



Universidad Nacional de Córdoba  
Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud  
Facultad de Ciencias Médicas

*Desarrollo de Modelo Experimental de Lesión Corneal Inducida por Láser. Estudio de la Recuperación Corneal en Animales Normales y Deficientes en Ácido Ascórbico*

Autora: Alicia C. Suárez

Director: Prof. Dr. Horacio M. Serra

Trabajo presentado para obtener el título de

Doctor en Ciencias de la Salud.

2017

## **Dedicatorias**

A mi director Profesor Dr. Horacio Marcelo Serra.

A los Prof. Dres. Vilma Campana y Julio Alberto Urrets-Zavalía.

A la Bioquímica María Fernanda Suárez.

A los residentes de oftalmología del Centro de la Visión, Clínica Universitaria Reina Fabiola: Nicolás Crim, Rodolfo Monti, Evangelina Espósito y Leandro Correa.

A la Prof. Dra. María Cristina Maldonado (Centro de Microscopía Electrónica, UNC).

## **Agradecimientos**

A René por su paciencia, apoyo y contención.

A mis amigas Griselda, Corina y Sandra que me acompañaron, alentaron y aconsejaron durante toda la carrera, como amigas y como profesionales.

A Karina, Verónica y Franco, a Lita y Ana María que comprendieron mis ausencias.

Artículo 43 del reglamento para Carrera de Doctorado en Ciencias de la Salud:

“La Facultad de Ciencias Médicas no se hace solidaria con las opiniones de esta Tesis”

## Índice

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| .....                                                                                                                     | 1  |
| Índice.....                                                                                                               | 4  |
| Abreviaturas.....                                                                                                         | 6  |
| Resumen .....                                                                                                             | 8  |
| Summary .....                                                                                                             | 10 |
| Introducción .....                                                                                                        | 12 |
| Antecedentes del equipo de investigación y justificación del presente estudio .....                                       | 12 |
| Anatomía y Fisiología Corneal .....                                                                                       | 14 |
| Modelos de lesión corneal para estudiar la cicatrización.....                                                             | 29 |
| Antecedentes de uso del láser en oftalmología .....                                                                       | 29 |
| Antecedentes del uso de OCT en oftalmología .....                                                                         | 33 |
| Objetivos .....                                                                                                           | 35 |
| Objetivo general.....                                                                                                     | 35 |
| Objetivos específicos.....                                                                                                | 35 |
| Materiales y Métodos .....                                                                                                | 36 |
| Equipos láser .....                                                                                                       | 36 |
| Animales.....                                                                                                             | 36 |
| Diseño experimental de la primera etapa: Producir lesiones por los distintos tipos de láser a potencias baja y alta. .... | 37 |
| Diseño experimental de la segunda etapa: Investigación de técnicas útiles para evaluar córneas de cobayos in vivo.....    | 38 |
| Diseño experimental de la tercera etapa: Evaluación de la córnea lesionada cuando hay deficiencia de AA.....              | 39 |
| Estudios in vivo.....                                                                                                     | 41 |
| Biomicroscopía (BM) .....                                                                                                 | 41 |
| Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) Visante y Cirrus .....                                                              | 41 |
| Estudios in vitro.....                                                                                                    | 41 |
| Microscopía Óptica (MO) .....                                                                                             | 41 |
| Microscopía Electrónica (ME).....                                                                                         | 42 |
| Western Blot (WB) .....                                                                                                   | 42 |
| Análisis de los datos .....                                                                                               | 43 |
| Estudios Estadísticos .....                                                                                               | 43 |
| 4. Resultados.....                                                                                                        | 45 |
| Resultados de la primera etapa: Lesiones producidas por los distintos tipos de láser a potencias baja y alta.....         | 45 |

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Resultados de la segunda etapa: Investigación de técnicas útiles para la evaluación de córneas de cobayos in vivo.....        | 52  |
| Resultados de la BM .....                                                                                                     | 52  |
| Resultados OCT Visante.....                                                                                                   | 54  |
| Resultados de Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) Cirrus.....                                                               | 56  |
| Resultados de la tercera etapa: evaluación de la recuperación corneal en cobayos con deficiencia de ácido ascórbico (AA)..... | 56  |
| Resultados obtenidos por BM: .....                                                                                            | 57  |
| Resultados obtenidos con OCT Visante .....                                                                                    | 58  |
| Resultados de Microscopía óptica en grupos HAA y LAA .....                                                                    | 60  |
| Resultados de ME.....                                                                                                         | 63  |
| 5. Discusión .....                                                                                                            | 71  |
| 6. Conclusiones .....                                                                                                         | 85  |
| 7. Bibliografía .....                                                                                                         | 87  |
| 8. Anexo: Publicaciones.....                                                                                                  | 101 |

## Abreviaturas

|               |                                                                                                                    |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AA            | Ácido ascórbico                                                                                                    |
| ACh           | Acetilcolina                                                                                                       |
| ALDH 1        | Aldehído deshidrogenasa 1                                                                                          |
| BM            | Biomicroscopía                                                                                                     |
| CoQ10         | Coenzima Q10                                                                                                       |
| CS            | Condroitín sulfato                                                                                                 |
| DS            | Dermatán sulfato                                                                                                   |
| EGF           | Factor de crecimiento epidérmico                                                                                   |
| EGFR          | Receptor de factor de crecimiento epidérmico                                                                       |
| FNT- $\alpha$ | Factor de necrosis tumoral alfa                                                                                    |
| GAG           | Glucosaminoglicanos                                                                                                |
| GLO           | L-gulono- $\gamma$ -lactona oxidasa                                                                                |
| HAA           | Hight ascorbic acid- Alta en ácido ascórbico                                                                       |
| HE            | Hematoxilina y eosina                                                                                              |
| IGF -1        | Insulin like growth factor 1                                                                                       |
| IGF2R         | Insulin like growth factor 2 receptor                                                                              |
| IL-1          | Interleuquina 1                                                                                                    |
| LAA           | Low ascorbic acid- Baja en ácido ascórbico                                                                         |
| Láser o LASER | Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation o Amplificación de Luz por Emisión Estimulada de Radiación |
| LASIK         | Laser Assisted in Situ Keratomileusis (queratotomía radial para el tratamiento de errores refractivos de visión)   |
| MEC           | Matriz extracelular                                                                                                |

|                |                                               |
|----------------|-----------------------------------------------|
| MMP            | Metaloproteinasa de matriz                    |
| MO             | Microscopía óptica                            |
| ME             | Microscopía electrónica                       |
| MSK            | Queratotomía superficial manual               |
| Nd-YAG         | Neodymium-doped yttrium aluminium garnet      |
| NGF            | Factor de crecimiento nervioso                |
| OCT            | Tomografía de coherencia óptica               |
| OGF            | Factor de crecimiento opiode                  |
| PRK            | Queratotomía fotorefractiva                   |
| QCE            | Queratopatía climática esferoidea             |
| RD             | Retinopatía diabética                         |
| RUV            | Radiación ultravioleta                        |
| SP             | Sustancia P                                   |
| TGF- $\beta$ 1 | Factor de crecimiento transformador $\beta$ 1 |
| TIMPs          | Inhibidores de las MMPs                       |
| VEGF           | Factor de crecimiento endotelial vascular     |
| $\alpha$ -SMA  | Actina del músculo liso                       |

## Resumen

El objetivo del presente trabajo fue investigar las lesiones producidas por distintos tipos de láser de uso en oftalmología en córnea de cobayos y la recuperación corneal en animales normales y deficientes en ácido ascórbico (AA). Las erosiones corneales y la carencia de mecanismos protectores contra los efectos crónicos y nocivos de la radiación ultravioleta (déficit de AA entre otros) están asociados con la génesis de queratopatía climática esferoidea (QCE), una enfermedad humana que carece de un modelo experimental para la realización de estudios moleculares.

**Métodos:** En la primera etapa se lesionaron 32 córneas de cobayos normales utilizando distintas potencias y tiempos de 4 tipos de láser: argón, CO<sub>2</sub>, diodo y Nd-YAG en 4 grupos de animales y se estudiaron dichas lesiones por biomicroscopía (BM) y microscopía óptica (MO) con el fin de seleccionar un láser que lesione solamente el epitelio y el estroma superficial y no deje cicatrices. Luego, se identificaron equipos y técnicas para estudiar *in vivo* la lesión y posterior recuperación, en 14 córneas de otros cobayos normales, expuestas al láser elegido (argón) a una configuración de 350 mW, 0,3 s, 50  $\mu$  de diámetro, en diferentes tiempos. Por último, se investigó el efecto de una dieta deficiente en AA en el proceso de recuperación de la lesión inducida por el láser argón. Se utilizaron 14 cobayos, 7 alimentados con dieta normal en AA y 7 con dieta deficiente en AA y se comparó en ambos grupos la recuperación post aplicación del láser argón durante 15 días, utilizando BM, MO, microscopía electrónica (ME), tomografía de coherencia óptica (OCT) y Western blot (WB).

**Resultados:** Solo el láser argón a una configuración de 350 mW, 0,3 s, 50  $\mu$  de diámetro produjo lesiones de epitelio y estroma superficial, manteniéndose indemne el endotelio. Por BM se observaron algunos leucomas que desaparecieron hacia el día 15. Mediante OCT se observó un adelgazamiento del espesor corneal en los ojos tratados con esas condiciones de láser argón durante la primera semana. Los grupos de dieta alta en AA (HAA) y de dieta deficiente en AA (LAA) presentaron diferencias de peso al inicio del experimento. Con la técnica de BM, se observaron tanto en HAA como en LAA, leucomas que fueron desapareciendo hacia el día 15 post aplicación del láser, y ya a los 21 días, no se observaba ninguna anomalía corneal. Con la técnica de OCT se observó el adelgazamiento inicial de la córnea y una posterior recuperación en el día 7 en los dos grupos experimentales. Por MO se observaron infiltrados celulares y cambios de la



estructura epitelial y estromal similares en ambos grupos. MMP-9 y MMP-10 incrementaron sus valores luego de la lesión, alcanzaron un máximo a diferentes tiempos, para volver a valores basales hacia el séptimo día en ambos grupos experimentales. No se observaron diferencias significativas en la expresión de estas enzimas entre el grupo HAA y LAA, salvo para MMP-9 que fue mayor en el grupo LAA a las 18 horas post lesión. Por último, con la técnica de ME, se observaron diferentes lesiones que afectaron ultraestructuralmente tanto epitelio como estroma superficial durante los 7 primeros días. La recuperación del epitelio fue similar para ambos grupos experimentales, pero en el grupo LAA, a diferencia del grupo HAA, se pudieron observar alteraciones en el ordenamiento de las fibras colágenas y en las características morfológicas de los queratocitos hasta el final del estudio.

**Conclusiones:** Fue posible desarrollar lesiones corneales en epitelio y estroma anterior de cobayos de manera reproducible mediante el uso de láser argón. Los estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que las córneas lesionadas con este láser y en esas condiciones no dejaron alteraciones microscópicas irreversibles. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (HAA y LAA), cuando se estudió la recuperación de la córnea utilizando BM, OCT, MO (extravasación leucocitaria). La expresión de MMP-9 y MMP-10 medida a diferentes tiempos post lesión fue muy similar en ambos grupos.

Solo los estudios de ME permitieron hallar diferencias entre ambos grupos experimentales. Los cambios ultraestructurales en el estroma (ordenamiento de las fibras de colágeno y características anormales de los queratocitos) comenzaron a observarse hacia el día 7° post tratamiento con láser, y se mantuvieron hasta el final del estudio solamente en el grupo LAA.

**Palabras Clave:** cobayos, córnea, láser argón, déficit de vitamina C, curación.

## Summary

The aim of this study was to investigate the lesions produced by different types of lasers used in ophthalmology in guinea pig cornea, and the corneal healing in normal and deficient ascorbic acid (AA) animals. Corneal erosions and lack of protective mechanisms against chronic and harmful effects of ultraviolet radiation (among others a deficit of AA) are associated with the genesis of climatic droplet keratopathy (CDK), a human disease that lack of an experimental model for conducting molecular studies.

**Methods:** Firstly, damage were induced in 32 corneas of normal guinea pigs using different powers and times of 4 lasers types: argon, CO<sub>2</sub>, diode and Nd-Yag in 4 groups of animals. Such injuries were evaluated by biomicroscopy (BM) and optical microscopy (OM) in order to select a laser configuration that injures only the epithelium and superficial stroma, without leaving scars. Subsequently, useful equipments and methodologies were identified to perform *in vivo* studies of lesions produced in 14 normal guinea pigs by the chosen laser (argon) at 350 mW settings, 0.3 s, 50  $\mu$  diameter, and the corneal recovery at different times. Finally, the effect of a deficient AA diet was investigated in the healing process of the injury induced by the argon laser. Fourteen guinea pigs were used, 7 guinea pigs fed with normal diet (HAA) were compared with 7 animals fed with AA-deficient diet (LAA) and the corneal healing after argon laser application were assessed during 15 days using BM, OM, electronic microscopy (EM), optical coherence tomography (OCT) and Western blot (WB).

