

su vez, en 3 capas: una superficial de células de descamación, una intermedia de células poliédricas, y una profunda de células basales, únicas con capacidad mitótica. Esta diferenciación podría tratarse de diversos grados de maduración celular. Las células basales se originan en células madre de la capa basal del epitelio periférico, a nivel del limbo corneal, células que no expresan la queratina de 64 kDa que expresan las células epiteliales. (Sole y col., 1992) El tiempo de recambio celular, desde célula basal a célula de descamación, es de 7 días. (Hanna y col., 1961) Su organización muy regular, a diferencia de otros epitelios, contribuye con las propiedades ópticas de la córnea.

### I.1.3. La lámina basal del epitelio y la capa de Bowman

Las células basales del epitelio yacen sobre una membrana o lámina basal de unos 60 nm de espesor. Dicha lámina basal es sintetizada fundamentalmente por las células epiteliales. (Alberts y col., 2002) Está constituida por colágeno tipo IV, laminina, perlecán, fibronectina y fibrina. La *laminina*, glicoproteína de dominios múltiples y formada por una triple cadena polipeptídica muy larga ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), se localiza en la lámina lúcida de la membrana basal, y favorece la adhesión, migración, desarrollo y diferenciación celular epitelial. (Gipson y col., 1989) La *fibronectina* es también una glicoproteína grande de dominios múltiples, constituida por dos subunidades grandes (dímero), unida por puentes disulfuro en uno de los extremos, (Alberts y col., 2002-a) y está en relación con el estroma subyacente, (Tervo y col., 1986) dispuestas en fibrillas en estrecha relación con el citoesqueleto de los fibroblastos, facilitando la adhesión celular a la matriz extracelular. (Alberts y col., 2002-a)

Inmediatamente debajo de la lámina basal del epitelio se observa un área acelular del estroma de unas 8 a 14 micras de espesor, llamada capa de Bowman, la que está presente en humanos, primates y pájaros. No obstante, numerosos mamíferos como las ratas y los ratones no presentan una capa de Bowman individualizable, pero sus células epiteliales se adhieren a una membrana basal subyacente que contiene *laminina* y colágeno, con características morfológicas comunes a todas las membranas basales. (Stepp, 2006) En microscopía electrónica se



observa que la capa de Bowman está constituida por fibrillas colágenas de colágeno tipo I orientadas de manera aleatoria.

#### I.1.4. El estroma

Las características ópticas y estructurales de la córnea están determinadas principalmente por la estructura y composición del estroma corneal, el que representa el 90 % del espesor total de la córnea. El estroma está formado por fibroblastos especializados llamados *queratocitos*, que representan entre el tres y el cinco por ciento del volumen estromal, y componentes de la matriz extracelular. Los *queratocitos*, de escasa cantidad de organelas y núcleo voluminoso, son células de baja actividad metabólica. En los procesos de cicatrización corneal migran y se acumulan en los bordes de la lesión, transformándose en fibroblastos que desarrollan expansiones hacia el área lesionada.

El estroma está constituido principalmente por *fibrillas* de colágeno tipo I, y también por colágeno tipo V y VI. (Newsome y col., 1982) Se disponen formando láminas paralelas a la superficie corneal, organizadas de manera aleatoria. Al interior de cada lámina, las fibrillas colágenas se orientan en forma paralela entre ellas, y perpendicularmente a las fibrillas de las láminas adyacentes. Esta disposición es más regular en los dos tercios posteriores del estroma. Las láminas colágenas se disponen de limbo a limbo. Al llegar a éste, la mayoría de las fibras se incurban adquiriendo una disposición paralela al limbo, formando una banda de unos 2mm por delante del mismo. En las regiones anteriores de la córnea las láminas están dispuestas en forma oblicua unas de otras, y en las regiones posteriores, de manera ortogonal. (Meek y col., 1987)

La *matriz extracelular* del estroma, secretada por los *queratocitos*, está constituida principalmente por *proteoglicanos* que contribuyen a que las fibras colágenas mantengan una distancia constante entre ellas. De acuerdo con las cadenas laterales de carbohidratos, se los denomina *condroitín sulfato/dermatán sulfato* (CS/DS) y *queratán sulfato* (KS). Más recientemente, según sus proteínas centrales se los denomina *decorina* (correspondiendo a CS/DS), abundante en la parte anterior de la córnea, tres variedades de KS: *lumicano* (esencial en la transparencia de la

córnea) (Funderburgh y col., 1993), *queratocano* (proteína de localización exclusiva corneal) (Corpuz y col., 1996) y *mimecano*. Este último es producto del mismo gen que codifica la osteoglicina del hueso. (Funderburgh y col, 1997) Los *queratocitos* se activan cuando se produce una lesión en el estroma.

De la integridad del estroma dependerá la transparencia de la córnea y la resistencia a la presión intraocular.

### **I.1.5. El endotelio o capa de células posteriores**

El endotelio corneal es llamado así por constituir la capa más interna de la córnea que está en contacto con el humor acuoso de la cámara anterior. Estas células posteriores de la córnea, formadas a partir de la cresta neural, no son en realidad verdaderas células endoteliales, pero el uso ha hecho que esa denominación permanezca.

El endotelio está formado por una capa unicelular de unas 350.000 a 500.000 células hexagonales planas, de tamaño y forma regulares y sin capacidad mitótica. Al momento del nacimiento, la población de células endoteliales es de 3.000 a 4.000 células/mm<sup>2</sup>, reduciéndose a un promedio de 2.500 células/mm<sup>2</sup> a la edad media de la vida y a 2.000 células/mm<sup>2</sup> en el adulto mayor. Cuando por razones patológicas la población celular cae por debajo de 800 células/mm<sup>2</sup>, el estroma comienza a hidratarse anormalmente, constituyéndose un edema crónico de la córnea y pérdida definitiva de transparencia de la misma. Entre célula y célula se observan uniones tipo puente (gap junctions). A nivel apical, de cara a la cámara anterior, las células endoteliales poseen uniones entre sí tipo *zonula occludens* (tight junctions). La integridad de las células endoteliales y sus uniones de hermeticidad son fundamentales para el mantenimiento de la transparencia de la córnea. Por otra parte, mediante potentes bombas de Na/K ATPasa dependiente y HCO<sub>3</sub> ATPasa dependiente, las células endoteliales transportan en forma activa el agua del estroma hacia la cámara anterior, controlando así la hidratación y nutrición corneal. Los procesos de reparación endotelial incluyen aplanamiento y agrandamiento de las células endoteliales, a fin de mantener intacta la monocapa, y la producción de

colágeno anormal posterior a la membrana de Descemet. (Waring y col., 1982; Edelhauser, 2006)

#### **I.1.6. La membrana de Descemet**

El endotelio se dispone sobre su membrana basal, llamada membrana de Descemet, de unas 10 a 15 micras de espesor en el ojo adulto. Está constituida por colágeno tipo IV (principalmente), V y VII, laminina y fibronectina. Es muy resistente a la acción de las enzimas proteolíticas. (Sole y col., 1992)

#### **I.1.7. Otras células presentes en la córnea**

Además de los 3 estratos celulares descritos previamente, existen en la córnea otros 2 grupos de células: células dendríticas o *células de Langerhans*, con capacidad presentadora de antígeno y agrupadas en el epitelio en proximidades de los vasos limbares, y células neurogliales o *células de Schwann*, encontradas alrededor de los filetes nerviosos. Las *células de Langerhans*, normalmente presentes en forma escasa, aumenta considerablemente en condiciones patológicas tales como en el rechazo de un injerto corneal. (Sole y col., 1992)

En el estroma corneal, se encuentran *histiocitos*, dispuestos en forma plana entre las laminillas colágenas, representando a las principales células fagocíticas del estroma. A diferencia de los *queratocitos*, los *histiocitos* poseen lisosomas.<sup>1</sup>

#### **I.1.8. Adhesión celular: las integrinas**

Las *integrinas* son una familia de glicoproteínas de membrana que se expresan en la mayoría de las células del organismo, y cuya función es la de proporcionar la fijación celular a varias glicoproteínas como la fibronectina, la vitronectina y varias lamininas y colágenos. (Stepp, 2006) Expresadas en la córnea por las células epiteliales, los queratocitos, los fibroblastos y las células endoteliales, las *integrinas* son los principales receptores celulares que sirven a la adhesión de la célula a la matriz extracelular, como también a la adhesión célula con célula. Las *integrinas* parecieran detectar cambios que se producen en el medio extracelular, transmitiendo la información al núcleo de la célula mediante alteraciones de la organización del citoesqueleto, cumpliendo así funciones en las vías de señalización

intracelular y de comunicación del citoesqueleto con la matriz extracelular. (Stepp, 2006) Las células pueden regular su actividad de adhesión de sus *integrinas* desde su interior. Interactuando con otros receptores de señalización, las *integrinas* cooperan con el crecimiento celular, supervivencia celular y proliferación celular. (Alberts y col., 2002-b)

Diferentes familias de *integrinas* han sido descritas en la córnea: las *integrinas*  $\beta 1$  CD29, las *integrinas*  $\beta 2$  CD18, las *integrinas*  $\beta 4$  CD104 y las *integrinas*  $\alpha V$  CD51. A su vez, cada una de esas familias de *integrinas* está constituida por diversas subunidades, distribuidas cada una de ellas en forma específica en diferentes ubicaciones en la córnea. Salvo la familia  $\beta 2$  que se asocia a células vinculadas al sistema inmune, el resto de las *integrinas* se las encuentra en los queratocitos (in situ), en los fibroblastos y miofibroblastos (in vitro), en el epitelio corneal (incluyendo a las células basales del limbo), asociadas a nervios, y en el endotelio (sólo las  $\alpha V$ ). (Stepp, 2006)

Estudios en córneas de adultos mayores se comprobó que la presencia de la *integrina*  $\alpha 6\beta 4$  en la lámina basal del epitelio corneal era discontinua, sugiriendo ello una explicación a la disminución de la sensibilidad corneal, a la disminución de la resistencia a infecciones y al aumento de la permeabilidad del epitelio corneal a la fluoresceína, en la córnea de los ancianos. (Faragher, 1997) La alteración en la expresión de *integrinas* ha sido observada en diversas enfermedades corneales, aunque aún no se sabe si aquello puede ser la causa de determinadas enfermedades o una consecuencia de las mismas. (Stepp, 2006)

Para sintetizar, a nivel de la córnea las *integrinas* cumplen funciones de adhesión celular, remodelación de la matriz extracelular, supervivencia celular y como marcadores de células madre. (Stepp, 2006)

## **I.2. Inervación**

La córnea es una estructura ricamente inervada, y posee tanto inervación sensitiva como simpática.

La *inervación sensitiva* está provista por la rama oftálmica del nervio trigémino, ingresando al ojo por la región escleral posterior por vía de los nervios ciliares largos posteriores, y también por vía de los nervios ciliares cortos luego de haber pasado por el ganglio ciliar. Dirigiéndose por la esclera y la supracoroides hacia delante, comienzan a emitir ramificaciones a unos 8 mm del limbo, para formar un plexo circunferencial próximo al limbo esclero-corneal. Desde allí penetran en forma radiada al estroma medio, conservando su vaina de mielina hasta 2 a 3 mm del limbo, adelgazándose a medida que se aproximan al área central de la córnea. La ramificación de los nervios se produce dicotómicamente entre las fibras colágenas del estroma medio, no observándose nervios en la membrana de Descemet o el endotelio. Desde el estroma medio, las fibras nerviosas emiten ramificaciones anteriores, creando un rico plexo subepitelial, y desde allí atraviesan la capa de Bowman y la membrana basal del epitelio para terminar en el seno mismo de la capa epitelial. (Rozsa y Beuerman, 1982) Otras pequeñas ramas, pero en menor cantidad que las anteriormente citadas, penetran en la córnea más superficialmente e inmediatamente bajo el epitelio para hacerse intraepiteliales a nivel de la capa basal epitelial. (Sole y col., 1992)

Los receptores sensitivos corneales difieren de los corpúsculos sensitivos de la piel, ya que la córnea presenta terminaciones nerviosas libres, densamente organizadas. Un área de 0,01 mm<sup>2</sup> de epitelio corneal puede llegar a contener alrededor de 100 terminaciones nerviosas. Ello le confiere al epitelio corneal ser una de las estructuras más ricamente inervadas del organismo, siendo su sensibilidad 400 a 600 veces mayor que la de la piel, y cerca de 30 veces mayor a la densidad nerviosa de una pulpa dentaria. (Rozsa y Beuerman, 1982)

Las terminaciones nerviosas vehiculizan la sensibilidad al dolor y al contacto. Esta última es la que se estudia mediante la estesiometría. En cambio, la córnea no posee sensibilidad térmica. La sensibilidad al frío la proporcionan los receptores paráliticos de Krause. (Sole y col., 1992)

El área central, sobre un diámetro de 5 mm, es el área de mayor sensibilidad, decreciendo progresivamente hacia el limbo. Probablemente debido a la presión continua ejercida sobre el limbo superior por el párpado superior, aquella área es la de menor sensibilidad. (Sole y col., 1992) El meridiano horizontal posee más terminaciones que el meridiano vertical, y a su turno, el meridiano temporal en relación al nasal. (Sole y col., 1992)

La sensibilidad corneal disminuye con la edad. Además, la sensibilidad varía en forma nictemeral, siendo mayor en un 30 por ciento en la mañana en relación a la noche. (Sole y col., 1992)

Los axones nerviosos liberan factores neurotróficos en el estroma corneal que pueden afectar los queratocitos y las células epiteliales suprayacentes. (Stepp, 2006)

La sensibilidad corneal da origen al *reflejo córneo-palpebral*, que se traduce principalmente en blefaroespasma, y hasta lagrimeo, hiperhemia conjuntival y miosis, luego de excitación corneal. La vía aferente de este arco reflejo está representada por la rama oftálmica del trigémino, y la vía eferente por el facial. También la sensibilidad corneal puede dar origen a *reflejos a distancia* como el reflejo de deglución luego de la instilación de un colirio, reflejo mandibular o pterigoideo, reflejo respiratorio que puede provocar una apnea, y reflejo óculo-cardíaco. (Sole y col., 1992)

La pérdida de la sensibilidad de la córnea produce trastornos tróficos severos en la misma, que se traducen por adelgazamiento epitelial, cicatrización retardada y ulceración secundaria al bloqueo mitótico. Esta situación se ve agravada como consecuencia de la disminución o pérdida del reflejo córneo-palpebral, perturbando severamente la lubricación adecuada de las superficies corneal y conjuntival.

La *inervación simpática* es menos conocida, como también su rol. A nivel celular epitelial se han encontrado tasas elevadas de acetilcolina, colino-acetilasa y de colinesterasa. La superficie ocular posee receptores  $\beta$ -adrenérgicos, los que, por intermedio de la adenilciclase, inducen la formación de AMP-cíclico que interviene

en respuestas de la célula. Además, el sistema  $\beta$ -adrenérgico intervendría en el transporte transepitelial. (Sole y col., 1992)

### **I.3. Reparación tisular**

Cuando se produce una abrasión o ulceración del epitelio corneal, se produce una inhibición de las mitosis de las células basales del epitelio (que se restablecerá una vez cerrada la pérdida epitelial) y una migración y aumento de la actividad de las células epiteliales. Ello se traduce mediante el aumento de la síntesis proteica de las células epiteliales migratrices, en especial la *vinculina*, proteína de 100 kDa que participa en uniones celulares focales. (Ziche y col., 1989) A estas uniones focales contribuyen, además, la *integrina  $\beta 1$*  y la *paxilina*, proteína intracelular. Estas proteínas también tienen funciones de activación de señales intracelulares que controlan la liberación de calcio y la mitosis. Otra proteína de unión focal célula-célula y célula-sustrato que ve aumentada su expresión es la CD44, glucoproteína de la superficie celular. (Yu y col., 1998) La energía necesaria para la actividad celular reparadora la proporciona el glucógeno, observándose un aumento de la proteína GLUT1, proteína transportadora de la glucosa. (Takahashi y col., 1996)

La migración celular observada durante los procesos de reparación responden a un control autócrino y parácrino. La síntesis de los factores de crecimiento aumenta, como también la expresión de sus receptores. Uno de esos factores, el EGF o factor de crecimiento epidérmico, está presente en lágrimas y es expresado por las células epiteliales, promoviendo su migración y proliferación. (Tripathi y col., 1990) Como respuesta a la injuria epitelial, a nivel estromal se expresan también otros factores de crecimiento, como el KGF o factor de crecimiento del queratocito, y el HGF o factor de crecimiento del hepatocito, ambos sintetizados por los queratocitos estromales, como también aumento de la expresión de sus respectivos receptores en las células epiteliales. (Wilson y col., 1999) Otros factores de crecimiento descritos como involucrados en el proceso reparador son el bFGF o factor básico de crecimiento de fibroblastos y el TGF- $\beta$  o factor de crecimiento transformador de fibroblastos, cuya expresión se ve aumentada en las células epiteliales. (Wilson y col., 1992)

La activación de los receptores de los factores de crecimiento produce la activación de proteínas de señal intracelulares, entre las que se destacan la cascada de quinasa de la MAP o proteína activada por mitógeno, la fosforilasa C (PLC) y la fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa. La activación de estas proteínas por parte del EGF activa factores de transcripción génica, los que activan numerosos genes implicados en la síntesis proteica y en la diferenciación y proliferación celular. (Okada y col., 1996) A su vez, la activación de la PLC y la PI induce la activación de la PKC o proteinoquinasa, lo que tiene como resultado la liberación de calcio intracelular, esencial para la migración celular. (Sotozono y col., 1995) El epitelio corneal expresa receptores de acetilcolina, pudiendo ésta activar también las vías de la PLC, la PI y la PKC. (Sotozono y col., 1995)

Luego de producida una injuria en la córnea se expresan también numerosas citoquinas inflamatorias, entre ellas la IL-1, IL-6 e IL-10, y el TNF- $\alpha$ . La IL-6 promueve la expresión de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , cuya presencia en las placas de adhesión le otorga un rol importante en la migración celular. La integrina  $\alpha 5\beta 1$  es también sinérgica con el EGF, estimulando también la expresión de KGF y HGF. (Sotozono y col., 1995)

La matriz extracelular (MEC), en especial la lámina basal del epitelio, está involucrada en el proceso de reparación luego de una injuria epitelial (ver Capítulo 2). Moléculas como la *laminina* y la *fibronectina* influyen sobre las vías de señal intracelulares a través de la *paxilina* y la *quinasa de adhesión focal*. A su vez, el *lumicano* pareciera influir también en el proceso reparador a través de los receptores de integrinas. (Savage y Cohen, 1973)

Luego del cierre de la abrasión epitelial, en caso de que la capa basal no haya sido dañada, al poco tiempo se restituye el epitelio normal, y la adhesión de las células migratrices epiteliales se establece mediante hemidesmosomas con las células basales. En cambio, si la lámina basal fue también dañada en la injuria, el epitelio que cubrió la herida debe reformar la lámina basal en ese sitio, viéndose sumamente retardada la aparición de los complejos de unión. (Gipson y col., 1988)



## II. LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

### II.1. La matriz extracelular

Los tejidos biológicos constituyen ambientes dinámicos en los que las células que forman parte de los mismos interactúan unas con otras y con la matriz extracelular (MEC) circundante. (Sivak y Fini, 2002)

Hasta no hace mucho tiempo, la MEC era considerada como un simple andamiaje necesario para dar estabilidad física a los tejidos y sus células constitutivas. En la actualidad se sabe que la MEC posee una función mucho más activa y compleja en la regulación del comportamiento de las células que están en contacto con ella, brindándoles el micro ambiente necesario para su desarrollo y morfogénesis. La mayoría de las células necesita de la MEC para crecer, proliferar, migrar y sobrevivir. A ello se le llama *anclaje de dependencia*, y está mediado por integrinas y señales intracelulares que generan. A su vez la MEC puede influenciar en la forma y función de la célula, y en la organización del citoesqueleto celular. (Alberts y col., 2002)

La MEC está compuesta por una variedad de macromoléculas secretadas localmente y ensambladas en una malla organizada, en estrecha relación con las células que las producen. Dichas células constituyentes de un determinado tejido contribuyen, a su vez, a la organización de la MEC. La diversidad y tipo de constitución de la MEC responderá a los requerimientos funcionales del tejido. Principalmente dos clases de macromoléculas conforman la MEC: 1) *glicosaminoglicanos*, principalmente asociados covalentemente a proteínas en la forma de proteoglicanos; 2) *proteínas fibrosas*, en las que se destacan el *colágeno*, la *fibronectina*, la *elastina* y la *laminina*, y cuya función es a la vez estructural y adhesiva. En el tejido conectivo, los proteoglicanos forman una estructura de base altamente hidratada, en la cual se hallan entremezcladas las proteínas fibrosas. (Alberts y col., 2002)

Las macromoléculas de la MEC sufren una programada y constante regulación y recambio, lo que es fundamental para el cumplimiento de diversos

procesos biológicos, como, por ejemplo, cuando un glóbulo blanco debe atravesar la membrana basal del endotelio vascular para migrar hacia un determinado tejido en respuesta a un daño. En condiciones fisiológicas, la MEC sufre una renovación constante, en donde las macromoléculas son degradadas y resintetizadas. (Alberts y col., 2002)

La degradación de las macromoléculas de la MEC es llevada a cabo por *enzimas proteolíticas*, llamadas proteasas, que son secretadas localmente por células. La mayoría de estas enzimas proteolíticas pertenecen a dos grandes grupos: 1) las *metaloproteinasas* (MMP), cuya actividad dependerá de la unión con  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ ; 2) las *proteasas séricas*. Ambas proteasas colaboran en la degradación del colágeno, la laminina y la fibronectina, algunas adquiriendo alta especificidad como la metaloproteinasa *colagenasa*, clivando ciertas proteínas en sitios proteicos pequeños y específicos. Numerosas proteasas son secretadas como precursores inactivos, tal el caso del plasminógeno, el que es clivado localmente por otra proteasa, la tPA (tissue-type plasminogen activator) que lo transforma en plasmina. La acción de las proteasas es confinada a áreas específicas gracias a la secreción local de inhibidores específicos de las proteasas, tales como el *inhibidor tisular de las metaloproteinasas* y las *serpinas*. Estos inhibidores son específicos para las proteasas, y se unen selectiva y firmemente a las proteasas activadas, bloqueando así su actividad. (Alberts y col., 2002)

## II.2. Las metaloproteinasas

Las MMP (acrónimo de Matrix Metalloproteinasas), llamadas también *matrixinas*, constituyen una familia de enzimas Calcio y Zinc dependientes, que participan en el remodelamiento fisiológico de los tejidos. (Visse y Nagase, 2003) Además, la modificación proteolítica de los diferentes sustratos de la MEC (citoquinas, moléculas de adhesión celular y componentes activos de la MEC) puede ejercer una importante influencia en la señalización celular, regulando así la actividad celular y la interacción de las células con su MEC. (Sivak y Fini, 2002) Las MMP son secretadas localmente, a diferencia de muchos otros sistemas enzimáticos que deben ser producidos y transportados a los tejidos por células inflamatorias. (Sivak y Fini, 2002)

Las MMP son secretadas como pro-enzimas que son activadas principalmente a nivel extracelular por clivaje proteolítico, aunque también existen formas ligadas a la membrana celular. En condiciones fisiológicas, las MMP son sintetizadas sólo en caso de necesidad, y su actividad es regulada en forma precisa a nivel de transcripción, activación del precursor, interacción con componentes específicos de la MEC, e inhibición por la acción de inhibidores endógenos. (Visse y Nagase, 2003) Una amplia variedad de citoquinas y factores de crecimiento pueden tanto inducir como inhibir la expresión de las MMP, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), la interleukina-1 (IL-1), el factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) y otros. La expresión de MMP es también inducida en respuesta a cambios en la forma de las células y en sus asociaciones con la MEC. (Sivak y Fini, 2002)

En condiciones patológicas pueden contribuir en la degradación y desintegración de la MEC. La pérdida de su acción controlada puede tener como resultado enfermedades tales como artritis, arteriosclerosis, cáncer, aneurismas, nefritis, úlceras y fibrosis. (Visse y Nagase, 2003)

### II.3. Clasificación de las MMP

Hasta el presente han sido identificadas 24 MMP en vertebrados, de las cuales 23 se encuentran en el ser humano. Desde el punto de vista estructural, las MMP están formadas por un prodominio, un dominio catalítico, una región de articulación o bisagra, y un dominio hemopexina. En base a la especificidad de sustrato, similitud en la secuencia y la organización de los dominios, las MMP se dividen en seis grupos: 1. colagenasas; 2. gelatinasas; 3. stromelisin; 4. matrilisinas; 5 MMP de tipo membrana; 6. misceláneas. (Visse y Nagase, 2003)

- **Colagenasas:** este grupo está constituido por la MMP-1, la MMP-8, la MMP-13 y la MMP-18. Su acción consiste en el clivaje del colágeno intersticial fibrilar tipo I, tipo II, tipo III y tipo VII, a nivel de un sitio específico próximo a la porción amino terminal. Además, pueden digerir otras moléculas pertenecientes o no

a la MEC. El mecanismo por el cual las colagenasas clivan el colágeno de triple hélice aún no se ha dilucidado.

- **Gelatinasas:** lo constituyen la MMP-2 o gelatinasa A y la MMP-9 o gelatinasa B. Degradan el colágeno desnaturalizado (tipo IV, V, VII, X), fibronectina, laminina, elastina. A la MMP-2 se la considera importante en la osteogénesis.

- **Stromelisin:** lo constituyen la MMP-3 o stromelisin 1, la MMP-10 o stromelisin 2 y la MMP-11 o stromelisin 3 (de secuencia y especificidad de sustrato diferente a la MMP-3). La MMP-3 y la MMP-10 tienen la misma especificidad de sustrato, pero la MMP-3 mayor eficacia proteolítica que la MMP-10. Además de digerir componentes de la MEC, tanto colágenos como proteoglicanos, la MMP-3 y la MMP-10 activan algunas proMMP, paso fundamental para la activación completa de una determinada MMP, tal el caso de la MMP-1, MMP-8, y MMP-9.

- **Matrilisinas:** integran este grupo la MMP-7 o matrilisina 1, y la MMP-26 o matrilisina 2, llamada también endometasa. Ambas participan en el procesamiento de componentes de la MEC. Además, la MMP-7 procesa moléculas de la superficie celular, tales como pro- $\alpha$ -defensina, Fas-ligando, pro-TNF- $\alpha$ , y E-cadherina.

- **MMP de tipo membrana:** descubiertas más recientemente, a este grupo lo constituyen seis enzimas MT (transmembrana)-MMP: cuatro son proteínas de transmembrana tipo I (MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-24), y dos son proteínas de anclaje glicosidil-fosfatidil-inositol o GPI (MMP-17 y MMP-25). Todas ellas tienen capacidad para digerir moléculas de la MEC. A excepción de la MMP-24 (o MT4-MMP), todas tienen la capacidad de activar la proMMP-2. La MMP-14 (o MT1-MMP) posee actividad colagenolítica sobre el colágeno tipo I, II y III. Esta última MMP también juega un rol importante en la angiogénesis.<sup>4</sup> La MMP-17 (o MT5-MMP) se expresa principalmente a nivel del cerebelo, y la MMP-25 (o MT6-MMP) se expresa casi exclusivamente en los leucocitos de sangre periférica, y en el astrocitoma anaplásico y glioblastomas.

- **Misceláneas:** este grupo está constituido por siete enzimas: la metaloelastasa o MMP-12, expresada principalmente en macrófagos y esencial para

su migración, digiere elastina y otras proteínas; la MMP-19, expresada en pacientes con artritis reumatoidea; la enamelisina o MMP-20, digiere la amelogenina y se la encuentra principalmente en el esmalte dentario recién formado; la MMP-22, cuya función no se conoce; la MMP-23, expresada principalmente en tejidos de reproducción, y se la considera una proteína de membrana tipo II; y la epilisina o MMP-28, expresada fundamentalmente en los queratinocitos, y se piensa que podría tener un rol en la homeostasis tisular y en la cicatrización de heridas.

Esta clasificación, basada en los sustratos y funciones de las diferentes MMP, es potencialmente inexacta debido a que los conocimientos acerca de los objetivos-blancos para cada enzima continúan expandiéndose.

#### **II.4. Activación de las MMP**

Las MMP pueden ser activadas por proteasas, o *in vitro* por agentes químicos como agentes tilo-modificantes, glutatión oxidado, SDS, agentes caotrópicos y moléculas reactivas de oxígeno, al igual que el pH ácido y el tratamiento con calor. Todos ellos actúan generando una alteración a nivel de la interacción cisteína-zinc, a nivel del conector (switch) cisteína. La fase final de la activación es conducida por una MMP. La mayoría de las proMMP son secretadas intracelularmente, y se activan a nivel extracelular. (Pepper, 2001)

#### **II.5. Inhibidores endógenos de las MMP**

Los inhibidores tisulares de las MMP (TIMP, acrónimo de Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases) son inhibidores específicos que se unen selectivamente a las MMP. En los vertebrados se han identificado cuatro TIMP: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Su expresión es regulada durante el desarrollo y remodelamiento tisular. En condiciones patológicas están vinculadas con el desbalance de la actividad de las MMP. (Pepper, 2001)

Además, los TIMP poseen otras propiedades específicas, como por ejemplo el TIMP-2 que contribuye en la activación de la gelatinasa A (MMP-2), mediando en su unión con un complejo MT1-MMP en la superficie celular. Existe, además, evidencia creciente de que los TIMP poseen actividades biológicas independientes de su actividad inhibitoria de MMP, influenciando el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. (Sivak y Fini, 2002)

Ciertas proteínas plasmáticas como la  $\alpha$ -macroglobulina actúan también como inhibidores de endopeptidasas, inhibiendo la mayoría de las proteasas. Una glicoproteína GPI, llamada RECK, inhibe la actividad proteolítica de la MMP-2, la MMP-9 y la MMP-14 (o MT1-MMP), suprimiendo, entre otras cosas los brotes de neovascularización. (Pepper, 2001)

## II.6. Metaloproteinasas en enfermedades de la córnea y la superficie ocular

Las MMP han sido implicadas en la patogenia de diversas enfermedades de la superficie ocular y alteraciones de la película lagrimal, tales como la ulceración corneal no infecciosa, (Kervick y col., 1992) erosiones epiteliales recurrentes, (Dursun y col., 2001) ojo seco asociado a artritis reumatoidea, (Smith y col., 2001) pterigion, (Solomon y col., 2000) laxitud conjuntival, (Meller y col., 2000) y cicatrización post queratectomía fotorrefractiva (Holopainen y col., 2003).

Un buen ejemplo de la acción deletérea de las MMP a nivel corneal lo constituye la queratitis periférica ulcerante, caracterizada por el adelgazamiento periférico progresivo de la córnea que puede llevar a la perforación espontánea de la misma. El estadio terminal hacia la perforación es responsabilidad de la *colagenasa intersticial* MMP-1, expresada anormalmente en la córnea de pacientes portadores de queratitis periférica ulcerante. Esta MMP, junto a la colagenasa producida por los neutrófilos llamada MMP-8, son las únicas enzimas en mamíferos capaces de iniciar la hidrólisis de colágeno tipo I, componente fundamental del estroma corneal. (Smith y col., 2001)

A su turno, las *gelatinasas* MMP-2 y MMP-9 son enzimas que hidrolizan el colágeno tipo IV, constituyente preponderante de las membranas basales. Estas dos

enzimas han sido responsabilizadas de la fase inicial de la queratitis ulcerante periférica. (Smith y col., 1999)

En general, la expresión de MMP durante el proceso reparador de la córnea despliega una respuesta precoz y otra a largo plazo, la primera mediante la actividad de la gelatinasa B (MMP-9) en la reparación epitelial y la membrana basal, y la segunda mediante la secreción de gelatinasa A (MMP-2), stromelisina y colagenasa por los fibroblastos estromales para el remodelamiento del área de la herida, aumentado su expresión en forma gradual luego de meses de remodelamiento estromal. (Sivak y Fini, 2002) Se ha observado que la sobre-expresión de gelatinasa B conduce a una alteración en la reepitelización, y que la inhibición de dicha MMP produce a una mejoría en la integridad de la membrana basal. (Sivak y Fini, 2002)

Matsubara y col. (Matsubara y col., 1991) demostraron actividad de gelatinasas en el epitelio corneal y estroma subyacente a nivel del borde de una úlcera. Luego del cierre del defecto epitelial, observaron un cese de la actividad de las gelatinasas. A su turno, Azar y col. (Azar y col., 1996) detectaron MMP-2 y MMP-9 en el epitelio corneal migratriz en ablaciones corneales en ratas mediante Excimer laser, pero no en los controles no tratados. En esa línea, se ha observado que niveles proteicos de MMP-2 y MMP-9 se hallaban aumentados en lágrimas humanas luego de queratectomía fotorrefractiva (Vesaluoma MH y col. 2000, datos no publicados). Ello permite inferir que cambios en los niveles de MMP en lágrimas ocurren luego de cambios a nivel tisular y viceversa. Citoquinas inflamatorias, incluyendo IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  pueden aumentar la actividad de transcripción, la actividad proteica y la enzimática de la MMP-9 en células epiteliales corneales humanas. (Li y col., 2001) En concordancia con estas observaciones, la MMP-9 ha sido implicada en la patogenia de enfermedades inflamatorias de la córnea y el ojo seco (Afonso y col., 2001; Pflugfelder y col., 2005) y en la úlcera corneal estéril (Kervick y col., 1992).

Debido a que las fibrillas estromales corneales están compuestas por complejos heterodiméricos de colágeno tipo I y tipo IV, se piensa que las colagenasas intersticiales participarían en el remodelamiento estromal luego de una

herida corneal. Concordantemente, durante la fase inicial del proceso de reparación corneal la expresión de colagenasas se halla rápidamente aumentada. (Girard y col., 1993) No obstante, el rol de las colagenasas en enfermedades corneales, incluyendo la ulceración corneal y los estados inflamatorios, aún no ha sido establecido. Las colagenasas humanas MMP-1, MMP-8 y MMP-13, clavan los colágenos intersticiales tipo I, II y III. (Visse y Nagase, 2003) La colagenasa 2 (MMP-8) es una potencial iniciadora de colagenolisis intersticial en los sitios inflamatorios. (Birkedal-Hansen, 1993) También ha sido observado que las células epiteliales corneales secretan MMP-8 durante la queratolisis ulcerativa, en la que dicha enzima contribuiría en la degradación estromal y/o en el proceso de reparación. (O'Brian y col., 2001) Ha sido demostrado en el hombre que la MMP-8 se halla elevada en lágrima luego de queratectomía fotorrefractiva, sugiriendo que esta enzima puede jugar un rol importante en los procesos reparadores en heridas corneales. (Holopainen y col., 2003; Owen y col., 2004; Gueders y col., 2005) La colagenasa 3 (MMP-13) es una MMP colagenolítica que participa en la destrucción de tejido articular en la artritis humana. (Mitchell y col., 1996; Neuhold y col., 2001) El ARNm MMP-13 ha sido detectado en heridas del epitelio corneal, (Li y col., 2003) sugiriendo que esta proteasa podría estar involucrada en enfermedades del epitelio corneal.

Hasta el presente, no existe información disponible concerniente a las metaloproteinasas (tanto gelatinasas como colagenasas) en pacientes con enfermedades corneales degenerativas.



### III. LA QUERTOPATÍA CLIMÁTICA

#### III.1. Definición de la enfermedad y características clínicas

La queratopatía climática (QPC) es una afección degenerativa adquirida, bilateral aunque asimétrica de la córnea, caracterizada por el desarrollo de una turbidez o velamiento progresivo de sus capas más anteriores, pudiendo llegar a la opacidad subtotal de la misma. En los estadios iniciales se observa la aparición de múltiples finísimos depósitos translúcidos distribuidos en forma apretada bajo el epitelio corneal, como microgotas o microvesículas que le dan el aspecto de empañado, afectando las regiones yuxtalímbicas laterales (*grado 1*). Entre el limbo esclero-corneal y el área patológica contigua se observa una franja de córnea transparente, aparentemente indemne. En forma lenta y progresiva, dicho velamiento se extiende en forma de banda hacia el centro de la córnea, cubriendo los dos tercios inferiores y centrales de la córnea (*grado 2*). Es común observar pequeñas zonas redondas u ovales en el seno de un área patológica, como pequeñas ventanas de córnea transparente que dejan ver con nitidez la trama del estroma del iris a través de las mismas. A medida que la enfermedad avanza en extensión, aparecen vesículas más grandes, algunas de ellas translúcidas y otras amarillentas o ambarinas, distribuidas en forma confluyente, a veces agrupadas formando racimos, y que protruyen bajo el epitelio corneal (*grado 3*) (Freedman A., 1973; Gray y col., 1991).

#### III.2. Denominaciones

La QPC ha sido denominada de formas variadas: de acuerdo con el lugar geográfico en donde fueron observados los casos afectados, por epónimo, de acuerdo con el aspecto clínico, según la naturaleza de los depósitos corneales, según su etiología presunta, y según la ocupación de los individuos afectados (Gray y col., 1991). A continuación ellas se enumeran de acuerdo a la revisión sobre QPC llevada a cabo por Gray y col..

**III.2.1. Según lugar geográfico:** “Ciegos de la Isla Dahlac” (Zanetin, 1937, citado por Gray y col., 1991), “La Distrofia Corneal de los Trópicos” (Falcone C, 1954, citado por Gray y col., 1991), “Distrofia Tropical” (Falcone G, 1954, citado

por Gray y col., 1991), “La Distrofia Corneana nodular en Cinturón de los Países Tropicales de Suelo Árido” (Bietti, 1954, citado por Gray y col., 1991), “Queratopatía de Labrador” (Freedman A., 1965), “Queratopatía de Nama” (Freedman J., 1973), “La Queratitis del Labrador” (Tremblay, 1974), “Queratopatía Esquimal” (English, 1975, citado por Gray y col., 1991).

**III.2.2. Por epónimo:** “Distrofia Nodular de Bietti” (Etzine, 1964), “Distrofia Nodular Corneal de Bietti” (Freedman J., 1973).

**III.2.3. Según el aspecto clínico:** “Degeneratio Corneae Sphaerularis Elaioides” (Lugli, 1935),<sup>7</sup> “Degeneración Primaria en Gotas de Aceite Central y Superficial” (Alajmo, 1953, citado por Gray y col., 1991), “Distrofia Nodular en Forma de Banda” (Etzine, 1964), “Queratopatía Hialina Nodular en Forma de Banda” (Duke-Elder, 1965), “Degeneración Esferoidea” (Fraunfelder, 1972), “Distrofia Gelatinosa” (Freedman J, 1973), “Queratopatía en Gotitas” (Garner, 1976), “Degeneración de la Córnea en Gotitas” (Anderson, 1976).

**III.2.4. Según la naturaleza presunta de los depósitos corneales:** “Degeneración Coloide de la Córnea” (Baquis, 1898), “Degeneración Hialina de la Córnea” (Sachsalber, 1901, citado por Gray y col., 1991), “Tipo Especial de Degeneración Hialina” (Parsons, 1904, citado por Gray y col., 1991), “Degeneración Hialoidea Granuliforme de la Córnea” (Kozłowski, 1953, citado por Gray y col., 1991), “Degeneración Corneana Queratinoidea” (Garner, 1970), “Degeneración Corneal Proteinácea” (Christensen, 1973), “Degeneración Elastótica de la Córnea” (Brownstein, 1973), “Elastosis Corneana” (Rodríguez, 1975).

**III.2.5. Según su etiología presunta:** “Queratopatía actínica crónica” (Klintworth, 1972), “Degeneración Climatológica en Forma de Banda” (Forsius, 1972),<sup>19</sup> “Queratopatía Climática en Gotitas” (Freedman A., 1973).