**Results:** Only Argon laser at a configuration of 350mW, 0.3 s, 50  $\mu$  in diameter produced lesions to the epithelium and the superficial stroma, remaining undamaged the endothelium. Using BM some leucomas were observed but they disappeared by day 15. By OCT thickness corneal thinning was observed during the first week in the eyes treated with this configuration of the Argon laser. Groups fed with high diet in AA (HAA) and deficient AA diet (LAA) showed differences in weight at the start of the experiment. With the BM we observed in both groups of animals. leucomas which were disappearing by day 15 post application of the laser, and no corneal abnormalities were observed by 21 days. OCT technique showed an initial thinning of the cornea with a complete recovery by day 7 in the two experimental groups. OM studies indicated that the leukocytes infiltration, and changes in the epithelial and stromal structure were similar in both groups. MMP-9 and MMP-10 values increased after injury, peaked at

different time to return to baseline values to the seventh day. No significant differences in the kinetics of expression of these enzymes between HAA and LAA group were observed, except at 18 hours in the LAA group for MMP-9. Finally, with EM technique, different ultrastructural lesions that affected both the epithelium and stroma surface during the first 7 days were observed. Epithelium recovery was similar for both experimental groups but in the LAA group, unlike the HAA group, the changes in the arrangement of collagen fibers and keratocytes morphology remain until the end of the study.

**Conclusions:** It was possible to develop epithelium and anterior stroma corneal reproducibly lesions in guinea pig using Argon laser. The *in vivo* and *in vitro* studies showed that injured corneas with this laser and in these conditions, did not result in irreversible microscopic alterations. No significant differences between experimental groups (HAA and LAA) were observed when the healing of the cornea was studied using BM, OCT, MO (leukocyte extravasation). The expression of MMP-9 and MMP-10 measured at different times post lesion was very similar in both groups. Only ME studies allowed to find differences between the two experimental groups. Ultrastructural changes in the stroma (arrangement of collagen fibers and keratocytes abnormal characteristics) were observed by day 7th post laser treatment and continued until the end of the study only in the LAA group.

**Keywords:** guinea pigs, cornea, argon laser, vitamin C deficiency, healing.

## Introducción

### Antecedentes del equipo de investigación y justificación del presente estudio

Esta tesis fue desarrollada como parte de una línea de investigación relacionada a aspectos clínicos y moleculares de una enfermedad degenerativa de la córnea humana, conocida como Queratopatía Climática Esferoidea (QCE) que se lleva a cabo desde hace más de 10 años por un grupo internacional constituido por investigadores de USA, Finlandia, Arabia Saudita y Argentina.

Para intentar lograr este modelo experimental y elegir los animales, se estudiaron numerosos antecedentes sobre modelos biológicos, modelos animales, estudios de órganos y estudios celulares, tisulares y moleculares. Era necesario encontrar un animal cuyas características corneales fueran similares en muchos aspectos al humano.

Los cobayos son incapaces de sintetizar AA y debe ser incorporado a su dieta. Es por esta razón que se decidió utilizar cobayos para investigar los efectos en la córnea de una deficiencia parcial de ascorbato.

Además, era necesario conseguir un método que permitiera reproducir lesiones sobre la córnea de manera controlada. Se concluyó que la tecnología láser sería la indicada. Este modelo, utilizado en forma crónica, podría utilizarse en un futuro para intentar obtener un modelo experimental de QCE, así como también para estudiar mecanismos moleculares involucrados en los procesos de regeneración corneal.

Por todo lo expuesto, se propuso realizar este trabajo de tesis el cual fue organizado en tres partes: 1) Elección de un láser que lesione la córnea sin causar alteraciones marcadas e irreversibles. 2) Búsqueda de equipamientos oftalmológicos utilizados en humanos que permitan obtener información de córnea de cobayos *in vivo*, para investigar los cambios estructurales y ultraestructurales de la córnea de estos animales lesionados con diferentes condiciones de láser argón. Este tipo de láser fue elegido en la primera etapa del trabajo. 3) Investigación de la recuperación corneal luego de lesionar con una condición particular de láser argón, la córnea de animales con alto contenido de AA en sus dietas y la de otros con deficiencia parcial de este nutriente esencial.

## Marco teórico

La QCE o queratopatía ambiental, fue descrita por primera vez en el siglo XIX por Baquis (Baquis, 1898) y ha recibido a lo largo de su historia diferentes nombres (queratopatía del labrador, degeneración esferoidea de la córnea, distrofia nodular de Bietti, distrofia nodular en banda de la córnea, degeneración queratinoide de la córnea), de acuerdo con su apariencia clínica, características anatomopatológicas, ubicación geográfica y relación con factores climáticos. Esta enfermedad degenerativa de la córnea humana se caracteriza por un progresivo velamiento de la misma. Muchos años después, se confirmaría que esta opacidad ocurre en la capa de Bowman y en el estroma superficial (Forsius, 1972). El desarrollo de QCE ha sido asociado con la sobreexposición a los RUV (Taylor et al., 1992).

La QCE ha sido descrita en distintas partes del mundo y por primera vez en Latinoamérica, en Argentina, en pobladores de una región marginal en la provincia de Río Negro (Urrets-Zavalía et al., 2006). La opacidad, es producida por depósitos globulares proteicos descritos mediante microscopía óptica, electrónica y confocal (Johnson y Overall, 1978; Urrets-Zavalía et al., 2012).

Se ha demostrado que en pacientes con QCE se produce una reacción de hipersensibilidad en la córnea, en donde inicialmente participan componentes pro-inflamatorios muy importantes de la inmunidad (Holopainen et al., 2012).

Recientemente se revisaron la historia de esta enfermedad, las características clínicas, el diagnóstico, el tratamiento y los últimos avances sobre patogénesis y la importancia de la dieta en el desarrollo de esta patología (Serra et al., 2014; Serra et al., 2015; Suárez MF et al., 2015a).

En el año 2009, Cafaro publicó una descripción funcional y estructural de la córnea de los cobayos (*Cavia porcellus*). Estos animales, son incapaces de sintetizar AA y por esta razón se han usado para evaluar el efecto de la deficiencia de ascorbato en el tejido conectivo (Cafaro et al., 2009).

Aprovechando estos conocimientos sobre la funcionalidad y estructura de la córnea de cobayos, se planteó la posibilidad de realizar este trabajo de investigación para desarrollar lesiones corneales controladas y reproducibles en estos animales, a los fines

de ser utilizadas en otros trabajos durante varios años (forma crónica) para intentar obtener un modelo experimental de QCE. Además, investigar el efecto de una deficiencia parcial en AA en cobayos expuestos a este tipo de lesiones, ya que un déficit de este nutriente esencial contribuye al desarrollo de esta enfermedad degenerativa de la córnea humana (Suárez MF et al., 2015a).

### **La visión y la córnea**

La visión es la facultad por la cual, a través del ojo, órgano visual, se percibe el mundo exterior. La agudeza visual puede disminuir, entre otras causas, por vicios de refracción o por opacidades corneales que pueden ser de origen hereditario, infeccioso, traumático, alérgico o por una cicatrización inadecuada (Hart, 1994).

### **Anatomía y Fisiología Corneal**

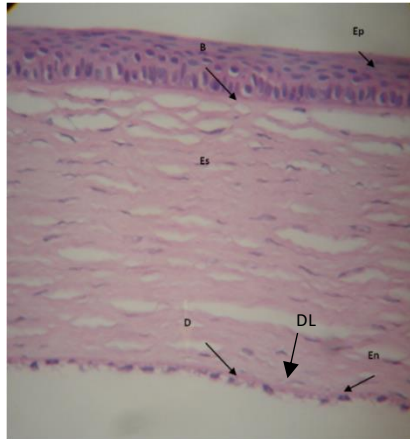
#### **Anatomía macroscópica de la córnea.**

El ojo posee tres túnicas; la externa o fibrosa que incluye la córnea y esclera, la media o úvea, compuesta por la coroides y la interna por la retina (Hart, 1994).

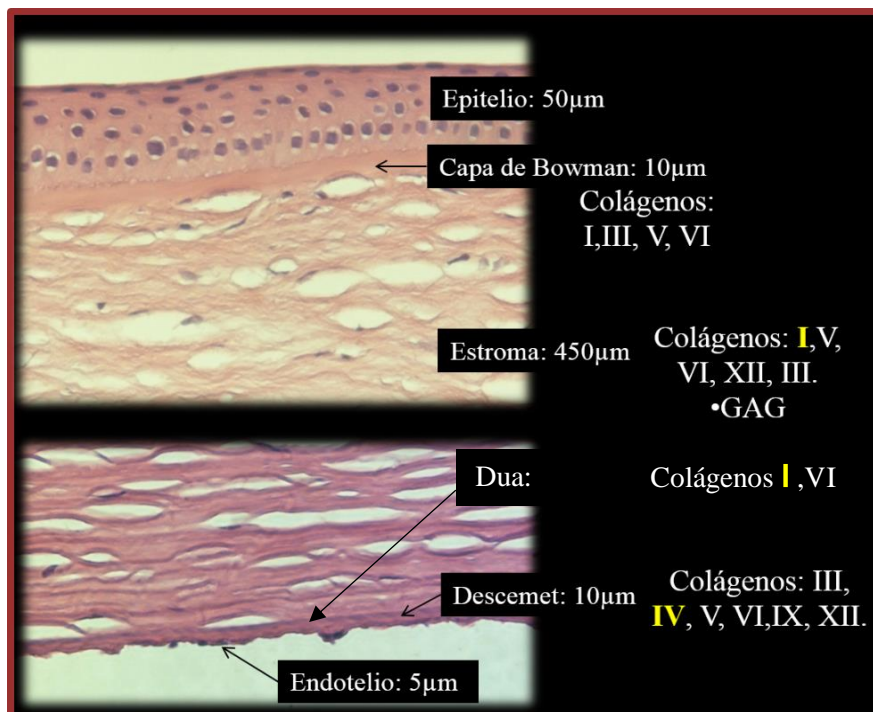
La córnea del cobayo es suave, transparente y brillante. No hay diferencias entre animales albinos y pigmentados, ni entre hembras y machos y tampoco hay diferencias significativas entre los valores de espesor corneal central y periférico ( $227.85 \pm 14.09\mu\text{m}$ ) y entre regiones superiores y temporales periféricas ( $226.60 \pm 12.50$  y  $225.70 \pm 14.40\mu\text{m}$ , respectivamente) (Cafaro et al., 2009).

#### **Anatomía microscópica de la córnea**

La córnea humana es avascular y transparente, formada por diversas estructuras: epitelio, membrana de Bowman, estroma, capa de Dua, membrana de Descemet y endotelio (Dua et al., 2013) (Fig. 1 y 2).



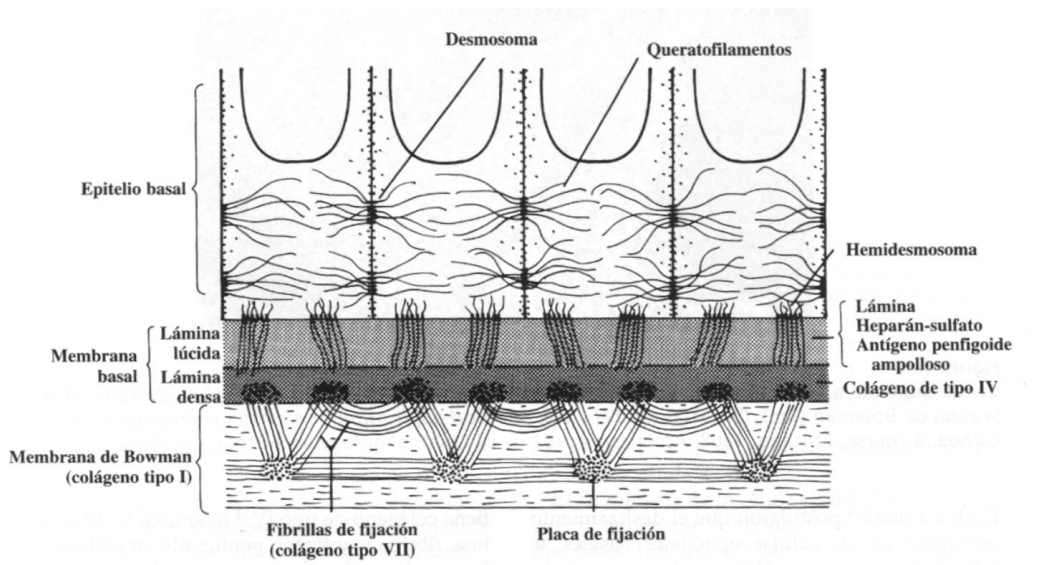
**Fig. 1:** Fotografía del corte transversal de una córnea humana al microscopio, que muestra el epitelio escamoso estratificado (Ep), la capa de Bowman (BL), el estroma (Es), la membrana de Descemet (D) y el endotelio (En). La capa de Dua (DL) se encuentra por arriba de la membrana de Descemet. H&E 40X.



**Fig. 2:** Montaje fotográfico de microscopía óptica de la córnea humana. Se indican las distintas capas que la conforman, el espesor y con números romanos, los tipos de colágeno que se encuentran en cada una de ellas. Los números en color amarillo indican el tipo de colágeno que más abunda. H&E 60X.

## Epitelio Corneal

El epitelio es estratificado plano no queratinizado. Consta de una lámina basal, una capa de células basales, una capa de células intermedias y una capa de células escamosas o superficiales. El grosor total de 50-56  $\mu\text{m}$ . El epitelio mantiene una actividad metabólica y de barrera a los agentes externos, presentando una fuerte resistencia a la abrasión y una rápida capacidad de cicatrización. Entre las células basales y la lámina basal, hay gran cantidad de uniones tipo hemidesmosoma, desmosoma y mácula ocludens, que proporcionan al epitelio su gran cohesión (Griffith et al., 2014). En la superficie lagrimal de las células más superficiales existen microvellosidades cuya función es fijar el film precorneal (Anderson, 1977; Gipson, 1994). Debajo del epitelio hay una membrana basal. Ultraestructuralmente, consiste en una capa de 30 a 55 nm de espesor, separada de la membrana basal de las células, por una zona electrolúcida de 25 nm (McTigue, 1967). Los hemidesmosomas unen las células basales a la membrana basal, fijándose a fibrillas de anclaje situadas en la membrana basal, compuestas por colágeno VII, y que penetran en la estructura del estroma. A este nivel se encuentra toda una red de microestructuras de adhesión para mantener unido el epitelio, que está sometido a múltiples tensiones, al estroma. La importancia del epitelio como barrera queda demostrada por el edema estromal consecutivo a la abrasión epitelial, al absorberse fluido desde la lágrima (Fig. 3) (McMenamin et al., 1997, Arffa, 1999).



**Fig. 3:** Dibujo esquemático de las uniones entre epitelio corneal, membrana basal y estroma anterior (Modificado de Arffa, 1999).



## **Estroma Corneal**

Su espesor central es de 500-540  $\mu\text{m}$ , siendo mayor en la periferia en donde alcanza hasta 700  $\mu\text{m}$ , lo que supone el 90% del grosor corneal total. Para ser transparente, el estroma corneal posee una estructura peculiar, que contiene fibras de colágeno fundamentalmente del tipo I, V y VI. Las fibras de colágeno tipo IV son características de la membrana basal y membrana de Descemet; el tipo VII compone las fibrillas de anclaje del epitelio, y el tipo III es mucho más común durante la cicatrización de una herida (Hart, 1994).

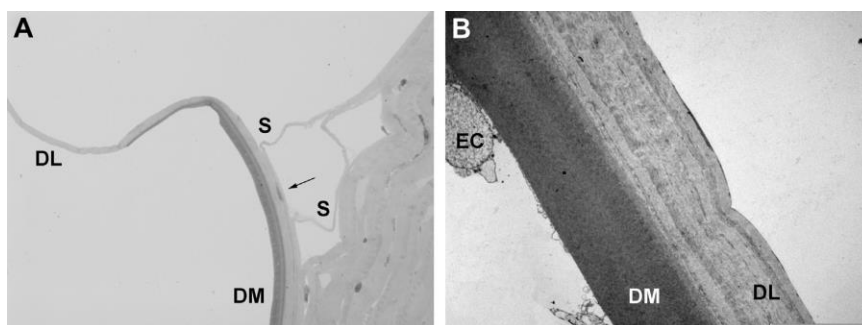
La unidad estructural básica del estroma corneal es la microfibrilla de colágeno. Las microfibrillas de colágeno se disponen en bandas y varias bandas dispuestas paralelamente forman una lámina. Todas las microfibrillas de colágeno de una misma banda se disponen perfectamente paralelas entre ellas (Bron, 2001).

En el estroma corneal se puede diferenciar una zona libre de células, que está situada inmediatamente por debajo de la lámina basal, presenta pocas microfibrillas de colágeno, de inferior diámetro y dispuestas totalmente al azar. Esta capa corresponde a la membrana limitante anterior o de Bowman de los primates, del hombre y de los bóvidos. La membrana de Bowman tiene 8-12  $\mu\text{m}$  de grosor y está compuesta por fibrillas de colágeno tipos I, III, V y VI. El estroma anterior es más compacto que el posterior y difiere en la composición de proteoglicanos (Conrad, 1970; Müller et al., 2001; Dua et al., 2013). El espacio interfibrilar contiene proteoglicanos de tipo queratán sulfato y dermatán sulfato, estando más presente el primero en el estroma central y anterior. Los proteoglicanos se unen a las fibras colágenas de forma ordenada (un proteoglicano a un punto específico de unión), lo que es esencial para el ordenamiento y el espaciamiento fibrilar (Scott, 1991).

Los queratocitos, se acomodan entre las láminas y mantienen la estructura al sintetizar proteoglicanos y colágeno. Las características enzimáticas de estas células permiten el ensamblaje ordenado del material sintetizado. Ante las agresiones, emigran hacia el lugar de lesión para restaurar las estructuras dañadas. Así, tras la queratotomía radial, exhiben un incremento de su actividad en las zonas próximas a la intervención que puede durar varios meses (Kato et al., 2003).

La capa de Dua, es una nueva capa en la córnea pre-Descemet bien definida en el hombre, acelular y fuerte. El promedio de espesor en la capa de Dua es de  $10,15 \pm 3,6$

µm. Está formada por 5 a 8 finas laminillas de haces de colágeno que corren en direcciones longitudinal, transversa y oblicua, y al igual que el estroma, el colágeno es de tipo I. También están presentes el colágeno IV y VI y algo de colágeno tipo V. Los proteoglicanos lumican, mimecan, y decorin son similares a los del estroma corneal (Fig. 4) (Dua et al., 2013). Esta capa de Dua, no se ha encontrado en los cobayos (Suárez MF et al., 2015 b).



**Fig. 4:** Capa de Dua. A, Microfotografía óptica en la que se observa el estroma (S), la membrana de Descemet (DM), y la capa de Dua (DL). Se ve un queratocito (flecha) en la superficie anterior de la DL (40X). B, Microscopía electrónica en la que se observa la DL fuertemente adherida a la DM. Se observa parte de una célula endotelial (EC). Barra=10 micrones. (Dua et al., 2013).

### Endotelio corneal

La membrana de Descemet, representa la membrana basal del endotelio. Las células endoteliales sintetizan esta membrana a lo largo de toda la vida, por lo que va aumentando de grosor con la edad. Es rica en glicoproteínas, laminina y colágeno IV, que le confieren una gran elasticidad y resistencia, mayor que el estroma ante agresiones traumáticas o inflamatorias (McMenamin et al., 1997). Cuando se secciona, como ocurre durante algunas intervenciones quirúrgicas, tiende a enrollarse hacia la cámara anterior.

El endotelio corneal, es una capa simple de células cuboides y mantiene un estado de deshidratación corneal. Ultraestructuralmente se observan interdigitaciones intercelulares y algunos desmosomas, lo cual facilita a las células su despliegue para cubrir la pérdida celular constante. El endotelio corneal, es incapaz de renovar sus células. Esto origina una pérdida de población celular con la edad. La pérdida endotelial

se manifiesta por el polimegetismo, pleomorfismo y aumento de la poligonalidad, asociado a un incremento de la permeabilidad (Waring et al., 1982).

### **Metabolismo y transparencia corneal**

Cualquier problema en el epitelio y en el endotelio corneal dará lugar a un edema con pérdida de la transparencia. La función barrera del epitelio es limitar los fluidos que entran a la córnea desde la lágrima y proteger el ojo de patógenos. Para su mantenimiento, es elemental la integridad celular con su constante renovación, así como su capacidad de respuesta ante una agresión. La barrera endotelial regula el movimiento de agua y sustancias desde el humor acuoso hacia el estroma. Una córnea en condiciones normales contiene un 78% de agua. Los factores que contribuyen a la transparencia corneal son: la avascularidad, la superficie epitelial no queratinizada mantenida por el film lagrimal precorneal, la ausencia de pigmentación, la perfecta estructuración de las microfibrillas de colágeno en el estroma corneal, la presencia de terminaciones nerviosas sin mielina y los factores fisiológicos que permiten un grado óptimo de hidratación (Maurice, 1957; Gelatt, 1991). La presencia de células madre en el limbo esclerocorneal, garantiza la renovación celular y el mantenimiento de la claridad óptica y la integridad del epitelio corneal (Joe y Yeung, 2014).

La aparición de cualquier tipo de vascularización corneal, superficial o profunda implica la existencia de un proceso patológico (Amescua et al., 2008). Los queratocitos, se encuentran aplanados entre las laminillas y ubicados paralelos a la superficie corneal con el fin de permitir la transparencia óptica. Los queratocitos se entrelazan entre sí a través de procesos celulares que los unen. Además de las laminillas de colágeno y de los queratocitos, los espacios intersticiales están ocupados con glucosaminoglicanos (GAG). Los GAGs del estroma corneal son queratán sulfato, dermatán sulfato (DS), y condroitín sulfato (CS). El queratán sulfato constituye alrededor del 50% de los GAGs de la córnea (Hart, 1994).

Cuando la córnea se edematiza, las fibras cambian su orientación y la luz sufre una dispersión al atravesarla, anulándose la interferencia entre las longitudes de onda reflejadas por las fibras y explicando la pérdida de transparencia que se aprecia cuando se observa clínicamente un edema corneal (Polack, 1976).

La córnea tiene abundante inervación sensitiva, de hecho, es la estructura más densamente inervada del cuerpo (Shaheen et al., 2014). Estas terminaciones son las responsables de la sensación de tacto, dolor y temperatura y juegan un rol muy importante en el reflejo de parpadeo, cicatrización de heridas, producción y secreción de lágrimas. La disfunción de los nervios de la córnea se encuentra en enfermedades que causan opacidad y terminan con pérdida de la visión (Rózsa y Beuerman, 1982; Müller y Pels, 1996; Kubilus y Linsenmayer, 2010 a; Kubilus y Linsenmayer, 2010 b). Tanto en el trofismo tisular, como en la regeneración del tejido después de un trauma, la inervación juega un papel fundamental al liberar neuropéptidos, que a su vez estimulan la llegada de células inflamatorias, factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofinas, etc. (Li et al., 2011 a; Li et al., 2011 b).

### **Cicatrización corneal**

La respuesta de cicatrización es una compleja interacción entre células estromales, epiteliales e inmunes, todo lo cual está mediado por citoquinas, factores de crecimiento y sus receptores. La apoptosis de los queratocitos es importante en la activación de la cascada de cicatrización (Murakami et al., 1992; Imanishi et al., 2000; Netto et al., 2005; Dupps y Wilson, 2006; Li et al., 2006). La renovación epitelial se produce cada 7 días, pero ante una erosión o un defecto se inicia una reacción que consiste en tres fases. La fase latente consiste en un periodo de 4 a 6 horas durante el cual se eliminan los restos celulares, las células se redondean y se reducen los hemidesmosomas del área de la lesión (Trinkaus-Randall y Gipson, 1984; Dua et al., 1994). En la fase de migración celular, que dura entre 24 y 36 horas, la movilidad celular se acelera y llega a cubrir en poco tiempo la pérdida de sustancia, con la recuperación del efecto barrera, gracias a un incremento de la superficie celular y a la formación de fibrillas y filamentos. En la fase de proliferación celular se activan las células primordiales del limbo, se desarrollan los complejos de unión con la membrana basal y se restablecen las terminaciones nerviosas (Terai et al., 2011). Las lesiones que involucran solo al epitelio curan por migración, mitosis y diferenciación de células, sin dejar cicatriz (Azar et al., 1998; Mohan et al., 2003; Griffith et al., 2014).

Si en cambio, se lesiona la membrana basal, la transparencia corneal puede verse afectada (Imanishi et al., 2000; Hassell y Birk, 2010). Primero se observa una apoptosis de los queratocitos del estroma superficial (Helena et al., 1998). Esta involución de las células provoca la liberación de enzimas proteolíticas y otros componentes intracelulares que dañan la matriz extracelular y el tejido alrededor de las células (Ma et al., 2011). Desde el epitelio, se envían señales con citoquinas como interleuquina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ). La apoptosis se produce en el momento de la lesión y continúa una semana más, e incluye células madre atraídas al estroma (Yamada et al., 2004; Petrescu et al., 2007; Andre y Torricelli, 2014).