**III.2.6. Según la actividad desarrollada por el individuo que la padece:** “Queratitis del Pescador” (Prasadrao, 1961, citado por Gray y col., 1991).

Es importante aclarar que muchas de estas denominaciones incluidas erróneamente aquí por Gray y col. en 1991, no hacen referencia a lo que hoy conocemos como queratopatía climática, sino que se refieren a la degeneración esferoidea secundaria (ver punto 4.1.1 más abajo), no específicamente relacionada a factores climáticos o ambientales. Tal es el caso de la Distrofia Gelatinosa (Freedman J., 1973), Degeneración Coloide de la Córnea (Baquis, 1898), Degeneración Hialina de la Córnea (Sachsaber, citado por Gray y col., 1991), Degeneración Corneana Queratinoidea (Garner, 1970), Degeneración Corneal Proteinácea (Christensen, 1973), Degeneración Elastótica de la Córnea (Brownstein, 1973), y la Elastosis Corneana (Rodríguez, 1975). El problema radica en la generalizada confusión de términos, ya que una cosa es hablar de degeneración esferoidea, haciendo sólo referencia al aspecto clínico del grado III (avanzado), y en donde toda patología corneal que presente dicha alteración visible clínicamente sea incluida en esa denominación, y otra cosa es pretender incluir dentro de la denominación Queratopatía Climática, patología corneal que presenta en sus estadios avanzados esferas o gotas subepiteliales y estromales, y cuya vinculación con factores climáticos y ambientales ha sido claramente establecida, enfermedades distróficas varias y la degeneración esferoidea secundaria, en donde los factores climáticos no tendrían responsabilidad, al menos fundamental, en su patogenia. Por ello, y en base a las evidencias histopatológicas actuales, coincidimos con Garner (Garner, 1970) en que las esferas o gotitas observadas clínicamente, y también histopatológicamente, son una expresión común de múltiples enfermedades corneales que pueden tener orígenes diferentes.

Algunas de las denominaciones no pudieron ser constatadas en sus artículos originales, al no haber podido acceder a sus textos. Tal es el caso de Tipo Especial de Degeneración Hialina (Parsons JH. *The Pathology of the Eye*, Vol 1. London: Hodder and Stoughton, 1904, p. 240), la Degeneración Hialoidea Granuliforme de la Córnea (Kozlowski B. Szczegolna postac swyrodnienia szklistego rogowski. *Acta Ophthalmol (Polonica)* 1953; 23: 249-253), Degeneración Primaria en Gotas de Aceite Central y Superficial (Alajmo A. Su di una forma non commune di degenerazione corneale. *Rass Ital Oftalmol* 1953; 22: 26). En relación al artículo de Kozlowski, la referencia hecha por Duke-Elder (Duke-Elder, 1965) acerca de dicho

artículo da a entender que aquel autor se refería a una patología corneal que podría corresponderse con la QPC.

La denominación adoptada por nosotros es la de queratopatía climática. Obviamos el agregado de “en gotitas” de la denominación de A. Freedman (Freedman A., 1973) que la denominó “climatic droplet keratopathy (queratopatía climática en gotitas) debido a que el hablar de queratopatía climática lleva implícito el hacer referencia a una enfermedad crónica de la córnea vinculada a la exposición crónica de factores climáticos particulares y cuya presentación clínica y evolución ya son bien conocidas. Por otra parte, si bien el término “en gotitas” habla del aspecto observado en la córnea de los pacientes afectados, podría no ser adecuado debido a que los estudios histopatológicos no han revelado la presencia de líquido sino de depósitos sólidos, por lo que, en todo caso, sería conveniente reemplazar “en gotitas” por “esferoidea”.

### III.3. Distribución geográfica

Esta enfermedad ha sido descripta como restringida a ciertas regiones del mundo tales como Somalia (Bartolucci, 1933; Falcone, 1954; Bietti, 1955, citados por Gray y col., 1991), Italia (Lugli, 1935), islas Dahlak del Mar Rojo (Zanettin, 1937, citado por Gray y col., 1991; Rodger, 1973), Eritrea (Bietti y col., 1955, citado por Gray y col., 1991; Rodger, 1973), el Golfo Pérsico (Bietti y col., 1955, citado por Gray y col., 1991), Túnez (Nataf y col., 1957, citado por Gray y col., 1991), Libia (Gandolfi, 1962, citado por Gray y col., 1991), Sudáfrica (Etzine y Kaufmann, 1964, en Transvaal; Freedman J., 1973, en región sudoeste), península del Labrador e isla de Terranova, Canadá (Freedman A., 1965; Young y col., 1975), Islandia (Forsius y col., 1970), norte de Rusia (Forsius, 1972), Estados Unidos (Fraunfelder y Hanna, 1972; Klintworth, 1972), Australia (McGuinness y col., 1972, citado por Gray y col., 1991; Taylor, 1980), Isla de Baffin (Freedman A., 1973-b), norte de Canadá (Forsius y Eriksson, 1973; Wyatt, 1973), Sudáfrica (Freedman J., 1973-a), Guinea (English, 1975, citado por Gray y col., 1991), región norte de Camerún (Anderson y Fuglsang, 1976), las islas Seychelles (Pillely, 1976, citado por Gray y col., 1991), Finlandia (Forsius, 1976), el Punjab, India (Singh y Singh, 1978), Groenlandia (Norn, 1978),

Chad (Resnicoff, 1988), región del lago Titicaca, Perú (Forsius y Losno, 1985), y Ruanda (Forsius y col., 1995).

Salvo en el Punjab, ciertas similitudes climáticas pueden observarse entre estas regiones, tales como la aridez del suelo, la sequedad ambiental, la alta exposición a la radiación ultravioleta (UV) del sol debido a la poca nubosidad y la falta de sombra por la escasez de vegetación arbórea, y vientos constantes vehiculizando partículas de polvo, arena o hielo.

La QPC afecta fundamentalmente a personas adultas mayores de 40 años. Se la considera una enfermedad del medio rural y de las ocupaciones a la intemperie. La etiología de la QPC, posiblemente multifactorial, es desconocida. Los factores ambientales son los que posiblemente jueguen el rol más importante, entre ellos los climas áridos y ventosos, tanto calurosos como fríos, y la exposición a radiaciones ultravioletas por falta de sombra.

La presentación clínica y la severidad de las lesiones observadas varían significativamente en función de la región en donde la enfermedad ha sido descrita. Así, las formas clínicas más grotescas y graves han sido descritas en regiones de climas tórridos como la cuenca del Mar Rojo (Rodger, 1973) y el Punjab en la India (Singh y Singh, 1978), y lesiones menos grotescas en regiones de climas fríos como el Labrador (Freedman J., 1973-a) y el Círculo Polar Ártico (Forsius, 1972). Ello ha llevado a que exista cierta diversidad de criterios en la descripción y estadificación de la enfermedad. Además, como la enfermedad se presenta en regiones marginales o alejadas, son escasos los trabajos que han descrito en forma detallada los aspectos clínicos, las asociaciones patológicas y la evaluación del ojo externo, como tampoco que hayan mostrado la progresión de la enfermedad y el seguimiento en un determinado grupo de pacientes.

#### **III.4. Diagnósticos diferenciales**

La QPC es una enfermedad de la córnea bien definida, y su diagnóstico es sencillo, aún en sus estadios iniciales, siempre y cuando se realice un cuidadoso examen biomicroscópico con lámpara de hendidura.

### III.4.1. Enfermedades degenerativas de la córnea

**III.4.1.1. Degeneración esferoidea secundaria.** La degeneración esferoidea secundaria de la córnea consiste en la aparición de vesículas amarillentas o ambarinas bajo el epitelio corneal y en el estroma anterior de la córnea, en forma esparcida y aislada o agrupadas, en ciertos ojos ciegos o severamente enfermos por trauma, uveitis, etc., en pacientes urbanos no expuestos a condiciones ambientales rigurosas como las observadas en las áreas en que habitan los pacientes portadores de QPC ni con carencias alimentarias. El ojo sano de estos pacientes no presenta alteración corneal alguna similar a la QPC. Su carácter unilateral, su ocurrencia sólo en ciertos ojos patológicos y la ocurrencia en individuos urbanos la diferencia de la QPC. Por ello, consideramos que el incluir la degeneración esferoidea de la córnea dentro de la clasificación de queratopatía climática como queratopatía climática secundaria, tal como la clasifican Gray y col. (Gray y col., 1991), es erróneo, y debe ser considerada una entidad aparte, aún cuando las vesículas amarillentas puedan estar constituidas por los mismos componentes moleculares.

**III.4.1.2. Edema epitelial de la córnea.** El edema puede estar asociado a diversas entidades clínicas. El edema epitelial puede ocurrir con un endotelio normal, como en el caso de la hipertensión ocular, o un defecto epitelial persistente. En estos casos, las finísimas bullas epiteliales de toda la córnea en el primer caso y más circunscriptas al área del defecto epitelial en el segundo caso, producen el aspecto de empañamiento. El estroma puede tener un espesor normal, y la cara posterior de la córnea no presentar pliegues. La causa más frecuente de edema corneal es el que se produce como consecuencia de una disfunción endotelial. Ésta puede ser primaria como la observada en las distrofias endoteliales (distrofia endotelial de Fuchs, distrofia endotelial hereditaria congénita y distrofia polimorfa posterior), o secundaria, como la observada en un trauma quirúrgico (cirugía de catarata o glaucoma) o postquirúrgico (contacto endotelial de vítreo, aceite de silicón o lente intraocular), en un trauma corneal, en el contacto endotelial de un cuerpo extraño intraocular, una inflamación o una hipertensión ocular persistente. Generalmente, en estos casos de disfunción endotelial, el edema epitelial es de gran magnitud, pudiéndose observar bullas epiteliales gigantes, el estroma aumenta de espesor,

aparecen pliegues en la membrana de Descemet y el endotelio se torna opalescente. (van Meter y col., 2000)

#### **III.4.1.3. Degeneración calcárea de la córnea o queratopatía en banda.**

Consiste en el depósito de sales de calcio sobre la membrana basal del epitelio corneal, la membrana de Bowman y el estroma anterior, ocupando el área interpalpebral. (Kenyon y col., 2000) Generalmente, dicho depósito comienza a producirse en los meridianos horizontales de la periferia corneal, progresando en forma lenta hacia el área central, cubriendo así los tercios medio e inferior de la córnea en forma de banda. (Kenyon y col., 2000) Se observa en uveitis asociadas a artritis infantiles, queratitis intersticial, en ojos afáquicos con aceite de silicón intraocular, edema corneal crónico, y en ojos severamente patológicos. También puede observarse en enfermedades sistémicas como el hiperparatiroidismo y la hiperfosfatemia de la insuficiencia renal. En los casos de enfermedades oculares, el depósito cálcico es extracelular, mientras que en la hipercalcemia sistémica el depósito es intracelular. A medida que se hace más denso el depósito calcáreo aumenta la densidad de la opacificación corneal, adquiriendo un color blanquecino opaco. Dichos depósitos pueden ser removidos con la aplicación tópica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la debridación del epitelio corneal (Wood y Walter, 1975). También han sido descritas formas hereditarias, idiopáticas, de queratopatía en banda, observadas tanto en niños como en adultos, sin una causa aparente o patología asociada. En la gota se pueden producir depósitos de urato en igual disposición y localización tisular que en la degeneración calcárea, pero el color de los depósitos es amarronado (Fishman y Sunderman, 1966).

#### **III.4.1.4. Degeneración nodular de Salzmann.**

Se caracteriza por la aparición progresiva de nódulos blanco-azulados superficiales, representando el acúmulo hialinizado de masas de fibrillas colágenas a nivel del epitelio y sobre la membrana de Bowman, dándole un aspecto marcadamente irregular a la superficie corneal. Dichos nódulos suelen confluir formando placas. Su origen es incierto, observándose en estadios avanzados de enfermedades corneales crónicas como la descompensación endo-epitelial, la degeneración calcárea, la queratitis flictenular, la

querato-conjuntivitis vernal y el tracoma. Puede ser uni o bilateral, dependiendo ello de la enfermedad de base. (Wood, 1990)

**III.4.1.5. Queratopatía estromal proteoglicana climática.** Descripta en 1995 por Waring III y col., (Waring y col., 1995) esta degeneración bilateral de la córnea consiste en la opacificación grisácea discreta a moderada del estroma anterior y medio del área central de la córnea, de varios milímetros de diámetro, de forma oval o redonda, más homogénea, amplia y densa en el estroma anterior y de aspecto lamelar y de menor diámetro por detrás, no impidiendo la observación biomicroscópica del iris y el cristalino subyacentes, y no alterando la regularidad de la superficie corneal. (Waring y col., 1995) El espesor corneal puede variar desde normal hasta visiblemente disminuido, y la córnea central puede observarse aplanada mediante video-queratografía. La enfermedad es observada en adultos mayores, y no posee un carácter familiar, ni está vinculada a enfermedades sistémicas. (Waring y col., 1995) El estudio histopatológico, mediante tinciones de hierro coloidal y azul alciano, revela exceso de depósito intra y extracelular de proteoglicanos. Si bien esta entidad es bien diferente a la QPC, la incluimos dentro de los diagnósticos diferenciales por dos motivos. El primero, porque es considerada también una enfermedad vinculada a factores climáticos, ya que fue descripta en el Medio Oriente y porque afecta la córnea en forma de banda en el área interpalpebral. (Waring y col., 1995) El segundo, porque algunos de los pacientes presentaban también QPC o degeneración calcárea en banda. (Waring y col., 1995)

**III.4.1.6. Cinturón o faja limbal.** Descripta por Vogt en 1921, es un hallazgo frecuente en ojos sanos de adultos e ambos sexos de más de 40 años, incrementando su incidencia y densidad con la edad. Se distinguen dos tipos. El *tipo I* consiste en una opacidad blanquecina, como tiza, dispuesta en forma de banda paralela al/o sobre el limbo en las regiones límbicas nasal y temporal, de aspecto granular y/o en empalizada, con agujeros claros de córnea aparentemente indemne, separada de la esclera por una franja o intervalo claro y sin prolongaciones en el área central. El *tipo II* es la forma más común, de aspecto similar al tipo I pero sin los agujeros; puede estar o no separada de la esclera por un intervalo claro y puede presentar prolongaciones en el borde central de la opacidad, sugiriendo que se trata



de las porciones terminales de las empalizadas y los capilares límbicos. Se la encuentra más frecuentemente sobre el limbo nasal, aunque sobre el limbo temporal es más notoria. Estas alteraciones son generalmente bilaterales y simétricas. Histopatológicamente consisten en degeneración hialina y elastótica focal. (Sugar y Kobernick, 1960)

#### **III.4.2. Distrofias de la córnea**

Las distrofias de la córnea son enfermedades hereditarias que pueden comprometer el epitelio, el estroma o el endotelio. Son bilaterales y notablemente simétricas, con alteraciones muy particulares y características que permiten individualizarlas con relativa facilidad. Su descripción está fuera de la óptica de este trabajo.

#### **III.5. Anatomía patológica**

Las primeras observaciones histopatológicas de especímenes de córnea que presentaban vesículas subepiteliales y estromales corresponden a Wedl en 1861 (citado por Garner, 1970), y poco después por Kamocki en 1892 (también citado por Garner, 1970), quien consideró los depósitos de naturaleza hialina según la definición de von Recklinghausen, que consideraba hialina a toda sustancia homogénea y refráctil, resistente a los ácidos y álcalis, e intensamente acidófila en la tinción. Baquis, en 1898, le atribuyó una naturaleza coloide a los glóbulos. (Garner, 1970)

**III.5.1. Microscopía óptica.** El examen histopatológico bajo microscopio óptico demuestra a menudo depósitos esféricos de diferentes tamaños bajo el epitelio corneal, en la membrana de Bowman y el estroma anterior. La coalescencia y aumento de volumen de estas esferas puede provocar disrupción de la membrana de Bowman y elevación y adelgazamiento del epitelio corneal. (Gray y col., 1991; Garner y col., 1973; Johnson y Overall, 1978; Tabbara, 1986) Generalmente, las gotitas no tiñen para grasa o calcio. (Gray y col., 1991; Garner y col., 1973; Johnson y Overall, 1978)

**III.5.2. Microscopía electrónica.** La microscopía electrónica ha mostrado que los glóbulos o gotitas son estructuras redondas, electrono-densas y muy bien

delimitadas, siempre rodeadas por material de la membrana basal y fibrillas colágenas adyacentes desorganizadas. (Gray y col., 1991; Johnson y Overall, 1978)

Si bien Best en 1900 (citado por Garner, 1970) mostró que los depósitos o gotitas corneales tenían semejanza con la tirosina, el origen y la naturaleza exacta de la composición de las gotitas corneales aún no han podido ser dilucidados. Algunos de sus componentes podrían ser proteínas, (Garner y col., 1973; Johnson y Overall, 1978; Tabbara, 1986) habiéndose encontrado en los glóbulos amino-ácidos tales como triptofano, tirosina, cisteína y cistina, elementos no presentes en la córnea en condiciones normales. (Johnson y Overall, 1978) En un estudio de los glóbulos o depósitos de nueve córneas de QPC extraídas en ocasión de queratoplastia parcial penetrante, se observó un alto contenido de proteínas que promediaban 72 µg/mg de tejido hidratado. El análisis de SDS-PAGE mostró que las proteínas de un peso molecular de 20 a 300 KDa formaban parte de las gotitas, y que la fracción mayor de ellas tenían 67 KDa. (Tabbara, 1986; Duhaiman y col., 1997)

Un estudio reciente realizado en especímenes quirúrgicos de córneas, algunas con QPC y otras con degeneración esferoidea secundaria (mal llamada “QPC secundaria” por los autores del trabajo) para la determinación de *productos finales de glicosidación avanzada* (PFGA), utilizó anticuerpos monoclonales contra N-(carboximetil)-L-lisina (CML), N-(carboxietil)-L-lisina (CEL), pirralina, pentosidina e imidazolona, mostrando inmunorreactividad para estas modificaciones proteicas, fuerte inmunorreactividad para CML, moderada para pirralina y pentosidina, y débil para imidazolona. (Kaki y col., 2007) En contraste, no se encontró inmunorreactividad para CEL en los especímenes de QPC. (Kaki y col., 2007) En especímenes de córnea con queratopatía en banda, queratopatía bullosa y córneas normales no se detectó inmunorreactividad para CML, CEL, pirralina, pentosidina o imidazolona. (Kaki y col., 2007) Por estos resultados, estos autores sugieren que la patogenia de la QPC está relacionada con la agregación y acumulación de PFGA. (Kaki y col., 2007) Los PFGA son los productos de la reacción final de azúcares y proteínas, y están estrechamente relacionados con la radiación UV y los procesos de envejecimiento. El proceso de formación de PFGA progresa muy lentamente debido a que en él no intervienen enzimas, detectándose así en sitios del organismo con

bajo grado de renovación tisular como el cristalino, la dura madre y las membranas basales. Los depósitos corneales de la QPC son extremadamente insolubles, siendo esto una característica de las proteínas modificadas por los PFGA.

### III.6. Etiología

La evidencia circunstancial de la mayoría de las poblaciones afectadas de QPC ha enfocado la atención en los efectos de la exposición crónica a la radiación UV como el factor de riesgo más importante. La sensibilidad de los tejidos biológicos a la radiación UV depende de diversos factores, entre ellos la longitud de onda, el tiempo de exposición, y las particularidades del tejido expuesto. Si bien el daño agudo que produce la radiación UV de menor longitud de onda en tejidos como la piel y la córnea ha sido bien demostrado, no es así el caso de la exposición crónica, por lo que resta aún mucho por investigar para poder dilucidar el verdadero rol que jugaría la radiación UV en esta patología. (Ver Capítulo 1, punto V)

### III.7. Tratamiento

Hasta el presente no se dispone de un tratamiento preventivo. Con la idea de la radiación UV como principal factor de riesgo, se ha recomendado la utilización de sombreros de ala grande. No obstante, la radiación UV que podría afectar estos pacientes no es solamente la proveniente en forma directa de la atmósfera, sino la reflejada por la atmósfera circundante, y desde el suelo por las características del mismo y la falta de vegetación arbórea (o edificios y casas como en una ciudad). (Ver Radiación UV y Queratopatía Climática) También se ha sugerido la utilización de anteojos-antiparras con filtros para rayos UV. Ello es difícil de llevar a cabo ya que genera incomodidad para la realización de tareas, además de la resistencia de los pacientes al uso de las mismas.

Durante mucho tiempo, el único tratamiento disponible para la recuperación completa de la transparencia de la córnea en los estadios más avanzados ha sido la queratoplastia parcial penetrante. Pero la complejidad del seguimiento de un paciente con trasplante de córnea, diario o semanal en los primeros meses de realizado, lo hace casi impracticable en las condiciones en que se encuentran miles de pacientes afectados en diferentes zonas marginales en el mundo. Además, de nada serviría un

tratamiento quirúrgico complejo si el paciente seguirá luego expuesto a los factores ambientales que presumiblemente provocaron la enfermedad, ya que la QPC puede recidivar a los pocos años en pacientes con QPC que recibieron un injerto laminar o penetrante. (Al-Rajhi y Cameron, 1996) En esos casos reportados por Al-Rajhi y Cameron, la QPC recidivó desde la periferia hacia el área central del injerto, luego de que los pacientes retornaran a sus lugares de origen a realizar la misma vida que antes de la operación. (Al-Rajhi y Cameron, 1996)

La ablación de las vesículas se puede realizar mediante escarificación. No obstante, muchas de ellas se hallan en la membrana de Bowman y el estroma anterior, por lo que su remoción necesita de una keratectomía laminar, lo que va a dejar como secuela una opacidad definitiva en el área tratada. En casos *grado 3* con vesículas grandes y procidentes, la debridación de las vesículas mediante escarificación puede mejorar las molestias y la irritación. Una alternativa menos traumática ha sido ofrecida a través de la queratectomía fotorrefractiva (QFR), reduciendo la opacificación en alrededor del 80 % de los casos con *grado 2* pero sólo en el 25 % de los casos con *grado 3* mejorando la visión en el 52% de todos los casos. (Badr y col., 1996) Desde esos primeros resultados, ha habido un interés creciente en el tratamiento con QFR mediante el Excimer laser de 193 nanómetros de enfermedades de la córnea anterior como cicatrices, distrofias y degeneraciones, desplazando a clásicas indicaciones de queratoplastia. (Ayres y Capuano, 2006) Además, los ojos con *grado 3* tenían más riesgo de presentar demoras en la reepitelización y de desarrollar complicaciones serias como queratitis bacteriana.

En un estudio que evaluó la queratectomía fotorrefractiva en diversas patologías de la superficie y el estroma anterior de la córnea, se observó que el 1,2 % de los ojos tratados desarrollaron una queratitis bacteriana. Todos ellos eran ojos portadores de QPC. (Al-Rajhi y col., 1996)

La involución de la QPC ha sido documentada sólo en un estudio que la observó en un número importante de pacientes (92 %) 8 semanas después de extracción extracapsular de catarata. (Dahan y col., 1986) En los pacientes que habían sido operados de sólo un ojo pero presentaban una QPC bilateral, la

involución ocurrió en ambos ojos. (Dahan y col., 1986) La explicación que los autores propusieron fue que estos pacientes operados, y atropinizados en el postoperatorio durante dos meses, presentaban fotofobia, evitando toda exposición a la luz del sol. (Dahan y col., 1986)

## IV. EL POLIMORFISMO GENÉTICO

### IV.1. Grupos sanguíneos eritrocitarios. El sistema ABO

Los diversos grupos o sistemas sanguíneos se definen por la presencia de determinados antígenos eritrocitarios, plaquetarios, leucocitarios y séricos. Dichos antígenos son el producto directo o indirecto de la actividad de los genes, y se transmiten hereditariamente. Por lo tanto, los grupos eritrocitarios se definen como el conjunto de antígenos alotípicos transmitidos genéticamente, y detectados en la superficie de la membrana eritrocitaria mediante anticuerpos específicos. Los genes determinantes de los grupos sanguíneos transmiten caracteres que se expresan tanto en individuos homocigotas como heterocigotos, es decir son caracteres codominantes. Además, existen genes llamados amorfos que intervienen en la herencia de los grupos sanguíneos pero que no generan productos antigénicos, como el gen 0 o el gen d. Los genes que codifican los antígenos de cualquier sistema de grupo sanguíneo suelen ocupar loci equivalentes en pares de cromosomas homólogos. Cuando la herencia de unos antígenos está relacionada con la de otros se dice que todos ellos constituyen un sistema de grupo sanguíneo. (Castillo y col., 2001)

Hasta el presente se han definido más de 400 antígenos eritrocitarios. La mayoría de los antígenos de los grupos sanguíneos se agrupan de acuerdo a criterios genéticos. De los 29 sistemas o grupos individualizados en la actualidad, los más frecuentes son el sistema ABO, el sistema Rhesus, el sistema Kell y el sistema Duffy.

El sistema ABO fue el primer sistema antigénico eritrocitario descrito, y continúa siendo el más importante en la práctica transfusional. Está definido por tres antígenos hallados en la superficie eritrocitaria y por los anticuerpos correspondientes en el suero: el A, el B y el H. De ello resultan cuatro grupos: el A, el B, el AB y el O (o cero). Sus antígenos están ampliamente distribuidos en el organismo, especialmente en las células epiteliales y endoteliales, y en algunas secreciones, por lo que se los considera antígenos histohemáticos, más que eritrocitarios, y por lo que tienen importancia en la histocompatibilidad. Tres genes,

el A, el B y el O, ubicados en el mismo locus del cromosoma 9, codifican para el sistema ABO. (Castillo y col., 2001)

El sistema Rhesus posee alrededor de 48 antígenos conocidos. No obstante, en la práctica sólo se utilizan cinco: el D, el C, el E, el c y el e. El sistema Kell está formado por cuatro antígenos, de los cuales el K es el más utilizado en transfusión sanguínea, que está codificado por el gen K, presente en el 9 % de la población de raza blanca y el 2 % de la raza negra. El sistema Duffy está definido por dos antígenos antitéticos:  $Fy^a$  y  $Fy^b$ , de lo que surgen tres fenotipos  $Fy$ :  $Fy^{a+b-}$ ,  $Fy^{a-b+}$ , y  $Fy^{a+b+}$ , y el fenotipo  $Fy^{a-b-}$  o fenotipo silencioso, raro en la raza blanca pero muy frecuente en la raza negra. (Castillo y col., 2001)

Las combinaciones posibles entre los diferentes antígenos sanguíneos son múltiples, lo que le otorga a un individuo caracteres peculiares, casi irrepetibles. (Castillo y col., 2001) A comienzos del siglo XX, Ludwig Hirszfeld observó que los grupos sanguíneos ABO ponían de manifiesto la existencia de diferencias raciales y que podían ser utilizados en el estudio de la evolución. (Allan, 1963)<sup>4</sup> El estudio de los grupos sanguíneos posee un gran interés etnológico, ya que contribuye a determinar el origen y la migración de las razas humanas. Existe una elevada frecuencia de individuos pertenecientes al grupo B entre los orientales, y una ausencia casi completa de A y B entre las tribus indias americanas, en comparación con las poblaciones caucásicas. (Olsson y col., 1998; Barjas-Castro y col., 2003)

#### **IV.2. El Complejo Mayor de Histocompatibilidad**

La función principal de los linfocitos T es la defensa contra microbios, y la activación de otras células como los macrófagos y los linfocitos B. Para llevar a cabo estas funciones, los linfocitos T deben interactuar con dichas células, al igual que con otras como las células dendríticas. Esta capacidad de los linfocitos T de interactuar con otras células se debe a que los receptores antigénicos específicos que poseen en su membrana citoplasmática sólo reconocen antígenos dispuestos o presentados sobre otras células. A diferencia de los linfocitos T, los linfocitos B y sus productos, los anticuerpos, reconocen tanto antígenos solubles como antígenos asociados a células. La tarea de presentar los antígenos celulares para su reconocimiento por los linfocitos

Es llevada a cabo por proteínas especializadas que son codificadas en el brazo corto del cromosoma 6, en las regiones 6p21.31 y 6p21.33, por genes en un locus llamado *complejo mayor de histocompatibilidad* (CMH). El CMH es llamado en el ser humano *sistema HLA* (acrónimo de Human Leucocyte Antigen). Los genes del CMH producen tres tipos de moléculas en tres loci diferentes: las moléculas de histocompatibilidad CMH *clase I*, las moléculas de histocompatibilidad CMH *clase II* y las moléculas de histocompatibilidad CMH *clase III*. Se denomina haplotipo HLA al conjunto de genes presentes en esta región del cromosoma 6. El gran polimorfismo del sistema hace que la información de los diferentes haplotipos varíe tanto en los alelos de cada locus como en el número de genes y la distancia física entre los mismos. Cada molécula del CMH se une a un péptido por vez, y cada péptido que se une a una molécula del CMH comparte motivos estructurales comunes. (Abbas y Lichtman, 2005)

Las moléculas *clase I* están formadas por una cadena  $\alpha$  de 340 aminoácidos (peso molecular= 42 a 44 kD) que atraviesa la membrana citoplasmática hacia el interior celular, unida no covalentemente a otra más pequeña llamada  $\beta$ 2 microglobulina de 99 aminoácidos (peso molecular=12 kD). Sólo la cadena  $\alpha$  está codificada dentro del CMH, y en ella se halla el sitio (o hendidura) de presentación antigénica. A su vez, en el ser humano existen tres moléculas *clase I* diferentes, denominadas HLA-A, HLA-B y HLA-C, las que tienen la función de la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos o citolíticos). Las tres moléculas *clase I*, que comparten la misma cadena  $\beta$ 2 microglobulina pero difieren en la cadena  $\alpha$ , se expresan simultáneamente en la superficie de casi todas las células nucleadas, a excepción de los glóbulos rojos y el sincicio trofoblasto. Las moléculas *clase I* poseen un gran polimorfismo poblacional, es decir que para cada una de las tres moléculas HLA existen múltiples diferentes alelos o variantes. Estos alelos son identificados mediante anticuerpos específicos. (Abbas y Lichtman, 2005; Fainboim y Satz, 1995)

Las moléculas *clase II* son heterodímeros que están formados por una cadena  $\alpha$  de 229 aminoácidos (PM= 32 a 34 kD) y una cadena  $\beta$  de 237 aminoácidos (PM= 28 a 29 kD). Ambas cadenas atraviesan la membrana citoplasmática hacia el interior



celular. A diferencia de las moléculas *clase I*, toda la molécula *clase II* es sintetizada por el CMH. Las moléculas *clase II* son reconocidas por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (helper/inductores), y su distribución tisular es muy restringida, expresándose en células especializadas en la presentación antigénica como los linfocitos B, los macrófagos, las células dendríticas, las células de Langerhans, las células endoteliales y las células epiteliales del timo. Tres moléculas *clase II* diferentes pueden expresarse simultáneamente sobre la superficie celular: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Las moléculas *clase II* son también muy polimórficas. Los alelos de las moléculas HLA-DR y DQ son identificadas por serología, mientras que las DP mediante reacciones de cultivo mixto linfocitario secundario. En las moléculas HLA-DR las variaciones alélicas residen en la cadena DR $\beta$ , mientras que la cadena DR $\alpha$  es idéntica en todas. Los cambios en la cadena DR $\beta$  se dan en tres zonas llamadas regiones de hipervariabilidad alélica. En las moléculas HLA-DQ ambas cadenas, DQ $\alpha$  y DQ $\beta$ , contribuyen al polimorfismo. (Janeway y col., 1999)

Las moléculas *clase III* no cumplen con la función de presentación antigénica. Dichas moléculas comprenden los componentes C2, C4 y B del complemento.

Los diferentes alelos de CMH *clase I* y *clase II* están distribuidos en la población con cierta frecuencia, variando según los grupos étnicos. Por ejemplo, el alelo HLA-B8 es relativamente alto en caucásicos (17 %), desciende al 3 % en indios americanos y es sólo el 0,2 % en japoneses. (Ryder y col., 1978; Baur y Danilovs, 1980; Vullo y col., 1984)

Desde la primera observación de una asociación genética de una enfermedad humana con alelos particulares HLA hace más de 40 años, el impacto de los genes HLA en la medicina predictiva ha estado constantemente en crecimiento y estudio. Los mecanismos propuestos para explicar estas asociaciones son muy variados, y van desde las que sugieren que son los antígenos HLA los que están involucrados (pueden actuar como receptores de microorganismos, son similares a microorganismos, o pueden ser modificadas por microorganismos), o que son otros genes que están ligados a los HLA. Se han descrito más de 500 enfermedades que

se manifiestan más frecuentemente en individuos que poseen determinados alelos HLA, y muchas de ellas son enfermedades oftalmológicas (neuritis, glaucomas, distrofias, escleritis, corioretinitis, iridociclitis, etc.). (Tiwari y Terasali, 1985) La de mayor asociación es la retinocoroidopatía multifocal birdshot, ya que el 80-90 % de los individuos que padecen esta enfermedad son HLA-A29, mientras que sólo el 7 % de la población posee dicho alelo, por lo que se dice que los individuos portadores del HLA-A29 tienen riesgo relativo de 48 de sufrir dicha enfermedad. (Faure y col., 1988; Le Hoang y Ryan, 1996) No obstante, no todas las enfermedades en las que se identifica la presencia de un alelo determinado presentan asociaciones tan marcadas como el ejemplo descrito. La fuerza de la asociación dependerá de la frecuencia del alelo HLA en el grupo de pacientes en comparación con la población general. Ello ayudará a calcular cuantas veces más riesgo de sufrir la enfermedad poseen los portadores de un determinado alelo respecto de los que no lo tienen. (Fainboim y Satz, 1995)

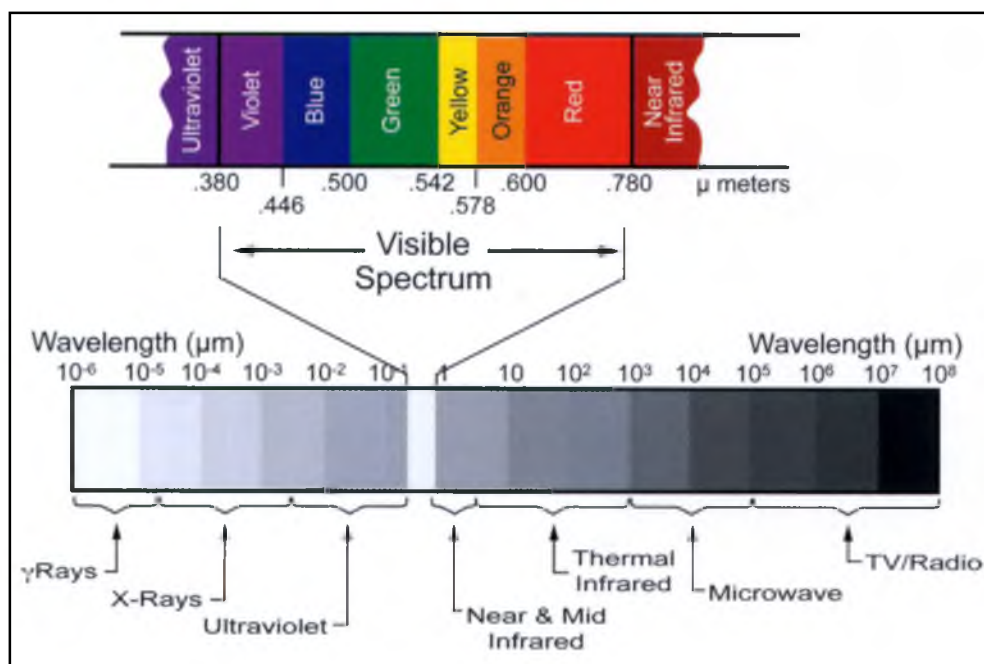
Muchas enfermedades son multifactoriales, en donde están involucrados factores genéticos y ambientales. Para la mayoría de las asociaciones de enfermedades con alelos del CMH se desconoce el mecanismo de acción, y si efectivamente las moléculas del CMH tienen participación en la patogenia de una enfermedad o son sólo marcadores genéticos.

El objetivo de estudiar el sistema ABO y los alelos del locus más polimórfico del sistema HLA en estas poblaciones fue el de evaluar si existe un grupo de individuos genéticamente más susceptible de adquirir la QPC, o si, por el contrario, los individuos que no la padecen poseen algún gen que podría ser considerado como protector.

## V. LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

### V.1. La radiación solar

Los rayos solares que llegan a la tierra son ondas electromagnéticas que poseen determinadas cantidades de energía. La luz es una onda electromagnética constituida por fotones que oscilan a una determinada frecuencia. Estos fotones pueden transportar diversas cantidades de energía. Las diferentes ondas electromagnéticas compuestas (de menor a mayor longitud de onda) por los rayos gama, los rayos X, los rayos ultravioletas, la luz visible, los rayos infrarrojos, las microondas, las ondas de televisión y de radio, constituyen el espectro electromagnético (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de la composición del espectro electromagnético, en donde se muestran de izquierda a derecha las ondas de menor a mayor longitud de onda, expresadas en la figura en micras (1 micra= 1000 nanómetros).

La luz visible es sólo una pequeña fracción del espectro, y se compone de ondas cuya longitud de onda va de 380 nm (color violeta) hasta 780 nm (color rojo) (Figura 1). El 47 % por ciento de las ondas electromagnéticas emitidas por el

sol lo constituyen ondas pertenecientes a la luz visible, mientras que el 46 % son rayos infrarrojos, y el 7 % rayos ultravioletas. (Barry y Chorley, 1998)

Cuando las radiaciones solares llegan a la atmósfera terrestre, interactúan con las moléculas de ésta, de lo que resulta que una proporción de las radiaciones puede llegar a la superficie terrestre, otras son absorbidas por esas moléculas atmosféricas, y otras se dispersan en diferentes direcciones. Por lo tanto, la cantidad de irradiación solar que llega a la superficie terrestre dependerá de la densidad y espesor de la atmósfera y la presencia o no de nubes. La atmósfera está constituida en un 78 % por nitrógeno, 21 % de oxígeno y un 1 % por otras moléculas como agua, dióxido de carbono y otros gases (argón, helio, ozono, etc.), y partículas suspendidas llamadas aerosoles (polvo mineral, sales marinas, partículas carbonáceas, sulfato de amonio y gotitas de ácido sulfúrico diluido). (Madronich, 1993) La concentración atmosférica de muchos de estos componentes varía en función de la altura, la latitud y la estación. Estas moléculas de la atmósfera absorben en forma completa los rayos gama, los rayos X, ciertos rayos ultravioletas (UV-C) y ciertos rayos infrarrojos (IR-C). Los rayos que poseen una longitud de onda corta difunden y atraviesan mejor la atmósfera que aquellos de longitud de onda amplia. (Barry y Chorley, 1998)

Existe evidencia de que tanto la luz visible como aquella que no vemos, en particular la radiación ultravioleta (UV), pueden tener efectos potencialmente dañinos en el ojo. La interpretación de estudios clínicos es, no obstante, complicado debido a la dificultad de cuantificar la cantidad y la longitud de onda exacta de la luz a la cual un individuo dado ha estado expuesto, y la cantidad de tiempo en el cual un daño tisular puede ocurrir. (Rosenthal y col., 1991) Estudios epidemiológicos han involucrado diferentes poblaciones, las que pueden tener variados grados de predisposición genética al daño provocado por la luz. (Hu, 2005)

Del total de la radiación UV, el 90 % es UV-A y el 10 % UV-B. La radiación UV-A (400-320 nm) produce el “bronceado” cutáneo y las reacciones de fotosensibilidad. La radiación UV-B (320-290 nm) produce quemaduras cutáneas y se la asocia al cáncer cutáneo. La radiación UV-C (290-100 nm), la más peligrosa, es

absorbida por la capa de ozono. La luz visible también puede producir daño ocular. (Madronich, 1993)

## **V.2. Factores que influyen la irradiación UV sobre la superficie terrestre**

**V.2.1. La variabilidad atmosférica y los aerosoles.** Además de los componentes normales de la atmósfera, existen diversos factores que pueden modificar la trayectoria o absorber ciertas longitudes de onda de la radiación solar. (Madronich, 1993) Los aerosoles pueden ser naturales o provenir de la actividad del hombre como la combustión de combustibles fósiles y la quema de biomasa, y la utilización de gases cloro-fluoro-carbonos, dependiendo su ocurrencia y distribución de las fuentes que las originan, vientos, humedad ambiente, entre otros. (Madronich, 1993; Parisi y Turnbull, 2005) Cuanto más bajo están los aerosoles en la atmósfera, más pueden afectar la transmisión de radiación UV. (Madronich, 1993) La contaminación ambiental puede, de ese modo, reducir los niveles de radiación UV en ciertas áreas. (Madronich, 1993) Por otra parte, las radiaciones UV de menores longitudes de onda, como las UV-B, se dispersan en la atmósfera más que las de mayor longitud de onda, como las UV-A. (Parisi y Turnbull, 2005)

**V.2.2. Nubes.** La máxima irradiación solar sobre la tierra se da en condiciones de cielo azul despejado. Las nubes de gran altura bloquean un 5 a 10 % de la radiación UV proveniente del cielo, mientras que las nubes de media o baja altura la bloquean en un 30 a 70 %. Sólo las nubes grandes y negras pueden bloquear la totalidad de la radiación UV. No obstante, la morfología individual de las nubes y la extensión de cobertura son altamente irregulares y constantemente cambiantes. (Madronich, 1993; Parisi y Turnbull, 2005)

**V.2.3. Sombra.** La sombra reduce el componente directo de la radiación UV solar. No obstante, una proporción de radiación solar difusa permanece presente, por lo que se debe tener en cuenta que la protección brindada por la sombra no es total. A mayor ángulo del cenit solar, mayor irradiación difusa. (Parisi y Turnbull, 2005)

**V.2.4. Latitud.** En el trópico, en donde el sol pasa por el cenit en cada solsticio, el trayecto de los rayos UV es más corto y su impacto más intenso.