La córnea contiene una población de células madre que se encuentran principalmente en el limbo y que se auto renuevan para preservar la claridad óptica por mantenimiento de la integridad corneal (Joe y Yeung, 2014).

Algunos queratocitos quedan en el estroma periférico y posterior (profundo) y comienzan a sufrir mitosis 12 a 24 hs después de la lesión. Esta proliferación genera precursores de miofibroblastos (Beals et al., 1999).

Cuando las lesiones son importantes y hay muchos miofibroblastos, la opacidad de las células y la matriz extracelular desorganizada que ellos producen, puede generar una opacidad corneal (nube, nubécula, niebla) (McTigue, 1967; Spurr-Michaud et al., 1988; Stepp et al., 1993; Meek et al., 2003; Ruberti y Zieske, 2008).

Los miofibroblastos tienen características de células musculares lisas, como filamentos intracelulares, respuesta contráctil a agonistas del músculo liso y actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA). En un principio estas células producen vimentina y desmina, y completan su maduración bajo la influencia de TGBF- $\beta$  y PDGF y entonces expresan  $\alpha$ -SMA. La generación de miofibroblastos es beneficiosa para la incisión estromal porque facilitan el cierre de la herida, pero su aparición puede generar una cicatriz indeseada (Andre y Torricelli, 2014).

Los proteoglicanos normales como el queratán sulfato, regulan del diámetro y espacio de las fibrillas de colágeno asociadas a la transparencia (Trelstad, 1973; Svoboda et al., 1988). Los miofibroblastos, expresan pocas cristalinas corneales como la transquetolasa y la ALDH 1, comparado con los queratocitos normales. La producción disminuida de cristalinas lleva a la opacidad (Menegay, 2008).

El factor TGF- $\beta$  es clave en el desarrollo de los miofibroblastos, estimula la producción de proteínas de la MEC, inhibe las MMPs y modula la respuesta cicatrizal. Los factores TGF- $\beta$  1 y 2 favorecen la cicatrización mientras que el tipo 3, la retrasa (Finsson et al., 2013). Durante la cicatrización de la herida corneal aumenta la expresión del factor IGF2R (insulin like growth factor 2 receptor) en los miofibroblastos estromales que regula la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (Bohnsack et al., 2014).

### **Participación de las metaloproteinasas en la córnea**

La matriz extracelular (MEC) está formada por gran cantidad de proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina). Estos componentes se encuentran interconectados y requieren una familia de proteasas denominadas metaloproteinasas (MMP), cuya misión es degradar las proteínas integrantes de dicha MEC en su medioambiente inmediato y activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión. La interacción de la célula con la MEC desencadena cascadas de señalización que promueven la diferenciación, migración y movilización celular, esenciales para el mantenimiento de la homeostasis (Angosto y Álvarez-Gómez, 2010).

Las MMPs se encuentran en el ojo sano y en el enfermo. Actúan en procesos patológicos y fisiológicos como reparación de heridas, inflamación, tumores y liberan moléculas señaladoras latentes y proteinasas. Se han descrito 25 miembros de la familia MMP, que se clasifican en cinco subfamilias: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, metaloproteinasas de membrana (MT-MMP) y otras MMP. Todas ellas difieren en su estructura y especificidad de sustrato, pero su acción combinada es capaz de conducir a la degradación prácticamente de la totalidad de los componentes macromoleculares de la MEC (Tabla 1).

**Tabla 1:** Principales MMPs halladas en la córnea y su relación con procesos fisiopatológicos. (Modificado de Sivak, 2002)

| Familia                    | Proceso implicado                                                             | Tejido                       |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Colagenasa 1 (MMP-1)       | Reparación de heridas corneales                                               | Estroma corneal              |
| Colagenasa 3 (MMP-13)      | Reparación de heridas corneales                                               | Epitelio corneal             |
| Gelatinasa A (MMP-2)       | Reparación de heridas corneales                                               | Todas las capas de la córnea |
| Gelatinasa B (MMP-9)       | Ulcera corneal y neovascularización                                           | Epitelio y estroma corneal   |
| Estromelisinina 1 (MMP-3)  | Reparación de heridas                                                         | Estroma corneal              |
| Estromelisinina 2 (MMP-10) | Ulcera corneal                                                                | Epitelio corneal             |
| Matrilisinina 1 (MMP-7)    | Reparación de heridas corneales                                               | Epitelio y estroma corneal   |
| MT1 MMP (MMP-14)           | Infección corneal.<br>Cicatrización de heridas.<br>Neovascularización corneal | Epitelio corneal             |
| TIMP-1                     | Reparación de heridas corneales y queratocono                                 | Epitelio corneal y endotelio |
| TIMP-2                     | Reparación de heridas corneales y queratocono                                 | Epitelio corneal             |

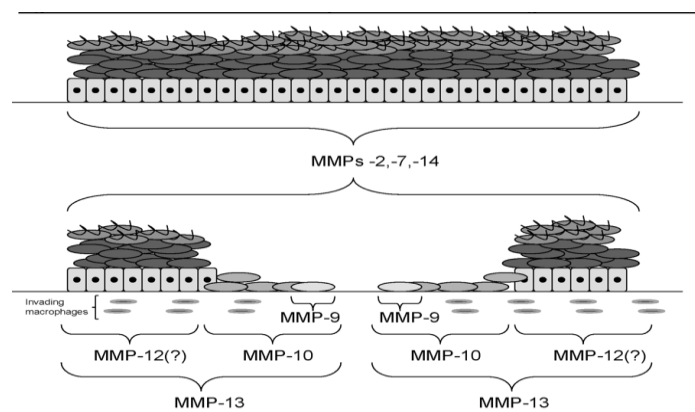
Cada una de estas MMPs y sus inhibidores tienen funciones específicas, pero todas, de una manera u otra, están relacionadas no solamente con la reparación de heridas corneales, sino que también participan en neovascularización e infecciones corneales (Sivak y Finia, 2002). Fini et al. (1996), utilizando un modelo de lesión en la córnea animal, descubrieron que la MMP-9 participó en la degradación de la membrana basal, mientras que la MMP-2 estaba involucrada en la remodelación de la matriz extracelular y de la membrana basal.

Garrana et al. (1999), investigaron las MMPs en córneas humanas sanas y con erosión corneal recurrente e informaron que las MMP-2 están sobre-reguladas en córneas enfermas y que se localizan en las capas basales de las células epiteliales, donde juegan un importante rol en la degradación del sistema de anclaje epitelial y en el deslizamiento y erosión epitelial recurrente.

Los inhibidores de las MMPs como el TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 se encuentran en los tejidos, y se unen de manera no covalente al sitio activo de las MMPs para bloquear su activación. Los TIMP-2 toman parte de la activación de la gelatinasa A (MMP-2) al unirse a un complejo en la superficie celular. Tienen función sobre el crecimiento, diferenciación y apoptosis celular (Sivak y Finia, 2002).

Las MMPs se regulan a nivel de transcripción, porque no se sintetizan hasta que no son necesarias. Las citoquinas y varios factores inducen o inhiben su expresión (TNF- $\alpha$ , IL 1, TGF- $\beta$ ). Como la integridad del epitelio corneal depende en gran medida de la membrana basal subyacente, que se compone predominantemente de colágeno tipo IV y laminina, es sensible a la actividad de las proteasas. Las MMP-2 y MMP-9 digieren fácilmente gelatinas y colágenos desnaturalizados, y participan en la cicatrización de heridas de la córnea, y en la patogénesis de enfermedades inflamatorias de la misma, pues existe una relación de regulación de estas MMPs con las citoquinas liberadas durante la inflamación (Mohan et al., 2003). Una vez activas las MMPs se regulan por los inhibidores (TIMPs). La MMP-9 se expresa en el frente de epitelización, aunque otras MMP son esenciales para la migración celular. El aumento de la MMP-9 está relacionada con la falla en la epitelización porque favorece la disolución de la membrana basal al catalizar el clivaje del colágeno desnaturalizado. Después de 18 hs de una lesión corneal la MMP-9 aparece en el frente de migración, le siguen la MMP-10 detrás y la MMP-13 en toda la zona de la herida (Fig. 5). La MMP-9 tiene un papel importante en la modulación de la dinámica celular pues afecta moléculas de señalización en el microambiente celular y se necesita para remover la matriz provisoria sobre la cual migran las células epiteliales (Sivak y Finia, 2002; Gordon et al., 2011). Cuando se cierra completamente la herida en 24 hs, se observa sobre-regulación de la MMP-1a, 1b y 13 y aumenta la expresión de la MMP-9. Luego de 24 hs no se encuentran ni la MMP-9, ni MMP-10, ni la MMP-12. Durante el proceso de reepitelización están aumentadas las MMPs y las TIMP.





**Fig.5:** Esquema que muestra las expresiones diferenciales de MMPs durante la recuperación corneal. (Gordon et al., 2011).

Cuando se compromete la integridad del epitelio corneal, en lágrimas aparecen altos niveles de MMP-9 y MMP-2. Holopainen et al. (2011), encontraron que los pacientes con QCE tienen concentraciones significativamente más altas de MMP-2 y MMP-9 en lágrimas, y que estarían implicadas en las fallas de la reepitelización de estos pacientes. Los niveles de TIMP-1 eran más bajos que los de los controles, haciendo posiblemente más vulnerable la córnea a la acción de las MMPs. Las citoquinas de la inflamación y varios factores (TNF- $\alpha$ , IL 1, TGF- $\beta$ ), inducen o inhiben la expresión de las MMPs. Holopainem et al. (2012), investigaron la distribución histológica, los niveles y formas moleculares de la MMP-2 y la MMP-9, así como los de MMPs y citoquinas en lágrimas de pacientes con QCE. También examinaron el efecto de la RUV-B sobre la producción de gelatinasas y citoquinas por el epitelio corneal en un modelo de cultivo celular. Los valores de MMP-2 y MMP-9 fueron significativamente mayores en las lágrimas recogidas de pacientes de QCE que los controles sanos y fueron acompañados por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. La inmunohistoquímica mostró que MMP-2 se expresó en la zona de la membrana basal tanto en las córneas control como en las afectadas, pero también marcó los bordes de los depósitos granulares de QCE. La expresión de MMP-9 fue restringida a las capas basales del epitelio y se indujo notablemente en las córneas de QCE. En las células del epitelio corneal humano, la RUV-B aumenta la secreción de gelatinasa, con un efecto sorprendente sobre la MMP-9, precedido por la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Los autores demostraron que el epitelio corneal podría participar en el desarrollo de QCE como una fuente de

citoquinas y gelatinasas. En las células del epitelio corneal humano, la RUV-B modula la liberación de citoquinas y subsecuentemente la secreción de MMPs. La inhibición local de la secreción de citoquinas y gelatinasas podría prevenir la progresión de la QCE (Holopainen et al., 2012).

Wu et al. (2015), estudiaron la actividad de la MMP-2 y MMP-9 en células epiteliales de córnea de conejos, estimuladas con TNF- $\alpha$  para investigar el mecanismo que regula su secreción y su efecto en las enfermedades inflamatorias. Sus resultados indican que el TNF- $\alpha$  estimula la secreción de MMP 2 y 9 en un nivel dosis dependiente y la MMP-2 fue activada por el TNF- $\alpha$ . Los factores inflamatorios como el TNF- $\alpha$  pueden estimular la actividad de las MMP-2 y 9.

Las proteínas de la familia de las MMP-10 están implicadas en la degradación de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales, como la remodelación de tejidos. La pro-enzima codificada se procesa proteolíticamente para generar la proteasa activa. Esta enzima secretada rompe la fibronectina, laminina, elastina, núcleo proteico de los proteoglicanos, gelatinas, y varios tipos de colágeno. Kabosova et al. (2003), han documentado el aumento de expresión de MMP-10 en las córneas de los pacientes con retinopatía diabética (RD) en comparación con córneas normales.

Investigaciones recientes, estudiaron el OGF (factor de crecimiento opioide) y su relación con la expresión de MMP-1 y 9 en córneas de conejo después de una queratectomía lamelar con el agregado de nalbufina, un opioide agonista kapa y antagonista mu. Estudios *in vitro* e *in vivo* mostraron que el OGF se expresa en el proceso de cicatrización del epitelio corneal de ratones, conejos y perros. El OGF subregula la división celular epitelial y migración en el cierre de la lesión epitelial corneal (Shetty et al., 2015).