**V.2.5. Estación y posición del sol según hora del día.** En el hemisferio sur, los meses de mayor irradiación son los meses de Diciembre y Enero, y en el hemisferio norte, en Junio y Julio. El 60 % de la radiación UV que nos llega durante el día lo hacen entre las 10 y las 14 horas.

**V.2.6. Altura.** Debido a que la capa de atmósfera que deben atravesar los rayos UV es menor y menos densa a mayor altura, el impacto de los rayos UV es mayor a mayor altura en relación al nivel del mar. Se calcula que la cantidad de irradiación UV aumenta entre 5 y 8 % cada mil metros de altura. (Madronich, 1993)

**V.2.7. Superficie albedo.** La reflexión de diferentes tipos de suelo, de la vegetación y del agua (líquida o congelada) ejerce efectos significativos en la irradiación UV ambiental (Tabla 1). Se distinguen dos tipos de reflexión de la radiación: una *especular*, en la que el ángulo de la luz reflejada es igual al de la luz incidente, y una *Lambertiana*, en la que la luz reflejada es isotrópica, es decir que se distribuye igualitariamente en todas las direcciones e independientemente del ángulo de incidencia. En la práctica, la mayoría de las superficies se encuentran entre estos dos extremos. La *superficie albedo* es la relación entre la luz reflejada y la luz incidente. Por ello, el albedo depende del tipo de superficie, la longitud de onda y del ángulo de incidencia de la radiación. (Madronich, 1993)

**Tabla 1.** Albedo ultravioleta de diversas superficies sobre las que incide la radiación UV en la superficie terrestre. (Modificado de Madronich, 1993)

Superficie Reflectante	Albedo (%)
Agua	5-10
Arena de desierto	4
Asfalto negro	4-11
Bosque de pinos	1-2
Caliza	8-12
Cemento blanco	17
Coníferas	4-8
Hielo	7-75
Nieve limpia	30-100
Pasturas	1-3
Sedimento y arcilla	8-11
Vestimenta negra	2

### V.3. Radiación UV y su acción nociva en el ojo. La córnea como filtro de radiación UV

La sensibilidad de los organismos a la radiación UV está, en general, en relación con la longitud de onda de dicha radiación. Se observa una respuesta máxima entre los 300 y 310 nm (dependiendo del ángulo del cenit solar), y una disminución rápida a longitudes de onda más cortas (debido a la menor incidencia de fotones) y a longitudes de onda más largas (debido a menor respuesta del ADN). (Madronich, 1993)

La córnea en su conjunto absorbe el 70 a 75 % de la radiación UV que llega a la córnea, absorbiendo la mayor proporción de radiación UV-B que llega al ojo, lo que la hace particularmente sensible al daño inducido por la exposición a dicha longitud de onda de radiación UV. (Zigman, 1993) No obstante una cantidad

significativa de radiación UV ingresa al ojo, alcanzando estructuras más profundas y pudiendo provocar daño en los tejidos. (Zigman, 1993) El epitelio corneal y la membrana de Bowman poseen mayor coeficiente de absorción de la radiación UV inferior a 310 nm que el estroma y, ambas capas, responsables del 25 al 30 % de la radiación UV absorbida por la córnea. (Koložvári y col., 2002) Esta eficacia del epitelio y la Bowman como filtro de radiación UV puede deberse a su composición molecular especial, y al mayor contenido de masa seca de la Bowman, resultando así un más alto coeficiente de absorción. (Koložvári y col., 2002) La absorción a nivel del epitelio se produce a expensas de las proteínas, ácidos nucleicos y al ascorbato. (Ringvold, 1998) Se ha observado que la remoción del epitelio y la Bowman crea mayor susceptibilidad del ojo al daño inducido por la radiación UV que la remoción de un espesor significativo de estroma. (Koložvári y col., 2002) Ello puede deberse, al menos en parte, a que el epitelio corneal posee un alto contenido en ácido ascórbico, pudiendo contribuir éste a absorber el 77 % de la radiación incidente de longitudes de onda peligrosas. (Ringvold, 1998; Ringvold, 1997; Brubaker y col., 2000) Borkman, citado por Gray y col., (Gray y col., 1992) reportó que, con el paso de los años, la córnea absorbe más luz, tanto en el espectro visible como en el UV debido al incremento de cromóforos fluorescentes derivados de la degradación fotoquímica de triptofano.

Por otra parte, se ha observado que la exposición de la córnea a la radiación UV induce cambios patológicos en su estructura. (Doughty y Cullen, 1989) La exposición aguda de la córnea a la radiación UV produce queratitis actínica, mientras que la exposición repetida, crónica, produce queratopatías que afectan principalmente el epitelio y el estroma anterior.

Numerosos estudios epidemiológicos se han ocupado del daño provocado al cristalino por la radiación UV y la luz visible. El desarrollo de catarata ha sido documentado luego de exposición tanto breve como crónica de conejos a la radiación UV-B. La asociación más fuerte se ha observado entre la exposición a radiación UV-B y catarata cortical. (Cruickshanks y col., 1992; Taylor y col., 1988) No obstante, la luz visible no pareciera asociarse a la formación de catarata. (Taylor y col., 1992)



El desarrollo de pterigion y de la queratopatía climática ha sido asociado con la radiación UV-A y UV-B, y a la luz visible. (Taylor y col., 1992)

La degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) es una enfermedad degenerativa de la retina que afecta a personas mayores de 40 años. De probable origen multifactorial, cierta evidencia pareciera indicar que la luz visible podría jugar un rol en su ocurrencia. En un estudio realizado en marineros del estado de Maryland se observó que la DMRE avanzada era más frecuente en aquellas personas expuestas a radiación azul (400-500 nm) pero no a la radiación UV. (Taylor y col., 1992) Igualmente, el estudio de Beaver Dam observó que la exposición a la luz visible se asociaba con DMRE en hombres. (Cruickshanks y col., 1993) El hecho de no haber encontrado una incidencia aumentada en mujeres en dicho estudio puede deberse a que las mujeres participaban menos de las tareas a la intemperie. Si bien la radiación UV-B ha sido asociadas a catarata, no se han hallado evidencias de un vínculo entre la exposición a radiación UV-A y UV-B y DMRE. (West y col., 1989)

## **VI. EL ÁCIDO ASCÓRBICO Y SU POSIBLE ROL EN LA QUERATOPATÍA CLIMÁTICA**

### **VI.1. Introducción**

El ojo está expuesto en forma constante a la luz solar. En contraste con la luz visible (400-780 nm), la radiación ultravioleta (UV), comprendida entre los 200 a 400 nm, puede ser absorbida en el ojo, pudiendo inducir efectos adversos sobre diversas estructuras de la superficie ocular y estructuras intraoculares (ver Sección II, Capítulo 7). No obstante, existen en el ojo mecanismos protectores como la melanina y la luteína, enzimas como la superóxido dismutasa, glutatión,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico (AA). (Ringvold y col., 1998) La córnea es la estructura en el organismo que posee la concentración más elevada de AA, siendo ello aún más notorio en el ser humano y en animales de hábitos diurnos que en los animales de hábitos nocturnos. (Ringvold y col., 1998) Ello ha llevado a considerar que el AA juega un papel fundamental en la protección de las diferentes estructuras oculares de la radiación UV.

### **VI.2. Generalidades acerca del ácido ascórbico**

El AA, comúnmente llamado vitamina C, es una vitamina hidrosoluble y esencial, sintetizada químicamente a partir de la glucosa mediante una serie de reacciones catalizadas por enzimas, siendo la L-gulono  $\gamma$ -lactona oxidasa (GLO) la última enzima involucrada en su síntesis. (Blanco, 2006) Es considerado uno de los más potentes agentes antioxidantes del organismo. En humanos, esta vitamina se encuentra concentrada en ciertos órganos tales como el ojo, el hígado, el bazo, el cerebro, las glándulas suprarrenales y la tiroides.

La especie humana, algunos primates, los cobayos, murciélagos frugívoros y algunas aves como el bulbul de orejas rojas no poseen la capacidad de sintetizar AA debido a la ausencia de GLO. Nishikimi y Udenfriend demostraron en 1976 que los cobayos y algunos primates poseen un defecto genético que los predispone al padecimiento del escorbuto, debido a la pérdida de expresión del gen de la enzima

GLO. (Nishikimi y Udenfriend, 1976) Posteriormente aislaron la secuencia no funcional del gen de esta enzima humana y realizaron el mapeo cromosómico (8q21.1). (Nishikimi y col., 1994) La secuenciación mostró la presencia de regiones exónicas con cambios anómalos de nucleótidos, tales como delección e inserción de nucleótido/s, lo que confirmó que el gen de esta enzima ha acumulado un gran número de mutaciones no selectivas en el proceso evolutivo, hasta llegar a la pérdida de su actividad. (Nishikimi y col., 1994) Sin embargo la inmensa mayoría de los animales, incluidos los de granja, pueden sintetizar AA a partir de la glucosa fundamentalmente en el hígado, el intestino y las glándulas suprarrenales.

En las especies deficientes, la no ingestión, y por consiguiente la ausencia de AA en el organismo conlleva a la aparición del escorbuto (AA <2,5 mg/l). El efecto carencial se hace evidente luego de tres semanas de no ingestión de AA, y las manifestaciones clínicas son fatiga, mialgias, artralgias, púrpura vascular y síndrome hemorrágico. También se observan hemorragias gingivales y pérdida de piezas dentarias. Los signos biológicos (no específicos) más evidentes son: anemia, hipocolesterolemia, hipoalbuminemia, hiperkeratosis folicular, hemorragias perifoliculares, equimosis, edema, y deficiencia en la cicatrización. (Pauling, 1970; Hirschmann y Raugi, 1999) Todos estos signos y síntomas pueden revertirse administrando 1 g de vitamina C por día durante 2 semanas, caso contrario la deficiencia crónica lleva a la muerte repentina. (Pauling, 1970; Hirschmann y Raugi, 1999) Luego de muchos años de investigación se ha llegado a la conclusión de que la dosis requerida para adultos es de 100 mg diarios. (Fain, 2004)

### **VI.3. Absorción del ácido ascórbico**

En humanos el AA es un micro-nutriente esencial, (Jesse y Gregory, 2000) requerido para todas las funciones biológicas, incluidas las reacciones enzimáticas y las antioxidantes. Se absorbe en el intestino delgado por un proceso activo dependiente de sodio, siendo SVTC-1 (sodium-dependent vitamin C transporter 1) el transportador que tiene selectividad para el isómero L del AA y el ácido L-dehidroascórbico (ADA), pero no para glucosa. (Levine y col., 1996) En el cromosoma humano 5q31.2-31.3 se encuentra el gen SLC23A2 que codifica para el

transportador SVCT 1, y el gen SLC23A1 que codifica para el transportador SVCT 2. (Wang y col., 2000) A pesar de que ambos transportadores poseen una gran homología estructural y similitud funcional, su distribución es altamente definida ya que SVCT1 se encuentra en intestino, pulmón e hígado, mientras que SVCT2 está presente en ojo y cerebro. (Wang y col., 2000; Tsukaguchi y col., 1999)

El AA puede ser incorporado a ciertas células como neutrófilos y células del sistema nervioso a través de un transporte facilitado no específico que es mediado por el transportador de la glucosa GLUT 1. Este transportador solo conduce a la forma oxidada del AA, el ADA, y el mecanismo es dependiente de las concentraciones de glucosa plasmática. (Tsukaguchi y col., 1999)

Las fuentes naturales de vitamina C son las frutas y los vegetales frescos, siendo la acerola, la soja, el brócoli, el pimiento, el kiwi, el pomelo, la naranja y el tomate los que poseen mayor contenido de esta vitamina. En situaciones especiales la vitamina purificada también puede ser administrada por vía oral, intramuscular, subcutánea e intravenosa.

#### **VI.4. Degradación del ácido ascórbico**

Debido a su estructura química, el AA es muy sensible a la degradación. Numerosos factores influyen en los mecanismos degradantes, entre los que cabe citar el pH, las concentraciones de oxígeno, las enzimas, los catalizadores metálicos, la concentración inicial del ácido y la relación AA - ADA. Existen tres vías de degradación del AA, la vía oxidativa catalizada, la vía oxidativa no catalizada y bajo condiciones anaeróbicas. Independientemente de la vía degradante, la apertura del anillo lactona, formación de DCG, elimina irreversiblemente la actividad de la vitamina C generando distintos productos tales como: a) productos intermediarios polimerizados, b) ácidos carboxílicos insaturados de 5-6 carbonos, y c) productos de fragmentación de algunos pocos carbonos (<5 C). (Jesse y Gregory, 2000)

#### **VI.5. Funciones generales del ácido ascórbico**

El AA es esencial en la síntesis del colágeno, interviniendo también en la síntesis de lípidos, proteínas, norepinefrina, serotonina, L-carnitina, y en el metabolismo de tirosina, histamina, y fenilalanina. (Basabe Tuero, 2000) La deficiencia de AA se asocia con una disminución en la síntesis de pro-colágeno y con una reducida hidroxilación de los residuos prolina y lisina, obteniéndose una molécula de colágeno menos estable. (Mahmoodian y Peterkofsky, 1999) El AA facilita la absorción del hierro en el tracto digestivo y regula la distribución y almacenamiento del mismo. El ascorbato (AH<sup>-</sup>), forma químicamente estable a pH fisiológico, es un gran agente reductor hidrosoluble debido a sus dos hidroxilos (OH<sup>-</sup>) ionizables capaces de “limpiar” a los tejidos de las especies reactivas del oxígeno (ERO) responsables del stress oxidativo. (Machlin y Bendich, 1987) El AA también posee la capacidad de regenerar vitamina E, y de esta manera la mantiene en un estado activo contribuyendo a la acción antioxidante. (Serra y Cafaro, 2007) Además de sus efectos antioxidantes se ha demostrado que posee capacidad para absorber radiación UV entre 290 nm y 320 nm. (Man Choy y col., 2001)

#### **VI.6. El ácido ascórbico en estructuras oculares**

Los conocimientos sobre la distribución del ascorbato en compartimientos oculares han incrementado notablemente en los últimos años y han sido revisados recientemente. (Serra y Cafaro, 2007) La concentración del AA en el humor acuoso depende, fundamentalmente, de la concentración del AA en el suero, siendo extraído desde allí por el cuerpo ciliar y secretado hacia el humor acuoso. (Purcell y col., 1954) Este último posee una concentración 40 veces mayor de ascorbato que el plasma. Este gradiente continúa a través de endotelio y estroma de la córnea hasta alcanzar concentraciones máximas en el epitelio. (Brubaker y col., 2000) En el conejo, por ejemplo, el epitelio corneal posee una concentración de AA 8 veces mayor que la del humor acuoso. (Reim y col., 1978) Además del ascorbato, en la cámara anterior del ojo existen diferentes enzimas capaces de remover ERO.

Alteraciones en la síntesis, existencia, y/o función de dichos componentes podrían participar en la génesis de enfermedades oculares como la queratopatía climática (QPC). Por otra parte, la dieta de los individuos que habitan la región del

departamento de El Cuy se compone, en forma casi exclusiva, de carne de cordero hervida o asada, y muy ocasionales y escasas cantidades de leche vacuna o caprina y verduras. Por ello, realizamos estudios de diferentes analitos séricos a fin de corroborar esta dieta muy restringida y de poder establecer posibles relaciones con la QPC.

## **OBJETIVOS**

Debido a que la queratopatía climática (QPC) es una enfermedad poco conocida, e ignorada en esta región de América Latina pero posiblemente muy prevalente en ciertas regiones de la Argentina, y que hasta la fecha no se han estudiado detalladamente ciertos aspectos clínicos y los mecanismos moleculares involucrados en la QPC, hemos decidido realizar trabajos de investigación para ampliar los conocimientos sobre esta patología que es altamente discapacitante, afectando a individuos que habitan áreas alejadas y marginales de nuestro territorio nacional.

Es probable que se le haya prestado poca atención debido a que afecta a personas que habitan medios rurales alejados o marginales, llegando a ser muy discapacitante en sus estadios avanzados. Teniendo en cuenta estos aspectos, la enfermedad adquiere aún mayor dramatismo si se tiene en cuenta que la gran mayoría de los pacientes no tienen acceso a exámenes y controles oftalmológicos, constituyéndose en un serio problema de salud pública.

### **a) Objetivo General**

Investigar la existencia de QPC en ciertas regiones de la Argentina y estudiar las alteraciones oculares y moleculares en pacientes con QPC.

### **b) Objetivos Específicos**

1. Investigar si la QPC afecta, además de pobladores del noroeste de la Patagonia Argentina, a individuos que habitan otras zonas geográficas del país que tendrían ciertas características socioculturales y ambientales similares a la Patagonia (Puna, Pcia. de Jujuy, y región de Sumampa y las Salinas Grandes en la Pcia. de Santiago del Estero).
2. Investigar la prevalencia de la QPC, y la distribución por edades y sexo.

3. Estudiar el impacto visual y la discapacidad que dicha patología provoca en esa población afectada.
4. Estudiar las características específicas de las alteraciones corneales, determinar sus estadios evolutivos y el grado de progresión.
5. Estudiar el compromiso visual, la superficie ocular y la sensibilidad corneal.
6. Investigar otras posibles alteraciones oftalmológicas asociadas.
7. Estudiar marcadores genéticos asociados a esta enfermedad, a fin de poder determinar probables genes protectores y genes facilitadores. Para ello se evaluarán los antígenos eritrocitarios del grupo sanguíneo ABO, y el alelo HLA-DR $\beta$  del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II.
8. Investigar los niveles, formas moleculares y grado de activación de diferentes metaloproteinasas (poniendo énfasis en los grupos de las colagenasas y gelatinasas) y sus inhibidores endógenos tisulares TIMP-1 y TIMP-2 en lágrima de pacientes con queratopatía climática que habitan en un área de la región noroeste de la Patagonia Argentina, habida cuenta que hasta el presente no existe información disponible concerniente a dichas moléculas en pacientes con enfermedades corneales degenerativas.
9. Considerando las altas concentraciones de ácido ascórbico en el epitelio corneal en condiciones normales, nos propusimos estudiar posibles factores nutricionales como coadyuvantes en la génesis de la enfermedad, evaluando signos clínicos de déficits nutricionales, y niveles de vitamina C en suero.
10. Estudiar factores ambientales (composición química del agua de la zona de Aguada Guzmán, y los niveles de radiación ultravioleta en las tres áreas geográficas de estudio) como posibles factores de riesgo de la enfermedad.



# *CAPÍTULO 2*

## *Materiales y Métodos*

# ***I. ESTUDIOS CLÍNICOS OFTALMOLÓGICOS EN DIFERENTES REGIONES DE LA ARGENTINA***

## ***I.1. REGIÓN DE AGUADA GUZMÁN***

### ***I.1.1. Contexto***

Entre los años 1997 y 2007, en el marco de una campaña de salud visual coordinada por el autor (por el Centro de la Visión de la Clínica Universitaria Reina Fabiola) y por la Srta. Graciela Franchini (por el Voluntariado del Vicerrectorado de Medio Universitario de la Universidad Católica de Córdoba), y en el contexto del Proyecto de Promoción Humana y Evangelización en Aguada Guzmán, Pcia. de Río Negro (Figura 2), de la Universidad Católica de Córdoba, hemos llevado a cabo 8 campañas de 2 días de atención oftalmológica: una en 1997, una en 1998, una en 1999, una en 2001, una en 2003, una en 2006 y dos en 2007. Dicho Proyecto forma parte, a su vez, del Proyecto de Promoción Humana y Evangelización en medios rurales marginales, pensado y desarrollado por el Sacerdote Jesuita Miguel A. Petty. La Promoción Humana es un conjunto de acciones entendidas como un proceso, orientadas a pasar de condiciones de vida menos humanas a condiciones más humanas. (Petty, 1994)

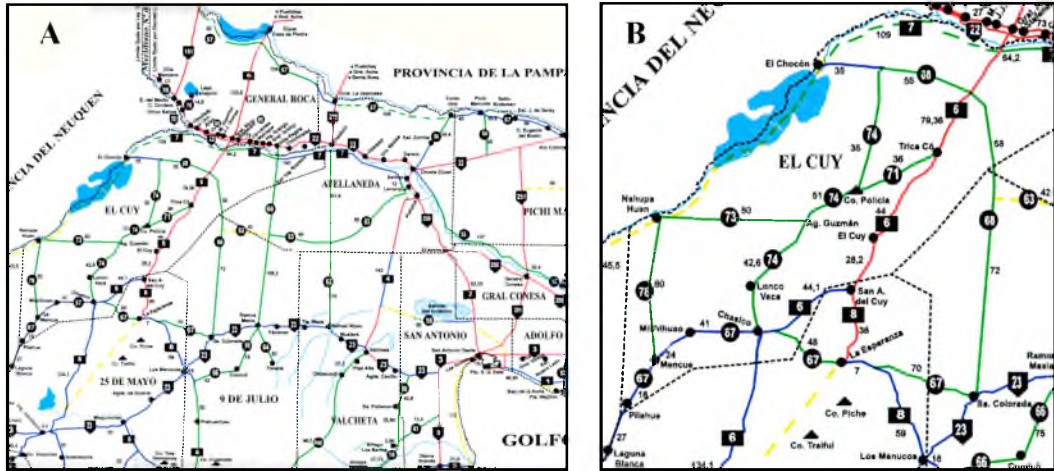


**Figura 2.** Vista del sector norte del Poblado de Aguada Guzmán, Pcia. de Río Negro.

### **I.1.2. Características geográficas del área**

El poblado de Aguada Guzmán se ubica en un área del norte de la Patagonia Argentina, perteneciendo al departamento El Cuy de la Provincia de Río Negro (Figuras 3 A y B), a 190 km al sur de la ciudad de General Roca, centro urbano e industrial más próximo. En esta área de 11.281 km<sup>2</sup>, ubicada a 40° latitud sur y 68° longitud oeste, viven 2.329 habitantes (1.311 varones y 1.018 mujeres), y cuya densidad poblacional es de 0,2 habitantes/km<sup>2</sup>. Esta región está emplazada en una planicie semidesierta, de origen volcánico y sedimentario, de suelo arenoso y arcilloso (Figura 4), a una altura media de 677 metros sobre el nivel del mar. El tipo de vegetación dominante es la estepa arbustiva y herbácea, con arbustos achaparrados de menos de un metro de altura. La cobertura vegetal no supera el 50 % del suelo (Figura 5). Su clima templado frío, con una temperatura media anual de 12,9° C, es seco, árido, ventoso, con vientos secos, fuertes y constantes que provienen del oeste y suroeste, que se originan en un anticiclón en el Océano Pacífico, soplando persistentemente con una velocidad media de 8 km/h, vehiculizando partículas de roca sedimentaria, arena y arcilla. La lluvia media anual es de 195,5 mm. Toda la región está sufriendo un proceso de desertificación, de erosión eólica y abrasión por roca sedimentaria, a lo que se agrega la degradación del suelo (pisoteo, compactación) provocado desde hace

décadas por el ganado ovino. Éste, a su vez, contribuye también con la degradación de la escasa vegetación arbustiva, debido a la forma de presión y corte que realiza la oveja para alimentarse. (Massera, 2001)



**Figura 3.** (A) Mapa político de la región norte de la Patagonia Argentina. (B) Zona ampliada correspondiente a la región noroeste de dicha región, en donde se encuentra el departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro.



**Figura 4.** Fotografía que muestra al fondo la meseta sobre la cual está emplazada la región correspondiente a Aguada Guzmán, Pcia. de Río Negro.



**Figura 5.** Fotografía de una vista típica de zonas aledañas a Aguada Guzmán, en la que se pueden observar las características del suelo arenoso/arcilloso cubierto escasamente por vegetación arbustiva achaparrada.

### **I.1.3. Individuos**

La mayoría de los habitantes de la región poseen ascendencia Mapuche. Una pequeña proporción (0.4 %) está constituida por segundas y terceras generaciones de origen europeo instalados en la región desde comienzos del siglo veinte.

El nivel educativo de los pobladores de la región es bajo. En los poblados cuentan sólo con educación formal básica (nivel primario), con importante nivel de deserción escolar. Sólo el 50 % de los adultos sabe leer y escribir. Existe una importante emigración a los centros urbanos, sobre todo de la población joven. La pirámide poblacional es la de una doble pirámide invertida.

Los pobladores viven en familias constituidas por 5 personas en promedio, y habitan mayoritariamente precarias casas de adobe y techo de chapa o paja, con pocas habitaciones y con baño externo tipo letrina (Figura 6). Su principal ocupación consiste en la cría de ganado lanar (principalmente ovino, y más recientemente también de camélidos sudamericanos domésticos), la esquila, y en

ciertos casos la manufactura de la lana. El principal sustento económico proviene de la venta de la lana, la carne y, en menor medida, del cuero. La alimentación se basa, en forma casi exclusiva, en la ingesta de carne bovina asada o hervida dos o tres veces al día, y pequeñas cantidades de leche de vaca o cabra en forma esporádica. Verduras y frutas constituyen un elemento de excepción en la dieta de los pobladores del área.



**Figura 6.** Fotografía de una típica casa de adobe habitada por pobladores de la región de Aguada Guzmán, Pcia. de Río Negro. A la derecha se observa el baño o letrina.

#### **1.1.4. Agua de consumo**

El agua para el consumo presenta un alto grado de salinidad, con una concentración de sales que va desde 500 a 9.712 mg/l, dependiendo de la zona y profundidad de las napas, con altas concentraciones de sodio, sulfatos (1.100-3.706 mg/l), cloruros (2.503 mg/l) y flúor (2.4 mg/l).

En base al contenido total de Calcio y magnesio, generalmente como bicarbonatos y expresado como carbonato de calcio, el agua se clasifica en blanda, semidura o mala, pero bebible, y dura o desechable (Tabla 2). (Bavera, 2001)



**Tabla 2.** Clasificación de la dureza del agua para consumo humano.

<b>Blanda o buena</b>	< 100 mg/l de carbonato de Calcio
<b>Semidura o mala</b> (pero bebible)	200 a 300 mg/l de carbonato de Calcio
<b>Dura o desechable</b>	> 300 mg/l de carbonato de Calcio

La mayoría de los habitantes de Aguada Guzmán poseen agua de red proveniente de un pozo local. Algunos pobladores que viven en áreas alejadas en el campo consumen agua de jagüeles. En el año 2006 se tomaron muestras de agua de diferentes lugares en el poblado de Aguada Guzmán y zonas aledañas que consumen los pobladores. Dichas muestras fueron traídas a la ciudad de Córdoba y analizadas en el Laboratorio de Análisis de Suelo, Agua y Forraje (Ing. Agrónoma María Florencia Barbero) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba. A modo de control, se obtuvieron muestras de agua de red de la ciudad de Córdoba y fueron analizadas por el mismo laboratorio.

### **I.1.5. Examen clínico oftalmológico**

Todos los pacientes recibieron un examen oftalmológico completo que incluyó examen de la agudeza visual con tabla de optotipos de Snellen y anillos de Landolt o la E para niños e individuos iletrados (alrededor del 50 % de la población adulta); refracción objetiva mediante autorrefractómetro (RK1, Canon Inc., Tokyo, Japón); biomicroscopía detallada del segmento anterior con lámpara de hendidura (Slit-lamp 100/16, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania; AO Slit Lamp 11665, American Optical Co., Buffalo, EE.UU.; Led Slit Lamp XL-1, Shin Nipón, Ohira Co., Niigata, Japón) que incluyó el examen del borde palpebral, la conjuntiva bulbar y tarsal, la córnea, la cámara anterior, el iris, el cristalino y el vítreo anterior; medición de la presión intraocular mediante tonometría por aplanación (Kowa A-1, Tokyo, Japón); y examen del fondo de ojo mediante oftalmoscopia binocular indirecta (Omega 100, Heine Optotechnik, Herrsching, Alemania).

### **I.1.6. Exámenes complementarios de ojo externo**

En un grupo de pacientes que presentaban QPC (23 pacientes, 42 ojos), y en un grupo comparable de individuos sin la enfermedad, pero que habitaban la misma área, como controles (13 individuos, 26 ojos), se Evaluó la sensibilidad corneal, el tiempo de ruptura de la película lagrimal precorneal (TRP), la tinción de la superficie ocular y la secreción lagrimal. Este grupo de individuos estudiados firmó un consentimiento informado, y el estudio fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación de la Clínica Universitaria Reina Fabiola de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina y registrado en el Registro Provincial de Investigación en Salud (RePIS).

**I.1.6.1. Evaluación de la sensibilidad corneal.** Fue evaluada previamente a la instilación de gota alguna y de la tonometría, mediante el estesiómetro de Cochet-Bonnet (Luneau, Paris, Francia), que posee un monofilamento de nylon de 0,12 mm de sección, de longitud variable, ejerciendo sobre el epitelio corneal una presión que varía de 11 a 200 mg por  $0,0113 \text{ mm}^2$ , en función de la longitud del filamento de nylon que se haya predeterminado. A menor longitud del filamento, mayor rigidez, y así mayor presión sobre el área estimulada. Se calcula que la superficie del extremo distal del filamento toma contacto con 4 a 10 células epiteliales, estimulando así una unidad nerviosa sensitiva de la córnea.<sup>6</sup> El individuo a examinar fija su mirada en un objeto al frente de él, mientras el examinador mueve el extremo distal del monofilamento de nylon hacia el área de la córnea a examinar, hasta que dicho extremo toca la córnea y el monofilamento se incurba, produciendo un reflejo de parpadeo. La sensibilidad corneal fue cuantificada en una escala de 0-6 (graduada en el estesiómetro, siendo 0 una longitud del monofilamento inferior a 1 cm, y 6 una longitud máxima de 6 cm) en la cual mediciones obtenidas entre 0 y 2 fue considerada severa hipoestesia, 3y 4 moderada hipoestesia, y 5 y 6 sensibilidad corneal normal.

**I.1.6.2. Evaluación del TRP.** Se lo evaluó antes inmediatamente después de evaluar la sensibilidad corneal y antes de la realización del test de Schirmer y de la medición de la tensión ocular. Para su evaluación, se instiló en el fondo de saco conjuntival inferior una gota de fluoresceína al 0,50 % en cada ojo del



paciente a examinar. Luego de indicarle al paciente la realización de un parpadeo, a fin de lograr la adecuada dispersión sobre la superficie corneal de la película lagrimal teñida con la fluoresceína, se le indicó no parpadear. Desde ese momento se midió el tiempo (en segundos) que demoró en comenzar a fragmentarse dicha película. La observación fue realizada mediante lámpara de hendidura, e iluminación con luz de cobalto. El TRP fue considerado anormal cuando fue igual o inferior a 10 segundos.

**I.1.6.3. Evaluación de la tinción de la superficie ocular.** Teniendo en cuenta que los factores ambientales como la sequedad ambiental y los vientos constantes vehiculizando partículas son agresivos para la superficie ocular, pudiendo provocar daño en la córnea y la conjuntiva, se efectuó tinción de la superficie ocular verde de lisamina al 1 % (C-Lissamine Green 1 %, Leiter's Pharmacy, San Jose, CA, EE.UU.) en este grupo pacientes con QPC y el grupo de individuos controles, a los fines de evaluar la toma del colorante a nivel de posibles ulceraciones y de células patológicas del epitelio corneal y la conjuntiva bulbar nasal y temporal. La tinción obtenida se calificó en una escala de 0 a 3, en donde 0 equivale a no tinción; 1 tinción leve; 2 tinción moderada; 3 tinción severa. La observación se realizó con lámpara de hendidura. Para la tinción superficial se utilizó el verde de lisamina debido a que es igualmente eficaz que el rosa de bengala, pero es mejor tolerada (Manning y col., 1995; Kim, 2000).

**I.1.6.4. Evaluación de la secreción lagrimal.** Se estudió mediante el test de Schirmer II. Previa anestesia tópica con clorhidrato de proparacaína al 0,5 % (Anestalcón®, Alcon Laboratories, Fortworth, EE.UU) instilada en el fondo de saco conjuntival inferior (1 gota en cada ojo del paciente cada 10 segundos hasta completar 3 gotas), se evaluó con cinta de papel de filtro Wartmann n° 2 de 5 mm de ancho por 30 mm de largo. Luego de secar con gasa de algodón las lágrimas y la humedad superficial de las pestañas y del fondo de saco conjuntival inferior, se introdujo en éste un extremo doblado de 5 mm de largo de la cinta de papel, debiendo permanecer el paciente con ambos ojos abiertos pero parpadeando normalmente y con la mirada al frente. A los 5 minutos de introducida la cinta se la retiró, y con una regla graduada en mm se midió la longitud de la superficie de cinta mojada, contando desde el doblado y no desde el extremo introducido en el

fondo de saco. Se consideró un test de Schirmer normal cuando se obtuvo una medición de 10 o más milímetros, moderada hiposecreción lagrimal entre 5 y 9 mm, y severa hiposecreción inferior a 5 mm.

### I.1.7. Registro fotográfico de casos clínicos

En las campañas de 2001, 2003 y abril de 2007, a un grupo de pacientes con QPC se les realizó fotografía de córnea y segmento anterior mediante lámpara de hendidura fotográfica (Foto-Spaltlamp, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), y utilización de película fotográfica de 24x36 mm para diapositivas, Fujichrome Sensia o Fujichrome Provia 100 F, Iso 100/21° (Fujifilm Corporation, Japón) (Figura 7).



**Figura 7.** Examen biomicroscópico y fotografía con lámpara de hendidura.

El consultorio de atención oftalmológica se estableció en el poblado de Aguada Guzmán. La energía eléctrica fue provista por un grupo electrógeno alimentado a gasoil. Todo el equipamiento oftalmológico, de propiedad del Centro de la Visión Urrets Zavalía de la Clínica Universitaria Reina Fabiola, fue transportado desde la ciudad de Córdoba, distante a 1.400 km de Aguada Guzmán. En un área de 22.475 km<sup>2</sup>, los 3.363 pobladores que viven en ella no

tienen acceso a atención oftalmológica alguna. La mayoría de los pacientes adultos examinados nunca habían recibido atención oftalmológica.

### **I.1.8. Análisis estadísticos**

Para los cálculos estadísticos, los resultados fueron evaluados mediante el test de Fisher y el  $\chi^2$ -test. La significación estadística fue establecida en  $p < 0,05$ .

## **I.2. REGIÓN DE SUMAMPA**

### **I.2.1. Contexto**

Como parte del presente proyecto de investigación, se realizaron 2 campañas de atención oftalmológica de 2 días de atención cada una, la primera en Noviembre de 2006 y la segunda en Mayo de 2007, a fin de pesquisar posibles casos con QPC en dicha región geográfica. La actividad desarrollada por el Dr. José A. Saad, miembro de nuestro equipo de trabajo del Centro de la Visión de la Clínica Universitaria Reina Fabiola, hizo posible la convocatoria de los pacientes que habitan esa región vecina a las Salinas Grandes, y la instalación del consultorio de atención oftalmológica.

### **I.2.2. Características geográficas del área**

La región de Sumampa y las Salinas Grandes se encuentran en la región central de la Argentina y al sur de la Pcia. de Santiago del Estero, en el departamento Quebrachos (3.507 km<sup>2</sup>), a 29° latitud sur y 63° longitud oeste. Dicho departamento posee una población de 11.331 habitantes. Posee una altura promedio de 254,50 m sobre nivel del mar. Salvo algunas áreas de monte bajo, la región posee escasa vegetación arbórea (nula en toda la extensión de las Salinas Grandes). El suelo es arcilloso-salitroso está cubierto discretamente por vegetación arbustiva baja. El clima es árido, cálido en verano y templado en invierno, con un bajo régimen anual de lluvias. A diferencia de la Patagonia, no se observan vientos intensos en forma constante.

### **I.2.3. Individuos**

La mayoría de los pacientes que habitan esa región trabajan en tareas rurales vinculadas principalmente a la ganadería (ganado bovino y caprino). Debido a que los pacientes fueron examinados en un centro urbano (ciudad de Sumampa), no se pudo corroborar el tipo de vivienda habitada ni la provisión de servicios básicos domiciliarios.

#### **I.2.4. Examen clínico oftalmológico**

Se examinaron 154 pacientes (307 ojos, 1 prótesis). A todos los pacientes se les realizó un examen oftalmológico completo, similar al realizado en Aguada Guzmán (ver punto I.1.5.).

El centro de atención oftalmológica se estableció en la ciudad de Sumampa, con una población de 4.800 habitantes y ubicada a 236 km de la ciudad de Santiago del Estero, debido a que en las áreas rurales aledañas, sobre todo en las Salinas Grandes, no se contaba con sitio adecuado para la recepción de los pacientes, ni tampoco con suministro eléctrico para los equipos de examen oftalmológico. Por otra parte, en las mismas Salinas prácticamente no existen pobladores. Todo el equipamiento fue trasladado desde la ciudad de Córdoba.

#### **I.2.5. Exámenes complementarios**

Ningún paciente brindó su acuerdo para que se le extraiga sangre para estudios de polimorfismo genético u otro tipo de estudio complementario.

### **I.3. REGIÓN DE CIENEGUILLAS**

#### **I.3.1. Contexto**

Se eligió examinar a pacientes de la región de Cieneguillas, Pcia. de Jujuy, por sus características geográfico-ambientales, y por los vínculos que la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba posee con miembros de dicha comuna. Ello facilitó enormemente la convocatoria de los pacientes, y la ubicación e instalación del consultorio de atención. Al igual que en las campañas de atención en Aguada Guzmán y Sumampa, la convocatoria se hizo para toda la población de la región, tuviesen o no problemas oculares o visuales.

Se realizó una campaña de atención oftalmológica en Diciembre de 2005, de 2 días de duración.

### **I.3.2. Características geográficas del área**

La región de Cieneguillas se encuentra en la Puna, Pcia. de Jujuy, en la llamada Puna desértica, a 22° latitud sur y 65° longitud oeste, distante a 36 km al oeste de La Quiaca (11.900 habitantes). Esa región explorada se encuentra a una altura promedio de 3.700 m sobre el nivel del mar. La región posee muy escasa vegetación arbórea (queñoa). El suelo es arcilloso-arenoso y está cubierto por escasa vegetación arbustiva baja o esteparia (tola, ñagua). El clima es árido, frío y seco, con gran amplitud térmica entre el día y la noche, con muy bajo régimen anual de lluvias (100 a 200 mm) y escasa nubosidad. Al igual que en la Patagonia, esa región sufre la acción constante de vientos intensos. En esa región, la densidad poblacional es muy baja, llegando a 0,03 habitantes/km<sup>2</sup> en algunas áreas alejadas.

### **I.3.3. Individuos**

La mayoría de los pobladores que habitan esa región realizan tareas rurales vinculadas con la cría y esquila de ganado ovino, caprino y camélido (llama y vicuña). Existe movilidad de la población hacia zonas urbanas, en especial los adultos varones en edad productiva, y también por la misma actividad ganadera debido al sistema de trashumancia, es decir cambiando de región para la veranada y la internada. Los pobladores de esa región habitan pequeñas casas o chozas de adobe y techo de paja. La dieta es variada, probablemente por su proximidad con centros urbanos como La Quiaca, aunque predomina la carne de oveja. La mayoría de los adultos mayores, tanto varones como mujeres, utilizan sombrero alado en forma permanente. Los departamentos que conforman la Puna jujeña, a excepción de Yavi, figuran entre los departamentos del país con mayores necesidades básicas insatisfechas (INDEC, Censo Nacional de Población y Vivienda 1991). (García y col., 1998)

### **I.3.4. Examen clínico oftalmológico**

Se examinaron 152 pacientes (304 ojos). A todos los pacientes se les realizó un examen oftalmológico completo como el descripto previamente (ver I.1.5.)

El centro de atención oftalmológica se ubicó en la Cooperativa del poblado de Cieneguillas, con provisión de energía eléctrica y agua corriente. Todo el equipamiento fue trasladado desde la ciudad de Córdoba.

### **I.3.5. Exámenes complementarios**

A un grupo de pacientes se les extrajo sangre periférica para estudios de polimorfismo genético.

## II. ESTUDIO DE POLIMORFISMO GENÉTICO

La queratopatía climática (QPC) fue observada preponderantemente en pacientes de ascendencia mapuche que habitan la región noroeste de la Patagonia Argentina, precisamente en el departamento El Cuy de la Provincia de Río Negro. No obstante, también fue observada en un grupo de pacientes de ascendencia europea que habitan esa área desde hace varias generaciones. (Urrets-Zavalía y col., 2006; Urrets-Zavalía y col., 2007) En cambio, no observamos caso alguno de QPC en pobladores de la región de Cieneguillas, Puna, Pcia. de Jujuy, región con condiciones climáticas y ambientales similares a las de la región de El Cuy. Ello nos llevó a pensar que otros factores de riesgo podrían estar presentes sólo en un determinado grupo de pacientes, cuyas características intrínsecas podrían hacerlos más susceptibles a los factores ambientales y climáticos para sufrir la enfermedad.

Es probable que factores genéticos pudieran intervenir en la génesis de la QPC. No obstante, su rol exacto sería difícil de determinar, siendo factible que varios genes puedan estar involucrados. A su vez, factores ambientales podrían ejercer una influencia en la expresión y penetrancia de esos genes.

Para el estudio del polimorfismo genético se estudiaron los antígenos eritrocitarios (sistema ABO) y los alelos HLA- DR  $\beta$ 1 (*clase II* del Complejo Mayor de Histocompatibilidad) en un grupo de pacientes con QPC e individuos controles en el departamento el Cuy, Pcia. de Río Negro, y en un grupo de pobladores de Cieneguillas, Puna, Pcia. de Jujuy, en donde no se encontró caso alguno de QPC.

El estudio fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación de la Clínica Universitaria Reina Fabiola de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina y registrado en el Registro Provincial de Investigación en Salud (RePIS). Todos los participantes, que fueron elegidos al azar, aceptaron participar en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado.

### **II.1. Estudio del Sistema AB0**

A un grupo de pacientes con QPC y a un grupo de individuos controles en el Departamento El Cuy, y a un grupo de individuos de la Puna Jujeña, se les extrajo una muestra de sangre periférica mediante punción en pulpejo de un dedo de la mano. A dos gotas de esa sangre se las colocó sobre un portaobjeto separadas una de otra. A una de ellas se le agregó el antisuero anti A y a la otra antisuero anti B. Cuando se observaba aglutinación eritrocitaria se clasificaba dicha sangre como perteneciente al antígeno reconocido por ese antisuero. En ausencia de aglutinación frente a ambos anticuerpos la muestra se clasificaba como 0.

### **II.2. Estudio del CMH clase II (HLA- DR $\beta$ 1)**

A un grupo de pacientes con QPC y a un grupo de individuos controles en el Departamento El Cuy, y a un grupo de individuos de la Puna Jujeña, se les extrajo una muestra de sangre venosa que fue inmediatamente mezclada con EDTA (anticoagulante) y conservada congelada hasta el momento de proceder a la purificación de ADN.

#### **II.2.1. Extracción de ADN: método del “Salting Out”**

Para la obtención de ADN se utilizó el método descrito por Miller y col. (Miller y col., 1988). (Ver Anexo 1)

#### **II.2.2. Tipificación HLA- DR $\beta$ 1**

Para la tipificación del HLA- DR  $\beta$ 1 se utilizó la técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR-SSP), mediante la utilización de Primers específicos de secuencia para diversos alelos como ha sido descrita por Bunce y col. (Bunce y col., 1995). (Ver Anexo 1) En la Tabla 3 se muestran los alelos estudiados.



**Tabla 3.** *Diferentes variantes alélicas del HLA- DR β1*

DRB1*01	
DRB1*02	DRB1*15
DRB1*02	DRB1*16
DRB1*03	DRB1*17
DRB1*03	DRB1*18
DRB1*04	
DRB1*05	DRB1*11
DRB1*05	DRB1*12
DRB1*06	DRB1*13
DRB1*06	DRB1*14
DRB1*07	
DRB1*08	
DRB1*09	
DRB1*10	

**II.3. Análisis estadístico.**

Para determinar el valor estadístico los resultados fueron analizados utilizando el test de Fisher. Un valor de p menor a 0,05 fue considerado significativo.

### **III. ROL DE LAS METALOPROTEINASAS EN LA QUERATOPATÍA CLIMÁTICA**

#### ***Estudio de Gelatinasas, Colagenasas e Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas en Lágrima de Pacientes con Queratopatía Climática***

Se evaluaron los niveles, formas moleculares y grado de activación de las MMP-2, MMP-9, MMP-8 y MMP-13, y sus inhibidores endógenos tisulares TIMP-1 y TIMP-2 en lágrimas de pacientes con queratopatía climática (QPC) que habitan en un área de la región noroeste de la Patagonia Argentina.

#### **III.1. Individuos**

Estudiamos 17 pacientes con QPC (16 varones y 1 mujer) y 10 controles (8 varones y 2 mujeres) que habitan en un área del noroeste de la Patagonia Argentina, descrita previamente en capítulos anteriores. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado, y el estudio fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación de la Clínica Universitaria Reina Fabiola de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina y registrado en el Registro Provincial de Investigación en Salud (RePIS) del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, Argentina. El estudio fue conducido de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

#### **III.2. Examen clínico oftalmológico**

Diecisiete pacientes (31 ojos) con QPC, y el grupo control sin la enfermedad (20 ojos), recibieron un examen oftalmológico completo (ver I.1.5.).

#### **III.3. Obtención de muestras de lágrima**

La producción lagrimal fue estimulada mediante una breve exposición del ojo a los vapores de rodajas frescas de cebolla. Se recolectaron entre 15 y 30 microlitros de lágrima refleja del menisco lagrimal inferior de cada ojo mediante tubos microcapilares descartables (Biocap, Argentina), produciendo la mínima irritación posible. Cada muestra fue congelada y conservada a -80° C hasta su análisis.

#### **III.4. Determinación de la concentración de proteínas en lágrima**

La concentración total de proteínas en las muestras de lágrimas fue medida según técnica de Bradford.<sup>26</sup> Se utilizó una curva estándar de diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) diluída en el mismo buffer de las muestras de lágrima, y se analizó la absorción a 595 nm versus la concentración proteica. Los volúmenes de todas las muestras de lágrima fueron ajustados a fin de obtener la misma cantidad de proteínas para los análisis subsiguientes.

#### **III.5. Determinación de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en muestras de lágrima**

Ver Anexo 2.

#### **III.6. Colagenasas (MMP-8 y MMP-13) y TIMP-1 y TIMP-2 en lágrima**

Los niveles de MMP-8 fueron determinados mediante inmunofluorofotometría, como ha sido previamente descrito. (Holopainen y col., 2003; Hanemaaijer y col., 1997; Chen y col., 2000) (Ver Anexo 2)

#### **III.7. Análisis estadístico**

Los datos zimográficos de las gelatinasas fueron expresados en píxeles por microgramo de proteína, y los datos de las colagenasas y TIMP fueron evaluados densitométricamente de los Western blots. Los resultados fueron evaluados mediante el test Mann-Whitney. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

## **IV. ESTUDIO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA**

Con el objeto de determinar si los pacientes portadores de QPC habitaban en áreas con mayor irradiación UV-B que en otras áreas en donde no observamos QPC, estudiamos la densidad de la capa de ozono y la irradiación UV-B de diferentes regiones (al sur, centro y norte) en el territorio de la Argentina, pero de condiciones ambientales y características geográficas similares.

### **IV.1. Regiones geográficas estudiadas**

Se estudió la densidad de la capa de ozono y la irradiación UV-B promedio anual en los últimos 8 años (1998 a 2005 inclusive) en la región de Aguada Guzmán (40°S 68°O), departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro, en la región de Sumampa (29°S 63°O), Pcia. de Santiago del Estero, y en la región de Cieneguillas (22°S 65°O), Puna, Pcia. de Jujuy. Las tres regiones poseen en común la gran aridez, la escasa humedad ambiente, los vientos constantes (de menor intensidad y constancia en la región de Sumampa), la escasa o nula vegetación arbórea y las características arenosas y arcillosas del suelo cubierto por muy escasa vegetación arbustiva. Por otra parte, la actividad de los pobladores de dichas áreas es similar, dedicándose en su mayoría a tareas rurales vinculada con la cría de ganado ovino y/o caprino.

### **IV.2. Determinación de la densidad de la capa atmosférica de ozono**

Se determinó la densidad promedio de la capa de ozono de los últimos 8 años (1998-2005) en esas tres regiones geográficas. Los valores de ozono correspondientes a dichas regiones geográficas elegidas se obtuvieron del sitio web de la National Aero-Spatial Agency (NASA, EE.UU.): Total Ozone Mapping Spectrometer (TOMS-NASA), <http://jwocky.gsfc.nasa.gov/> La densidad de la capa de ozono se mide en unidades Dobson (uD), y los valores varían dependiendo de la latitud y la altitud, considerándose valores normales el rango entre 230 y 300 uD. Agujero de la capa de ozono se refiere a cuando la densidad de la capa de ozono en una determinada región se halla por debajo de 200 uD.

### **IV.3. Determinación de la irradiación UV-B a nivel de superficie terrestre**

Por cada año estudiado se obtuvieron cuatro medidas: una el 21 de Marzo, una el 21 de Junio, una el 21 de Septiembre y una el 21 de Diciembre. Con esas cuatro mediciones se obtuvo la media anual. Con los valores obtenidos de ozono se calcularon los valores de radiación UV-B a nivel suelo de cada una de las tres regiones estudiadas mediante el programa de computación DayLight, versión 2.3.10, diseñado por Martin Schuster, del Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie, Universidad Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Alemania, 2000-2001, para calcular los niveles de radiación UV-B. (Björn y Murphy, 1985)

Se evaluó sólo la radiación UV-B ya que la radiación UV-C es absorbida prácticamente en su totalidad por la atmósfera terráquea, y la radiación UV-A es absorbida sólo escasamente (6-20 %) por la córnea. En cambio, la radiación UV-B es absorbida en gran parte (22-73 %) por la córnea. La unidad para la radiación UV-B es el KiloJoule/m<sup>2</sup>, y no existen estudios que hayan establecido cuáles son los valores normales de radiación UV-B a nivel superficie terrestre.

A todos los pacientes examinados en las áreas geográficas estudiadas se les interrogó sobre su actividad laboral, sobre la utilización de anteojos y sobre la utilización de sombreros alados o gorros con visera.

Los valores obtenidos fueron evaluados mediante el test de ANOVA en bloque. Se consideraron diferencias significativas cuando se obtuvo una  $p < 0,05$ .

## **V. EL ÁCIDO ASCÓRBICO Y SU POSIBLE ROL EN LA QUERATOPATÍA CLIMÁTICA**

### **V.1. Individuos**

En la localidad de Aguada Guzmán, Pcia. de Río Negro, se estudiaron 36 individuos que habitaban la región de El Cuy, de esa provincia: 23 eran pacientes portadores de QPC y 13 eran individuos sanos como controles. Se estudiaron también 22 individuos urbanos sanos de la ciudad de Córdoba. A todos ellos se les extrajo sangre por venopunción y se analizaron las concentraciones séricas de AA, colesterol, triglicéridos, ácido úrico y proteínas totales.

A todos los individuos se los interrogó, como parte de la anamnesis, acerca de sus hábitos dietéticos y composición de la dieta, no sólo la actual sino la dieta que ellos habían tenido desde su infancia hasta el presente.

Todos los individuos estudiados firmaron un consentimiento informado, y el estudio fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación de la Clínica Universitaria Reina Fabiola de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina y registrado en el Registro Provincial de Investigación en Salud (RePIS).

### **V.2. Estudio del ácido ascórbico en suero**

El AA fue estudiado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna LC-18 (25 cm de alto x 4,6 mm de diámetro con un tamaño de partícula de 5 µm) como ha sido descripto previamente (Serra y Cafaro, 2007). Los otros analitos fueron estudiados mediante métodos colorimétricos utilizando reactivos comerciales (Laboratorio GT y Laboratorio Wiener).

### **V.3. Análisis estadístico**

Los resultados fueron comparados utilizando el test de Student, considerando diferencia significativa un valor de  $p < 0,05$ .

# *CAPÍTULO 3*

## *Resultados*

## **I. ESTUDIOS CLÍNICOS OFTALMOLÓGICOS EN DIFERENTES REGIONES DE LA ARGENTINA**

### **I.1. REGIÓN DE AGUADA GUZMÁN**

#### **I.1.1. Demografía**

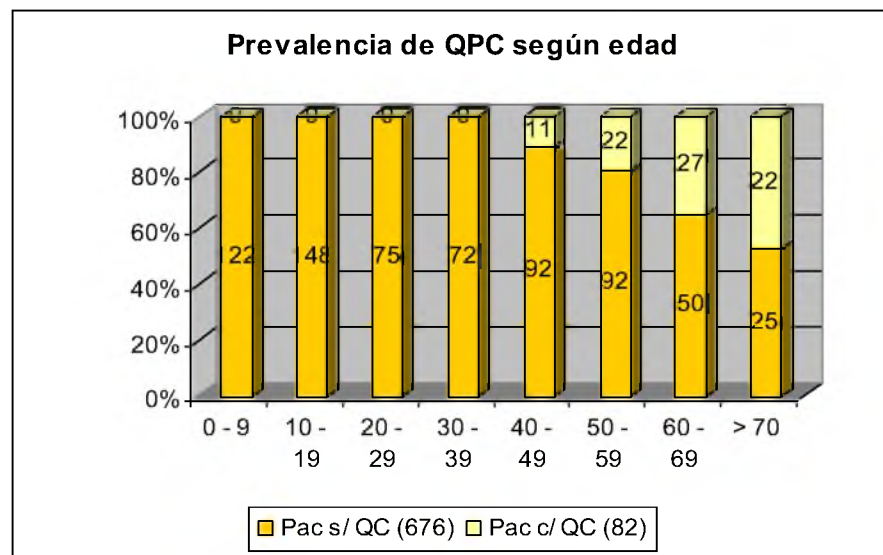
En total se examinaron 758 pacientes (1.514 ojos, 2 pacientes con 1 ojo enucleado cada uno), cuya edad media fue de 33,15 años (rango= 1,3 meses a 89 años), y de los cuales 411 fueron mujeres y 347 varones.

Del total de pacientes examinados, 82 (10,82 %) presentaron QPC, de los cuales 17 pacientes no habían tenido QPC en el examen inicial. En la Tabla 4 se puede observar el número de pacientes nuevos examinados en cada año de campaña y los casos nuevos de QPC diagnosticados cada año. La edad media de los pacientes con QPC fue de 61,71 años (rango= 40 a 89 años). En el gráfico de la Figura 8 se observa la relación entre grupo etario y pacientes con QPC, y en la Tabla 5 la prevalencia de QPC según grupo etario, en donde se muestra claramente el aumento de la prevalencia de QPC con la edad. De los 82 pacientes, 71 (86,58 %) fueron varones y 11 fueron mujeres (Figura 9). En la Figura 10 se puede observar la distribución por género según el grupo etario.



**Tabla 4.** Prevalencia de queratopatía climática (QPC) por año de campaña.

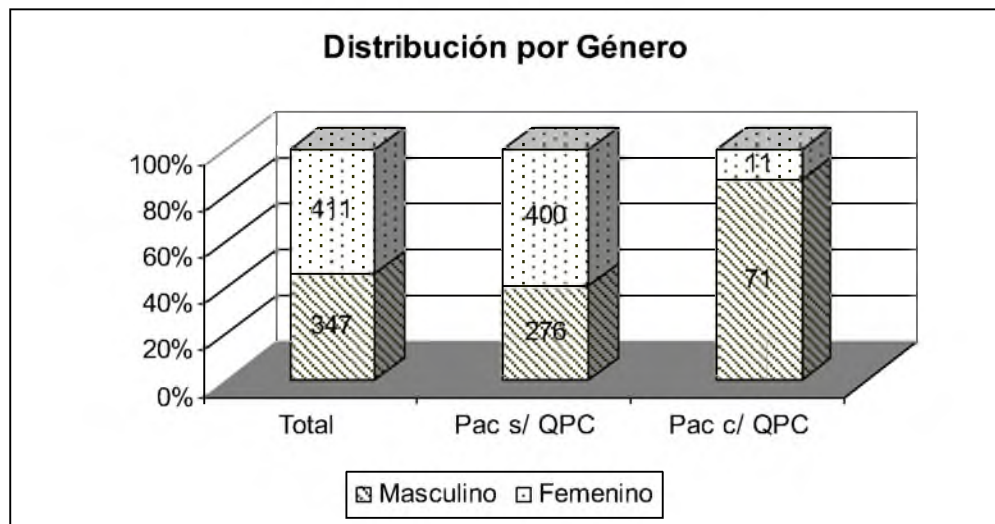
Año de campaña	Pacientes nuevos	Pacientes nuevos con QPC	%
1997	199	13	6,53
1998	165	10	6,06
1999	34	3	8,82
2001	88	5	5,68
2003	91	13	14,28
2006	81	9	11,11
2007 (x2)	100	12	12,00



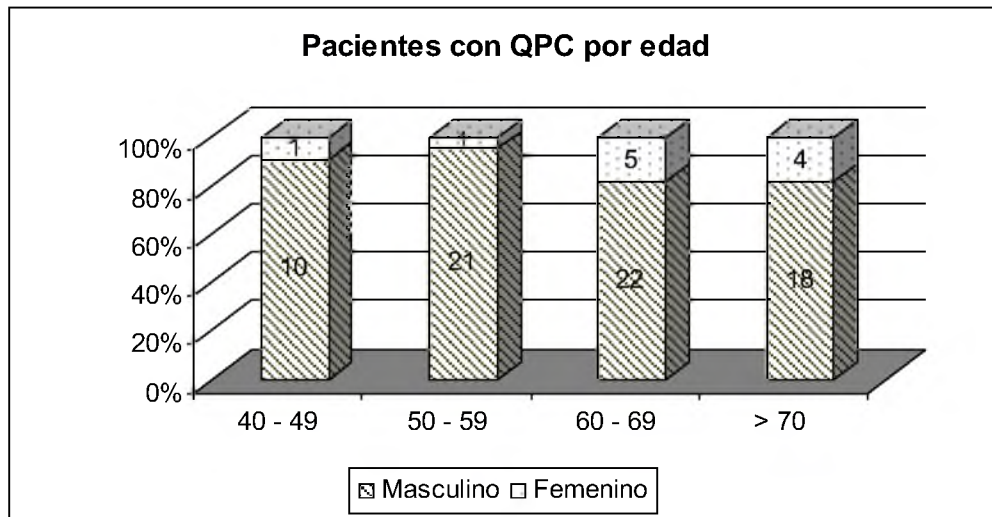
**Figura 8.** Relación entre grupo etario y pacientes sin (Pac s/QPC) y con queratopatía climática (Pac c/QPC).

**Tabla 5.** Prevalencia de queratopatía climática según grupo etario.

Edad (en años)	Total	Pacientes sin QPC	Pacientes con QPC	%
40 - 49	103	92	11	10,68
50 - 59	114	92	22	19,30
60 - 69	77	50	27	35,06
70 - 89	47	25	22	46,81
Totales	341	259	82	24,05



**Figura 9.** Distribución por género en el total de pacientes examinados, y en los pacientes sin (pac s/QPC) y con queratopatía climática (Pac c/QPC).

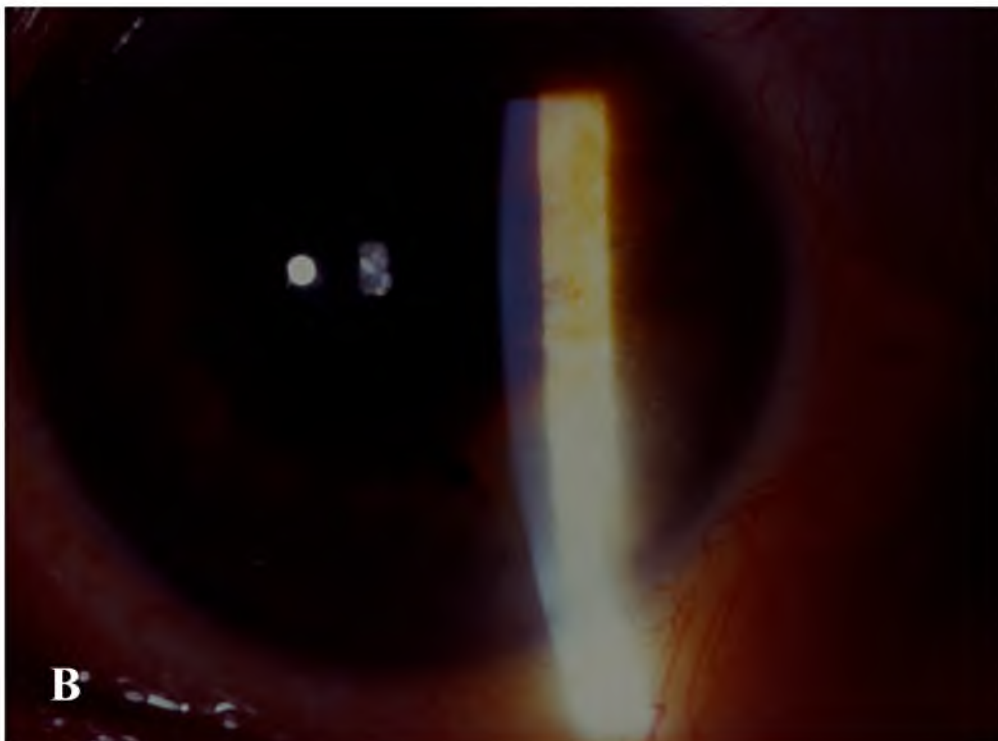
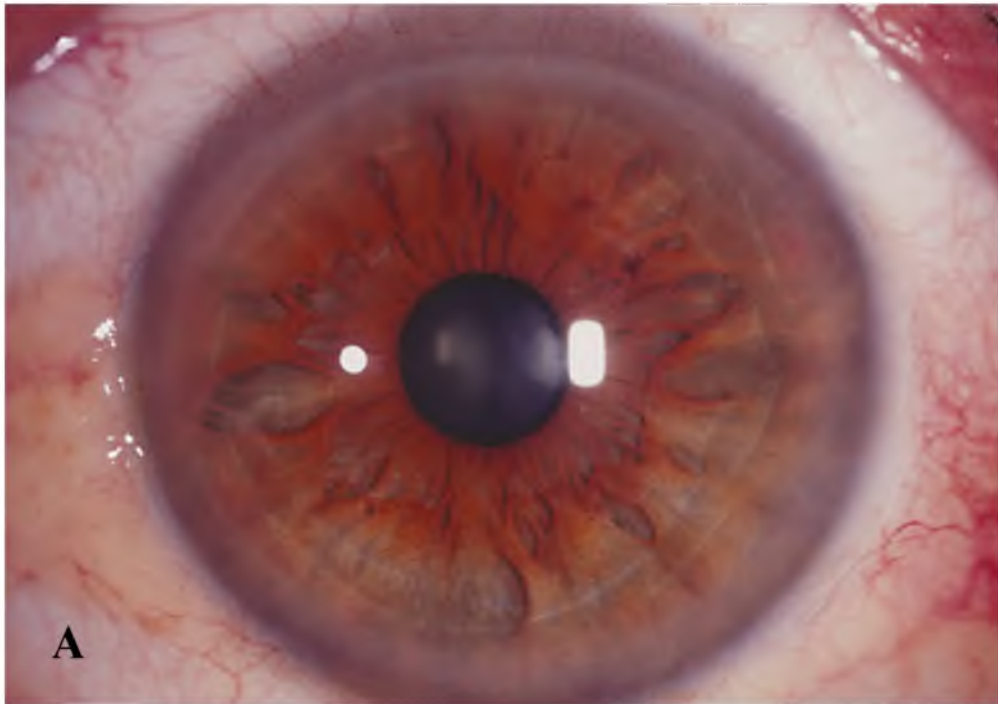


**Figura 10.** Distribución por género según grupo etario en pacientes con queratopatía climática (QPC).

### I.1.2. Hallazgos clínicos

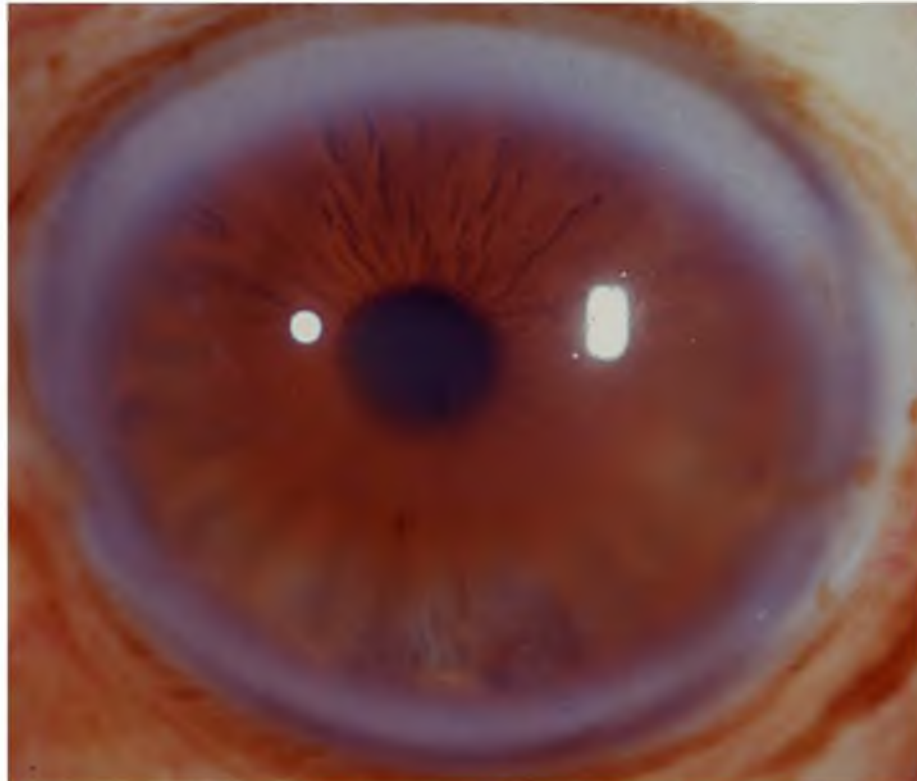
Para la estadificación de los hallazgos clínicos de la córnea, se excluyeron 9 de los 82 pacientes con QPC debido a inconsistencias de los datos vertidos en las historias clínicas correspondientes, relacionadas con grado, extensión o severidad de las lesiones, quedando 73 pacientes (139 ojos). En 66 pacientes (90,41 %) la QPC fue bilateral, siendo notablemente asimétrica en 7 pacientes. La enfermedad fue unilateral en 7 pacientes, de los cuales 3 tenían el ojo contralateral atrófico de causa ignorada. En uno de estos ojos atróficos se observaron pequeñas gotitas amarillentas subepiteliales dispersas en una córnea completamente opacificada y retraída, por lo que dicho hallazgo fue considerado como degeneración esferoidea secundaria y no QPC.

**Clasificación de las lesiones corneales provocadas por microgotas subepiteliales:** 92 (66,19 %) ojos de los 139 presentaron una enfermedad *grado 1*, es decir velamiento de la córnea por microgotitas translúcidas subepiteliales distribuidas apretadamente a nivel periférico temporal y/o nasal (Figura 11 A), dejando, casi siempre, una franja o espacio claro prelimbar aparentemente indemne (Figura 11 B).



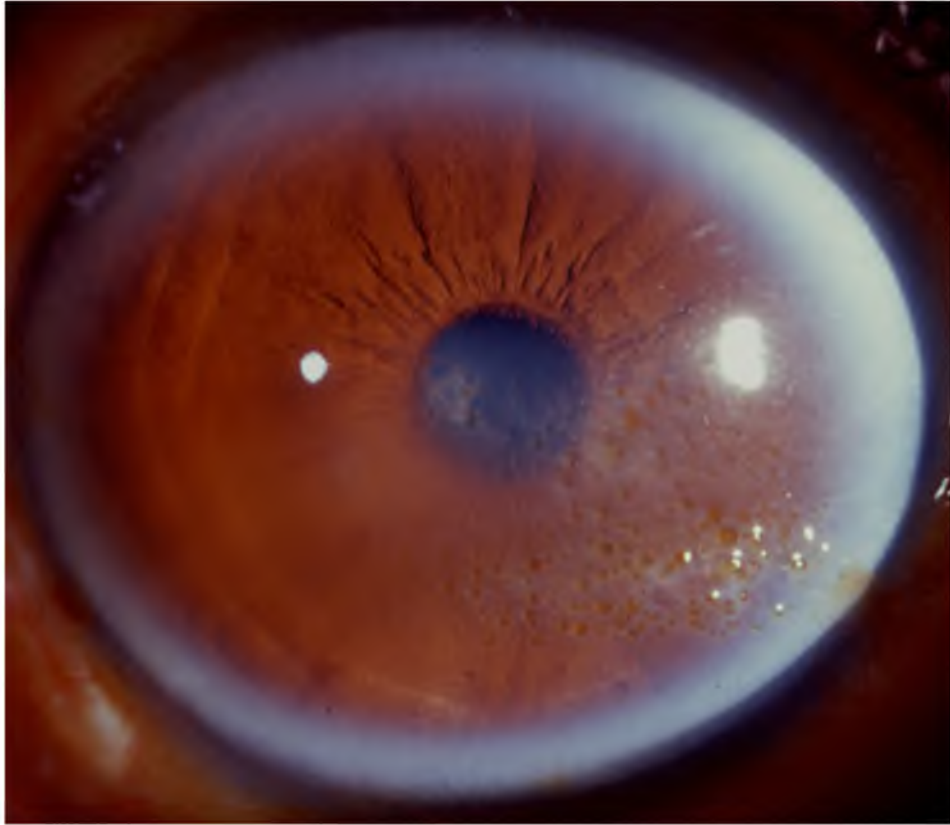
**Figura 11.** (A) Ojo con *grado 1*, con discreto velamiento periférico en los meridianos horizontales. (B) Mismo ojo, en el que se observa a mayor aumento y retroiluminación con la lámpara de hendidura, microgotitas que producen el aspecto de empañamiento de la córnea afectada, y la franja prelimbar de córnea aparentemente indemne.

Treinta y cinco ojos (25,18 %) presentaron una enfermedad *grado 2*, es decir velamiento por microgotitas translúcidas en forma de banda de limbo a limbo, dejando también una franja prelimbar aparentemene indemne, y distribuida en el 1/3 a los 2/3 inferiores de la córnea (Figura 12).



**Figura 12.** Ojo con queratopatía climática grado 2, en el que se observa un velamiento difuso de la mitad inferior de la córnea. Nótese la mejor visibilidad de los detalles del iris a través de la mitad superior normal de la córnea.

Doce ojos (8,63 %) presentaron una enfermedad *grado 3*, es decir alteraciones como las descritas en el grado 2, a lo que se agregaban gotitas o vesículas amarillas o ambarinas confluentes, agrupándose por sectores en racimos (Figura 13).



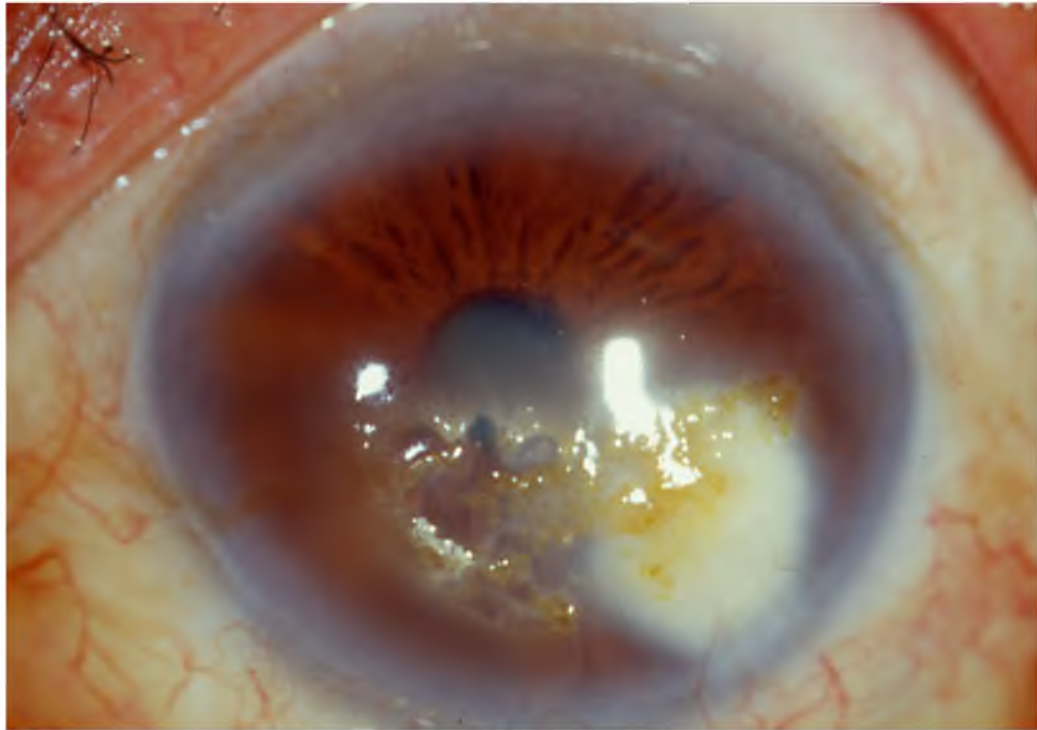
**Figura 13** Ojo izquierdo con queratopatía climática *grado 3*, en el que se observan múltiples vesículas amarillentas subepiteliales agrupadas en el cuadrante temporal inferior de la córnea, y distribuidas en un área extensa de velamiento que compromete la mitad inferior de la córnea. Nótese el borramiento de los detalles del iris en esta área, en comparación con la mitad superior.

En este último grupo, 5 ojos presentaron áreas de opacidad discreta, moderada o marcada del estroma anterior, con zonas de engrosamiento y zonas de adelgazamiento estromal, subyacentes a las áreas en donde se observaban las vesículas amarillas (Figura 14). En 3 de estos 5 ojos se observaron finos vasos sanguíneos que llegaban a esa área de fibrosis estromal, provenientes del limbo esclero-corneal adyacente (Figura 14).

**Evolución de las lesiones corneales.** De los 73 pacientes con QPC incluidos en el análisis de las lesiones corneales, 51 (69,86 %) fueron controlados en más de una campaña. De ellos, 25 (49 %) presentaron algún grado de QPC en el primer control, y el resto desarrolló la enfermedad durante el período de seguimiento. El promedio de seguimiento fue de 6,5 años (rango= 2 a 10 años).



En 4 (7,84 %) de los 51 pacientes con QPC que tuvieron un seguimiento, mostraron una progresión de *grado 1* a *grado 2*. El promedio de seguimiento de estos pacientes fue de 6 años (rango= 3 a 8 años). No se observaron progresiones de *grado 2* a *grado 3*.



**Figura 14.** Ojo izquierdo con queratopatía climática *grado 3*, en el que se observan múltiples vesículas amarillentas confluentes, distribuidas sobre un área de opacidad estromal con vasos sanguíneos provenientes del limbo esclero-corneal entre hora 4 y 5.

En la Tabla 6 se puede observar la distribución de los grados de compromiso corneal en los diferentes grupos etarios.

**Tabla 6.** Grados de enfermedad corneal según grupo etario.

Edad (en años)	Número de ojos (82 pacientes)	Grado 1	Grado 2	Grado 3
40 – 49	13	13	0	0
50 – 59	48	33	9	6
> 60	78	46	26	6
Total	139	92	35	12

**Áreas claras:** 56 (40,29 %) de los 139 ojos presentaron pequeñas áreas circulares o geográficas claras, de córnea aparentemente indemne, en el interior de áreas de velamiento por microgotitas, y a través de las cuales se observaban con nitidez los detalles del iris, borrados éstos en las zonas aledañas por el velamiento subepitelial. Su distribución fue aleatoria, observándolas tanto a nivel central como periférico (Figura 15).