### **Vitamina C y alteraciones corneales**

El ácido L-ascórbico, comúnmente llamado vitamina C, es considerado uno de los más potentes agentes antioxidantes del organismo. Es una vitamina hidrosoluble y esencial, sintetizada químicamente a partir de 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). Los cobayos, murciélagos frugívoros, algunas

aves (bulbul de orejas rojas), ciertos primates y los hombres, no poseen la capacidad de sintetizar AA debido a la ausencia de GLO (Serra y Cafaro, 2007).

La deficiencia total 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 menos estable a la temperatura corporal. Se pueden observar cambios morfológicos en el endotelio y en la capa muscular de los vasos sanguíneos debido a la baja expresión de colágeno tipo IV y elastina (Chojkier et al., 1983; Mahmoodian y Peterkofsky, 1999; Oyamada et al., 1988). La deficiencia de AA en cobayos provoca signos clínicos observables a partir de los 15 días de privación (Mody et al., 2005) como pérdida de apetito, pérdida de peso, debilidad, encías inflamadas, sangrantes y úlceras, pérdida de pelo, pelaje opaco, debilidad muscular, dolor e inflamación de las articulaciones, dificultad en el movimiento e incluso parálisis, hemorragias musculares, aflojamiento de dientes, pobre desarrollo de la dentadura y de los huesos, secreciones nasales, abundante secreción ocular, heces blandas y fétidas, quejido/dolor cuando se le sostiene o toca y muerte a las tres o cuatro semanas. Un cobayo adulto necesita 10mg/Kg. de vitamina C y en estado gestacional o de lactación, 30 mg/Kg por día (Durán y Hernández, 2009).

La córnea concentra el AA. En cobayos, el AH- (monoión ascorbato) se concentra más de 10 veces en las capas más externas de la córnea (epitelio) para desarrollar su función tanto antioxidante como de filtro de rayos ultravioleta (Di Mattio, 1992, Wu et al., 2004).

Se utilizó el AA junto al factor de crecimiento transformador  $\beta 1$  (TGF-  $\beta 1$ ) para crear un modelo in vitro de fibrosis corneal humana, cuya cicatrización se caracteriza por presencia de miofibroblastos y por un depósito inadecuado de componentes de la matriz extracelular (MEC). El TGF- $\beta 1$  estimula la sobreproducción y depósito de componentes de la MEC. El AA (en cultivo celular) estimula la síntesis y secreción de colágeno y componentes de la matriz extracelular y permite la estabilización del colágeno formado, lo cual colabora con la estratificación de las células y la acumulación de material entre ellas (Pinnell, 1975; Schwarz, 1985; Peterkofsky, 1991). Los fibroblastos de la córnea humana estimulados con vitamina C y TGF- $\beta 1$  crean un modelo que es similar al observado en la fibrosis corneal humana (Oyamada et al., 1990; Karamichos et al., 2010).

El AA aumenta la estratificación celular *in vitro*, pero también incrementa la expresión de proteínas contráctiles como la  $\alpha$ -SMA la cual está relacionada con la pérdida de transparencia corneal *in vivo* (Jester et al., 1995; Phu y Orwin, 2009).

Cuando ocurre una lesión corneal importante como la producida por un láser, se puede perder el equilibrio de óxido-reducción intracelular con exceso de producción de especies reactivas de oxígeno ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $HO^\cdot$ ) y daño celular (Blanco-Mezquita et al., 2013). Entre las defensas antioxidantes naturales podemos mencionar a enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y además de la vitamina C, a las vitaminas E y A (Ríos, 2003). La extensión del daño en el tejido y la calidad de la cicatrización refleja el balance entre la generación de radicales libres generados y las defensas antioxidantes locales (Gan et al., 2001).

Además de la participación de procesos inflamatorios, el déficit de AA provoca alteración de proteínas, fragmentación de DNA, generación de radicales libres, peroxidación lipídica, y otros factores a identificar que promueven el desarrollo de QCE que afecta principalmente la capa de Bowman de la córnea (Pacifci y Iozzo, 1988; Suárez MF et al., 2015 a).

En la región patagónica de El Cuy, hay una alta prevalencia de QCE (20%). Las personas afectadas con esta enfermedad son individuos mayores de 30 años que han trabajado cuidando ovejas toda su vida, en un clima seco y árido, sin protección a la RUV y alimentados con una dieta pobre en vitamina C. Por el contrario, ovejas adultas de esa misma zona que han estado expuestas a las mismas condiciones que los pacientes, si bien presentan mayores erosiones en el epitelio corneal que ovejas que pastan en zonas menos inhóspitas, no presentaron ninguna anormalidad subepitelial en sus córneas. Es importante recordar que estos animales pueden sintetizar AA a partir de los pastos que comen y de esa manera estarían protegidos contra el estrés oxidativo de la prolongada exposición a la RUV y la inflamación producida por las constantes erosiones corneales (Suárez MF et al., 2015a). La dosis de AA en la dieta de animales de experimentación está relacionada con el nivel de alteraciones corneales en el estroma producido en cobayos expuestos a RUV (Hayes et al., 2011).

## Modelos de lesión corneal para estudiar la cicatrización.

La cicatrización corneal se ha estudiado con diferentes tipos de lesiones y en diferentes especies (Pallikaris et al., 1990; Nagy et al., 2007; Sta Iglesia y Stepp, 2000; Yin y Yu, 2010; Notara et al., 2011; Pal-Ghosh et al., 2011 a; Pal-Ghosh et al., 2011 b; Stepp et al., 2014).

Existen numerosos trabajos relacionados con la creación de una herida corneal de profundidad definida para evaluar la pérdida de células, la reepitelización, la disposición de las fibras de colágeno, los cambios en los tipos de colágeno según la etapa de cicatrización, la presencia de factores que regulan la cicatrización, la expresión de diferentes MMPs, la aparición de miofibroblastos, la infiltración celular, factores de señalización, inhibición, y otros factores estudiados para comprender y prevenir o curar algunas patologías oculares (Friedenwald y Buschke, 1944; Gipson y Kiorpes, 1982; Morgan y Abrams, 1991; Murphy et al., 2001; Netto et al., 2005; Gould, 2011; Boote et al., 2012; Saika et al., 2013; Gosling et al., 2013; Pal-Ghosh et al., 2014).

## Antecedentes de uso del láser en oftalmología

Láser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) o Amplificación de Luz por Emisión Estimulada de Radiación utiliza como medio activo un sólido (cristal), líquido, gas o plasma, el cual es estimulado por una fuente de energía (luz o electricidad). Los fotones emitidos por el átomo estimulado poseen fase, energía y dirección similares a las del fotón externo que les dio origen (bombeo). El haz de luz es monocromático, coherente y amplificado (Fig. 6).



**Fig. 6:** Componentes del elemento productor del láser. La estructura física contiene el medio (gas o cristal) entre un resonador con dos espejos, a través del cual se emite el láser, los fotones son reflejados entre los espejos y producen cada vez más fotones. Cuando el medio se satura, escapa el 10% de los fotones que formarán el rayo láser. Se necesita una fuente de energía que estimule los electrones.

La tecnología del láser emplea haces intensos y estrechos de luz, y permite realizar lesiones reproducibles, disminuyendo el factor de operador-dependiente.

Los láseres tienen diversas aplicaciones generales, entre las que podemos mencionar: cortar, coagular, fotocauterizar, estimular tejidos, etc. Desde luego, que cada láser tiene su campo de acción, diversificándose en las diferentes ramas de la medicina actual. De esta forma, por ejemplo, en oftalmología se utiliza más el Nd-YAG, argón, diodo y excímer láser; mientras que en ginecología la herramienta principal es el láser de CO<sub>2</sub> (Boyd et al., 2005).

Al provocar aumento de la temperatura corneal, los láseres, disminuyen la actividad de la enzima superóxido dismutasa del humor acuoso e inducen la peroxidación del estroma superficial de la córnea. En la detoxificación de los aldehídos generados por las reacciones de radicales libres, juegan un rol importante la aldehído deshidrogenasa y la glutatión S-transferasa (Bilgihan et al., 1998; Bilgihan et al., 2003).

Actualmente los láseres son clasificados de acuerdo a la normativa internacional “New láser classification UNE EN 60825-1/A2- 2002”, la cual propone que la clasificación de un láser en categorías de riesgo permite identificar la peligrosidad del mismo y está basada en el Límite de Emisión Accesible (LEA) para el usuario. Dependiendo del LEA, el láser obtendrá una clasificación u otra, lo cual estará correlacionado con la potencia de cada aparato y la longitud de onda según el tipo de láser (Segura y Rupérez Calvo, 2002)

Láser de Clase I: no se consideran peligrosos

Láser de Clase II: los niveles de radiación láser se consideran peligrosos para la visualización crónica.

Láser de Clase IIIa: se consideran, en función de la irradiancia, ya sea un riesgo agudo de visión al rayo o peligro visualización crónica, y un peligro para la visión aguda si se ven directamente con instrumentos ópticos.

Láser de Clase IIIb: se consideran un riesgo agudo para la piel y los ojos de la radiación directa. Los productos láser de Clase IIIb pueden tener paneles desmontables que, cuando se desplazan, permiten el acceso a los niveles de radiación láser que van de Clase II a Clase IV.

Láser de Clase IV: se consideran un riesgo agudo para la piel y los ojos de la radiación directa y dispersa. Los productos láser de Clase IV pueden tener paneles desmontables que, cuando se desplazan, permiten el acceso a los niveles de radiación láser que van de Clase II a Clase IV.

En nuestro trabajo de investigación, se utilizaron los láseres de CO<sub>2</sub>, láser Nd-YAG, láser de argón y diodo láser, considerados todos de clase IV, debido a que la simple exposición a los ojos puede producir importante daño.

Numerosos estudios indican el empleo de láser en diferentes partes del ojo, pero pocos lo emplean en la córnea, y cuando lo hacen, muchos de ellos solo informan el resultado clínico y muy pocos los resultados histopatológicos (Keates et al., 1981; McCally, 1983; Kraus, 1986; Spiess, 2012).

### **Láser de CO<sub>2</sub>**

El láser de CO<sub>2</sub> es un láser molecular, cuyo medio activo está formado por partículas de gas carbónico. Se lo emplea en oftalmología para blefaroplastia y se puede usar como herramienta de corte y coagulación. El daño generado es por fotoablación térmica. La absorción energética del láser en la célula está íntimamente ligada a la concentración de agua. La potencia puede llegar a un máximo de 100 W y su longitud de onda es de 10600 nm. El láser de CO<sub>2</sub> es un láser de tipo portátil con puntas de distancia focal de longitud determinada invariables, lo cual permite su objetividad total. Varios autores han investigado el láser de CO<sub>2</sub> en la córnea bovina, porcina, de conejo y humana y sus informes indican que se observan cambios en el epitelio y en el estroma corneal cuando

se examinan al microscopio óptico (Keates et al., 1981; McCally, 1983; Kraus, 1986; Widder et al., 1998; Chandonet, 1992; Gilmour, 2002).

Bernard Spiess informa sobre el uso clínico de láser de CO<sub>2</sub> comparado con láser diodo en oftalmología veterinaria, pero no presenta estudios microscópicos que indiquen el grado de daño corneal causado (Spiess, 2012).

La fotoqueratotomía con láser de CO<sub>2</sub> también se ha empleado en perros para el tratamiento de la úlcera indolente o erosión corneal recurrente (Hoffman et al., 2009).

### **Láser Nd-YAG**

El láser de Nd-YAG (neodymium-doped yttrium aluminium garnet), ampliamente utilizado en oftalmología, es de no contacto y permite modificar diferentes variables en cada disparo. Su longitud de onda es de 1060 nm (infrarrojo).

El mecanismo del Láser Nd-YAG consiste en la emisión de unos pulsos muy cortos de luz de un alto poder que provocan una explosión debido a la ionización del tejido que queda convertido en plasma. Tiene gran afinidad por el agua intra y extracelular. El láser Nd-YAG se aplica en el tratamiento oftalmológico de la opacificación capsular tras cirugía de cataratas, en medicina estética o en procesos industriales, como tratamientos de superficie y mecanizados. El daño lo produce por fotodisrupción. El Nd-YAG, se monta en una lámpara de hendidura lo que permite hacer foco en una parte determinada del estroma y producir una lesión térmica a ese nivel (Gilmour, 2003).

Tanto el láser de CO<sub>2</sub> como el Nd-YAG, tienen una función de disparos en forma pulsada, de manera que permiten modificar en cada disparo no sólo la energía (Joule) que se aplica, sino también el tiempo de exposición (milisegundos).

### **Láser argón**

El láser de argón está basado en el uso del gas argón y tiene afinidad por los epitelios pigmentarios y la hemoglobina, de ahí su amplia utilización en patologías retinianas, como por ejemplo en los desgarros retinianos, retinopatía diabética, oclusiones vasculares, etc. Tiene una longitud de onda con dos picos de emisión en onda continua de 488 y 514 nm. Vieira et al. (2004), emplearon este láser con foco intraestromal, para



retirar suturas de la córnea, con una potencia de 340 mW 0,1 s, y diámetro de 5 a 100 $\mu$ , sin observar úlceras ni infecciones.

Kremer et al. (1996), estudiaron el efecto del láser argón de 514 nm, en córnea teñida con rosa de bengala y expuesta a diferentes niveles de potencia (0,04 y 0,8 W, spot entre 50 y 200 micrones y 0,1 s de exposición). La histología reveló una mínima coagulación del tejido a 0,05 W y 50  $\mu$ ., moderada coagulación del estroma anterior con potencia de 0,07 W y spot de 100 a 200  $\mu$ . y ruptura lamelar con potencias de 0,7 y 0,8 W.

### **Láser diodo**

Este láser tiene una longitud de onda de 810 nm. Posee gran afinidad por la hemoglobina, y también en el área oftalmológica es ampliamente utilizado, pese que su daño térmico es mayor que el de los demás, siendo una herramienta útil en patologías retinianas como las tratadas por el láser de argón. En muchas ocasiones se utiliza este láser como “aiming beam”, es decir de guía para disparar otros láseres que poseen longitud de onda lejana al espectro visible como el argón, Nd-YAG y el CO<sub>2</sub> (Spiess, 2012).

Chew et al. (2000), compararon la transmisibilidad del láser diodo versus el láser de argón sobre los efectos fototérmicos en córnea e iris. Utilizaron tres tipos de córnea, clara, intermedia y opaca y enfocaron en el estroma medio. La transmisibilidad del argón fue del 78%, 73% y 70%. En las córneas opacas se observó daño corneal. El calor indujo contracción del estroma corneal, con adelgazamiento del espesor corneal. El epitelio se mantuvo intacto, pero en otras zonas de depresión el epitelio se perdió. Los autores concluyeron que para la iridotomía es mejor el diodo láser porque pasa sin dañar la córnea y actúa sobre el iris.

### **Antecedentes del uso de OCT en oftalmología**

El OCT Visante proporciona imágenes en profundidad, claras y de gran detalle de la cámara anterior, incluyendo el ángulo irido-corneal. El software del sistema Visante OCT hace posible, después de la captura de imagen, medir pre y post operatoriamente el segmento anterior. Los principales parámetros medidos con este sistema de OCT son

el grosor corneal, la profundidad de la cámara anterior, la apertura del ángulo irido-corneal y la distancia ángulo-ángulo. También se pueden hacer mediciones del iris y del cristalino (Cerviño et al., 2008).

El OCT Cirrus es un sistema de escaneo del polo posterior (retina) pero puede adaptarse al polo anterior. Adquiere los datos recogiendo 200 A-scans de 200 B-scan lineales que están distribuidos en un cuadro de 6 mm del centro de la fovea. Así presenta significativamente muchos más puntos y consigue explorar más zonas. Es un OCT no midriático que está basado en el dominio espectral con un sistema de alta definición. Utiliza como fuente de luz un diodo superluminiscente con una longitud de onda de 840 nm con una velocidad de escaneo de 27.000 cortes axiales por segundo. La longitud axial y horizontal de resolución es de 5 y 15  $\mu$ m, respectivamente. Una limitación importante del OCT Cirrus frente al OCT Visante, es que el Cirrus solamente puede obtener imágenes de una zona angular en cada toma (no se puede visualizar toda la córnea en una misma imagen); mientras que el Visante puede mostrar un corte seccional de limbo a limbo completo. Se pueden estudiar córneas sanas (en las que se distingue epitelio, estroma y endotelio) y patológicas (Morcillo Laiz y Arnalich Montiel, 2010). Una revisión de Lara Medina et al. (2012), relacionada con el uso y los principios de funcionamiento de la OCT del segmento anterior y posibles ventajas frente a la biomicroscopía ultrasónica (BMU), describe que la OCT permite la obtención de imágenes con una mayor resolución espacial que la BMU. Ostrin et al. (2014), utilizaron OCT para medir el diámetro pupilar y la profundidad de la cámara anterior de cobayos luego de la aplicación de pilocarpina, pero esta técnica de estudio no resultó superior o mejor que otra para esa medición. Otros investigadores como Zhou et al. (2008), determinaron valores del ojo de ratones por OCT, tanto de la córnea como de la cámara anterior, la lente, cámara vítrea, y la retina. Estos autores concluyeron que este nuevo método se puede utilizar para estudiar pequeños modelos animales de desarrollo normal y anormal de los ojos.

Con toda esta información sobre la córnea humana y de cobayos, las características metabólicas e inmunológicas de ambas, y teniendo la disponibilidad de emplear equipos de oftalmología de última generación, es que se llevó a cabo este trabajo para tratar de encontrar una manera de lesionar la córnea en sus capas más superficiales, imitando lesiones ambientales, para intentar observar con varias técnicas si la recuperación corneal es diferente cuando el AA disponible no es suficiente en la dieta.

## Objetivos

### Objetivo general

1. Investigar los efectos producidos sobre córnea de cobayos de distintos tipos de láser de uso en oftalmología y estudiar la curación corneal en animales normales y deficientes en AA.

### Objetivos específicos

1.1- Determinar las ventajas y desventajas de los láseres de CO<sub>2</sub> y Nd-YAG, argón y diodo, para la realización de lesiones en córneas de cobayos. Determinar qué tipo de láser y potencia es necesario utilizar para provocar daño en el epitelio y estroma corneal, conservando indemne el endotelio

1.2- Estudiar las diferentes lesiones corneales, en relación con la modificación del tiempo de exposición (milisegundos) y la energía utilizada (Joule).

2.1- A- Buscar equipos y métodos que permitan estudiar la córnea de los cobayos *in vivo*.

2.2.- B- Investigar la recuperación de la córnea en diferentes lesiones producidas con láser argón.

3.1- C- Investigar el papel del AA en los procesos de recuperación corneal luego de inducir lesiones con láser argón.

## Materiales y Métodos

### Equipos láser

Los equipos láser empleados fueron los siguientes:

1. Un equipo de láser de CO<sub>2</sub> Smartoffice+, Deka, Calenzano, Firenze, Italia, de uso ginecológico, longitud de onda 10,6  $\mu$  con modalidad de disparos pulsados de 0,2 a 2 W con tiempos de exposición de 0,2 a 1 s.
2. Un equipo de láser de Nd-YAG, Coherent 7970 Yag Láser, Coherent, Santa Clara, de uso oftalmológico, con su montura en lámpara de hendidura también con modalidad de disparos pulsados con un spot de 50 a 100 micrones.
3. Un equipo de láser argón, Novus 2000, Coherent, Santa Clara, CA, EE.UU., de uso oftalmológico.
4. Un equipo de láser diodo, Microlase SL, Keeler, Broomall, PA, EE.UU. de uso oftalmológico. Emite en una longitud de onda de 800 nm, emplea un diodo semiconductor y es de baja potencia.

### Animales

Se utilizaron cobayos hembras cepa Ssi: Al, provenientes del Bioterio del Instituto Biológico Argentino S.A.I.C, Buenos Aires, Argentina, de entre 3 y 5 meses de edad. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba y se los distribuyó en grupos de a dos o tres en jaulas de acero inoxidable con el piso cubierto de aserrín.

Fueron alimentados ad libitum con alimento para conejos (Conejo Casero, Cargill, Pilar Córdoba, Argentina) y agua ad libitum suplementada con AA (10mg/Kg al día) para un normal desarrollo. La temperatura de la habitación fue mantenida a 22°C y se programaron ciclos de luz (36W tubos fluorescentes) de 12h (12h luz/ 12h oscuridad).

El protocolo de experimentación fue aprobado por la comisión de evaluación de protocolos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Resolución del Honorable Consejo Directivo 122/08), de acuerdo con lo establecido en

los estatutos de Uso de Animales Para la Investigación en Visión y Oftalmología de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO).

Solo se incluyeron animales libres de patologías oculares luego de ser examinados con lámpara de hendidura portátil y tinción con fluoresceína. No se incluyeron animales con enfermedades en algún otro órgano o sistema (Fig. 7).



*Fig. 7: Fotografías de cobayos utilizados en el trabajo.*

**Diseño experimental de la primera etapa: Producir lesiones por los distintos tipos de láser a potencias baja y alta.**

Cuatro grupos experimentales de cobayos (n=4) fueron tratados con los siguientes láseres con distintas potencias y tiempos de exposición. (Grupo 1: Láser argón, Grupo 2: Láser CO<sub>2</sub>, Grupo 3: Láser diodo y Grupo 4: Láser Nd-YAG) (Tabla 2). Un grupo control de 4 animales no fue tratado con láser. Los animales fueron anestesiados con ketamina 5mg/kg (IM), asociado a proparacaína tópica (Anestalcon®, Laboratorios Alcón, Buenos Aires, Argentina) y se le instiló fluoresceína tópica (Laboratorios Poen, Buenos Aires, Argentina) previa a la realización de 15 disparos láser en la zona central de la córnea con foco en el epitelio. Luego de ser evaluados por BM fueron eutanasiados y las córneas estudiadas por MO.

**Tabla 2.** Se indican los láser y configuración utilizadas en cada grupo experimental.

| Grupo | Láser           | Configuración             | n (cobayos) |
|-------|-----------------|---------------------------|-------------|
| 1     | argón           | 350-650 mW<br>0,3 a 0,4 s | 4           |
| 2     | CO <sub>2</sub> | 300mW- 1 W<br>0,3-0,4 s   | 4           |
| 3     | diodo           | 900-1200 mW<br>0,3-0,4 s  | 4           |
| 4     | Nd-YAG          | 26-41,5 mW<br>0,2 s       | 4           |

Diseño experimental de la segunda etapa: Investigación de técnicas útiles para evaluar córneas de cobayos in vivo.

En esta parte de la investigación, se utilizaron 7 grupos experimentales y un grupo control (n=2 en cada grupo). Al grupo control se lo dejó sin aplicación de láser argón. Los 7 grupos experimentales fueron tratados con láser argón a diferentes condiciones y localizando los disparos en la córnea central como lo indica la tabla 6.

**Tabla 3.** Se indican las variables utilizadas en cada grupo experimental.

| Grupo | Potencias | Tiempo de exposición | Tamaño Spot | # Disparos |
|-------|-----------|----------------------|-------------|------------|
| 1     | 500 mW    | 0,3 s                | 50 μ        | 7          |
| 2     | 400 mW    | 0,3 s                | 50 μ        | 7          |
| 3     | 350 mW    | 0,3 s                | 50 μ        | 7          |
| 4     | 350 mW    | 0,3 s                | 50 μ        | 15         |
| 5     | 300 mW    | 0,3 s                | 50 μ        | 7          |
| 6     | 150 mW    | 0,3 s                | 50 μ        | 7          |
| 7     | 100 mW    | 0,3 s                | 50 μ        | 7          |

Luego de estos disparos, el estudio de las alteraciones corneales se realizó en los siguientes momentos: 1 h, 14 h, 7 d, 14 d y 21 d, mediante BM (Haag Streit 900), OCT Visante (Carl Zeiss), y OCT Cirrus.

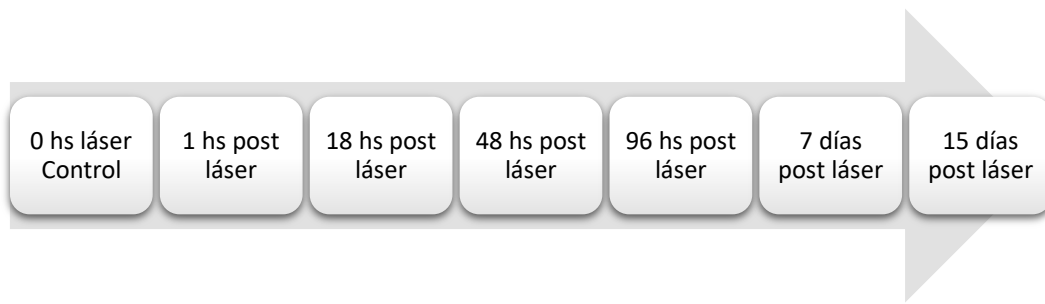
#### Diseño experimental de la tercera etapa: Evaluación de la córnea lesionada cuando hay deficiencia de AA.

Se utilizaron 14 cobayos con iguales características de los animales de la primera etapa, es decir sanos y acondicionados en jaulas adecuadas.