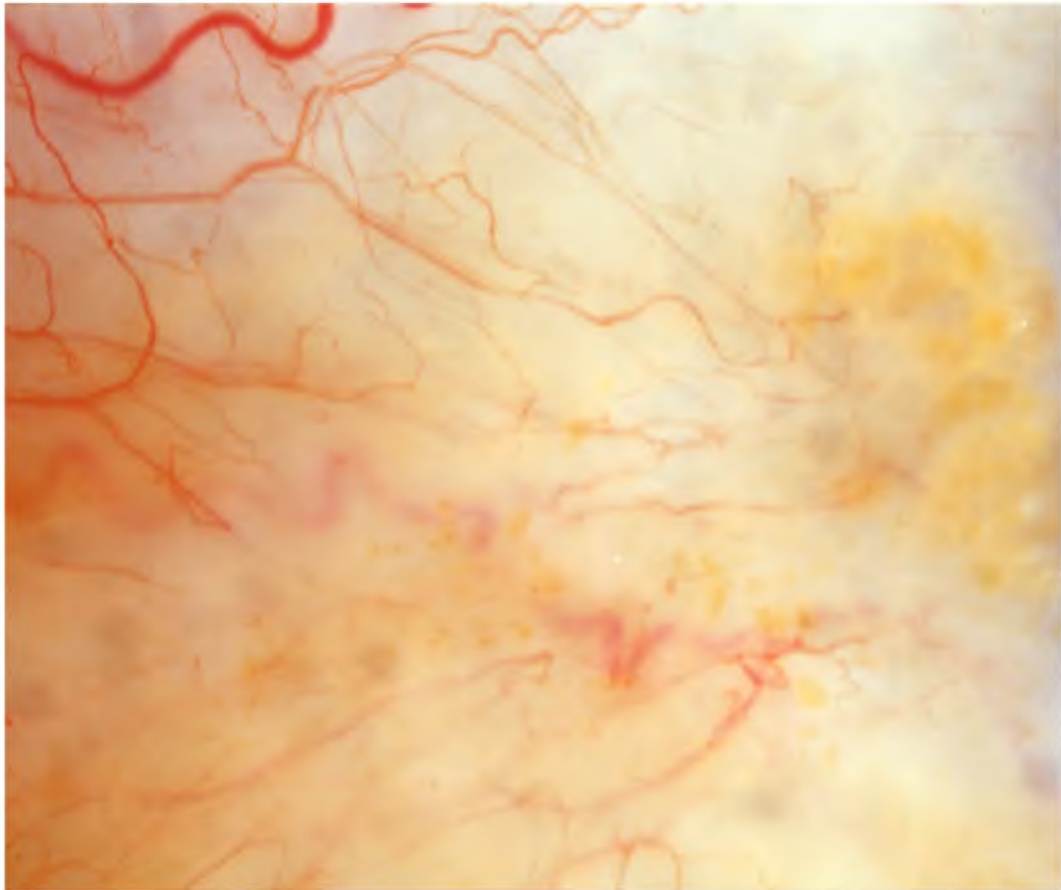


**Figura 15.** Ojo izquierdo con queratopatía climática *grado 2*, con pequeño espacio claro redondo paracentral nasal, a través del cual puede observarse con más nitidez el iris.

**Depósitos conjuntivales en forma de gotitas amarillas:** del total de pacientes examinados sólo 4 presentaron gotitas amarillentas en la conjuntiva bulbar, de los cuales 2 pacientes (0,30 %) del grupo de los 676 pacientes sin QPC y 2 pacientes del grupo de los 82 pacientes con QPC (2,44 %). Uno de estos 2 últimos pacientes presentó inicialmente sólo las lesiones en la conjuntiva, desarrollando posteriormente la enfermedad corneal. Las lesiones conjuntivales se distribuían en la conjuntiva bulbar temporal y/o nasal, a nivel yuxta o paralimbar



(Figura 16). En todos los pacientes con QPC, salvo uno, presentaron una conjuntiva tarsal superior e inferior completamente sana. En dicho paciente, que relató una historia de conjuntivitis severa en ambos ojos, se observaron discretas áreas de fibrosis conjuntival a nivel tarsal superior en ambos ojos.



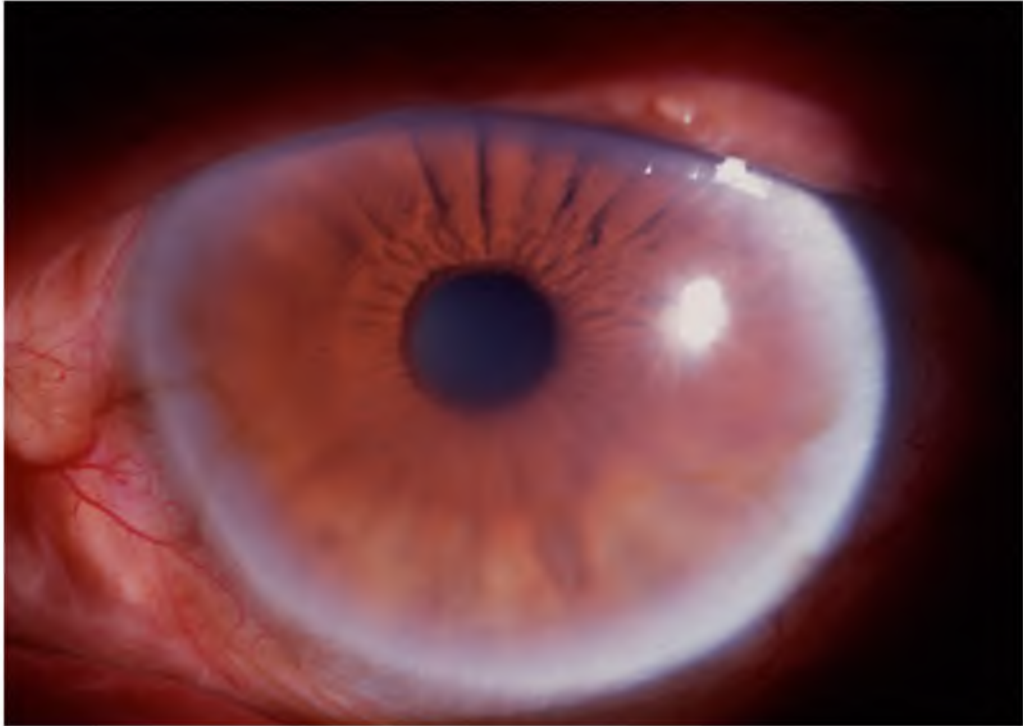
**Figura 16.** Fotografía de conjuntiva bulbar nasal, en donde se observan pequeñas gotitas amarillas en un paciente sin queratopatía climática.

**Atrofia del iris:** Una lesión curiosa, y no descripta previamente, fue observada a nivel del estroma anterior del iris inferior, predominantemente entre los meridianos de las 4 y las 8, consistiendo en una discreta depigmentación del estroma anterior, a lo que se la denominó atrofia discreta (Figura 17). Cuando la depigmentación provocaba el aspecto de pérdida de la textura suave de la cara anterior del iris se la denominó atrofia moderada (Figura 18). Por último, cuando la pérdida de las capas más anteriores del iris permitía ver su estructura

subyacente (vasos radiados, finas bandas colágenas radiadas, nervios), se la denominó atrofia marcada (Figura 19). En ningún caso esta alteración del iris provocó alteración de la forma o motilidad de la pupila. Tampoco se observaron síndromes de dispersión pigmentaria asociados, salvo un caso que presentaba, además de una atrofia marcada, un síndrome pseudoexfoliativo. En todos los casos, la cámara anterior tenía una profundidad biomicroscópicamente normal. El 28,78 % de los ojos de los pacientes con QPC presentaban atrofia del iris, mientras que no fue observada en pacientes sin QPC.



**Figura 17.** Atrofia discreta del iris en un caso con queratopatía climática *grado 3*



**Figura 18.** Atrofia moderada del iris en un caso con queratopatía climática *grado 2*.



**Figura 19.** Atrofia marcada del estroma anterior del iris inferior en un caso con queratopatía climática *grado 3*.

### I.1.3. Agudeza visual

Veinte (27,4 %) de los 73 pacientes con QPC analizados presentaron una agudeza visual corregida en su mejor ojo igual o inferior a 3/10 (discapacidad visual severa). En 15 (20,55 %) pacientes con QPC la agudeza visual corregida en su mejor ojo fue igual o inferior a 1/10 (ceguera legal). Por el contrario, ninguno de los pacientes de 40 años o más sin QPC presentaron agudezas visuales por debajo de 4/10 en su mejor ojo.

Cuando se analizaron individualmente los ojos con QPC, se observó que 9 (9,78 %) ojos de los 92 ojos con *grado 1*, 25 (71,43 %) ojos de los 35 ojos con *grado 2*, y 10 (80,33 %) ojos de los 12 ojos con *grado 3*, presentaron una agudeza visual corregida igual o inferior a 3/10, y que 4 (4,35 %) ojos con *grado 1*, 21 (60 %) con *grado 2* y 7 (58,33 %) con *grado 3*, presentaron una agudeza visual corregida igual o inferior a 1/10.

### I.1.4. Estudios de ojo externo

**Demografía.** La edad media de la subpoblación de pacientes estudiados con QPC era de 67,69 años (rango= 47 a 84 años), y la de los individuos controles de 61,23 años (rango= 50 a 74 años). Los pacientes con QPC fueron mayoritariamente varones (21 de 23), y casi todos (21 de los 23) eran trabajadores rurales.

**Sensibilidad corneal.** La sensibilidad de la córnea se correlacionó con el grado de compromiso corneal, observándose que a mayor grado de la enfermedad, mayor fue la disminución de la sensibilidad corneal ( $r = -0,5$ ;  $p = 0,0008$ ) (Tabla 7). Ninguno de los controles presentó anomalías de la sensibilidad corneal.

**Tabla 7.** Relación entre grado evolutivo de la queratopatía climática y sensibilidad corneal.

Sensibilidad corneal en ojos queratopatía climática	Grado 1 (n=16)	Grado 2 (n= 21)	Grado 3 (n=5)
0 a 2= Severamente alterada	0	4	2
3 y 4= Moderadamente alterada	6	4	3
5 y 6= Normal	10	13	0

**TRP, tinción superficial con verde de lisamina y test de Schirmer II.** Cuando los pacientes con QPC fueron evaluados como un solo grupo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos y los controles. Así, una discreta a moderada tinción corneal y/o conjuntival con verde de lisamina fue observada en 12 (28,57 %) de los 42 ojos con QPC y en 15 (57,69 %) de los 26 ojos controles. No obstante, cuando los resultados del TRP y la tinción con verde de lisamina fueron analizados considerando los pacientes con diferentes grados de compromiso corneal, se hallaron diferencias significativas entre el *grado 3* y el *grado 1*, el *grado 3* y el *grado 2*, y el *grado 3* y los controles (TRP:  $p=0,0057$ ;  $p=0,0042$ ;  $p=0,0038$  respectivamente; verde de lisamina:  $p=0,0071$ ;  $p=0,0062$ ;  $p=0,0164$ ). Cuando este tipo de análisis se realizó para el test de Schirmer II, no hubo en ningún caso diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resultados de las pruebas de ojo externo en ojos de pacientes con queratopatía climática y ojos de individuos controles.

<b>Prueba</b>	<b>Controles</b> (n= 26)	<b>QPC</b> (n= 42)	<b>Grado 1</b> (n= 16)	<b>Grado 2</b> (n= 21)	<b>Grado 3</b> (n= 5)
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
<b>TRP</b> (segundos)	10,5 ± 4,61	7 ± 5,18	10,31 ± 4,57	9,81 ± 4,11	3,2 ± 2,49
<b>Tinción</b>					
<b>Superficial</b> (unidades)	0,8 ± 0,76	1,3 ± 0,89	0,36 ± 0,72	0,38 ± 0,74	1,8 ± 0,45
<b>Schirmer II</b> (mm)	11,9 ± 6,79	11 ± 7,27	10,69 ± 4,85	10,29 ± 5,08	15,8 ± 6,94

QPC: queratopatía climática; DE: desviación estándar; TRP: test de ruptura precorneal; mm: milímetros.

### I.1.5. Otras alteraciones oculares asociadas

Una *pingüecula* fue observada en 48 (65,75 %) de los 73 pacientes con QPC, mientras que en 104 (40,15 %) de los 259 pacientes de 40 años o más sin QPC ( $p= 0,0001$ ;  $OR= 2,86$ ;  $IC= 1,67-4,91$ ). Un *pterygion* fue observado en 12 (16,44%) de los pacientes con QPC, y en 29 (11,20 %) de los pacientes sin QPC ( $p= 0,2293$ ;  $OR= 1,56$ ;  $IC= 0,76-3,20$ ). La gran mayoría de los pacientes presentaron alguna de dichas alteraciones en ambos ojos. Una *pseudoexfoliación capsular* fue observada en 4 (5,48 %) de los pacientes con QPC, y en 9 (3,47 %) de los pacientes sin QPC ( $p= 0,4355$ ;  $OR= 1,61$ ;  $IC= 0,51-5,10$ ). Una *catarata* fue observada en 22 (30,14 %) de los pacientes con QPC, y en 42 (16,22 %) de los pacientes sin QPC ( $p= 0,0077$ ;  $OR= 2,23$ ;  $IC= 1,23-4,04$ ).

Un *glaucoma crónico de ángulo abierto* fue diagnosticado en uno o ambos ojos de 4 (5,48 %) de los 73 pacientes con QPC, y en 14 (5,40 %) de los 259 pacientes de 40 años o más sin QPC.

Ninguno de los 758 pacientes examinados en las 8 campañas presentó alteraciones degenerativas de la mácula, sean éstas hereditarias o adquiridas.

**I.1.6. Análisis del agua**

De cada uno de los análisis se realizaron las combinaciones hipotéticas para determinar la posible combinación de los electrolitos dentro del agua, y así poder predecir sus comportamientos en los organismos vivos (Tabla 9).

**Tabla 9.** *Combinaciones obtenidas en base a los análisis realizados a diferentes muestras de agua de consumo de Aguada Guzmán y zonas aledañas, y a agua potable de red de la ciudad de Córdoba.*

Combinación	Pozo/red de agua analizado/a					
	Pelusa	Bernardo Guecamburu	Jorge Taux	Nilo Aranda	Doña Chiquita	Meyer Michi
Bicarbonato de Calcio (mg/l)	395.56	518.77	402.05	415.02	213.99	415.02
Bicarbonato de Magnesio (mg/l)	184.41	-	76.11	228.32	52.69	
Bicarbonato de Sodio (mg/l)	-	-	-	47.05	238.60	305.81
Carbonato de Magnesio (mg/l)	1.69	-	16.87	-	-	
Carbonato de Sodio (mg/l)	40.28	-	-	-	-	
Sulfato de Calcio (mg/l)	-	767.28	-	-	-	
Sulfato de Magnesio (mg/l)	-	577.82	43.34	-	-	
Sulfato de Sodio (mg/l)	390.63	-	434.69	322.44	396.31	176.85
Cloruro de Magnesio (mg/l)	-	414.27	-	111.06	-	
Cloruro de Sodio (mg/l)	101.71	422.04	109.89	7.46	121.58	50.85
Cloruro de Potasio (mg/l)	7.46	-	2.98		5.96	6.71

Tabla 9 (cont.)

Combinación	Pozo/red de agua analizado/a			
	Miguez Michi	Escuela	Flia. Colin	Agua Potable Córdoba
Bicarbonato de Calcio (mg/l)	421.50	564.16	570.65	64.85
Bicarbonato de Magnesio (mg/l)	-	228.32	231.24	29.27
Bicarbonato de Sodio (mg/l)	-	43.69	-	8.40
Carbonato de Magnesio (mg/l)	-	-	-	-
Carbonato de Sodio (mg/l)	-	-	-	-
Sulfato de Calcio (mg/l)	434.61	-	-	-
Sulfato de Magnesio (mg/l)	428.55	-	2.41	-
Sulfato de Sodio (mg/l)	639.95	568.18	832.44	-
Cloruro de Magnesio (mg/l)	-	-	-	-
Cloruro de Sodio (mg/l)	467.05	230.33	308.64	11.11
Cloruro de Potasio (mg/l)	6.71	8.95	29.82	3.35



## I.2. REGIÓN DE SUMAMPA

### I.2.1. Demografía

De los 154 pacientes examinados, 100 (64,94 %) fueron mujeres y 54 (35,06 %) fueron varones. La edad promedio fue de 50,23 años (rango= 2 a 93 años) (Ver Tabla 10). Ciento cinco (68,18 %) pacientes tenían 40 años de edad o más.

**Tabla 10.** Distribución según grupo etario de los pacientes examinados en Sumampa (Pcia. de Santiago del Estero).

Grupo Etario	Pacientes n= 154	%
0 a 9	4	2,6
10 a 19	16	10,39
20 a 29	16	10,39
30 a 39	13	8,44
40 a 49	14	9,09
50 a 59	36	23,38
60 a 69	23	14,93
70 a 79	18	11,69
80 a 89	12	7,79
90 a 99	2	1,30

### I.2.2. Hallazgos clínicos

Ninguno de los pacientes presentó QPC, como tampoco atrofia sectorial del iris inferior.

En 49 (31,82 %) pacientes se observó una pinguécula, en 22 (14,28 %) pacientes un pterigion, en 39 (25,32 %) pacientes catarata, en 6 (3,90 %) pacientes se observó una pseudoexfoliación capsular, y en 17 (11,04 %) pacientes un glaucoma crónico de ángulo abierto.

En 5 ojos de 5 pacientes se observaron cicatrices corneales o leucomas. Ninguno de esos ojos presentó degeneración esferoidea secundaria.

### **I.3. REGIÓN DE CIENEGUILLAS**

#### **I.3.1. Demografía**

De los 152 pacientes examinados, 97 (64 %) fueron mujeres y 55 (36 %) varones, con una edad promedio de 30,7 años (rango= 1 a 88 años) (Ver Tabla 11).

De los 152 pacientes, 48 tenían una edad igual o superior a 40 años, de los cuales 29 fueron mujeres y 19 fueron varones

**Tabla 11.** *Distribución según grupo etario de los pacientes examinados en Cieneguillas (Pcia. de Jujuy).*

<b>Grupo Etario</b>	<b>Pacientes n= 152</b>	<b>%</b>
0 a 9	28	18,42
10 a 19	35	23,03
20 a 29	18	11,84
30 a 39	22	14,47
40 a 49	13	8,55
50 a 59	14	9,21
60 a 69	13	8,55
70 a 79	5	3,29
80 a 89	4	2,63

### **I.3.2. Hallazgos clínicos**

Ninguno de los pacientes presentó QPC, como tampoco atrofia sectorial del iris inferior.

En 114 (37,5 %) ojos en 59 (38,82 %) pacientes se observó una pinguécula, en 24 (7,89 %) ojos en 15 (9,87 %) pacientes un pterigion, en 23 (7,57 %) ojos en 12 (7,90 %) pacientes se observó catarata, en 7 (2,30 %) ojos en 5 (3,29 %) pacientes se observó una pseudoexfoliación capsular, en los 2 (0,66 %) ojos en 1 (1,30 %) paciente un glaucoma crónico de ángulo abierto en ambos ojos, y en los 2 (0,66 %) ojos en 1 (1,30 %) paciente drusen maculares. En un (0,33 %) ojo atrófico se observó una degeneración esferoidea secundaria.

## II. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO

### II.1. Sistema ABO

En el grupo de pobladores del departamento el Cuy, Pcia. de Río Negro seleccionados al azar, el grupo sanguíneo preponderantemente hallado, tanto en pacientes (n= 45) como individuos controles (n=29), fue el grupo O (Tabla 12). Para simplificar la interpretación de los datos, y ante el marcado predominio del grupo O, se los agrupó en los O y en los No O (A, B, AB), apreciándose que entre los pacientes con QPC predominó el grupo O, mientras que en los controles los No O. No obstante, las diferencias halladas no fueron estadísticamente significativas (Tabla 13).

**Tabla 12.** Distribución de grupos sanguíneos O, A, B y AB en pacientes con QPC y controles de la región de El Cuy de la Patagonia Argentina.

<b>Individuos</b> <b>Sistema</b> <b>ABO</b>	<b>O (%)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>	<b>AB (%)</b>
<b>QPC</b>	29 (64,5)	7 (15,5)	7 (15,5)	2 (4,4)
<b>CONTROLES</b>	13 (44,8)	10 (34,5)	4 (13,8)	2 (6,9)

**Tabla 13.** Distribución de los grupos sanguíneos agrupados como O y No O en pacientes con QPC y controles de la región de El Cuy de la Patagonia Argentina.

<b>Individuos</b> <b>Sistema</b> <b>ABO</b>	<b>“O” (%)</b>	<b>No “O” (%)</b>
<b>QPC</b>	29 (64,5)	16 (35,5)
<b>CONTROLES</b>	13 (44,8)	16 (55,2)

Test de Fisher:  $p=0,149$ . Riesgo relativo= 1,44. 95% intervalo de confianza: 0,91 a 2,27

Ningún individuo examinado en Cieneguillas (Puna jujeña) presentó QPC. En un grupo ( $n=27$ ) seleccionado al azar del grupo total de individuos examinados oftalmológicamente, se realizó el estudio del sistema antigénico AB0, observándose un franco predominio de individuos portadores del grupo O (Tabla 14 y Tabla 15).

**Tabla 14.** Distribución de grupos sanguíneos O, A, B y AB en individuos de la región de Cieneguillas, Puna Jujeña.

<b>Sistema</b> <b>AB0</b>	<b>O (%)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>	<b>AB (%)</b>
<b>INDIVIDUOS</b>	19 (70)	5 (19)	3 (11)	0 (0)

**Tabla 15.** Distribución de los grupos sanguíneos agrupados como O y No O en individuos de la región de Cieneguillas, Puna Jujeña.

Sistema ABO	O (%)	No O (%)
INDIVIDUOS	19 (70)	8 (30)

## II.2. HLA- DR $\beta$ 1

Se realizó la genotipificación HLA- DR  $\beta$ 1 en 20 pacientes con QPC y en 20 individuos controles. Los resultados obtenidos en cada uno de los individuos se presentan en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Alelos HLA-DR $\beta$ 1 en pacientes con queratopatía climática (QPC) e individuos controles de la región de El Cuy de la Patagonia Argentina.

CONTROLES HLA-DR $\beta$ 1	PACIENTES QPC HLA-DR $\beta$ 1
*01 *11	*01 *13
*04 *04	*11 *01
*04 *04	*04 *04
*04 *01	*04 *11
*04 *08	*04 *16
*04 *16	*04 *16
*04 *13	*07 *17
*07 *08	*08 *09
*11 *11	*08 *13
*11 *16	*08 *14
*11 *15	*08 *14
*04 *08	*08 *17
*04 *08	*08 *17
*08 *11	*08 *17
*04 *14	*09 *17
*08 *16	*13 *17
*07 *17	*13 *14
*08 *11	*14 *16
*04 *16	*14 *14
*04 *04	*14 *16

Como se puede observar en la tabla 17, sólo hubo diferencias significativas entre pacientes y controles en los alelos HLA-DRβ1\*14 y HLA-DRβ1\*04.

**Tabla 17.** Distribución de alelos HLA-DRβ1 en pacientes con queratopatía climática (QPC) e individuos controles de la región de El Cuy de la Patagonia Argentina.

Individuos Alelo HLA-DRB1	*01	*15	*16	*17	*18	*11	*12	*07	*08	*09	*10	*04 +	*13	*14 ++
<b>QPC</b>	2	0	4	6	0	2	0	1	7	2	0	5	4	7
<b>CONTROLES</b>	2	1	4	1	0	7	0	2	7	0	0	14	1	1

Test de Fisher + (\*04): p= 0,03. Riesgo relativo= 0,35. 95% intervalo de confianza= 0,14 a 0,90

Test de Fisher ++ (\*14): p= 0,05. Riesgo relativo= 7. 95% intervalo de confianza= 0,9 a 54

La Tabla 18 muestra la genotipificación HLA-DRβ1 de veinte individuos que habitan la región de la Puna Jujeña. Tal como se puede observar en la Tabla 19 no hubo diferencia significativa entre la distribución de ninguno de los alelos entre individuos controles de la región patagónica de El Cuy y los individuos de la región de Cieneguillas.

**Tabla 18.** Alelos HLA-DRβ1 en individuos de la región de Cieneguillas, Puna Jujeña.

<b>HLA DRB1</b>
*04 *08
*04 *13
*04 *09
*04 *16
*04 *04
*04 *08
*04 *08
*04 *08
*04 *16
*04 *13
*04 *14
*04 *08
*08 *16
*08 *16
*09 *09
*08 *09
*11 *16
*11 *15
*17 *09
*17 *18

**Tabla 9.** Distribución de alelos HLA-DRβ1 estudiados en individuos controles de la región de Cieneguillas, Puna Jujeña y en individuos controles de la región patagónica de El Cuy.

<b>Alelos HLA-DRB1</b>	*01	*15	*16	*17	*18	*11	*12	*07	*08	*09	*10	*04	*13	*14
<i>Cieneguillas</i>	0	1	5	2	1	2	0	0	8	5	0	13	2	1
El Cuy	2	1	4	1	0	7	0	2	7	0	0	14	1	1



### III. ROL DE LAS METALOPROTEINASAS EN LA QUERATOPATÍA CLIMÁTICA

#### *Resultados del estudio de Gelatinasas, Colagenasas e Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas en Lágrima de Pacientes con Queratopatía Climática*

#### III.1. Demografía

La edad media de los pacientes con QPC en los que se estudiaron las MMP en lágrima era de 66,4 años (rango= 47-80 años), y la de los controles de 62,3 años (rango= 51-74 años). Un claro predominio de varones (16 de 17 pacientes) se observó entre los pacientes con QPC, siendo todos ellos trabajadores rurales.

#### III.2. Hallazgos clínicos

Catorce pacientes (82,4 %) presentaron una QPC bilateral, siendo asimétrica en 2 (14,3 %). Tres pacientes tenían una QPC unilateral, uno de los cuales era portador de una phthisis bulbo en el ojo contralateral, en el que se observaban pequeñas gotitas subepiteliales amarillentas dispersas sobre la córnea retraída y completamente opaca. Por ello, este ojo fue considerado como portador de una degeneración esferoidea secundaria y no de una QPC. El segundo paciente había sido enucleado del ojo contralateral debido a una aparente perforación espontánea de origen desconocido por el paciente, y el tercer paciente tenía normal su ojo contralateral.

Las alteraciones corneales fueron categorizadas en 3 grupos. El *grupo 1* incluyó 14 (45,2 %) de 31 ojos que presentaban QPC grado 1. El *grupo 2* incluyó 12 (38,7 %) ojos con QPC grado 2. El *grupo 3* incluyó 5 (16,1 %) ojos con QPC grado 3. La distribución de los diferentes grados de QPC y su relación con la edad de los pacientes se observan en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Distribución de los diferentes grados de compromiso corneal en relación a la edad en pacientes con queratopatía climática.

<b>EDAD</b> (en años)	<b>NÚMERO DE OJOS</b>	<b>GRUPO 1</b>	<b>GRUPO 2</b>	<b>GRUPO 3</b>
40-49	2	2	0	0
50-59	5	3	2	0
> 60	24	9	10	5
Total	31	14	12	5

El promedio de la mejor agudeza visual corregida en los 31 ojos con QPC fue 0,51 (rango 0,05-1,0). El promedio de la mejor agudeza visual corregida en los controles fue de 0,68 (rango 0,3-1,0). La mejor agudeza visual corregida de lejos en el mejor ojo fue  $\leq 0,3$  en 8 (47,05 %) de los 17 pacientes con QPC, y en 6 (35,29 %)  $\leq 0,1$ . En cambio, ninguno de los 10 pacientes controles tuvo una agudeza visual inferior a 0,3 en su mejor ojo.

La presión intraocular promedio fue de 13,5 mmHg (rango 5-22) en 31 ojos con QPC, y 13,8 mmHg (rango 10-18) en los controles.

Aparte de una retinopatía hipertensiva moderada encontrada en un paciente con QPC, los hallazgos fundoscópicos fueron normales tanto en pacientes con QPC como en los controles.

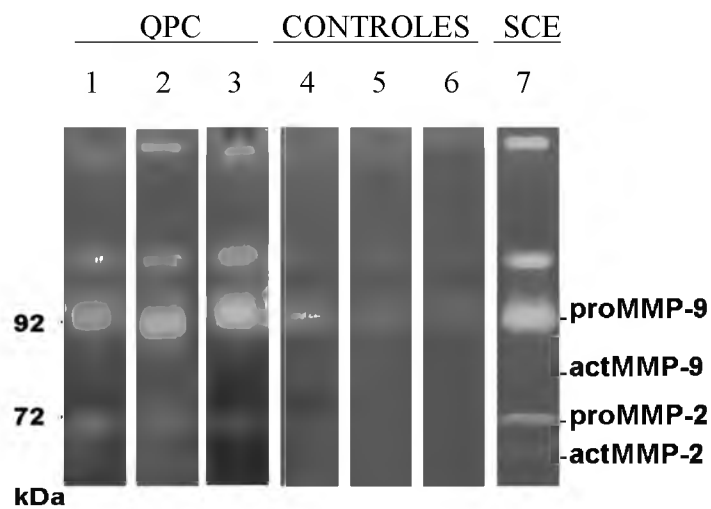
La sensibilidad corneal fue encontrada normal en 16 (51,61 %) de los 31 ojos con QPC, mientras que en 10 (32,25 %) se observó una hipoestesia moderada y en 5 (16,12 %) una hipoestesia severa. En cambio, todos los ojos controles tuvieron una sensibilidad corneal normal.

### III.3. Concentración de proteínas en lágrima

No se encontraron diferencias significativas en la concentración total de proteínas en lágrimas, tanto en pacientes con QPC (6,75 +/- 1,58 µg/µl) como en los controles (7,69 +/- 1,04 µg/µl). A excepción de la MMP-13, no se encontraron correlaciones entre el nivel total de proteínas y MMPs o proteínas totales y TIMPs.

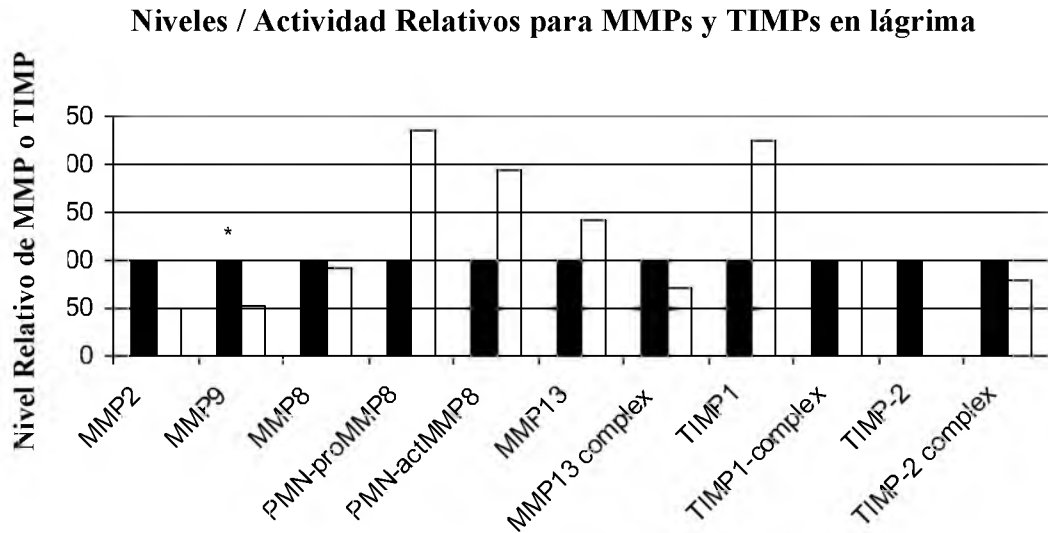
### III.4. Detección y caracterización de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y su grado de activación en lágrima

Las gelatinasas presentes en las muestras de lágrima fueron analizadas por zimografía, seguida de análisis densitométrico. El patrón de actividad de gelatinasa en lágrima en pacientes con QPC y en el grupo control se muestra en la Figura 1. Bandas gelatinolíticas típicas de 92 y 72 kDa fueron detectadas, correspondiendo a proMMP-9 y proMMP-2 respectivamente. Formas activas de peso molecular inferior a 10 kDa de MMP-2 o MMP-9 no se observaron en ninguno de los 2 grupos (Figura 20).



**Figura 20.** Zimografía representativa de muestras de lágrima de pacientes con QPC y controles. Las líneas 1 a 3 corresponden a lágrima de pacientes con queratopatía climática (QPC) y las líneas 4 a 6 a lágrimas de controles. En la línea 7, gelatinasas de sangre capilar entera (SCE) utilizada como control positivo. Las bandas gelatinolíticas de 92 y 72 kDa corresponden a proMMP-9 y proMMP-2, respectivamente.

Si bien la actividad media de la MMP-2 fue cerca del doble en los pacientes con QPC en relación con los controles, ello no fue estadísticamente significativo ( $p= 0,11$ ) (Figura 21 y Tabla 21). No obstante, la actividad de la proMMP-9 fue significativamente más alta en pacientes con QPC que en los controles ( $p= 0,04$ ) (Figura 21 y Tabla 21).



**Figura 21.** Análisis densitométrico relativo de MMPs en lágrima. Los niveles de MMPs en pacientes con QPC fueron ubicados en 100 % y luego se calcularon las diferencias relativas dividiendo los niveles de MMPs de los controles por los niveles de MMPs de pacientes con QPC. Esta diferencia se expresa como %.

**Tabla 21.** Actividades de gelatinasas medida en pacientes con QPC e individuos controles.

<b>Actividad de las Gelatinasas*</b>			
<b>MUESTRAS</b>	<b>QPC</b>	<b>CONTROLES</b>	<b>p</b>
MMP-9	$1.559 \pm 1.159$	$767 \pm 499$	0,04
MMP-2	$88 \pm 74$	$46 \pm 22$	0,11

\* Determinada como píxeles/ $\mu$ g de proteína bajo las zonas limpias en la zymografía, de acuerdo a como se describió en Material y Métodos.

### III.5. Niveles y formas moleculares de colagenasas (MMP-8 y MMP-13) y grado de activación en lágrima de pacientes con QPC

Las especies moleculares de MMP-8 (colagenasa 2) fueron analizadas mediante Western blot (Figura 22). Dos bandas inmunorreactivas fueron detectadas en aproximadamente 75 y 60 kDa en todas las muestras de lágrimas estudiadas, representando las formas latentes y activadas de la altamente glicosilada PMN MMP-8. (Hanemaaijer y col., 1997) En general, las isoformas menos glicosiladas de 45 a 55 kDa (Hanemaaijer y col., 1997) no fueron observadas, pero la MMP-8 latente mesenquimal fue observada en niveles bajos en un paciente con QPC y en un individuo control. La MMP-8 activa mesenquimal de 45 kDa se observó en un paciente con QPC.

En la inmunofluorometría, los niveles de MMP-8 en lágrimas de pacientes con QPC fueron encontrados iguales a los de los controles ( $358 \pm 362$  y  $329 \pm 363$   $\mu\text{g/l}$ , respectivamente:  $p=0,47$ ). Estos valores fueron 30 veces superiores que en individuos sanos urbanos de Finlandia, en los que los valores encontrados fueron  $10,1 \pm 20,8$   $\mu\text{g/l}$ . (Holopainen y col., 2003) Tanto las formas latentes como las activas de PMN MMP-8 fueron encontradas significativamente más altas en individuos controles en comparación con los pacientes con QPC (ambos  $p < 0,001$ , Figura 2, Tabla 3). El Western blot reveló también dos especies inmunorreactivas adicionales de alto peso molecular ( $> 120$  kDa) de complejo MMP-8 en la mayoría de las muestras, probablemente representando MMP-8 atrapadas por sus inhibidores endógenos (tanto TIMPs como  $\alpha 2$ -macroglobulina), dímeros MMP-8 y/o formas MMP-8 unidas a membrana. (Owen y col., 2004) Los niveles de estos complejos MMP-8 fueron cercanos al doble de elevados en los individuos controles. Se ha mostrado previamente que en individuos finlandeses sanos estos complejos MMP-8 de alto peso molecular están ausentes, mientras que en pacientes con erosiones corneales, y ocasionalmente en pacientes tratados mediante queratectomía fotorrefractiva, pueden ser encontrados. (Holopainen y col., 2003)

Una proteína de aproximadamente 65 kDa correspondiente a la proMMP-13 se encontró en cada muestra, y los niveles de esta enzima fueron encontrados significativamente más elevados en individuos controles que en pacientes con

QPC. No se observaron formas activas de MMP-13 de 45 kDa en alguna de las muestras estudiadas. Un complejo MMP-13 de alto peso molecular (>150 kDa) se observó en casi todas las muestras, con niveles ligeramente más elevados en individuos controles en comparación con pacientes con QPC (Figura 21, Tabla 22). Finalmente, se observaron inmunorreactividades difusas a 35 kDa, representando fragmentos de MMP-13. Los niveles de estos elementos eran tan bajos que una comparación significativa entre pacientes con QPC e individuos controles no se realizó.

**Tabla 22.** Niveles de colagenasa en lágrima medidos por ECL® Western blot.

Niveles de Colagenasas (U/μl)			
MUESTRAS	QPC	CONTROLES	p
Complejo PMN MMP-8	0,36 ± 0,30	0,69 ± 0,58	0,13
PMN proMMP-8	0,77 ± 0,45	1,83 ± 0,75	<0,001
PMN actMMP-8	1,87 ± 0,66	3,62 ± 1,10	<0,001
Complejo MMP-13	0,42 ± 0,40	0,53 ± 0,76	0,86
MMP-13	0,75 ± 0,54	1,06 ± 0,52	0,14

U/μl: unidades por microlitro

### III.6. TIMPs en lágrima de pacientes con QPC e individuos sanos.

El Western blot mostró la presencia de dos inhibidores de MMPs (TIMP-1 y TIMP-2) en lágrima (Figura 22). Los TIMP-1 mostraron una banda intensa a 28 kDa en 15 de 17 pacientes con QPC y en todos los individuos controles, representando una forma libre e intacta de TIMP-1. Más inmunotinciones a mayores pesos moleculares (>50 kDa) fueron observadas en casi todas las muestras (25/27) representando, eventualmente, TIMP-1 formando complejos con MMPs. El TIMP-2 mostró una inmunoreacción con una forma de 21 kDa en 7 de 17 pacientes con QPC, mientras que esta inmunoreacción no se observó en individuos controles. Más tinciones de los Western blots fueron observadas a más

de 50 kDa en cada muestra, representando TIMP-2 capturado por MMPs. Estos complejos estuvieron presentes en cada muestra estudiada.

Los niveles de TIMP-1 libres estaban el doble de elevados en individuos sanos en comparación con pacientes con QPC pero, debido a la amplia variación de estos niveles, el resultado no fue estadísticamente significativo ( $p= 0,07$ ) (Tabla 23). Los niveles de TIMP-1 formando complejos con MMPs fueron encontrados iguales en ambos grupos ( $p= 0,44$ ) (Tabla 23). Luego de ello, se procedió a estudiar los niveles de TIMP-2 libre. El TIMP-2 libre se detectó en 7 de 17 pacientes con QPC, pero en ninguno de los individuos controles. Esta diferencia en los niveles de TIMP-2 no fue estadísticamente significativa ( $p= 0,08$ ) (Tabla 23). Los niveles de complejos TIMP-2 fueron similares en ambos grupos, a pesar de una tendencia a niveles aumentados en pacientes con QPC ( $p= 0,29$ ) (Tabla 23).

Si bien el nivel total de TIMP (libre + complejo) era 4,6 veces más elevado en pacientes con QPC que en individuos controles, la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p= 0,33$ ), mostrando la amplia variación en los niveles medidos. En contraste, el nivel de TIMP libre (por ej. TIMP-1 libre + TIMP-2 libre) fue 7,6 veces más elevado en individuos controles que en los pacientes con QPC, pero, nuevamente, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p= 0,11$ ) (Tabla 22). Ambos TIMP se hallaban principalmente en sus formas complejas, y el TIMP-2 libre fue observado sólo en pacientes con QPC.