Todos los animales fueron alimentados con alimento comercial (Gepsa, Grupo Pilar) carente de AA, 5% del peso del animal de alimento por día y agua ad libitum. Los cobayos fueron divididos en 2 grupos experimentales de 7 animales cada uno. Un grupo recibió una dieta deficiente en AA y será denominado a partir de ahora como **LAA** (Low Ascorbic Acid), y el grupo control recibió una dieta normal en AA y se lo denominó **HAA** (High Ascorbic Acid). Al grupo LAA se les suministró la dieta suplementada con 0.8 mg de AA /100g peso/día. Esta dosis de AA es insuficiente para mantener las funciones normales de los animales, pero es suficiente para impedir que mueran de escorbuto durante la experimentación, ya que se requiere de este tipo de alimentación por tres meses para lograr la deficiencia. Indicadores reconocidos de la deficiencia de AA son pérdida de peso y debilidad.

Por otra parte, el grupo **HAA** recibió una dieta suplementada con 2mg AA/100g peso/día, que es la cantidad necesaria de este nutriente para el normal desarrollo de estos animales. Esta etapa previa a la realización de las lesiones duró 3 meses, y durante ese tiempo los animales fueron pesados al comienzo y al final.

Después de esos tres meses, la córnea (izquierda) de los animales de ambos grupos (LAA y HAA) fue expuesta por única vez a 15 disparos del láser argón con una potencia de 350 mW, 0,3 segundos, 50  $\mu$  de spot. La córnea derecha se utilizó como control. El estudio duró 15 días, durante los cuales se realizaron los estudios corneales *in vivo* e *in vitro*. Como lo indica el diagrama siguiente, las investigaciones fueron realizadas a distintos tiempos luego de producir las lesiones con el láser argón.



En la siguiente tabla n° 4, se indican los estudios que se realizaron después de la aplicación del láser argón sobre la córnea lesionada (izquierda) y sobre la córnea control (derecha) de los cobayos de ambos grupos.

**Tabla 4:** Se indica con un punto (•), en qué momentos se realizaron los estudios in vivo e in vitro, en animales de ambos grupos a diferentes tiempos, luego de la aplicación del láser.

|                              | 0 hs Control | 1 h post láser | 18 hs post láser | 48 hs post láser | 96 hs post láser | 7 días post láser | 15 días post láser |
|------------------------------|--------------|----------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| <b>BM</b>                    | •            | •              | •                |                  |                  | •                 | •                  |
| <b>OCT</b>                   | •            | •              | •                |                  |                  | •                 |                    |
| <b>Extracción de córneas</b> | •            | •              | •                | •                | •                | •                 | •                  |
| <b>MO</b>                    | •            |                | •                | •                | •                | •                 |                    |
| <b>ME</b>                    | •            | •              | •                |                  |                  | •                 | •                  |



## Estudios *in vivo*

### Biomicroscopía (BM)

En este trabajo se empleó el biomicroscopio o lámpara de hendidura portátil XL-1, Shin Nipon, Ohira Co., Niigata, Japan con magnificación de 10X, el cual permitió analizar el daño estructural producido, en el mismo lugar donde se realizó la lesión térmica. El posicionamiento del cobayo se hizo en la mayoría de los casos, solo con sujeción manual. La restricción farmacológica del cobayo, cuando fue necesaria, se hizo mediante la utilización de clorhidrato de ketamina inyectable intramuscular (IM) (5 mg/kg).

Se utilizó solución de proparacaína al 0,5% para anestésiar las córneas de los cobayos y solución de fluoresceína al 0,5%, para evidenciar las lesiones con la lámpara de hendidura, gasas y micro pipetas para instilar tanto la proparacaína como la fluoresceína en los cobayos y marcadores indelebles.

Se registraron con fotografías a cada uno de los cobayos sometidos a los diferentes tipos de láser.

### Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) Visante y Cirrus

Se realizaron estudios de la córnea con un equipo OCT Visante (Carl Zeiss, Obercohen, Alemania), y un equipo OCT Cirrus (Carl Zeiss Cirrus HD Model 4000 Quad Core, Obercohen, Alemania), previo uso de anestesia (ketamina 5 mg/kg/IM) asociado a proparacaína (Anestalcón®, Laboratorios Alcón, Buenos Aires, Argentina) como anestesia tópica.

## Estudios *in vitro*

### Microscopía Óptica (MO)

Las córneas fueron evaluadas mediante la técnica de MO. Resumidamente, los tejidos fueron fijados en tampón fosfato salino (PBS) - formaldehído (10% v/v) (24 horas), se deshidrataron y se embebieron en parafina a baja temperatura. Secciones seriadas (6 $\mu$ ), se montaron en portaobjetos y se secaron durante toda la noche a 37°C, posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) (Pearse, 1960).

De acuerdo con el objetivo específico de la tesis se estudiaron distintos aspectos histológicos de los mismos y todos los preparados fueron observados por 2 individuos sin conocer qué estaban observando. La documentación de las observaciones se realizó por microfotografías obtenidas con cámara Nikon Sight DS-U, A.G. Heinze Inc, Tokyo, Japón, adosada al microscopio.

#### Microscopía Electrónica (ME)

Las córneas para ME se fijaron por inmersión en el fijador de Karnovski que contenía glutaraldehído al 1,5 % v/v y paraformaldehído 4% w/v en solución cacodilato 0,1 molar (M); luego fueron posfijadas en tetróxido de osmio 1%. El tejido luego se deshidrató y se embebió en araldita. Se realizaron cortes con el ultramicrotomo JEOL JUM-7 y se montaron en grillas de níquel. Luego fueron contrateñidas con acetato de uranilo y citrato. Estas secciones fueron examinadas utilizando el microscopio de transmisión electrónica LEO 906E (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

#### Western Blot (WB)

La técnica de WB se utilizó en este trabajo para estudiar la expresión de MMP-9 y MMP-10. Básicamente, se utilizó la técnica descrita por Taylor and Posch (2014). Células epiteliales de córnea de cobayo fueron homogenizadas manualmente en 200uL de buffer de lisis celular conteniendo 25 mM Tris, 0.25M sucrosa (pH 7.4), 0.5 µg/ml de leupeptina, 0.5 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de pepstatina, y 100 µg/ml de fluoruro de fenilmetanosulfonilo (Sigma). Los lisados fueron sonicados durante 5 s en hielo en un sonicador (Labsonic 1510 B-Braun, Melsungen, Germany), luego enfriados por 5 s en hielo. Este ciclo se repitió tres veces. Los lisados fueron centrifugados a 12000 g durante 10 min a 4°C. Se tomó la fracción sobrenadante, donde se midió la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford.

Las proteínas (a iguales concentraciones) fueron separadas primero mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posteriormente, transferidas a una membrana de nitrocelulosa, mediante la aplicación de un campo eléctrico (100 V durante 80 minutos), perpendicular al gel.

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con buffer de bloqueo (50 mM Tris/150 NaCl, pH 7.5, conteniendo 0,1 % Tween-20 and 5 % leche descremada) por una hora a temperatura ambiente.

Como anticuerpos primarios, se utilizaron rabbit anti-guinea pig MMP-9 (1:250; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) y rabbit anti-mouse MMP-10 (1:250; Abcam, Cambridge, MA, USA). Las proteínas marcadas fueron visualizadas usando un anticuerpo secundario goat anti-rabbit marcado con peroxidasa (1:5000, Sigma) y detectadas por quimioluminiscencia (Pierce ECL, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). El análisis densitométrico de las bandas obtenidas fue realizado utilizando el software Image J (NIH).

### Análisis de los datos

La evaluación de cambios morfológicos estructurales en córneas, utilizando H&E y MO se describe de forma cualitativa.

Los resultados relacionados a los cambios en la ultraestructura celular (ME) fueron de tipo descriptivo.

El infiltrado celular de leucocitos se determinó contando el número de células en 3 campos de 40X y promediando esos campos. Así, las muestras se graduaron en: sin infiltrado, aislado ( $\pm = 1-5$  cel./campo), leve (+ = 5-10 cel./campo), moderado (++ = 10-20 cel./campo) e intenso (+++, > 20 cel. /campo).

Las observaciones por BM fueron de tipo descriptivas.

Las mediciones del grosor corneal con OCT Visante fueron cuantitativas y su unidad fue la micra.

Para WB se realizó densitometría de los valores de las bandas de MMP y de  $\beta$ -actina, y se determinó el cociente entre MMP/ $\beta$ -actina.

Todos los resultados son presentados como media y error estándar.

### Estudios Estadísticos

Se utilizó el programa Infostat para el análisis estadístico de los datos recogidos. Los resultados fueron comparados utilizando el Test T de Student o Test de ANOVA,

considerando diferencia significativa un valor de  $p < 0,05$ . También se utilizó el programa GrahpadPrism para la realización de gráficos.

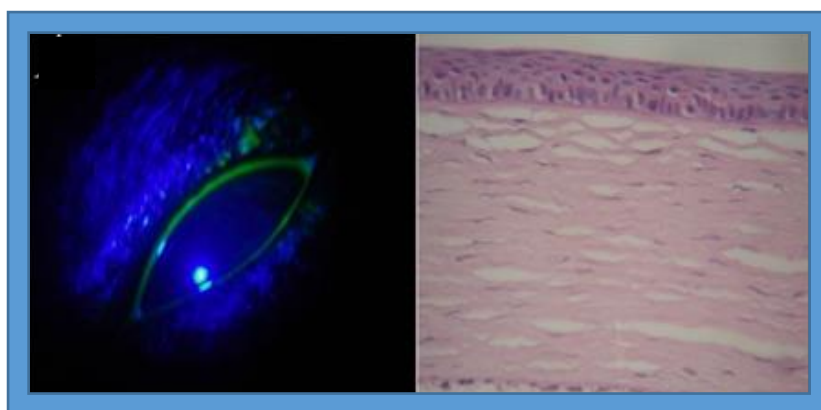
## 4. Resultados

### Resultados de la primera etapa: Lesiones producidas por los distintos tipos de láser a potencias baja y alta.

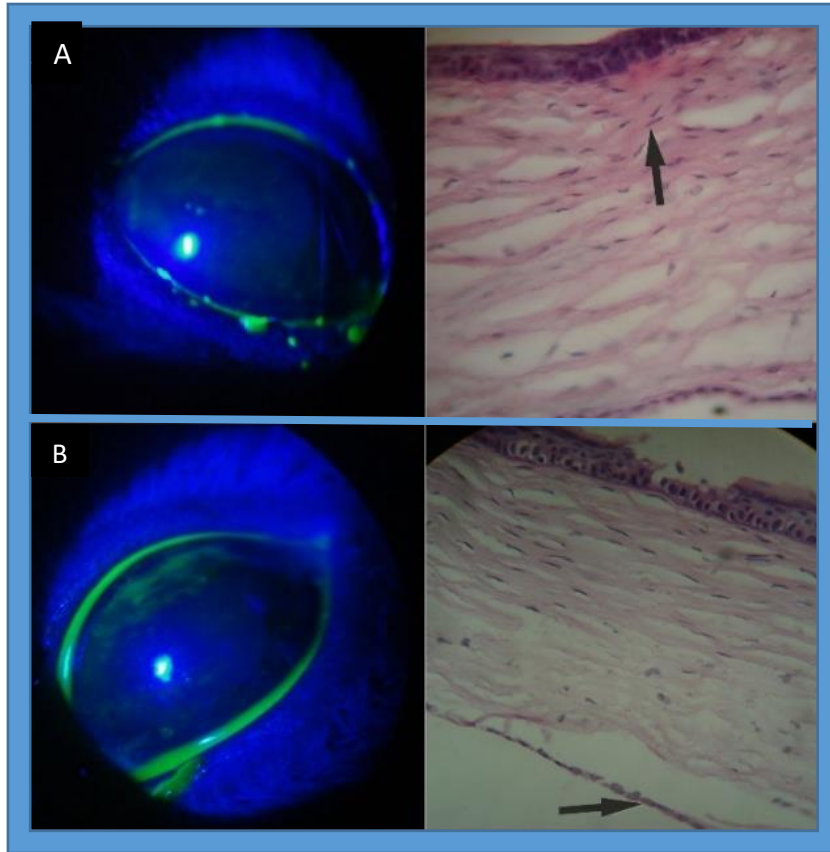
En la primera etapa, el objetivo fue desarrollar un modelo experimental para crear lesiones uniformes, medioestromales y no perforantes en córneas de cobayos, utilizando diferentes tipos de láser. Inicialmente se propuso utilizar solo láser de CO<sub>2</sub> y Nd-YAG. Los estudios preliminares, indicaron que los láseres propuestos, eran muy potentes a las condiciones utilizadas y provocaron lesiones severas en las córneas, por lo que se investigaron también otras alternativas y así agregamos otros 2 tipos de láser (argón y diodo).

El tipo de investigación de esta parte fue cualitativa, evaluando las lesiones mediante BM y MO. Las variables tienen relación con el tipo de láser y la potencia usada para provocar la lesión.