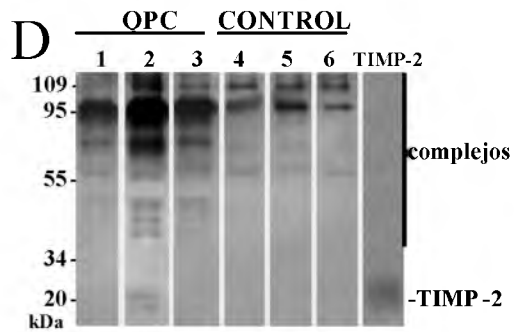
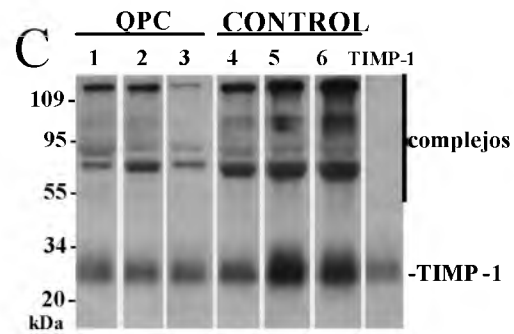
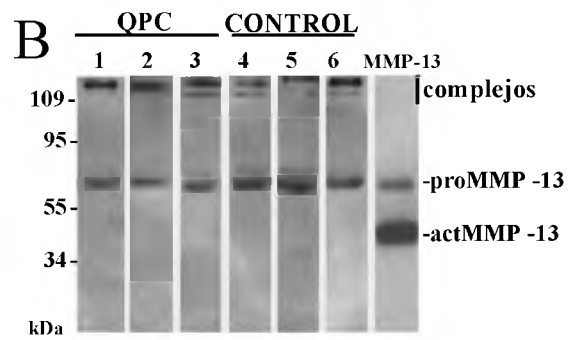
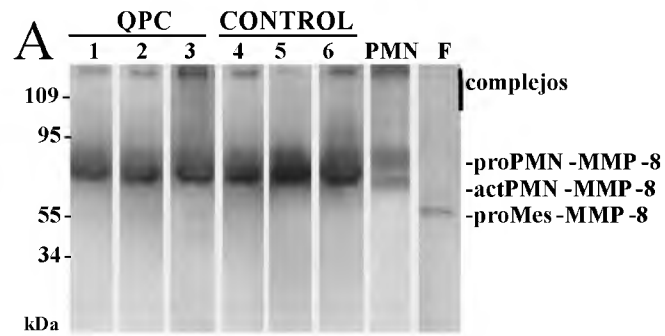
### III.7. Relación MMP / TIMP

En los tejidos, el balance entre los niveles de enzimas activadas y TIMPs libres determina la actividad global de las MMPs. No obstante, el mantenimiento del balance entre MMP y TIMP es un determinante crucial de la actividad proteolítica, y un incremento en la relación MMP/TIMP podría conducir a un aumento de la destrucción tisular. (Cederqvist y col., 2001) Si bien la mayor parte de las MMPs fue encontrada en sus formas latentes, consideramos que ello juega un rol en el mantenimiento de la superficie corneal, ya que la activación de numerosas MMPs puede ocurrir también en la superficie celular. (Nagase y Woessner, 1999) De ese modo, la secreción lagrimal puede ser considerada como

un reservorio de enzimas inactivas, las que pueden ser rápidamente convertidas en enzimas activas en función de los requerimientos. Por ello, calculamos las relaciones de las MMPs con las TIMPs para ambas TIMPs totales ( $TIMP_T$ ), y luego para las TIMPs libres ( $TIMP_L$ ). Estos datos se presentan en las Tablas 24 y 25. No observamos diferencia alguna entre pacientes con QPC e individuos controles para complejos PMN MMP-8 /  $TIMP_T$  ( $p= 0,29$ ) (Tabla 24). En contraste, niveles significativamente elevados de proMMP-8 /  $TIMP_T$  y MMP-8 activa /  $TIMP_T$  fueron observados en individuos controles en relación con pacientes con QPC ( $p<0,01$  y  $0,018$ , respectivamente) (Tabla 24). Niveles de MMP-13 /  $TIMP_T$  (ambas en complejos libre) fueron iguales en ambos grupos (Tabla 24). Las relaciones MMP-9 /  $TIMP_T$  y MMP-2 /  $TIMP_T$  fueron cercanas al doble más elevadas en pacientes con QPC en comparación con los individuos controles, pero esas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 24).

Debido a que la TIMP libre ( $TIMP_L$ ) determina la capacidad de unión de las MMPs de las lágrimas, determinamos las relaciones MMP / TIMP libre (Tabla 25). Los niveles de PMN MMP-8 /  $TIMP_L$  fueron hallados en similares cantidades en pacientes con QPC e individuos controles ( $p= 0,07-0,98$ ). No encontramos diferencias en los niveles MMP-13 /  $TIMP_L$ . Niveles proMMP-9 /  $TIMP_L$  y proMMP-2 /  $TIMP_L$  fueron 3 veces superior en pacientes con QPC en comparación con los individuos controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0,003$  y  $p= 0,024$ , respectivamente).





**Figura 22.** Western blots representativos de lágrimas de pacientes con queratopatía climática (QPC) y controles para MMP-8 (A), MMP-13 (B), TIMP-1 (C) and TIMP-2 (D). Líneas 1 a 3 lágrimas de QPC y líneas 4 a 6 lágrimas de controles.

PMN y F representan neutrófilos humanos y sobrenadantes de cultivos de fibroblastos sinoviales reumatoideos, respectivamente, que fueron utilizados como controles positivos para las isoformas de PMN MMP-8 y tipo fibroblasto (A); MMP-13 recombinante humana (B), TIMP-1 recombinante (C) y TIMP-2 recombinante (D) son utilizadas también como controles positivos. Las movilidades de los marcadores de peso molecular están indicadas sobre la izquierda.

**Tabla 23.** Niveles de inhibidor de metaloproteinasas de matriz (TIMP) medidos por ECL® Western blot en pacientes con QPC y controles.

Niveles de TIMP (U/ µl)			
MUESTRAS	QPC	CONTROLES	p
TIMP-1 libre	1,21 ± 1,10	2,73 ± 2,75	0,07
Complejos TIMP-1	3,74 ± 4,574	3,74 ± 2,84	0,44
TIMP-1 total	4,96 ± 5,19	6,47 ± 5,17	0,20
TIMP-2 libre	0,15 ± 0,28	0 ± 0	0,08
Complejos TIMP-2	6,10 ± 2,88	4,79 ± 3,45	0,29
TIMP-2 total	6,24 ± 2,98	4,79 ± 3,45	0,24

U/µl: unidades por microlitro

**Tabla 24.** Relaciones entre las diferentes MMPs / TIMPs totales ( $TIMP\ total = TIMP-1\ libre + complejo\ TIMP-1 + TIMP-2\ libre + complejo\ TIMP-2$ ).

<b>Relación MMP/total TIMP (TIMP-1 +TIMP-2)</b>			
<b>MUESTRAS</b>	<b>QPC</b>	<b>CONROLES</b>	<b>p</b>
Complejos PMN MMP-8	0,047 ± 0,06	0,074 ± 0,09	0,29
PMN proMMP-8	0,12 ± 0,17	0,23 ± 0,14	0,007
PMN actMMP-8	0,29 ± 0,42	0,46 ± 0,27	0,018
Complejos MMP-13	0,037 ± 0,03	0,033 ± 0,03	0,77
MMP-13	0,127 ± 0,25	0,132 ± 0,11	0,16
MMP-9	126,9 ± 79,4	73,54 ± 46,22	0,09
MMP-2	8,52 ± 6,81	4,71 ± 2,57	0,38

U/μl: unidades por microlitro

**Tabla 25.** Relaciones entre Gelatinasas y Colagenasas / TIMP libre (TIMP libre = TIMP-1 + TIMP-2).

Relación MMP / TIMP libre (TIMP-1 +TIMP-2)			
MUESTRAS	QPC	CONTROLES	p
Complejos PMN MMP-8	0,34 ± 0,33	0,32 ± 0,27	0,98
PMN proMMP-8	0,72 ± 0,51	1,09 ± 0,55	0,07
PMN actMMP-8	1,84 ± 1,13	2,39 ± 1,42	0,37
Complejos MMP-13	0,54 ± 0,77	0,18 ± 0,19	0,07
MMP-13	0,83 ± 0,86	0,59 ± 0,30	>0,99
MMP-9	1192,73 ± 691	372,06 ± 271,90	0,003
MMP-2	54,81 ± 40,63	18,60 ± 9,29	0,024

U/μl: unidades por microlitro

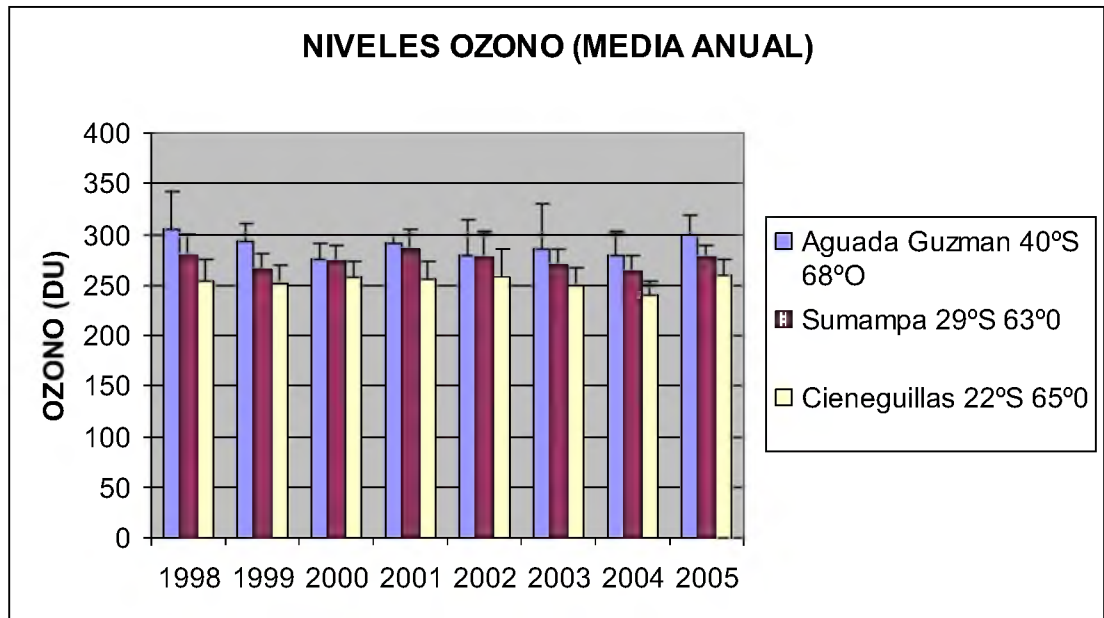
## IV. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y QUERATOPATÍA CLIMÁTICA

### IV.1. Niveles de densidad de la capa de ozono:

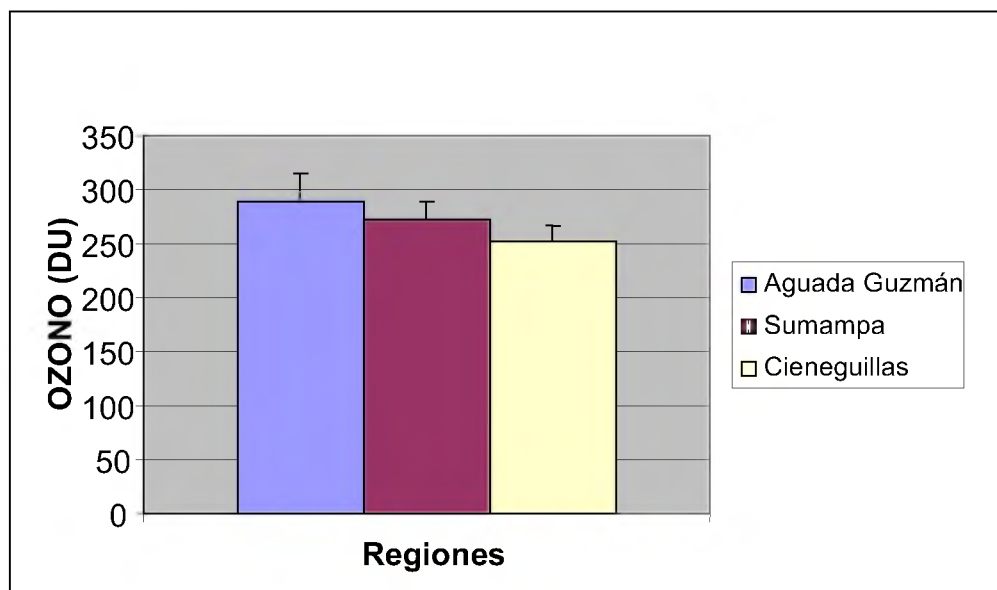
Los valores medios anuales de los niveles de ozono en las tres regiones estudiadas se expresan en la Tabla 26 y en la Figuras 23 y 24. Si bien se observaron discretas variaciones anuales para una misma región, todos los valores obtenidos se hallan dentro del rango considerado normal. Los valores medios anuales obtenidos tampoco difirieron en forma considerable entre las tres regiones. No obstante, los valores menores de densidad media fueron observados en la región de Cieneguillas.

**Tabla 26.** Densidades medias anuales y desviación estándar (DE) de la capa de ozono correspondientes a las regiones de Aguada Guzmán (Pcia. de Río Negro), Sumampa (Pcia. de Santiago del Estero) y Cieneguillas (Pcia. de Jujuy). Los valores expresados en la media corresponden a unidades Dobson.

AÑO	Aguada Guzmán 40°S 68°O		Sumampa 29°S 63°O		Cieneguillas 22°S 65°O	
	MEDIA	DE	MEDIA	DE	MEDIA	DE
1998	304,50	38,90	279,00	22,3	254,30	20,00
1999	293,00	18,31	265,50	16,3	252,30	17,90
2000	275,50	15,70	273,20	16,4	257,00	17,10
2001	290,75	9,03	285,00	19,2	256,30	17,10
2002	280,00	35,80	276,80	25,5	257,00	27,20
2003	285,25	46,10	269,50	16,4	250,00	18,00
2004	278,50	24,50	263,80	15,8	239,70	14,00
2005	298,50	19,80	276,50	11,9	258,67	15,63



**Figura 23.** Niveles anuales medios de la densidad de la capa de ozono de los ocho años estudiados en las regiones de Aguada Guzmán (Pcia. de Río Negro), Cieneguillas (Pcia. de Jujuy), y Sumampa (Pcia. de Santiago del Estero).



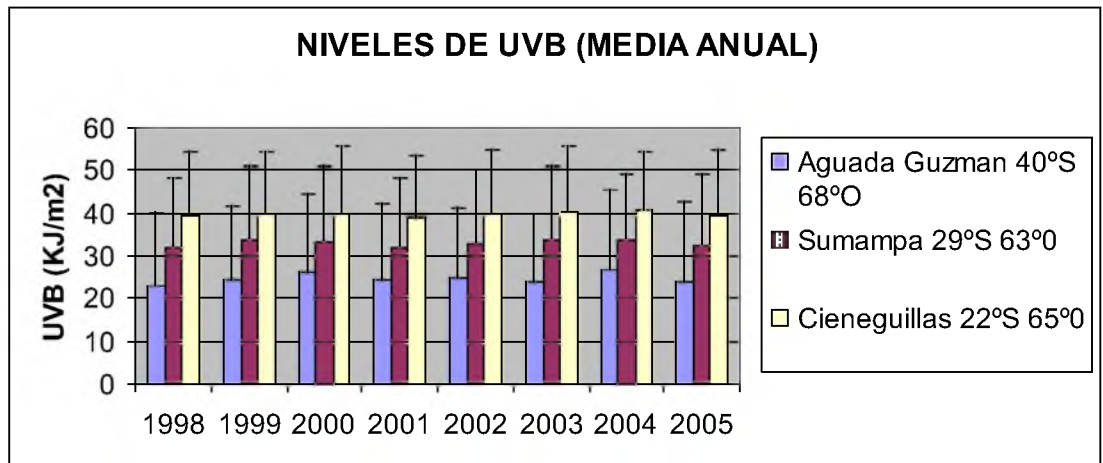
**Figura 24.** Niveles medios de la densidad de la capa de ozono de los años estudiados (1998 a 2005), en las regiones correspondientes a Aguada Guzmán, Pcia. de Río Negro, Cieneguillas, Pcia. de Jujuy, y Sumampa, Pcia. de Santiago del Estero.

#### IV.2. Niveles de radiación UV-B

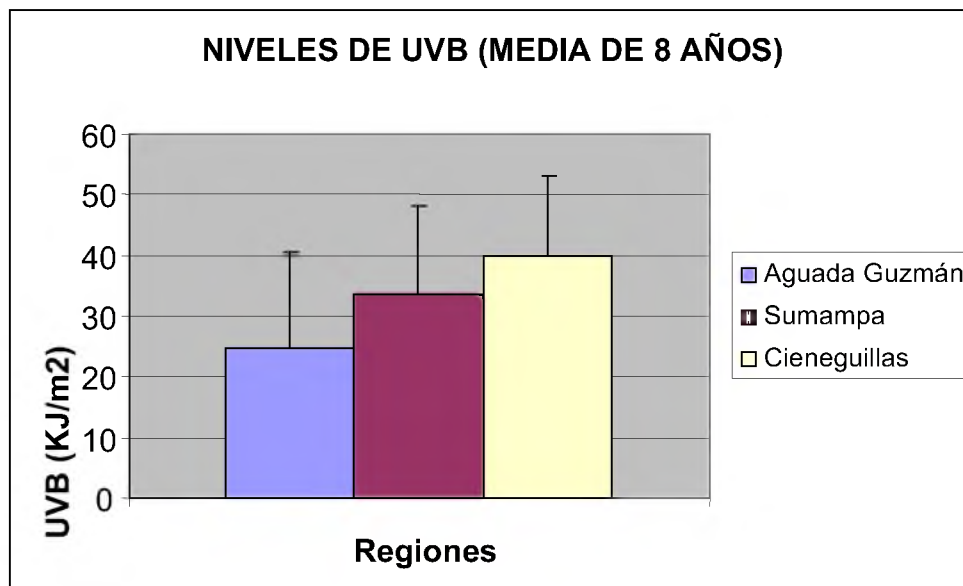
Una vez obtenidos los valores de ozono se calculó la irradiación UV-B media por año, expresada en KiloJoules/m<sup>2</sup> (ver Tabla 27 y Figuras 25 y 26). Los estudios comparativos de los valores medios anuales de cada zona en los diferentes años estudiados, y entre las diferentes regiones, no presentaron diferencias significativas. La media de los 8 años evaluados para Aguada Guzmán fué de 24,66 KJ/m<sup>2</sup> (DE 17,63), para Sumampa de 32,94 KJ/m<sup>2</sup> (DE 16,83) y para Cieneguillas de 39,80 KJ/m<sup>2</sup> (DE 14,89). Como puede notarse, los niveles más altos de irradiación UV-B correspondieron a la región de Cieneguillas.

**Tabla 27.** Niveles medios (expresados en KiloJoules/m<sup>2</sup>) y desviación estándar (DE) de la irradiación UV-B en las regiones de Aguada Guzmán, Sumampa y Cieneguillas, entre los años 1998 y 2005.

	<b>Aguada Guzman 40°S 68°O</b>		<b>Sumampa 29°S 63°O</b>		<b>Cieneguillas 22°S 65°O</b>	
<b>AÑO</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>
1998	22,95	17,56	32,06	16,29	39,53	14,91
1999	24,22	17,31	33,89	17,37	39,79	13,01
2000	26,06	18,53	33,17	17,70	39,95	15,89
2001	24,26	18,02	31,76	16,50	39,04	14,27
2002	24,69	16,77	32,77	17,44	39,68	15,05
2003	24,13	15,55	33,68	17,27	40,27	15,05
2004	26,93	18,76	33,65	15,55	40,78	13,51
2005	24,06	18,53	32,56	16,51	39,40	15,41



**Figura 25.** Niveles anuales medios de la irradiación UV-B en los años estudiados (1998 al 2005), en las regiones correspondientes a Aguada Guzmán (Pcia. de Río Negro), Cieneguillas (Pcia. de Jujuy) y Sumampa (Pcia. de Santiago del Estero).



**Figura 26.** Niveles medios de 8 años (1998 a 2005) de la irradiación UV-B en las regiones de Aguada Guzmán (Pcia. de Río Negro), Sumampa (Pcia. de Santiago del Estero) y Cieneguillas (Pcia. de Jujuy).



Una mínima proporción de los pacientes examinados en la región de Aguada Guzmán utilizaba sombrero o gorra con visera, mientras que casi la totalidad de los adultos mayores varones y mujeres en Cieneguillas utilizaban sombrero alado (Figura 27).



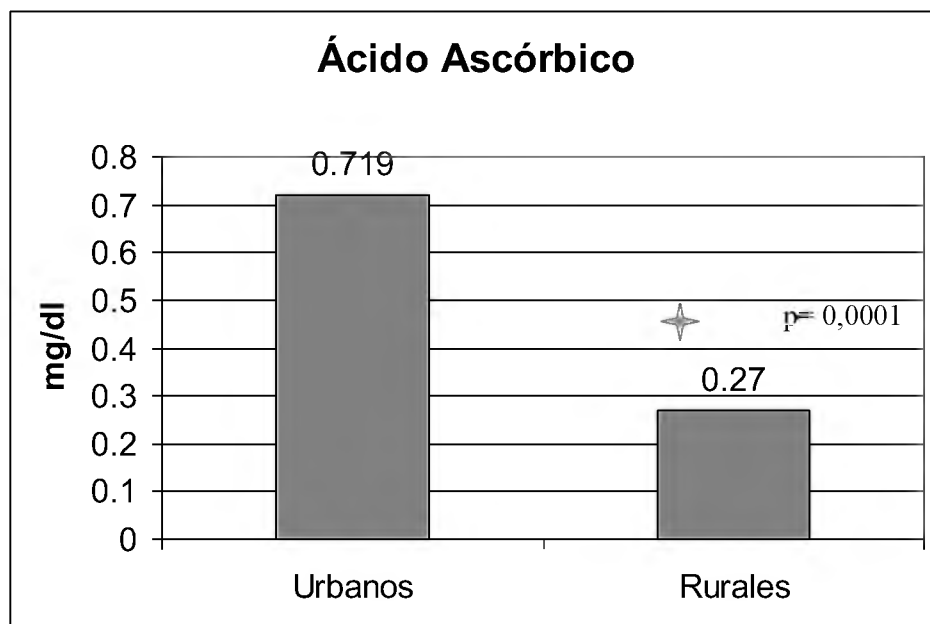
**Figura 27.** Utilización de sombrero alado en adultos mayores de Cieneguillas (Pcia. de Jujuy).

## V. EL ÁCIDO ASCÓRBICO

### V. 1. Hábitos dietéticos

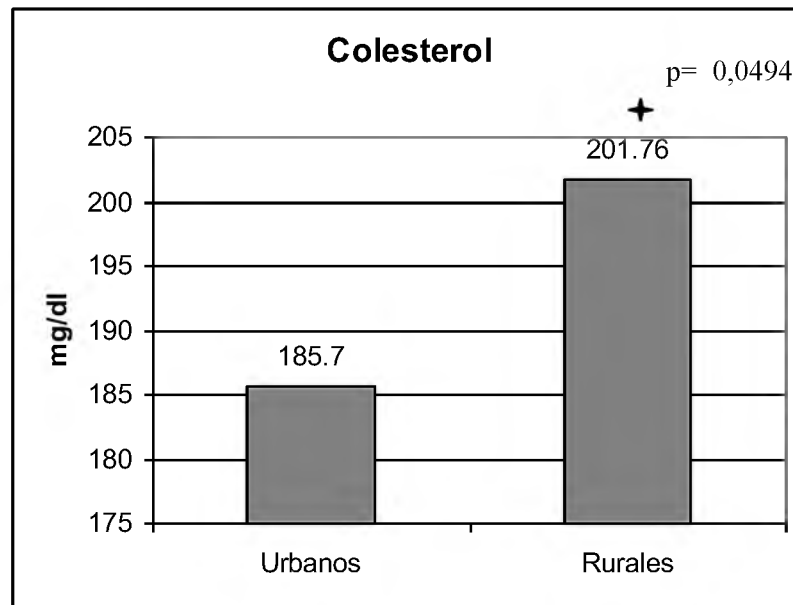
La totalidad de los individuos rurales, tanto los pacientes con QPC como los controles, refirieron tener, y haber tenido desde siempre, una dieta constituida casi en forma exclusiva de carne de cordero, tanto hervida como asada, a razón de 2 veces al día, acompañada muy excepcionalmente de verduras o frutas. Refirieron, también, ingerir muy ocasionalmente escasas cantidades de leche vacuna o caprina. Los individuos urbanos refirieron, en su totalidad, alimentarse mediante una dieta relativamente equilibrada, aunque rica en carne vacuna.

**V.2. Ácido ascórbico sérico.** Las concentraciones séricas de AA no mostraron diferencias entre pacientes con QPC e individuos rurales controles. En ambos grupos rurales se encontró un valor medio de 0,27 mg/dl (DE= 0,133), mientras que en los individuos urbanos de la ciudad de Córdoba se encontró un valor medio de 0,719 mg/dl (DE= 0,446) ( $p= 0,0001$ ). (Figura 28)



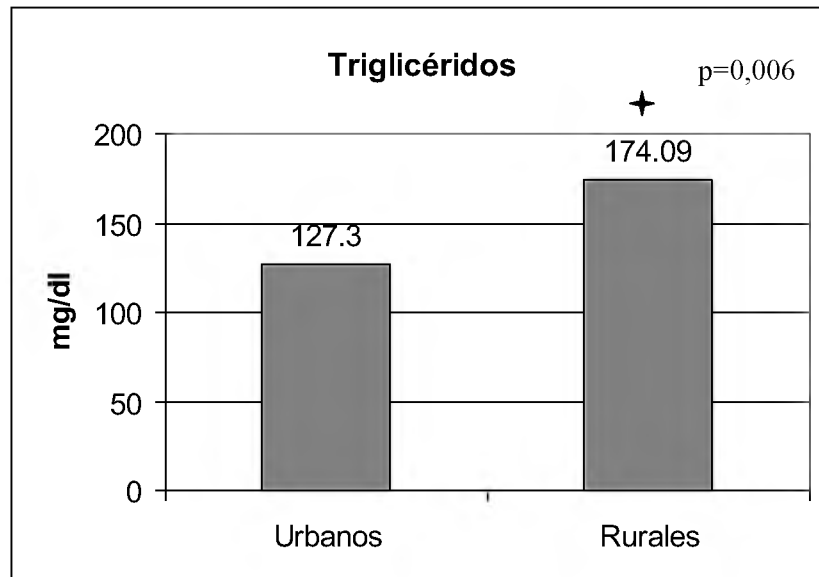
**Figura 28.** Gráfico en donde se compara la concentración sérica de ácido ascórbico en individuos urbanos de la ciudad de Córdoba (Urbanos) e individuos rurales de la región del Departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro (Rurales).

**V.3. Colesterol sérico.** No se encontraron diferencias entre pacientes con QPC e individuos rurales controles. La concentración media del colesterol sérico en el grupo de individuos rurales fue de 201,76 mg/dl (DE= 28,8) mientras que en los individuos urbanos de la ciudad de Córdoba fue de 185,7 mg/dl (DE= 23,2) ( $p= 0,0494$ ). (Figura 29)



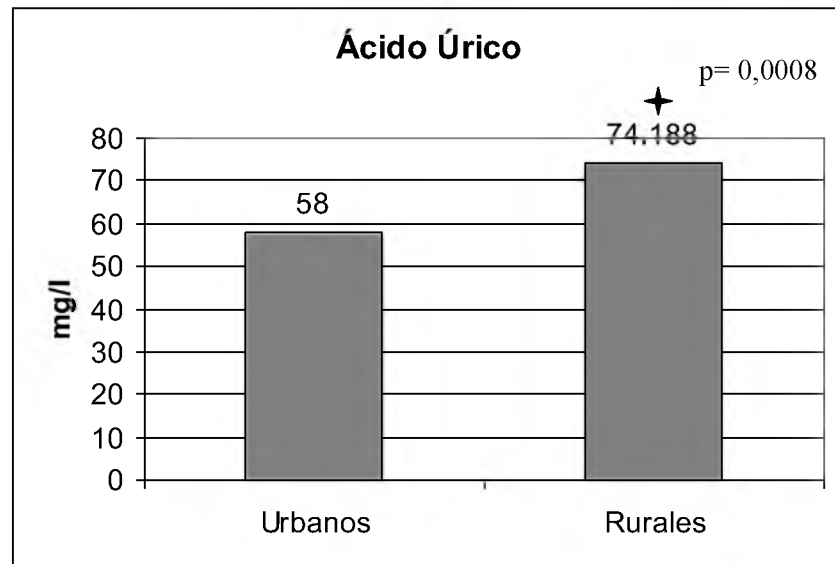
**Figura 29.** Gráfico en donde se compara la concentración sérica de colesterol total en individuos urbanos de la ciudad de Córdoba (Urbanos) e individuos rurales de la región del Departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro (Rurales).

**V.4. Triglicéridos séricos.** Tampoco se encontraron diferencias entre pacientes con QPC e individuos rurales controles. La concentración media de los triglicéridos en suero en el grupo de individuos rurales fue de 174,09 mg/dl (DE= 67,3) mientras que en los individuos urbanos fue de 127,3 mg/dl (DE= 28,03) ( $p= 0,006$ ). (Figura 30)



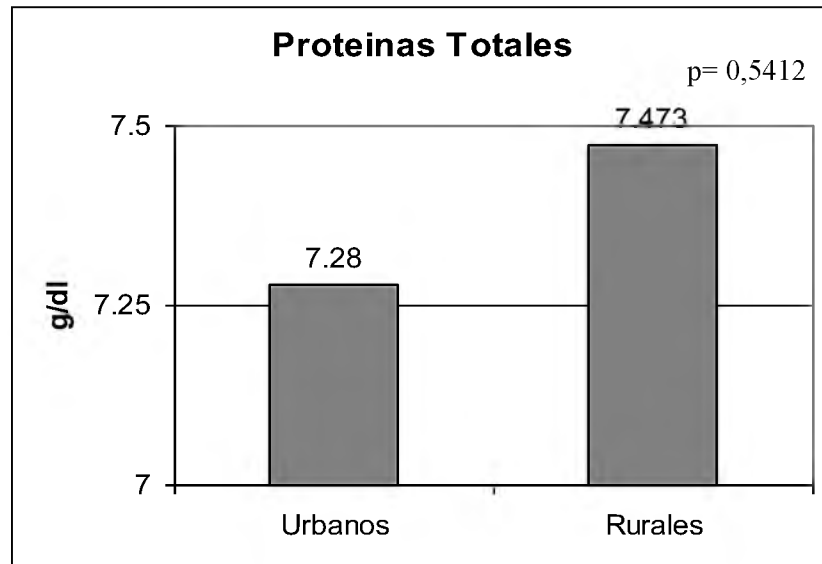
**Figura 30.** Gráfico en donde se compara la concentración sérica de triglicéridos en individuos urbanos de la ciudad de Córdoba (Urbanos) e individuos rurales de la región del Departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro (Rurales).

**.5. Ácido úrico.** Tampoco se encontraron diferencias entre pacientes con QPC e individuos rurales controles. La concentración media de ácido úrico en suero en el grupo de individuos rurales fue de 74,188 mg/l (DE= 16,8), mientras que en los individuos urbanos fue de 58 mg/l (DE= 13,45) ( $p= 0,0008$ ). (Figura 31)



**Figura 31.** Gráfico en donde se compara la concentración sérica de ácido úrico en individuos urbanos de la ciudad de Córdoba (Urbanos) e individuos rurales de la región del Departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro (Rurales).

**V.6. Proteínas totales.** No se encontraron diferencias entre pacientes con QPC e individuos rurales controles. Tampoco se encontraron diferencias entre pacientes con QPC e individuos rurales controles. La concentración media de proteínas totales en suero en el grupo de individuos rurales fue de 7,473 g/dl (DE= 0,46), mientras que en los individuos urbanos fue de 7,28 g/dl (DE= 0,45) ( $p= 0,5412$ ). (Figura 32)



**Figura 32.** Gráfico de barras en donde se compara la concentración sérica de proteínas totales en individuos urbanos de la ciudad de Córdoba (Urbanos) e individuos rurales de la región del Departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro (Rurales)

# *CAPÍTULO 4*

## *Discusión*

## *DISCUSIÓN*

La QPC es observada rara vez en una población urbana. No obstante, ha sido encontrada como altamente prevalente en ciertas comunidades alrededor del mundo que viven bajo condiciones climáticas muy rigurosas como alta exposición a la radiación UV solar en ámbitos desprovistos de nubosidad y sombras, vientos constantes e intensos que vehiculizan partículas de polvo, arena o hielo, altas temperaturas y baja humedad ambiente. (Urrets-Zavalía y col., 2006; Urrets-Zavalía y col., 2007; Rodger, 1973; Anderson y Fuglsang, 1976; Gray y col., 1992; Forsius, 1972; Singh y Singh, 1978) Al comparar una población urbana con una población rural en un mismo país, trabajos previos han encontrado que la QPC era mucho más prevalente en los trabajadores rurales. (Resnikoff, 1991)

En nuestros pacientes la QPC fue mucho más prevalente en varones que en mujeres, tal como lo previamente observado por nosotros y otros autores (Urrets-Zavalía y col., 2006; Forsius, 1972; Anderson y Fuglsang, 1976; Young y Finlay, 1975; Fraunfelder y Hanna, 1973) Esta observación puede deberse al hecho de que las tareas rurales son realizadas predominantemente por varones, lo que los expone mucho más a factores ambientales injuriantes en forma crónica.

La depigmentación o atrofia sectorial del iris es observada en muy raras ocasiones en ojos sanos de individuos que viven en áreas urbanas. En ocasiones, en adultos mayores puede observarse una depigmentación difusa y más o menos homogénea de toda la superficie anterior del iris. (Smith, 2000) Un hallazgo interesante, y nunca antes reportado, fue la observación de atrofia sectorial del estroma anterior del iris inferior en un tercio de los pacientes con QPC, siendo observada más frecuentemente en ojos con enfermedad *grado 2* y *grado 3*. (Urrets-Zavalía y col., 2007) No obstante, ninguno de los controles, como tampoco ninguno de los pacientes sin QPC, presentó dicha alteración. (Urrets-Zavalía y col., 2007) Si bien no pudimos encontrar una explicación para dicha alteración en el iris, como tampoco vincularla con la QPC, se podría especular que la radiación solar que llega en forma crónica a esta área del iris menos protegida

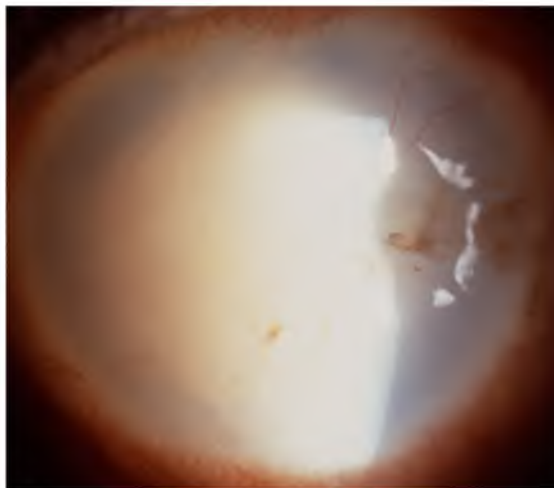


de la luz, podría inducir cambios inflamatorios y/o degenerativos en sus capas más anteriores, con las consecuentes alteraciones tróficas. La radiación UV solar ya ha sido implicada en la patogenia del melanoma y el nevus de iris. Estas lesiones han sido observadas en la mitad inferior del iris en la mayoría de los casos. (Jakobiec y Silbert, 1981) Pero, a diferencia de lo observado en la atrofia del iris en la QPC, que tanto a iris claros como iris marrones pueden estar comprometidos, el melanoma de iris es más prevalente en pacientes con iris claros. (Jakobiec y Silbert, 1981) Es llamativo que autores que han escrito mucho sobre la QPC no hallan reparado en esta alteración del iris, sin siquiera mencionarla, aún cuando en la figura 3 de la publicación de Gray y col. en 1992 (Gray y col., 1991) muestra claramente un cierto grado de atrofia del estroma anterior del iris inferior en un ojo con QPC.

En trabajos previos sobre QPC, la sensibilidad corneal no ha sido evaluada en forma sistemática, y menos aún en forma comparada con individuos controles sin la enfermedad. Mediante la utilización de un estesiómetro “Cochet”, Rodger (Rodger, 1973) encontró que, cuando el estroma corneal presentaba una banda blanca en sección óptica y con o sin “quistes” o “nódulos”, había siempre alguna pérdida de sensibilidad. En casi la mitad de nuestros pacientes con QPC observamos una moderada a severa hipoestesia corneal. A pesar del reducido número de casos con QPC muy avanzada, estos hallazgos sugieren una relación directa entre el grado de compromiso corneal y el grado de alteración de la sensibilidad corneal observando que a mayor severidad de la enfermedad, mayor pérdida de sensibilidad corneal. No obstante, también observamos discreta a moderada hipoestesia corneal en ojos con QPC *grado 1*. Ello podría significar que cambios degenerativos en la región subepitelial y el estroma anterior alterarían las terminaciones nerviosas aún antes de que los cambios corneales sean biomicroscópicamente evidentes. (Urrets-Zavalía y col., 2007)

La ocurrencia de úlceras de córnea graves complicadas de infección bacteriana, y su evolución tórpida hacia la perforación y endoftalmitis, ha sido previamente publicado. (Ormerod y col., 1994; Sridhar y col., 2000) Todos los casos reportados por Sridhar y col. (Sridhar y col., 2000) ocurrieron en ojos en los cuales los depósitos descriptos eran nodulares y elevados (enfermedad *grado 3*).

Otro estudio mostró que las secuelas de perforaciones corneales eran 30 veces más comunes en pacientes con QPC que en controles de edad similar. (Resnikoff y col., 1991) Si bien la alteración del epitelio corneal en casos avanzados de QPC puede contribuir con la ulceración corneal e infección, (Ormerod y col., 1994) es muy probable que, a la luz de nuestros hallazgos, una hipoestesia severa como la observada en algunos casos con QPC avanzada pueda producir una devitalización del epitelio, contribuir con la ocurrencia de una úlcera corneal, rápida sobreinfección bacteriana, retardo en la cicatrización y progresiva evolución hacia la perforación. Es probable que los 3 ojos atróficos de etiología incierta en algunos de nuestros pacientes pudieran haber sufrido de una úlcera corneal de evolución tórpida hacia la perforación, dejando como secuela un ojo atrófico y una córnea opaca y retraída con algunas gotitas amarillentas esparcidas bajo el epitelio (Figura 33).



**Figura 33.** Fotografía del ojo izquierdo de un paciente con queratopatía climática en su ojo derecho, en la que se observa la córnea completamente opacificada, con umbilicación retráctil y vascularizada en región paracentral temporal. En él se observan pequeñas gotitas por retroiluminación con lámpara de hendidura.

A pesar de la edad de nuestros pacientes con QPC y la de los controles, y a las condiciones climáticas y ambientales rudas de la región a la que estaban expuestos, el ojo seco no fue un hallazgo frecuente tanto en pacientes con QPC como en los que no tenían la enfermedad. Ninguno de nuestros pacientes presentó un ojo seco severo, tal como lo observado con el test de Schirmer II, el TRP y la tinción superficial con verde de lisamina. Si bien ello ha sido reportado previamente, (Rodger, 1973; Gray y col., 1992; Freedman A, 1973) ningún

trabajo previo ha consistido en estudio de casos y controles, como en nuestro trabajo, lo que le da aún más valor a nuestras observaciones.

La catarata fue una observación frecuente en pacientes con QPC, en coincidencia con observaciones previas. (Resnikoff, 1988; Urrets-Zavalía y col., 2006) No obstante, nuestros datos deben ser interpretados con cautela debido a que otros factores vinculados con catarata como herencia, enfermedades sistémicas como diabetes o hipertensión arterial, y tabaquismo no fueron evaluados en forma sistemática.

La etiología de la QPC es, hasta el presente, desconocida. No obstante, se sospecha que su origen puede estar en múltiples factores. La exposición crónica a la radiación solar en áreas de vegetación y sombras escasas y/o alta reflexión de la luz en el suelo, la aridez y vientos constantes que vehiculizan partículas probablemente provocando microtraumas corneales repetidos, pueden ser, al menos en parte, responsables de crear las condiciones necesarias para el desarrollo de la enfermedad. (Urrets-Zavalía y col., 2006; Rodger, 1973; Gray y col., 1992; Forsius, 1972; Resnikoff, 1991; Freedman A, 1973; Rodger y col., 1974; Resnikoff, 1988; Taylor y col., 1989) Esta región en donde llevamos a cabo nuestro estudio comparte muchas de estas características ambientales y climáticas, tales como alta exposición a la radiación solar por falta de vegetación arbórea y escasa nubosidad, suelo arenoso y vientos fuertes y constantes. La actividad predominante de los pobladores de esa región consiste en tareas rurales a la intemperie, expuestos diariamente y durante toda la vida a las condiciones climáticas previamente descritas. En contraste con las lesiones graves y grotescas observadas en pacientes de regiones de muy altas temperaturas ambiente y elevada irradiación solar como en Arabia Saudita, la región del Mar Rojo (Rodger, 1973) o el Punjab en India (Singh y Singh, 1978), en nuestros pacientes predominaron las formas más leves (*grado 1*) y moderadas (*grado 2*), coincidiendo con lo observado en regiones de climas fríos como la península del Labrador (Freedman A, 1973) y el ártico (Forsius, 1972).

Numerosos trabajos han asociado la exposición aumentada a la radiación UV de los individuos que desarrollan QPC. Klintworth, 1972; Rodger,

1973; Rodger y col., 1974; Taylor y col., 1989; Taylor, 1980; Johnson y col., 1989) No obstante, asociación no significa necesariamente causalidad. Para inferir causalidad se requiere la realización de estudios de campo a fin de evaluar la dosis-respuesta individual a la radiación UV. La estimación de la exposición del ojo a la radiación UV es muy importante a los fines de poder determinar sus efectos nocivos sobre las diferentes estructuras oculares expuestas. (Rosenthal y col., 1991)

La medición de la radiación UV a nivel suelo puede efectuarse con un radiómetro. Ello necesita de la instalación en un sitio adecuado del equipamiento y el manejo instrumental y evaluación constantes por parte de una persona idónea y dedicada a tal fin. Teniendo en cuenta las regiones exploradas por nosotros, dicha tarea es impracticable por varias razones. La primera es la lejanía, lo que imposibilita un control, calibración y cuidado permanentes del equipo, como también la obtención de los datos registrados por el radiómetro. La segunda es que, además del registro de la radiación UV por el radiómetro, se necesitaría el registro simultáneo de factores climáticos intercurrentes como las nubes y los vientos, que pueden hacer variar, aún por momentos, la irradiación solar. (Barry y Chorley, 1998) La tercera es que, teniendo en cuenta que la QPC es una enfermedad crónica de muy lenta evolución, harían falta mediciones durante años en las condiciones previamente referidas, lo que lo hace impracticable. La cuarta es que el radiómetro no mide la radiación que llega al ojo de un individuo determinado, con sus características faciales propias, su eventual protección de la radiación (anteojos, sombrero, gorra con visera) permanente, esporádica o nula. En definitiva, para estudiar in situ todos los aspectos climatológicos sería necesario instalar un laboratorio o estación meteorológica en cada una de las áreas exploradas, durante varios años y trabajando en forma simultánea. Probablemente, una de las formas más adecuadas para el estudio de la radiación UV a la cual están expuestos los pobladores de las diferentes áreas exploradas sería mediante el modelo de exposición de Rosenthal y col., (Rosenthal y col., 1991) quienes evaluaron la exposición a la radiación UV en un grupo de marineros que trabajaban en la Bahía de Chesapeake, Maryland, EE.UU., mediante una cinta dosimétrica de polysulfona sensible a la radiación UV pegada sobre el puente de anteojos utilizados por cada individuo durante sus horas de trabajo, y la

colocación de una cinta similar en el área de trabajo de esos mismos individuos. Con ello lograban registrar la exposición individual de cada sujeto y de la cantidad de radiación incidente en el ojo, teniendo en cuenta el lugar y la época del año, y la utilización o no de sombrero, y si el sombrero se utilizaba en forma constante o discontinua durante las horas de trabajo. (Rosenthal y col., 1991) No obstante, en ese estudio no pudieron determinar la exposición en aquellos individuos que no utilizaban anteojos o armazón durante las horas de trabajo, como tampoco las variaciones estacionales (realizaron registros sólo durante el verano). (Rosenthal y col., 1991) Este tipo de medición, por la lejanía y situación geográfica de las áreas evaluadas en nuestro estudio, sumado al modo de vida de esos pobladores viviendo en forma muy dispersa en grandes extensiones y, a la vez, muy renuentes a la utilización de anteojos o armazones considerados, al menos, incómodos para sus tareas rurales cotidianas. Recientemente, Downs y Parisi (Downs y Parisi, 2007) desarrollaron un modelo de evaluación detallada de la incidencia de la radiación UV sobre diferentes áreas de la cara y el cuello utilizando cabezas de maniquí, en las que se adhirieron múltiples dosímetros miniaturizados basados en cintas de polisulfona, evaluados luego en forma individual mediante un espectrofotómetro. (Downs y Parisi, 2007) Los autores consideran que este modelo podrá ser utilizado en futuras investigaciones que evalúen los efectos de la radiación UV a nivel ocular. (Downs y Parisi, 2007) La dosimetría de la radiación a nivel ocular es mucho más compleja de lo que ha venido apreciándose en general en los estudios epidemiológicos de enfermedades oculares del segmento anterior y posterior vinculadas con la edad y la radiación solar, teniendo en cuenta que los efectos fotobiológicos de la radiación sobre diferentes estructuras oculares son directamente dependientes de la geometría óptica de la exposición y de las características espectrales puntuales de la exposición. (Sloney, 2005)

El modelo de evaluación de la radiación UV que utilizamos en nuestro estudio no tiene en cuenta la exposición individual de cada persona. Por otra parte, el cálculo de radiación UV lo hace un programa de computación en base a la densidad de la capa de ozono de la región específica a estudiar. La densidad de la capa de ozono es, a su vez, medida en forma satelital por la NASA. No obstante, este método ha sido utilizado en numerosos estudios que evalúan la influencia de la radiación UV en diferentes aspectos de la vida terrestre y marina. (Björn y

Murphy, 1985) Por otra parte, la posible relación de la radiación UV con la QPC ya ha sido estudiada ampliamente. En las áreas que nosotros estudiamos, se observaron factores predisponentes a una mayor exposición a la radiación solar, fundamentalmente la ausencia de vegetación arbórea, suelo arenoso-arcilloso y nubosidad escasa. Lo que nosotros pretendimos estudiar es si en esas áreas había diferencias en la radiación UV ambiental que pudieran explicar el porqué de la ausencia de QPC en las poblaciones estudiadas en Sumampa y Cieneguillas. La región de Aguada Guzmán posee las características de elevada exposición a la radiación solar por ausencia de nubosidad y sombras arbóreas, y exposición cotidiana a vientos constantes de los individuos que habitan y trabajan en esa área. (Urrets-Zavalía y col., 2006; Urrets-Zavalía y col., 2007) Esas mismas características las hemos observado también en la región de Cieneguillas, y en la región de Sumampa, aunque en esta última los pobladores no son sometidos a vientos rigurosos como los observados en la Patagonia o en la Puna. Los estudios de densidad de la capa de ozono y de niveles de irradiación UV-B revelaron densidades normales para las tres regiones estudiadas. Los niveles de densidad de la capa de ozono ligeramente inferiores y de mayor irradiación UV-B observados en la región de Cieneguillas pueden explicarse por la altitud en la que se encuentra esa localidad (6 veces mayor que las otras regiones). Este dato no es menor, si se tiene en cuenta que a mayor altura sobre el nivel del mar, mayor irradiación solar. No obstante, las diferencias encontradas no alcanzaron valores estadísticamente significativos. En conclusión, entre las tres regiones estudiadas en tres diferentes latitudes de la Argentina con condiciones geográfico-ambientales similares, no se observaron diferencias significativas en los niveles de radiación UV-B en un período de estudio de ocho años. De estos resultados se podría inferir que, si bien la radiación UV-B podría participar como uno de los factores de riesgo en la QPC, en nuestro estudio no se ha mostrado como un factor determinante, habida cuenta que otras regiones en donde no encontramos paciente alguno con QPC mostraron niveles de irradiación UV-B ligeramente superiores a los observados en la región de Aguada Guzmán. No obstante, es probable que la utilización de sombrero alado por parte de los pobladores de la región de Cieneguillas los proteja de la radiación UV proveniente del cielo, aunque no así de la reflejada por el suelo.

Desde el punto de vista del examen clínico oftalmológico de los pacientes, como también de los aspectos demográficos y geográficos de las diferentes áreas exploradas, no se pudieron encontrar elementos determinantes que pudieran explicar la alta prevalencia de la QPC en la región de Aguada Guzmán en la Patagonia y, a su vez, la ausencia de caso alguno de QPC en las regiones de Sumampa y Cieneguillas.

Estas dos regiones exploradas, una en el centro y otra en el norte de la Argentina, tuvieron características geográficas relativamente similares a las observadas en la región de Aguada Guzmán en la Patagonia: aridez extrema, ausencia de vegetación arbórea, suelo escasamente cubierto por vegetación arbustiva achaparrada, escasa nubosidad y bajo régimen de lluvias. En cuanto a la exposición de los pobladores a vientos fuertes y constantes, ello es muy notorio en la Patagonia y en la Puna, pero adquiere menor relevancia en la región de Sumampa, lo que contribuye, por otra parte, a que las temperaturas diurnas, en especial en verano, sean considerablemente altas en esa región de Santiago del Estero.

Desde el punto de vista demográfico, las poblaciones de las regiones de Aguada Guzmán y Cieneguillas se asemejan en el alto grado de dispersión de la población, especialmente en la Patagonia por las mayores extensiones territoriales, con carencia de vías y medios de comunicación, manteniendo así esas poblaciones alejadas de centros urbanos, con la consecuente dificultad en la provisión de ciertos servicios básicos la atención médica, la provisión de alimentos o de agua potable. Este factor constituye un enorme obstáculo para la realización de estudios epidemiológicos que apunten a evaluar clínicamente y todos los aspectos vinculados a la vida de esos pobladores (vivienda, condiciones sanitarias, alimentación, costumbres individuales, actividad laboral, protección individual contra la radiación solar, etc.).

En la población estudiada en la Puna se observó mayor movilidad de la población, en especial los varones, hacia zonas urbanas. Ello puede explicar que la exposición a factores climáticos rigurosos no es constante, reduciendo así las

posibilidades de un efecto nocivo de ellos sobre la superficie ocular y la córnea. Lo mismo podría decirse de la población estudiada en la región de Sumampa.

La utilización de sombrero alado por parte de los adultos mayores que habitan en la Puna podría explicar, al menos en parte, una mayor protección contra la radiación solar. En cambio, en los pobladores de la Patagonia, posiblemente relacionado con la velocidad de los vientos, la mayoría utiliza gorra con visera pequeña o boina.

Las poblaciones que habitan las regiones de la Puna jujeña y del departamento de Quebrachos, en Santiago del Estero, pertenecen a pobladores ancestrales de esas tierras, probablemente adaptadas a esas condiciones geográfico-ambientales. En cambio, los pobladores de la región de Aguada Guzmán, en la Patagonia, pertenecen en su mayoría a descendientes de aborígenes Mapuche, que fueron desplazados desde lugares más fértiles como las estribaciones de la cordillera y los márgenes fluviales hacia zonas más inhóspitas y marginales luego de la colonización del territorio nacional. Ello podría explicar que esta población podría estar aún menos adaptada a estas condiciones de vida extrema. No obstante, los esquimales que habitan desde hace siglos el ártico, tienen una prevalencia importante de QPC (Forsius, 1972).

Los trabajadores rurales de la región de Aguada Guzmán están expuestos al bombardeo continuo de la córnea por partículas vehiculizadas por los vientos constantes, causando microtraumas repetidos del epitelio corneal. Este daño corneal induce, presumiblemente, inflamación y, eventualmente, cicatrización de la superficie corneal. Probablemente, debido a esta inflamación no controlada en las etapas iniciales de la enfermedad (cuando aún no existen signos clínicos observables) y posiblemente la presencia continua de leucocitos infiltrantes, se forman microquistes ovaliformes llenos de fluido, similares a la formación de ampollas en la piel en vías de cicatrización, las que contienen niveles aumentados de MMPs. (Oikarinen y col., 1993) En concordancia con este hallazgo, estos glóbulos están compuestos por proteínas, y fibrillas colágenas desorganizadas se observan en las adyacencias de los glóbulos en la córnea anterior de los pacientes con QPC. (Gray y col., 1992; Johnson y Overall, 1978) Basados en hallazgos



previos, nuestra hipótesis fue que niveles elevados en forma significativa de MMPs podrían ser hallados en lágrimas de pacientes con QPC. Así, hemos encontrado niveles aumentados significativamente de proMMP-9 y, en contraste, encontramos niveles elevados de la forma latente y la forma activada de MMP-8 en los individuos controles. Un hallazgo interesante fue que los niveles de MMP-8 de pacientes con QPC e individuos controles de esta región de la Patagonia eran 30 veces más elevados que en individuos que viven en Finlandia. Estos resultados sugieren fuertemente que tanto la MMP-9 como la MMP-8 pueden jugar un rol no sólo en la patogenia de la QPC, sino también en la protección de la córnea. En este sentido, la relación aumentada de MMP-8 / TIMP (Tabla 24) en individuos controles versus pacientes con QPC, en conjunto con niveles generalmente elevados de MMP-8, sugieren que preferentemente la MMP-8 y MMP-9, en lugar de la MMP-2 y la MMP-13, participan en un proceso protector antiinflamatorio de la córnea mediante el procesamiento proteolítico de mediadores de la comunicación celular y de la respuesta inmune, tal como lo mostrado recientemente en modelos de ratón de asma e inflamación inducida por alérgenos. (Owen y col., 2004; Gueders y col., 2005; McMillan y col., 2004) A pesar de estos interesantes resultados, un aspecto débil de este estudio vinculado a las MMPs fue el no tener acceso a especímenes de tejido corneal de nuestros pacientes con QPC debido a que la realización de un transplante de córnea y, fundamentalmente, el seguimiento en dichos pacientes y en esa área remota es muy difícil de llevar a cabo. Ello impidió que pudiésemos caracterizar las MMPs mediante inmunohistoquímica.

Fini y col., utilizando un modelo animal mostraron que la MMP-2 y la MMP-9 jugaban un rol significativo en la degradación de la membrana basal del epitelio corneal lesionado. (Matsubara y col., 1991; Fini y col., 1996) En sus estudios, encontraron que la MMP-9 aparecía dentro del día de producida la lesión corneal, y que la acción de dicha enzima desaparecía en pocas semanas. En contraste, la MMP-2 se observó elevada durante varias semanas. Un comportamiento similar fue observado con los niveles de colagenasas y stromelisin. La MMP-9 parecía participar en la degradación de la membrana basal, mientras que la MMP-2 participaba en el remodelamiento de la MEC y la membrana basal. También, en enfermedades que comprometen la integridad del

epitelio corneal, las concentraciones en lágrimas humanas de MMP-9 y MMP-2 se hallaban significativamente elevadas. (Smith y col., 2001; Solomon y col., 2000; Smith y col., 1999; Afonso y col., 1999; Sobrin y col., 2000; Kumagai y col., 2002; Sakimoto y col., 2004) Ha sido reportado que la MMP-9 se hallaba involucrada en el inicio de la formación de una úlcera corneal, y que esta enzima mostraba una prolongada expresión en caso de falla en la reepitelización de la córnea. (Matsubara y col., 1991; Fini y col., 1996) La integridad del epitelio corneal depende en gran medida de la membrana basal subyacente. Esta estructura está compuesta predominantemente por colágeno tipo IV y laminina, (Labermeier y Kenney, 1983; Millin y col., 1986) y estas proteínas son degradadas especialmente por las gelatinasas. Nuestro estudio muestra que en las lágrimas de pacientes con QPC existen niveles significativamente elevados de la actividad de la gelatinasa latente, como también de una relación aumentada de MMP / TIMP. Estos niveles elevados pueden enlentecer el proceso normal de cicatrización del epitelio corneal luego de microtraumas frecuentes, y así exponer a la córnea a la invasión de leucocitos y/o de varias proteinasas. Formas activas de gelatinasas han sido observadas en la queratoconjuntivitis vernal, úlceras corneales endógenas, causticaciones corneales severas y la rosácea ocular, (Azar y col., 1996; Kumagai y col., 2002; Sakimoto y col., 2004) en donde se ha sugerido que juegan un rol en la formación de erosiones corneales las que, a su vez, pueden conducir a úlceras de la córnea. Nosotros no observamos gelatinasas activas en las lágrimas de pacientes con QPC. Esta observación coincide con los estudios de Smith y col., (Smith y col., 2001; Smith y col., 1999) que mostraron que en lágrimas de pacientes con queratitis ulcerante periférica se observaban niveles elevados de gelatinasas, no siendo detectadas formas de gelatinasas de bajo peso molecular. Más aún, en casos en los que se observaban formas activas de gelatinasas, ellas representaban una mínima proporción del total de gelatinasas en lágrimas. (Solomon y col., 2000; Afonso y col., 1999; Kumagai y col., 2002) No obstante, estudios previos han mostrado que especialmente la proMMP-8 y la proMMP-9 pueden ser activadas oxidativamente o por interacción con sus substratos o sus inhibidores, sin cambios en su peso molecular, y así al menos parte de las formas de peso molecular completo de MMP-8 y MMP-9 detectadas en las muestras de lágrimas estudiadas pueden representar formas activas de MMP-8 y MMP-9. (Saari y col., 1990; Bannikov y col., 2002) Esta observación se apoya en los

resultados de la inmunofluorografía, que mostraron que las concentraciones halladas de MMP-8 eran similares en pacientes con QPC y controles, pero que el grado de activación de MMP-8 mostraba diferencias significativas entre esos dos grupos de individuos. La concentración aumentada de gelatinasas puede perturbar la integridad de la membrana basal del epitelio corneal una vez que éste ha sido dañado. Como una respuesta a la injuria, la gelatinasa puede hidrolizar el colágeno tipo IV y también al colágeno recientemente sintetizado y a los colágenos intersticiales entrecruzados, y de ese modo perturbar los mecanismos reparadores.

Luego de una lesión de la membrana basal del epitelio corneal, células inflamatorias como los polimorfonucleares y sus enzimas colagenolíticas podrían invadir el estroma corneal y provocar su desorganización. En particular la colagenasa MMP-8 podría alterar la arquitectura del estroma corneal. La MMP-8 juega un rol en las enfermedades inflamatorias destructivas, y su activación refleja la severidad y actividad de la enfermedad. (Hanemaaijer y col., 1997; Prikk y col., 2002; Sepper y col., 1995; Matsuki y col., 1996; Kiili y col., 2002) La expresión de MMP-8 se halla también aumentada en los procesos de cicatrización y remodelamiento tisular. (Nwomeh y col., 1999; Balbin y col., 1998) La falla en la cicatrización en úlceras crónicas ha sido atribuida a la sobreexpresión de MMP-8, (Nwomeh y col., 1999) sugiriendo la importancia de la regulación a nivel corneal de la actividad de la MMP-8. Ha sido demostrado previamente que las formas latente y activa de MMP-8 son constituyentes normales de las lágrimas humanas, y que ello no representaría peligro para la integridad corneal. (Holopainen y col., 2003) No obstante, la síntesis de MMP-8 y su activación se encuentran *transitoriamente* aumentadas en lágrimas como respuesta a la queratectomía fotorrefractiva, (Holopainen y col., 2003) sugiriendo que esta enzima puede participar tanto en la cicatrización de una herida corneal como también en su defensa. Tanto las lágrimas de pacientes con QPC como la de los individuos controles contenían inmunorreactividades predominantemente de formas latentes y activas de PMN MMP-8, y los niveles encontrados fueron más de 30 veces más altos en los habitantes estudiados de esa área de la Patagonia (con o sin QPC) que en individuos sanos de Finlandia. Este hallazgo sugiere fuertemente un rol de la MMP-8 en el proceso antiinflamatorio protector, tal como ha sido sugerido previamente para esta enzima en el asma experimental y la inflamación inducida

por alérgenos. (Owen y col., 2004; Gueders y col., 2005) Se podría esperar que las TIMPs deberían encontrarse expresadas en niveles elevados en pacientes con QPC, tal como se observó para la TIMP-2. Ello es obligatorio para proteger la arquitectura de la córnea de la actividad descompositora de las proteasas. Finalmente, debido a que las gelatinasas están presentes en las lágrimas de pacientes con QPC, se debería esperar una baja expresión de TIMP libre en lágrimas de pacientes con QPC, tal como fue observado (Tabla 23).

La edad y la exposición crónica a la radiación UV son considerados factores que juegan un rol importante en la etiología de la QPC. Por otra parte, bajas o altas temperaturas, inadecuada hidratación corneal y microtraumas corneales repetidos son considerados de menor importancia en la patogenia de la enfermedad. (Gray y col., 1992) Nuestros resultados desafían este punto de vista. La radiación UV, y más específicamente la radiación UV-B, producen aumento de apoptosis y pérdida celular del epitelio corneal, y así exponer al epitelio corneal a erosiones. (Ren y Wilson, 1994) Estas erosiones epiteliales cicatrizan rápidamente, y normalmente no provocan mayores complicaciones. No obstante, erosiones corneales repetitivas provocan inflamación e infiltración de células inflamatorias en la córnea y lágrimas. Así, los tejidos subyacentes al epitelio corneal son expuestos a las MMPs y otras enzimas proteolíticas. En estadios tempranos de QPC la membrana basal epitelial no se encuentra afectada, pero en estadios más avanzados tanto la membrana basal como la capa de Bowman se encuentran afectadas, como también se observa un velamiento o turbidez del estroma anterior. Estos cambios son producidos probablemente por la acción de proteinasas, tales como las MMPs que son capaces de degradar el colágeno y otras proteínas presentes en la membrana basal y la capa de Bowman. Nuestros resultados muestran que los niveles de gelatinasas, especialmente la proMMP-9, se encuentran moderadamente elevados en lágrimas de pacientes con QPC, de acuerdo con la lenta progresión de la enfermedad, proveyendo la respuesta defensiva necesaria. (Owen y col., 2004; Gueders y col., 2005; McMillan y col., 2004) La fuente de MMP-9 en pacientes con QPC no se conoce, pero se piensa que la MMP-9 de las lágrimas se origina en las células epiteliales de la córnea o de granulocitos en enfermedades inflamatorias. (Smith y col., 2001; Sobrin y col.,

2000) Nosotros proponemos que estas células son también responsables de la elevada expresión de gelatinasas en lágrimas de pacientes con QPC.

En la actualidad, no existe un tratamiento farmacológico para la QPC, siendo la queratectomía fototerapéutica y, más aún el transplante de córnea el tratamiento de elección para los estadios más avanzados de la enfermedad. Este último tratamiento, si bien es eficaz, es extremadamente difícil de realizar en estos pacientes de la Patagonia debido por un lado a la falta de centros oftalmológicos avanzados de la esfera pública cercanos, y por el otro a las dificultades en el seguimiento estrecho en caso de que un paciente sea operado. Por ello, nuevas intervenciones terapéuticas dirigidas contra las MMPs son necesarias, como por ejemplo inhibidores selectivos de MMPs o derivados de las tetraciclinas. En este sentido, inhibidores de las MMPs como las tetraciclinas y péptidos selectivos antigelatinasa, (Golub y col., 1998; Koivunen y col., 1999; Heikkilä y col., 2005; Määttä y col., 2006) más que otros más potentes inhibidores de MMPs tales como los basados en péptido hidroxámico, podrían de una manera segura regular MMPs sin inhibir su acción defensiva (Golub y col., 1998; Sorsa y Golub, 2005).

Para la mayoría de los genes de susceptibilidad que se asocian a una determinada enfermedad multifactorial, el valor predictivo positivo es débil, es decir que dicha asociación no puede ser utilizada para establecer un diagnóstico o para identificar los individuos con riesgo de padecerla.

No obstante, en ciertas enfermedades oculares y en determinadas poblaciones, como el glaucoma crónico de ángulo abierto (GCAA) en Túnez, se ha observado que fenotipos determinados genéticamente, como los grupos sanguíneos, poseen un rol en el determinismo de dicha enfermedad, poniendo en evidencia que el riesgo de sufrir GCAA es 5,5 veces mayor en individuos cuyo grupo sanguíneo es el AB. Por el contrario, en ese estudio no se observaron diferencias significativas para los sistemas Rhesus, Nelly y Duffy. (Jeddi Blouza y col., 2007) En esa población estudiada de pacientes glaucomatosos, el 10,5 % pertenecían al grupo AB, mientras que en individuos que habitan la misma región sólo el 5 % pertenecían a dicho grupo sanguíneo. (Hmida y col., 1994) El glaucoma pseudoexfoliativo ha sido encontrado más frecuentemente en pacientes

pertenecientes al sistema Kell (+) que en individuos Kell (-). (David and Jenkins, 1980) Los pacientes portadores de síndrome pseudoexfoliativo y cuyo grupo sanguíneo es el A, poseen 7 veces más de riesgo de sufrir glaucoma pseudoexfoliativo si, además, son Kell (+) en lugar de Kell (-). (Ringvold y col., 1993)

Si bien la mayoría de los individuos que habitan en la región patagónica de El Cuy son descendientes de Mapuches y aproximadamente un 10 % de ellos padecen de QPC, los resultados obtenidos luego del estudio del sistema antigénico ABO claramente demostraron que esta enfermedad degenerativa de la córnea no está restringida a individuos grupo O. No obstante, en relación al estudio de los genes HLA-DR $\beta$ 1 observamos mayor frecuencia del alelo DR $\beta$ 1\*14 en los pacientes con QPC con respecto a los controles ( $p=0,05$ ), pudiendo esto significar mayor riesgo para padecer la enfermedad (Riesgo relativo= 7).

En los individuos de Cieneguillas examinados, entre los que no se observó caso alguno de QPC, se halló con alta frecuencia el alelo HLA-DR $\beta$ 1\*04 en relación a los otros alelos DR  $\beta$ 1 estudiados. Resultados similares se observaron en los individuos controles (sin QPC) estudiados en el departamento El Cuy, Pcia. de Río Negro, en donde hubo una diferencia significativa para la expresión de este alelo con respecto a los pacientes con QPC ( $p=0,03$ ). Esto podría estar indicando un cierto rol protector de dicho alelo en el desarrollo de esta enfermedad (Riesgo relativo= 0,35).

Las diferencias en la calidad de la dieta entre una población urbana y la población rural estudiada fueron puestas en evidencia con los resultados obtenidos. En efecto, salvo para la concentración sérica de proteínas totales, los valores hallados aumentados para colesterol, triglicéridos y ácido úrico fueron estadísticamente significativos cuando se los comparó con los valores hallados en un grupo de individuos urbanos de la ciudad de Córdoba. Además, la carencia en la dieta de alimentos ricos en vitaminas, en especial en vitamina C, se vio reflejada en la menor concentración en suero de AA en individuos rurales en comparación con los urbanos. Este hallazgo podría tener una significativa importancia si se tienen en cuenta dos aspectos fundamentales: primero, la gran

concentración del AA en el epitelio corneal en individuos con dieta bien balanceada, y su rol “protector” de la radiación UV; segundo, la prevalencia aumentada de QPC en poblaciones rurales y su excepcional ocurrencia en individuos urbanos.

Es probable que en nuestros pacientes con QPC, las menores concentraciones séricas de AA, y por ende menor concentración a nivel de estructuras oculares como la córnea, sumado ello a otros factores ambientales como alta exposición crónica a radiación UV y microtraumas corneales repetidos provocados por vientos constantes que vehiculizan partículas como arena, podrían contribuir a crear condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Si bien no encontramos diferencias entre las concentraciones séricas de AA entre pacientes con QPC e individuos rurales controles de esa misma área, éstos presentaban características genéticas que podrían considerarse protectoras para QPC.

Se ha observado que en humanos la concentración del AA en el epitelio corneal es mayor en el centro de la córnea que en la periferia. (Brubaker y col., 2000) Es probable que ello pueda tener alguna relación con lo observado clínicamente. En efecto, en los estadios iniciales la QPC comienza en la periferia de los meridianos horizontales de la córnea, extendiéndose muy lentamente hacia el área central. (Urrets-Zavalía y col., 2006)

La QPC es una enfermedad de la córnea bien definida, y su diagnóstico es sencillo, aún en sus estadios iniciales, siempre y cuando se realice un cuidadoso examen biomicroscópico con lámpara de hendidura. La alta prevalencia de la QPC observada en esta región pobre y marginal de la Argentina genera un problema de salud pública serio y de difícil solución. (Urrets-Zavalía y col., 2006) Una vez que el área central de la córnea se halla afectada, el compromiso visual es severo, siendo definitivo para estos pacientes. Por otra parte, la pérdida de la sensibilidad corneal en casos avanzados puede crear las condiciones propicias para la

ulceración grave de la córnea y su evolución hacia la perforación del globo ocular, la consiguiente atrofia y la ceguera irreversible. La queratoplastia y el seguimiento postoperatorio son empresas casi inviables en esas condiciones de lejanía y aislamiento. Por ello, será fundamental poder determinar con certeza el o los factores más importantes que puedan causar la enfermedad.



# *CONCLUSIONES*

## CONCLUSIONES

El primer aspecto original y la importancia científica del proyecto han sido la identificación y estudio de poblaciones de riesgo de padecer queratopatía climática (QPC), por primera vez en la Argentina y en esta región de América Latina. La QPC es una enfermedad muy discapacitante pero ignorada por la comunidad médica y oftalmológica en estas latitudes de América, y poco conocida y estudiada en el resto del mundo. No obstante, como resultado de este trabajo de tesis doctoral hemos determinado que afecta a un grupo importante de personas que viven en una región remota de la Argentina, marginadas de una atención adecuada de su salud.

El segundo aspecto original del proyecto consiste en haber estudiado en forma detallada las características clínicas de la QPC que afecta a pobladores de una región del noroeste de la Patagonia Argentina, determinando las características clínicas de la afección corneal en estos pacientes.

El tercer aspecto original de nuestro trabajo es el haber descripto por primera vez desde que se conoce la enfermedad, la observación de la atrofia sectorial del iris en pacientes afectados de QPC. Si bien no podemos establecer una relación directa entre QPC y la atrofia sectorial del iris, es probable que factores involucrados en la enfermedad corneal, como la exposición crónica a la radiación UV, afecten también esa región más expuesta del iris, generando localmente procesos inflamatorios y/o degenerativos que se traduzcan clínicamente como áreas de depigmentación o atrofia anterior del iris. La accesibilidad al estudio post-mortem de un globo ocular perteneciente a un paciente portador de QPC con o sin atrofia evidente del iris podrá abrir nuevas vías de investigación que nos orienten mejor hacia su etiología, y los mecanismos involucrados en su inicio y evolución. Ello será, no obstante, difícil de lograr debido, por un lado, a la resistencia a la donación de órganos por parte de los individuos que habitan esa área, y por otro lado a las dificultades en la procuración de esos tejidos en forma adecuada e inmediata en caso que se obtuviera el acuerdo para la donación.

El cuarto aspecto original del proyecto consistió en estudiar otros aspectos aún no explorados detalladamente en la QPC, tales como el grado de compromiso visual de los pacientes afectados de QPC, la progresión de las alteraciones corneales, las alteraciones de la superficie ocular y de la sensibilidad de la córnea, y otras enfermedades oculares asociadas. En nuestro estudio demostramos el severo compromiso de la visión en los pacientes afectados con QPC. Demostramos también el potencial evolutivo de la enfermedad corneal, determinando que la QPC comienza con el *grado 1*, y evoluciona del *grado 1* al *grado 2*. Determinamos también por primera vez, en forma controlada, las alteraciones de la sensibilidad corneal, exponiendo a los pacientes portadores de grados avanzados a una severa hipoestesia corneal, con el riesgo que ello implica de ulceración y progresión hacia la perforación espontánea y atrofia del globo ocular.

El quinto aspecto original de nuestro proyecto se basó en el estudio del polimorfismo genético en pacientes portadores de QPC y en pobladores de la región. Si bien la mayoría de los individuos que habitan en la región patagónica de El Cuy son descendientes de Mapuches y aproximadamente un 10 % de ellos padecen de QPC, los resultados obtenidos luego del estudio del sistema antigénico ABO claramente demostraron que esta enfermedad degenerativa de la córnea no está restringida a individuos grupo O. En relación al estudio de los genes HLA-DR $\beta$ 1 observamos mayor frecuencia del alelo DR $\beta$ 1\*14 en los pacientes con QPC con respecto a los controles, pudiendo ello significar mayor riesgo para padecer la enfermedad. En los individuos de Cieneguillas examinados, entre los que no se observó caso alguno de QPC, encontramos con alta frecuencia el alelo HLA-DR $\beta$ 1\*04 en relación a los otros alelos DR  $\beta$ 1 estudiados. Resultados similares se observaron en los individuos controles (sin QPC) estudiados en la región de Aguada Guzmán en la Patagonia, en donde hubo una diferencia significativa para la expresión de este alelo con respecto a los pacientes con QPC. Esto podría estar indicando un cierto rol protector de dicho alelo en el desarrollo de esta enfermedad.

El sexto aspecto original e importante del proyecto, y teniendo en cuenta que hasta el presente no hemos encontrado QPC fuera de la región estudiada de Aguada Guzmán, ha sido el estudio de posibles factores involucrados, como la radiación UV-B, en la génesis de la enfermedad. El estudio de los niveles de irradiación UV-B no arrojó diferencias significativas entre las regiones estudiadas, mostrando que, si bien la exposición crónica a la radiación UV puede jugar algún rol en la génesis de la enfermedad, su participación no sería única ni preponderante, como se lo ha venido sosteniendo hasta el presente. Los bajos niveles de ascorbato hallados en los individuos que habitan en esta región de la Patagonia Argentina aportan un nuevo elemento a tener en cuenta cuando se habla de la génesis de esta enfermedad multifactorial.

El séptimo aspecto original de nuestro trabajo consistió en el estudio de cambios moleculares en lágrimas, en especial las metaloproteinasas (MMP), que podrían contribuir a la producción o el mantenimiento de las lesiones corneales observadas en los pacientes con QPC. La edad y la exposición crónica a la radiación UV son considerados factores que juegan un rol importante en la etiología de la QPC. Por otra parte, bajas o altas temperaturas, inadecuada hidratación corneal y microtraumas corneales repetidos han sido considerados de menor importancia en la patogenia de la enfermedad. Nuestros resultados desafían estos puntos de vista, sugiriendo que erosiones corneales repetitivas pueden provocar inflamación e infiltración de células inflamatorias en la córnea y lágrimas. Así, los tejidos subyacentes al epitelio corneal son expuestos a las MMP y otras enzimas proteolíticas, capaces de degradar el colágeno y otras proteínas presentes en la membrana basal y la capa de Bowman. Nuestros resultados muestran que los niveles de gelatinasas, especialmente la proMMP-9, se encuentran moderadamente elevados en lágrimas de pacientes con QPC, en concordancia con la lenta progresión de la enfermedad. En contraste, encontramos niveles elevados de la forma latente y la forma activada de MMP-8 en los individuos controles, sugiriendo fuertemente que la MMP-8 puede tener un rol importante en la protección de la córnea. En la actualidad, no existe un tratamiento farmacológico para la QPC, siendo la queratectomía fototerapéutica y, más aún el transplante de córnea el tratamiento de elección para los estadios más avanzados de la enfermedad. Este último tratamiento, si bien es eficaz, es

extremadamente difícil de realizar en estos pacientes de la Patagonia debido por un lado a la falta de centros oftalmológicos avanzados cercanos, y por el otro a las dificultades en el seguimiento estrecho en caso de que un paciente sea operado. Por ello, nuevas intervenciones terapéuticas dirigidas contra las MMPs son necesarias, como por ejemplo la posibilidad de utilizar localmente inhibidores selectivos de MMPs o derivados de las tetraciclinas.

A pesar de considerar que hemos avanzado en el conocimiento de una enfermedad, hasta el presente, ignorada en estas latitudes de América, quedan aún muchos aspectos oscuros por develar, los cuales probablemente se diluciden con estudios moleculares de córneas afectadas por esta patología, y con el desarrollo de un modelo experimental de esta enfermedad.

El alto grado de dispersión de la población de la Patagonia en esa vastedad territorial, con el agravante de la carencia de vías y medios de comunicación, manteniendo así esas poblaciones alejadas de centros urbanos con la consecuente dificultad en la provisión de ciertos servicios básicos como la atención médica, la provisión de alimentos o de agua potable, y la falta de programas de salud pública y comunitaria adecuados para esas realidades, constituyen enormes obstáculos para la realización de estudios epidemiológicos que apunten a evaluar integralmente, tanto desde el punto de vista clínico como desde todos los aspectos vinculados a la vida de cada uno de esos pobladores, a fin de poder determinar con un grado de certeza, cuál es, o cuáles son los factores predisponentes más significativos para el padecimiento de la QPC.

# *ANEXOS*

## ANEXO 1

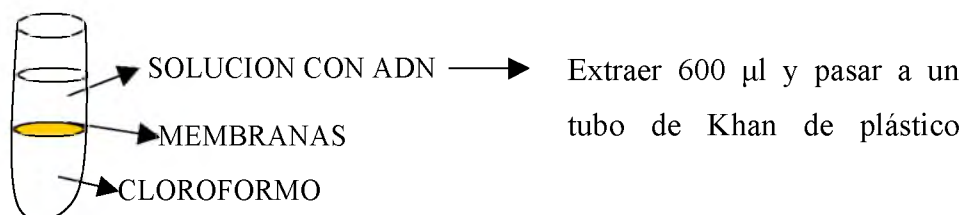
### ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO

#### Método de estudio del CMH clase II (HLA- DR $\beta$ 1)

##### 1. Extracción de ADN: método del “Salting Out”

Para la obtención de ADN se utilizó el método descrito por Miller y col. (1988), de la manera siguiente:

1. La sangre con EDTA al 5% es congelada a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de la purificación. Luego se descongela la sangre en baño maría y se centrifuga durante 1 minuto a 12.000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se seca la boca del tubo con papel.
2. Se resuspende el pellet en 700  $\mu$ l de Buffer, se vortea y centrifuga durante 1 minuto a 12.000 rpm.
3. Se repite este paso 2 veces, y se descarta el sobrenadante con hisopo.
4. Se resuspende el pellet con 400  $\mu$ l de Tris EDTA NaCl (TEN) para digerir proteínas, y se lo vortea.
5. Se agregan 195  $\mu$ l de NaCl 5M (rompe membranas y carga al ADN) y 25  $\mu$ l de SDS 20% (insolubiliza al ADN en el medio), y se vortea para formar un precipitado.
6. Se agregan 400  $\mu$ l de cloroformo (desproteinizante) y se mezcla sin vortear, para formar una solución lechosa.
7. Se centrifuga durante 3 minutos a 12.000 rpm.



8. Se agrega igual volumen (600ul) de Etanol al 95% (insolubiliza al ADN). Se invierte para condensar el ADN y se centrifuga durante 2 minutos a 12.000 rpm. Se elimina el sobrenadante sin perder el ADN adherido a las paredes del tubo.
9. Se lava el pellet con 1000 µl de etanol al 70% y se centrifuga durante 1 minuto a 12.000 rpm. Se elimina el sobrenadante, y se calcula la concentración de ADN para el agregado de Tris EDTA (TE).
10. Se centrifuga durante 30 segundos para que descienda el resto de alcohol y se descarta con hisopo.
11. Se resuspende el pellet con TE en las mismas proporciones observadas antes de ADN.
12. Se llevar a baño de 58° C durante 3 horas, como mínimo, y luego se conserva en heladera.
13. Se determina la concentración de ADN por espectrofotometría.

## 2. Tipificación HLA- DR β1

Para la tipificación del HLA- DR β1 se utilizó la técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR-SSP), mediante la utilización de Primers específicos de secuencia para diversos alelos como ha sido descripta por Bunce y col.<sup>17</sup>.

A continuación se describe resumidamente los reactivos y pasos de la metodología empleada.

### 2.1. Master Mix

Volumen final 450,8 µl

105 µl buffer fosfato

105 µl Dnts (nucleótidos)

84 µl MgCl<sub>2</sub>


156,8 µl Agua + 70 µl ADN + 4,1 µl Taq Polimerasa

### 2.2. Primers

Se utilizaron primers específicos para los alelos HLA-DRβ1 mostrados en la Tabla 1.



**2.3. Esquema:**

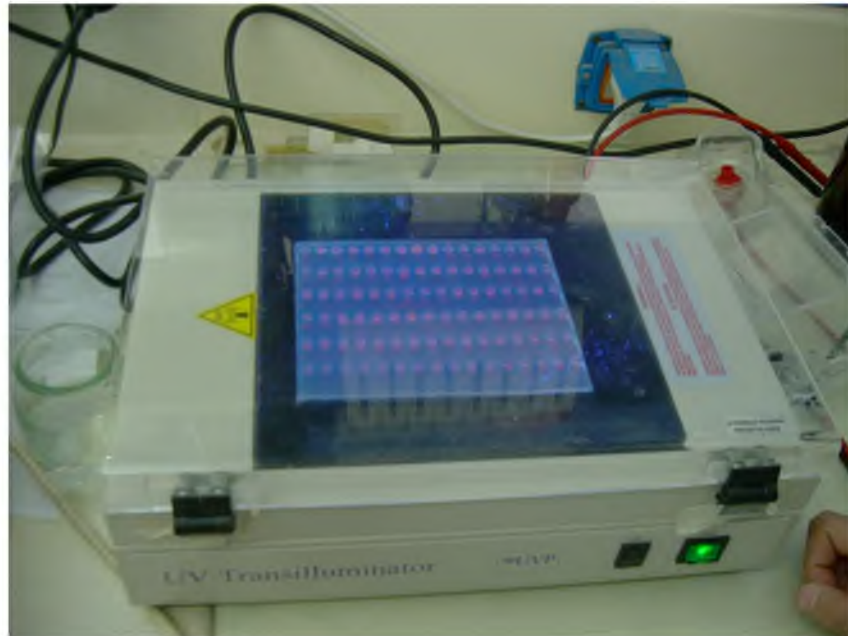
- a)  MASTER MIX  
ADN  
Taq } para cada muestra a tipificar

b) Se dispensan 5 µl en cada pocillo que contiene primers

c) Se cicla durante 1 hora 40 minutos utilizando un programa de Amplificación Phototyping.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96°C	60seg
5	96°C	20 min
	70°C	45seg
	72°C	25seg
21	96°C	25seg
	65°C	50seg
	72°C	30seg
4	96°C	30seg
	55°C	60seg
	72°C	90seg
	15°C	Indefinido

c) Se siembra en gel de agarosa, se realiza la corrida electroforética, se saca foto del gel iluminado con una lámpara ultravioleta (Figura 34) y luego se analizan los patrones obtenidos.



**Figura 34.** Visualización con luz ultravioleta de una placa de gel luego de la corrida electroforética, preparada para ser fotografiada.

## ANEXO 2

### ESTUDIO DE METALOPROTEINASAS

#### 1. Método para la determinación de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en muestras de lágrima

Para medir la actividad de las gelatinasas, se mezclaron 30 microgramos de proteínas de lágrimas con un buffer compuesto de SDS sin agente reductor, luego de lo cual se realizó una corrida por electroforesis en un substrato de gelatina 1,5 % con un gel copolimerizado de poliacrilamida al 7.5 % (gelatina SDS-PAGE). El gel fue corrido por 90 minutos a 100 voltios en un buffer 1x Tris-glicina-SDS (20 mM Tris base, 200 mM glicina, 3 mM SDS). Luego de la electroforesis, los geles fueron bañados por 30 minutos en Triton X-100 al 2,5 % y la actividad de la gelatinasa desarrollada a 37° C en buffer TNC (50 mM Tris [pH 7,5], 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) por 48 horas. Luego de la incubación, los geles fueron teñidos por una hora en azul Coomassie (azul brillante Comáis 0,1 %, etanol 25 %, ácido acético en agua destilada 10 %) y luego lavado por 2 horas en metanol 25 % y ácido acético 10 %. Las zonas claras que correspondían a la presencia de las proteinasas en el gel fueron cuantificadas mediante un programa de análisis de imagen (Gel-Pro Analyzer versión 3.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EE.UU.). Como control positivo se utilizó gelatinasa de sangre entera capilar, y las MMP-2 y MMP-9 fueron identificadas de acuerdo al peso molecular utilizando estándares de alto peso molecular (45-200 kDa) (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

#### 2. Método para la determinación de colagenasas (MMP-8 y MMP-13) y TIMP-1 y TIMP-2 en lágrima

Los niveles de MMP-8 fueron determinados mediante inmunofluorofotometría, como ha sido previamente descrito. (Holopainen y col., 2003; Hanemaaijer y col., 1997; Chen y col., 2000)

Luego, mediante Western blot, se estudiaron las diferentes colagenasas, los inhibidores tisulares (TIMP-1 y TIMP-2), y sus formas moleculares. Se utilizó un anticuerpo policlonal específico para MMP-8, y otro para MMP-13 (Oncogene Research Products, San Diego, CA, EE.UU). Anticuerpos policlonales específicos contra TIMP-1 y TIMP-2 fueron obtenidos de Chemicon (Temecula, CA, EE.UU.). Los ensayos se realizaron de acuerdo con lo descrito previamente por Prikk y col. (Prikk y col., 2001)

Brevemente, las muestras fueron mezcladas en buffer Laemmli sin agentes reductores, y calentados a 100° C por 5 minutos, luego de lo cual se realizó la separación de proteínas mediante gel de poliacrilamida-SDS 10 %. Antígenos recombinantes humanos purificados correspondientes se utilizaron como control positivo, y fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

A decorative border with a repeating geometric pattern surrounds the entire page content.

*REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK**, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5<sup>th</sup> updated ed., Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005: 65-80.
- Afonso AA**, Sobrin L, Monroy DC, Selzer M, Lokeshwar B, Pflugfelder SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40: 2506-2512.
- Alberts B**, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell*, 4<sup>th</sup> ed. New York, NY: Garland Science; 2002: 1090-1118.
- Allan TM**. Hirszfeld and the ABO blood groups. *Br J Prev Soc Med*. 1963; 17: 166-71.
- Al-Rajhi AA**, Cameron JA. Recurrence of Climatic droplet keratopathy. Two case reports. *Acta Ophthalmol Scand*. 1996; 74: 642-644.
- Al-Rajhi AA**, Wagoner MD, Badr IA, Al-Saif A, Mahmood M. Bacterial keratitis following phototherapeutic keratectomy. *J Refract Surg*. 1996; 12: 123-127.
- Anderson J**, Fuglsang H. Droplet degeneration of the cornea in North Cameroon. Prevalence and clinical appearances. *Br J Ophthalmol*. 1976; 60: 256-262.
- Ayres BD**, Capuano CJ. Excimer laser phototherapeutic keratectomy. *Ocul Surf*. 2006; 4: 196-206.
- Azar DT**, Hahn TW, Jain S, Yeh YC, Stetler-Stevensen WG. Matrix metalloproteinases are expressed during wound healing after excimer laser keratectomy. *Cornea*. 1996; 15: 18-24.
- Badr IA**, Al-Rajhi A, Wagoner MD, Dunham T, Teichman KD, Cameron JA, the KKESH Excimer Laser Study Group. Phototherapeutic keratectomy for climatic droplet keratopathy. *J Refract Surg*. 1996; 12: 114-122.
- Balbin M**, Fueyo A, Knauper V, Pendas AM, Lopez JM, Jimenez MG, Murphy G, Lopez-Otin C. Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J Biol Chem*. 1998; 273: 23959-23968.

- Bannikov GA**, Karelina TV, Collier IE, Marmer BL, Goldberg GI. Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J Biol Chem.* 2002; 277: 16022-16027.
- Baquis E.** Die colloïde Degeneration der Cornea. Ein Beitrag zur Kenntniss der Entstehung des Colloïds aus epithelialen Elementen. *Albrecht von Graefe's Arch Klin Exp Ophthalmol.* 1898; 46: 553-620.
- Barjas-Castro ML**, Soares MC, Menezes RC, Carvalho MH, Costa FF, Saad ST. ABO blood group in Amerindians from Brazilian Amazon. *Ann Hum Biol.* 2003; 30: 220-4.
- Barry RG**, Chorley RJ. *Atmosphere, Weather and Climate.* 7<sup>th</sup> ed. London: Routledge; 1998: 1-53.
- Basabe Tuero B.** Funciones de la vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 2000; 14: 46-54.
- Baur MP**, Danilovs JA. Reference tables for two and three locus haplotype frequencies of HLA. In Terasaki PI (ed): *Histocompatibility Testing.* 1980: 994-1210.
- Bavera GA.** *Manual de Aguas y Aguadas para el ganado.* 2da edición; Río Cuarto; 2001; 114.
- Birkedal-Hansen H.** Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993; 64: 474-484.
- Björn LO**, Murphy TM. Computer calculation of solar ultraviolet radiation at ground level. *Physiol Veget.* 1985; 23: 555-561.
- Blanco A.** Vitaminas. En: Blanco A, editor. *Química Biológica.* 8<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2006: 447-479.
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Brownstein S**, Rodriguez MM, Fine BS, Albert EN. The elastotic nature of hyaline corneal deposits. *Am J Ophthalmol.* 1973; 75: 799-809.
- Brubaker RE**, Bourne WM, Bachman L, McLaren JW. Ascorbic acid content of human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 1681-1683.
- Bunce M**, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C,

- DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primers mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*. 1995; 46: 355-367.
- Castillo R**, Mazzara R, Martorell J. Inmunoematología y transfusión sanguínea en hematología clínica. En: Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Cotrons JL. *Hematología Clínica*. Madrid: Ediciones Harcourt S.A.; 2001: 726-730.
- Cederqvist K**, Sorsa T, Tervahartiala T, Maisi P, Reunanen K, Lassus P, Andersson S. Matrix metalloproteinases-2, -8, and -9 and TIMP-2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress. *Pediatrics* 2001; 108: 686-692.
- Chen HY**, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2000; 27: 366-369.
- Christensen GR**. Proteinaceous corneal degeneration. *Arch Ophthalmol*. 1973; 89: 30-32.
- Corpuz LM**, Funderburgh JL, Funderburgh ML, Bottomley GS, Prakash S, Conrad GW. Molecular cloning and tissue distribution of keratocan. *J Biol Chem*. 1996; 271: 9759-9763.
- Cruickshanks KJ**, Klein BEK, Klein R. Ultraviolet light exposure and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Public Health*. 1992; 82: 1658-1662.
- Cruickshanks KJ**, Klein R, Klein BEK. Sunlight and age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol*. 1993; 111: 514-518.
- Dahan E**, Judelson J, Welsh NH. Regresión of Labrador keratopathy following cataract extraction. *Br J Ophthalmol*. 1986; 70: 737-741.
- David R**, Jenkins T. Genetic markers in glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 1980; 64: 227-231.
- Doughty MJ**, Cullen AP. Long-term effects of a single dose of ultraviolet-B on albino rabbit cornea. I. in vivo analyses. *Photochem Photobiol*. 1989; 49: 185-196.



- Downs N**, Parisi A. Three dimensional visualisation of human facial exposure to solar ultraviolet. *Photochem Photobiol Sci.* 2007; 6: 90-98.
- Duhaiman AS**, Aprahamian S, Gorban AM, Shoukrey N, Tabbara KF. Biochemical analysis of Climatic droplet keratopathy. *Saudi Bull Ophthalmol.* 1997; 3: 147-149.
- Duke-Elder S**, Leigh AG. Hyaline degeneration. En: Duke-Elder S (Ed). *System of Ophthalmology*, Vol VIII, Pt 2. *Diseases of the Outer Eye.* London: Kimpton; 1965: 888-890.
- Dursun D**, Kim MC, Solomon A, Pflugfelder SC. *Am J Ophthalmol.* 2001; 132: 8-13.
- Edelhauser HF**. The balance between corneal transparency and edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 1755-1767.
- Etzine S**, Kaufmann JCE. Band-shaped nodular dystrophy of the cornea. *Am J Ophthalmol.* 1964; 57: 760-763.
- Fain O**. Vitamin C deficiency. *Rev Med Interne.* 2004; 25: 872-880.
- Fainboim L**, Satz ML. *Introducción a la Inmunología Humana.* 3<sup>ra</sup> ed., Buenos Aires: Edición del Autor; 1995: 117-147.
- Faragher RG**, Mulholland B, Tuft SJ, Sandeman S, Khaw PT. Aging and the cornea. *Br J Ophthalmol.* 1997; 81: 814-817.
- Faure JP**, Bloch-Michel E, Le Hoang P, Vadot E. *Immunopathologie de l'oeil.* Paris: Masson; 1988: 32-37.
- Fini ME**, Parks WC, Rinehart WB, Girard MT, Matsubara M, Cook JR, West-Mays JA, Sadow PM, Burgeson RE, Jeffrey JJ, Raizman MB, Krueger RR, Zieske JD. Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. *Am J Pathol.* 1996; 149: 1287-1302.
- Fishman RS**, Sunderman FW. Band keratopathy in gout. *Arch Ophthalmol.* 1966; 75: 367-369.
- Forsius H**, Eriksson AW, Luukka H. Ophthalmological characteristics of Eskimos in Augpilagtok. *Arch Anthropol.* 1970; 7: 9-17.
- Forsius H**. Climatic changes in the eyes of Eskimos, Lapps and Cheremisses. *Acta Ophthalmol.* 1972; 50: 532-538.
- Forsius H**, Eriksson A. The cornea at northern latitudes. *Can J Ophthalmol.* 1973; 8: 280-285.

- Forsius H.** Pterygium, climatic keratopathy and pinguecula in arctic population. En: Shephard RJ, Itoh S (ed). *Circumpolar Health*. Toronto: University Toronto Press, 1976: 364-373.
- Forsius H, Losno W.** The eye in high altitude: comparison between arctic populations and 392 adults in the Titicaca region of Peru. *Circumpolar Health*. 1985; 84: 103-14.
- Forsius H, Maertens K, Fellman J.** Changes of the eye caused by the climate in Rwanda, Africa. *Ophthalmic Epidemiol*. 1995; 2: 107-113.
- Fraunfelder FT, Hanna C.** Spheroidal degeneration of cornea and conjunctiva. 1. Clinical course and characteristics. *Am J Ophthalmol*. 1972; 74: 821-826.
- Fraunfelder FT, Hanna C.** Spheroidal degeneration of cornea and conjunctiva. 3. Incidences, classification, and etiology. *Am J Ophthalmol*. 1973; 76: 41-50.
- Freedman A.** Labrador keratopathy. *Arch Ophthalmol*. 1965; 74: 198-202.
- Freedman A.** Climatic droplet keratopathy. 1. Clinical aspects. *Arch Ophthalmol*. 1973; 89: 193-197.
- Freedman A.** Labrador keratopathy and related diseases. (Arctic Symposium). *Can J Ophthalmol*. 1973; 8: 286-290.
- Freedman J.** Band shaped nodular dystrophy of the cornea in Bantu speaking Negroes. *S African Arch Ophthalmol*. 1973; 1: 149-155.
- Freedman J.** Nama keratopathy. *Br J Ophthalmol*. 1973; 57: 688-691.
- Funderburgh JL, Funderburgh ML, Brown SJ, Vergnes JP, Hassell JR, Mann MM, Conrad GW.** Sequence and structural implications of a bovine corneal keratan sulfate proteoglycan core protein. Protein 37B represents bovine lumican and proteins 37A and 25 are unique. *J Biol Chem*. 1993; 268: 11874-11880.
- Funderburgh JL, Corpuz LM, Roth MR, Funderburgh ML, Tasheva ES, Conrad GW.** Mimecan, the 25 kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J Biol Chem*. 1997; 44: 28089-28095.
- García PA, Minvielle SE, Bertoncetto R, Castro H.** *Geografía. Temas de la Argentina Actual*. Buenos Aires : Ediciones Santillana S.A.; 1998: 240-241.

- Garner A.** Keratinoid corneal degeneration. *Br J Ophthalmol.* 1970; 54: 769-780.
- Garner A,** Morgan G, Tripathi FC. Climatic droplet keratopathy. II. Pathologic findings. *Arch Ophthalmol.* 1973; 89: 198-204.
- Garner A,** Fraunfelder FT, Barras TC. Spheroidal degeneration of the cornea and conjunctiva. *Br J Ophthalmol.* 1976; 60: 473-478.
- Gipson IK,** Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS. Hemidesmosomes and anchoring fibril collagen appear synchronously during development and wound healing. *Dev Biol.* 1988; 126: 253-262.
- Gipson IK,** Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Keough M. Reassembly of the anchoring structures of the corneal epithelium during wound repair in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989; 30: 425-434.
- Girard MT,** Matsubara M, Kublin C, Tessier MJ, Cintron C, Fini ME. Stromal fibroblasts synthesize collagenase and stromelysin during long-term tissue remodeling. *J Cell Sci.* 1993; 104: 1001-1011.
- Golub LM,** Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res.* 1998; 12: 12-26.
- Gray RH,** Johnson GJ, Freedman A. Climatic droplet keratopathy. *Surv Ophthalmol* 1992; 36: 241-253.
- Gueders MM,** Balbin M, Rocks N, Foidart JM, Gosset P, Louis R, Shapiro S, Lopez-Otin C, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinase-8 deficiency promotes granulocytic allergen-induced airway inflammation. *J Immunol.* 2005; 175: 2589-2597.
- Hanemaaijer R,** Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, van Hinsbergh VW, Helaakoski T, Kainulainen T, Ronka H, Tschesche H, Salo T. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. *J Biol Chem.* 1997; 272: 31504-31509.
- Hanna C,** Bicknell DS, O'Brian J. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol.* 1961; 65: 695-698.
- Heikkilä P,** Suojanen J, Pirilä E, Vaananen A, Koivunen E, Sorsa T, Salo T. Human tongue carcinoma growth is inhibited by selective antigelatinolytic peptides. *Int J Cancer.* 2005; 118: 2202-2209.

- Hirschmann JV**, Raugi GJ. Adult scurvy. *J Am Acad Dermatol*. 1999; 41: 895-906.
- Hmida S**, Maamar M, Mojaat N, Abid S, Midouni B, Boukef K. Polymorphisme du système ABO dans la population tunisienne. *Transfus Clin Biol*. 1994; 4: 291-293.
- Holopainen JM**, Moilanen JA, Sorsa T, Kivela-Rajamki M, Tervahartiala T, Vesaluoma MH, Tervo TM. Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 2550-2556.
- Hu DN**. Photobiology of ocular melanocytes and melanoma. *Photochem Photobiol*. 2005; 81: 506-509.
- Jakobiec FA**, Silbert G. Are most iris “melanomas” really nevi?: A clinicopathologic study of 189 lesions. *Arch Ophthalmol*. 1981; 99: 2117-2132.
- Janeway CA**, Travers P, Walport M, Capra JD. *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*. 4<sup>th</sup> ed., New York: Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, 1999: 135-147.
- Jeddi Blouza A**, Loukil I, Mhenni A, Ben Rayana C, Hmida S. Groupes sanguins et glaucome primitif à angle ouvert. *J Fr Ophtalmol*. 2007; 30: 493-496.
- Jesse F**, Gregory III. Vitaminas. En: Fennema OR editor. *Química de los Alimentos*. 2<sup>a</sup> ed. Zaragoza: ACRIBIA; 2000: 559-568.
- Johnson GJ**, Overall M. Histology of spheroidal degeneration of the cornea in Labrador. *Br J Ophthalmol*. 1978; 62: 53-61.
- Johnson G**, Minassian D, Franken S. Alterations of the anterior lens capsule associated with climatic keratopathy. *Br J Ophthalmol*. 1989; 73: 229.
- Kaki Y**, Nagai R, Amano S, Takazawa Y, Fukayama M, Oshika T. Advanced glycation end product deposits in climatic droplet keratopathy. *Br J Ophthalmol*. 2007; 9: 85-88.
- Kenyon KR**, Hersh PS, Starck T, Fogle JA. Corneal Dysgeneses, Dystrophies, and Degenerations. In: Tasman W, ed. *Duane's Clinical Ophthalmology*. Vol 4, External Eye Diseases. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 2000; 16: 1-53.

- Kervick GN**, Pflugfelder SC, Haimovici R, Brown H, Tozman E, Yee R. Paracentral rheumatoid corneal ulceration. Clinical features and cyclosporine therapy. *Ophthalmol.* 1992; 99: 80-88.
- Kiili M**, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, Salo T, Sorsa T. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 224-232.
- Kim J**. The use of vital dyes in corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol.* 2000; 11: 241-7.
- Klintworth Gk**. Chronic actinic keratopathy. A condition associated with conjunctival elastosis (pingueculae) and typified by characteristic extracellular concretions. *Am J Pathol.* 1972; 67: 327-348.
- Koivunen E**, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Medina OP, Heikkila P, Kantor C, Gahmberg CG, Salo T, Konttinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E, Pasqualini R. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol.* 1999; 17: 768-774.
- Kolozvári L**, Nógrádi A, Hopp B, Bor Z. UV absorbance of the human cornea in the 240-to-400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 2165-2168.
- Kumagai N**, Yamamoto K, Fukuda K, Nakamura Y, Fujitsu Y, Nuno Y, Nishida T. Active matrix metalloproteinases in the tear fluid of individuals with vernal keratoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110: 489-491.
- Labermeier U**, Kenney MC. The presence of EC collagen and type IV collagen in bovine Descemet's membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983; 116: 619-25.
- Le Hoang P**, Ryan SJ. Birdshot Retinochoroidopathy. En: Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR. *Ocular Infection and Immunology*. St. Louis: Mosby; 1996: 570-578.
- Levine M**, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, Park JB, Lazarev A, Graumilch JF, King J, Cantilena LR. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 3704-3709.

- Li DQ**, Lokeshwar BL, Solomon A, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2001; 73: 449-459.
- Li DQ**, Shang TY, Kim HS, Solomon A, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC. Regulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 2928-2936.
- Lugli L**. Degeneratio corneae sphaerularis elaioides. *Albrecht von Graefe's Arch Klin Exp Ophthalmol.* 1935; 134: 211-226.
- Määttä M**, Kari O, Tervahartiala T, Peltonen S, Kari M, Saari M, Sorsa T. Tear fluid levels of MMP-8 are elevated in ocular rosacea - treatment effect of oral doxycycline. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006; 244 (8): 957-962.
- Machlin LJ**, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1987; 1: 441-445.
- Madronich S**. The atmosphere and UV-B radiation at ground level. En: Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsch W, editors. *Environmental UV Photobiology*. New York: Plenum Press; 1993: 1-39.
- Mahmoodian F**, Peterkofsky B. Vitamin C deficiency in guinea pigs differentially affects the expression of type IV collagen, laminin, and elastin in blood vessels. *J Nutr.* 1999; 129: 83-91.
- Man Choy CK**, Cho P, Chung WY, Benzie IFF. Water-soluble antioxidant in human tears: effects of the collection method. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 3130-3134.
- Manning FJ**, Wehrly SR, Foulks GN. Patient tolerance and ocular surface staining characteristics of lisamine green versus rose bengal. *Ophthalmol.* 1995; 102: 1953-1957.
- Martin XY**, Safran AB. Corneal hypoesthesia. *Surv Ophthalmol.* 1988; 33: 28-40.
- Massera RF**. *La Meseta Patagónica de El Cuy. Una Vasta Soledad*. Publicación del Gobierno de Río Negro, Argentina; 2001.
- Matsubara M**, Girard MT, Kublin CL, Cintron C, Fini ME. Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodeling cornea. *Dev Biol.* 1991; 147: 425-439.

- Matsuki H**, Fujimoto N, Iwata K, Knauper V, Okada Y, Hayakawa T. A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta*. 1996; 244: 129-143.
- McMillan SJ**, Kearley J, Campbell JD, Zhu XW, Larbi KY, Shipley JM, Senior RM, Nourshargh S, Lloyd CM. Matrix metalloproteinase-9 deficiency results in enhanced allergen-induced airway inflammation. *J Immunol*. 2004; 172: 2586-2594.
- Meek KM**, Blamires T, Elliott GF, Gyi TJ, Nave C. The organization of collagen fibrils in the corneal stroma: a synchrotron x-ray diffraction study. *Curr Eye Res*. 1987; 6: 841-846.
- Meller D**, Li D-Q, Tseng SCG. Regulation of collagenase, stromelysin, and gelatinase B in human conjunctival and conjunctivochalasis fibroblasts by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 2922-2929.
- Miller SA**, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16: 1215.
- Millin JA**, Golub BM, Foster CS. Human basement membrane components of keratoconus and normal corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986; 27: 604-607.
- Mitchell PG**, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Georghegan KF, Hambor JE. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*. 1996; 97: 761-768.
- Nagase H**, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999; 274: 21491-21494.
- Neuhold LA**, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, Turner J, Wu W, Billingham C, Meijers T, Poole AR, Babij P, DeGennaro LJ. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest*. 2001; 107: 35-44.
- Newsome DA**, Gross J, Hassell JR. Human corneal stroma contains three distinct collagens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1982; 22: 376-381.

- Nishikimi M**, Udenfriend S. Immunologic evidence that the gene for L-gulonono-y-lactone oxidase is not expressed in animals subject to scurvy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976; 73: 2066-2068.
- Nishikimi M**, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Yagi K. Cloning and chromosomal mapping of the human non functional gene for L-gulonono gamma-lactona oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem*. 1994; 269: 13685-13688.
- Norn MS**. Spheroid degeneration of the cornea and conjunctiva. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1978; 56: 551-562.
- Nwomeh BC**, Liang HX, Cohen IK, Yager DR. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *J Surg Res*. 1999; 81: 189-195.
- O'Connor GR**. Calcific band keratopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1972; 70: 58-81.
- O'Brien TP**, Li QJ, Sauerburger F, Reviglio VE, Rana T, Ashraf MF. The role of matrix metalloproteinases in ulcerative keratolysis associated with perioperative diclofenac use. *Ophthalmol*. 2001; 108: 656-659.
- Oikarinen A**, Kylmaniemi M, Autio-Harmanen H, Autio P, Salo T. Demonstration of 72-kDa and 92-kDa forms of type IV collagenase in human skin: variable expression in various blistering diseases, induction during re-epithelialization, and decrease by topical glucocorticoids. *J Invest Dermatol*. 1993; 101: 205-210.
- Okada Y**, Saika S, Hashizume N, Kobata S, Yamanaka O, Ohnishi Y, Senba E. Expression of fos family and jun family proto-oncogenes during corneal epithelial wound healing. *Curr Eye Res*. 1996; 15: 824-832.
- Olsson ML**, Santos SE, Guerreiro JF, Zago MA, Chester MA. Heterogeneity of the O alleles at the blood group ABO locus in Amerindians. *Vox Sang*. 1998; 74: 46-50.
- Ormerod DL**, Dahan E, Hagele JE, Guzek JP. Serious occurrences in the natural history of advanced climatic keratopathy. *Ophthalmol*. 1994; 101: 448-453.
- Owen CA**, Hu Z, Lopez-Otin C, Shapiro SD. Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent,



- tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J Immunol.* 2004; 172 (12): 7791-7803.
- Parisi AV**, Turnbull D. Diffuse solar ultraviolet radiation. En: Friedlaender MH, ed. Ultraviolet Radiation and the Eye. *Int Ophthalmol Clin.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005; 45: 19-27.
- Pauling L.** Evolution and need for ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1970; 67: 1643-1647.
- Pepper MS.** Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 346-355.
- Petty MA.** *Promoción Humana en Medios Rurales Marginales.* Buenos Aires: Editorial San Pablo, 1994.
- Pflugfelder SC**, Farley W, Luo L, Chen LZ, de Paiva CS, Olmos LC, Li DQ, Fini ME. Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye. *Am J Pathol.* 2005; 166: 61-71.
- Prikk K**, Maisi P, Pirila E, Sepper R, Salo T, Wahlgren J, Sorsa T. In vivo collagenase-2 (MMP-8) expression by human bronchial epithelial cells and monocytes/macrophages in bronchiectasis. *J Pathol.* 2001; 194: 232-238.
- Prikk K**, Maisi P, Pirila E, Reintam MA, Salo T, Sorsa T, Sepper R. Airway obstruction correlates with collagenase-2 (MMP-8) expression and activation in bronchial asthma. *Lab Invest.* 2002; 82: 1535-1545.
- Purcell EF**, Lerner LH, Kinsey VE. Ascorbic acid in aqueous humor and serum of patients with and without cataract. *Arch Ophthalmol.* 1954; 51: 1-6.
- Reim M**, Seidl M, Brucker K. Accumulation of ascorbic acid in the corneal epithelium. *Ophthalmic Res.* 1978; 10: 135-139.
- Ren H**, Wilson G. The effect of ultraviolet-B irradiation on the cell shedding rate of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol (Copenh.)* 1994; 72: 447-452.
- Resnikoff S.** Épidémiologie de la kératopathie de Bietti. Étude des facteurs de risque en Afrique centrale (Tchad). *J Fr Ophtalmol.* 1988; 11: 733-740.
- Resnikoff S**, Filliard G, Dell'Aquila B. Climatic droplet keratopathy, exfoliation syndrome, and cataract. *Br J Ophthalmol.* 1991; 75: 734-736.

- Ringvold A**, Blika S, Elsas T, Gudahl J, Juel Brevik T, Hesstvedt P, Hoff K. The middle-Norway eye-screening study. III. The prevalence of capsular glaucoma is influenced by blood group antigens. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1993; 71: 207-213.
- Ringvold A**. In vitro evidence for UV-protection of the eye by the corneal epithelium mediated by the cytoplasmic protein, RNA and ascorbate. *Acta Ophthalmol Scand*. 1997; 75: 496-498.
- Ringvold A**. Corneal epithelium and UV-protection of the eye. *Acta Ophthalmol Scand*. 1998; 76: 149-153.
- Ringvold A**, Anderssen E, Kjonniksen I. Ascorbate in the corneal epithelium of diurnal and nocturnal species. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39: 2774-2777.
- Rodger FC**. Clinical findings, course, and progress of Bietti's corneal degeneration in the Dahlak Islands. *Br J Ophthalmol*. 1973; 57: 657-664.
- Rodger FC**, Cuthill JA, Fydeler PJ, Lenham AP. Ultraviolet radiation as a possible cause of corneal degenerative changes under certain physiographic conditions. *Acta Ophthalmol*. 1974; 52: 777-785.
- Rodriguez MM**, Laibson PR, Weinreb S. Corneal elastosis. *Arch Ophthalmol*. 1975; 93: 111-114.
- Rosenthal FS**, West SK, Munoz B, Emmett EA, Strickland PT, Taylor HR. Ocular and facial skin exposure to ultraviolet radiation in sunlight: a personal exposure model with application to a worker population. *Health Physics*. 1991; 61: 77-86.
- Rozsa AJ**, Beuerman RW. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain*. 1982; 14: 105-20.
- Ryder LP**, Anderson E, Svejgaard A. An HLA map of Europe. *Hum Hered*. 1978; 28: 171-200.
- Saari H**, Suomalainen K, Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T. Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 171: 979-987.
- Sakimoto T**, Shoji J, Kanno H, Sawa M. Gelatinase expression in ocular surface disorders. *Jpn J Ophthalmol*. 2004; 48: 17-22.
- Savage CP Jr**, Cohen S. Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp Eye Res*. 1973; 15: 361-366.

- Sepper R**, Konttinen YT, Ding Y, Takagi M, Sorsa T. Human neutrophil collagenase (MMP-8), identified in bronchiectasis BAL fluid, correlates with severity of disease. *Chest*. 1995; 107: 1641-1647.
- Serra HM**, Cafaro T. Acido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquím Clin Latinoam*. 2007. En prensa.
- Singh D**, Singh M. Climatic keratopathy. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1978; 98: 10-13.
- Sivak JM**, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Progr Ret Eye Res*. 2002; 21: 1-14.
- Slincy DH**. Exposure geometry and spectral environment determine photobiological effects on the human eye. *Photochem Photobiol*. 2005; 81: 483-489.
- Smith ME**. Degenerations and Atrophies of the Iris. In: Tasman W, ed. *Duane's Clinical Ophthalmology*. Vol 4, Diseases of the Uvea. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 2000; 65: 1-6.
- Smith VA**, Hoh HB, Easty DL. Role of ocular matrix metalloproteinases in peripheral ulcerative keratitis. *Br J Ophthalmol*. 1999; 83: 1376-1383.
- Smith VA**, Rishmawi H, Hussein H, Easty DL. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br J Ophthalmol*. 2001; 85: 147-153.
- Sobrin L**, Liu Z, Monroy DC, Solomon A, Selzer MG, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 1703-1709.
- Sole P**, Dalens H, Gentou C. *Biophthalmologie*, Paris: Masson. Livre III Les Dioptries Oculaires, Ch 1 La Cornée; 1992: 1-28.
- Solomon A**, Li D-Q, Lee S-B, Tseng SCG. Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase-type plasminogen activator in primary pterygium body fibroblasts by inflammatory cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 2154-2163.
- Sorsa T**, Golub LM. Is the excessive inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) by potent synthetic MMP inhibitors (MMPIs) desirable in periodontitis and other inflammatory diseases? That is: 'Leaky' MMPIs vs excessively efficient drugs. *Oral Dis*. 2005; 11: 408-409.

- Sotozono C**, Inatomi T, Nakamura M, Kinoshita S. Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36: 1524-1529.
- Sridhar MS**, Garg P, Das S, Vemuganti G, Gopinathan U, Rao GN. Infectious keratitis in climatic droplet keratopathy. *Cornea.* 2000; 19: 455-458.
- Stepp MA**. Corneal integrins and their functions. *Exp Eye Res.* 2006; 83: 3-15.
- Sugar SH**, Kobernick S. The white limbus girdle of Vogt. *Am J. Ophthalmol.* 1960; 50: 101-107.
- Tabbara KF**. Climatic droplet keratopathy. *Int Ophthalmol Clin.* 1986; 26: 63-68.
- Takahashi H**, Kaminski AE, Zieske JD. Glucose transporter 1 expression is enhanced during corneal epithelial wound repair. *Exp Eye Res.* 1996; 63: 649-659.
- Taylor HR**. Aetiology of climatic droplet keratopathy and pterygium. *Br J Ophthalmol.* 1980; 64: 154-163.
- Taylor HR**, West SK, Rosenthal FS, Munoz B, Newland HS, Abbey H, Emmett EA. Effect of ultraviolet radiation on cataract formation. *N Engl J Med.* 1988; 319: 1429-1433.
- Taylor HR**, West SK, Rosenthal FS, Munoz B, Newland HS, Emmett EA. Corneal changes associated with chronic UV irradiation. *Arch Ophthalmol.* 1989; 107: 1481-1484.
- Taylor HR**, West SK, Munoz B, Rosenthal FS, Bressler SB, Bressler NM. The long term effects of visible light on the eye. *Arch Ophthalmol.* 1992; 110: 99-104.
- Tervo T**, Sulonen J, Valtonen S, Vannas A, Virtanen I. Distribution of fibronectin in human and rabbit corneas. *Exp Eye Res.* 1986; 42: 399-406.
- Tiwari JL**, Terasali PI. *HLA and Disease Associations*. Basilea: Springer-Verlag; 1985: 264-276.
- Tremblay M**, Dube I. La kératite du Labrador. *Arch Ophthalmol (Paris).* 1974; 34: 781-792.
- Tripathi RC**, Raja SC, Tripathi BJ. Prospects for epidermal growth factor in the management of corneal disorders. *Surv Ophthalmol.* 1990; 34: 457-462.

- Tsukaguchi H**, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, Brubaker RF, Hediger MA. A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*. 1999; 6 (399): 70-75.
- Urrets-Zavalía JA**, Knoll EG, Maccio JP, Urrets-Zavalía EA, Saad JA, Serra HM. Climatic droplet keratopathy in the Argentine Patagonia. *Am J Ophthalmol*. 2006; 141: 744-746.
- Urrets-Zavalía JA**, Maccio JP, Knoll EG, Cafaro TA, Urrets-Zavalía EA, Serra HM. Surface alterations, corneal hypoesthesia and iris atrophy in patients with climatic droplet keratopathy. *Cornea*. 2007; 26: 800-804.
- van Meter WS**, Holland EJ, Doughman DJ. Corneal edema. In: Tasman W, ed. *Duane's Clinical Ophthalmology*. Vol 4, External Eye Diseases. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 2000; 16 A: 1-19.
- Visse R**, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92: 827-839.
- Vullo CM**, Celis E, Serra HM, Riera CM. Study of HLA in Mataco population, an isolated american indian tribe. *Tissue Antigens*. 1984; 23: 33 – 39.
- Wang Y**, Mackenzie B, Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA. Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 267: 488-494.
- Waring GO 3rd**, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmol*. 1982; 89: 531-590.
- Waring GO III**, Malaty A, Grossniklaus H, Kaj H. Climatic proteoglycan stromal keratopathy, a new corneal degeneration. *Am J Ophthalmol*. 1995; 120: 330-341.
- West SK**, Rosenthal FS, Bressler NM, Bressler SB, Munoz B, Fine SL, Taylor HR. Exposure to sunlight and other risk factors for age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 1989; 107: 875-879.
- Wilson SE**, Chen L, Mohan RR, Liang Q, Liu J. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp Eye Res*. 1999; 68: 377-397.

- Wilson SE**, Lloyd SA, He YG. EGF, basic FGF, and TGF beta-1 messenger RNA production in rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33: 1987-1995.
- Wood TO**, Walter GG. Treatment of band keratopathy. *Am J Ophthalmol.* 1975; 80: 550.
- Wood TO**. Salzmann's nodular degeneration. *Cornea.* 1990; 9: 17-22.
- Wyatt HT**. Corneal disease in the Canadian north. *Can J Ophthalmol.* 1973; 8: 298-305.
- Young JDH**, Finlay RD. Primary spheroidal degeneration of the cornea in Labrador and Northern Newfoundland. *Am J Ophthalmol.* 1975; 79: 129-134.
- Yu FX**, Guo J, Zhang Q. Expression and distribution of adhesion molecule CD44 in healing corneal epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 710-717.
- Ziche M**, Alessandri G, Gullino PM. Gangliosides promote the angiogenic response. *Lab Invest.* 1989; 61: 629-634.
- Zigman S**. Ocular light damage. *Photochem Photobiol.* 1993; 57: 1060-1068.