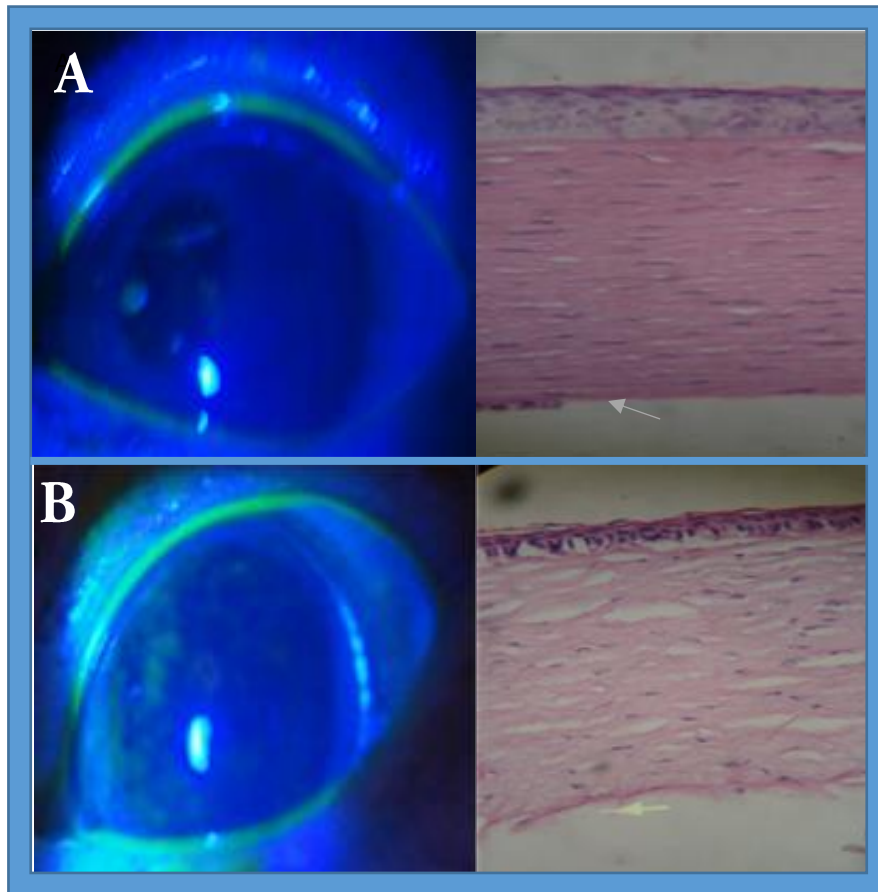
A continuación, se muestran imágenes representativas de BM y la MO correspondiente, de córneas control (Fig. 8) y de córneas lesionadas con distintos tipos de láser a potencia baja y alta (Fig. 9, 10, 11 y 12).



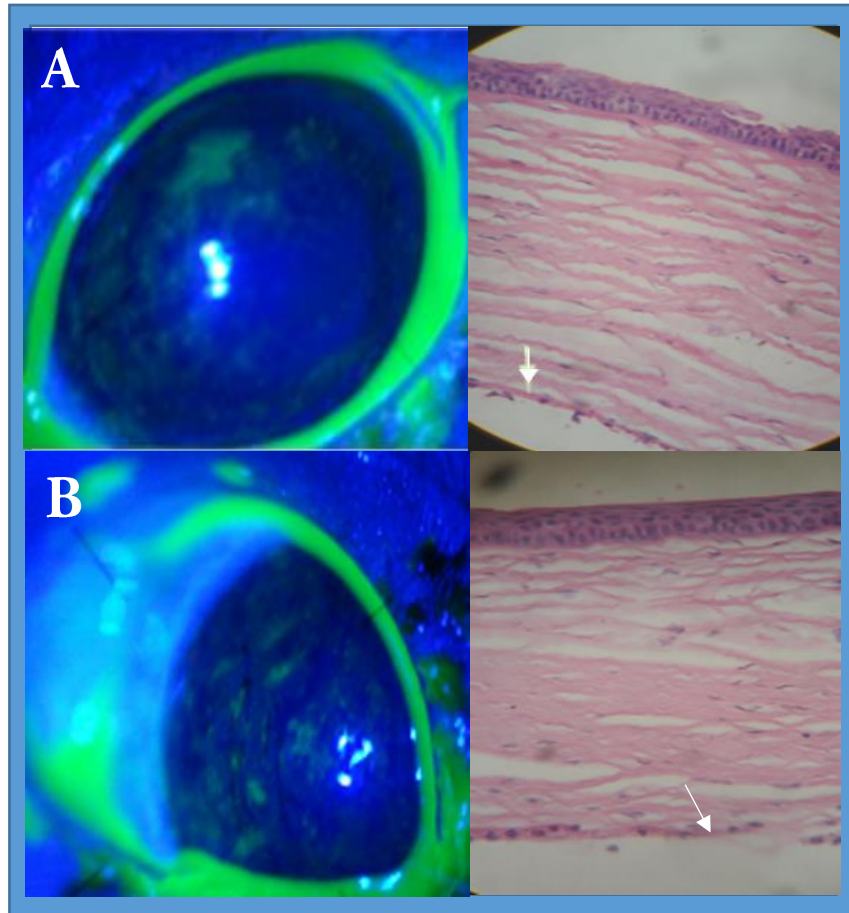
**Fig.8:** Imágen representativa de córnea **control** de cobayo. **Izquierda:** BM con tinción de fluoresceína 10X. **Derecha:** MO: H&E 40X.



**Fig.9:** Imágenes representativas de córneas de cobayos. Izquierda: BM con tinción de fluoresceína. Derecha: MO. **A)** Córnea tratada con **láser argón** a 350 mW, con 0,3 s de exposición y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. **B)** Córnea tratada con **láser argón** a 650 mW, 0,3 s de exposición y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. Derecha: Imágenes representativas de MO con tinción de H&E. En los cortes histológicos las flechas indican la profundidad del daño inducido por el láser. BM: 10X. MO: 40X.

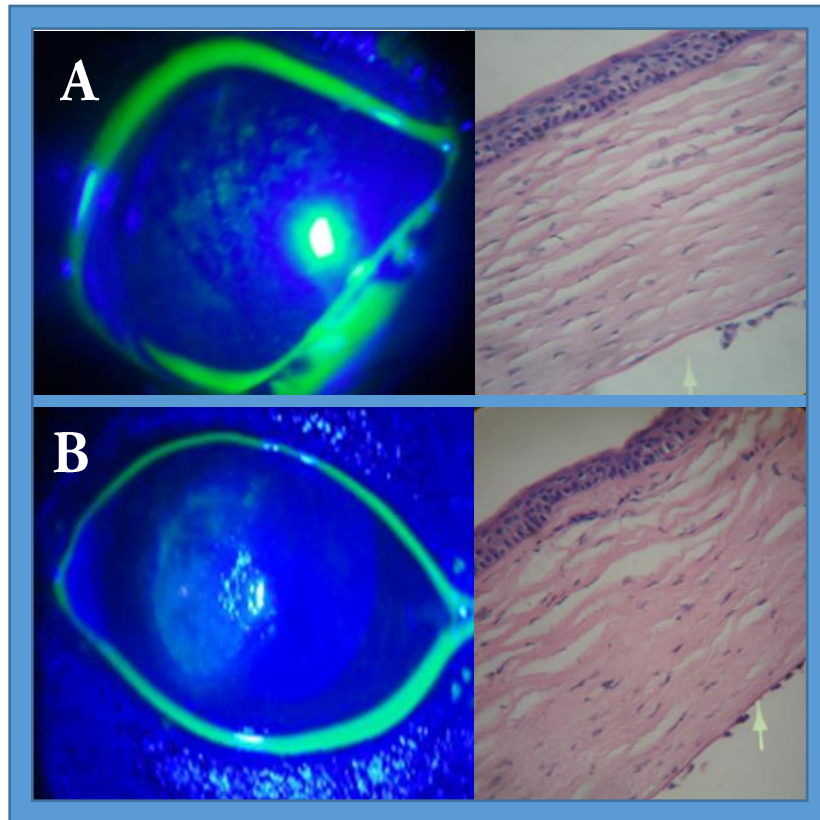


**Fig.10:** Imágenes representativas de córneas de cobayos lesionadas con láser  $\text{CO}_2$ . Izquierda: BM con tinción de fluoresceína. **A)** Córnea tratada con láser  $\text{CO}_2$  a 300 mW, con 0,3 s de exposición. **B)** Córnea tratada con láser  $\text{CO}_2$  a 1 W, 0,3 s de exposición. Derecha: Imágenes representativas de MO con tinción de HE. En los cortes histológicos las flechas indican la profundidad del daño inducido por el láser. BM: 10X. MO: 40X.



**Fig.11:** Imágenes representativas de corneas de cobayos lesionadas con **láser diodo**. Izquierda: BM con tinción de fluoresceína. **A)** Córnea tratada con **láser diodo** 900 mW, 0,3 s de exposición. **B)** Córnea tratada con **láser diodo** 1200 mW, 0,4 s de exposición. Derecha: Imágenes representativas de MO con tinción de HE. En los cortes histológicos las flechas indican la profundidad del daño inducido por el láser. BM: 10X. MO: 40X.





**Fig.12:** Imágenes representativas de córneas de cobayos lesionadas con **láser Nd-YAG**. Izquierda: BM con tinción de fluoresceína. **A)** Córnea tratada con **láser Nd-YAG** 7,8 mW, 0,2 s de exposición. **B)** Córnea tratada con **láser Nd-YAG** 8,3 mW, 0,2 s de exposición. Derecha: Imágenes representativas de MO con tinción de HE. En los cortes histológicos las flechas indican la profundidad del daño inducido por el láser. BM: 10X. MO: 40X.

A continuación, se muestran las tablas 5 a 8 con los resultados de la lesión provocada por cada tipo de láser en cada estrato corneal: epitelio, estroma y endotelio.

**Tabla 5.** Daño producido por Láser argón

| Grupo cobayos | Configuración             | Daño tisular |                                                                             |
|---------------|---------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>1</b>      | 350 mW<br>0,3 s, 50 $\mu$ | Epitelio     | Deshidratado, quemadura superficial                                         |
|               |                           | Estroma      | Leve alteración fibras superficiales                                        |
|               |                           | Endotelio    | Indemne                                                                     |
| <b>2</b>      | 650 mW<br>0,3s, 50 $\mu$  | Epitelio     | Ablacionado                                                                 |
|               |                           | Estroma      | Desorganización estructural, basofilia en fibras colágeno de mitad anterior |
|               |                           | Endotelio    | Dehiscencia de capa endotelio de Descemet                                   |
| <b>3</b>      | 350 mW<br>0,4 s, 50 $\mu$ | Epitelio     | Dehiscencia de epitelio de la Bowman                                        |
|               |                           | Estroma      | Alteración estructural de fibras                                            |
|               |                           | Endotelio    | Alteración de Descemet                                                      |
| <b>4</b>      | 650 mW<br>0,4 s, 50 $\mu$ | Epitelio     | Dehiscencia de epitelio de la Bowman                                        |
|               |                           | Estroma      | Desorganización estructural de fibras                                       |
|               |                           | Endotelio    | Alteración estructural                                                      |

**Tabla 6.** Daño producido por Láser CO<sub>2</sub>

| Grupo cobayos | Configuración   | Daño tisular |                                                                                                                                       |
|---------------|-----------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1</b>      | 300 mW<br>0,3 s | Epitelio     | Ablacionado                                                                                                                           |
|               |                 | Estroma      | Leve daño estructural                                                                                                                 |
|               |                 | Endotelio    | Pérdida de endotelio sectorial                                                                                                        |
| <b>2</b>      | 400 mW<br>0,3s  | Epitelio     | Dehiscencia de epitelio de la Bowman con vacuolización y citoplasma eosinófilo, condensación de cromatina                             |
|               |                 | Estroma      | Moderado daño estructural                                                                                                             |
|               |                 | Endotelio    | Alteración disposición celular                                                                                                        |
| <b>3</b>      | 700 mW<br>0,4 s | Epitelio     | Condensación y disminución de espesor epitelial                                                                                       |
|               |                 | Estroma      | Daño moderado del estroma                                                                                                             |
|               |                 | Endotelio    | Dehiscencia de la Descemet                                                                                                            |
| <b>4</b>      | 1 W<br>0,4 s    | Epitelio     | Dehiscencia del epitelio de Bowman, retracción del epitelio y vacuolización de células basales, con disminución del espesor epitelial |
|               |                 | Estroma      | Alteración moderada-severa de la arquitectura                                                                                         |
|               |                 | Endotelio    | Pérdida de endotelio sectorial                                                                                                        |

**Tabla 7.** Daño producido por Láser diodo

| Grupo cobayos | Configuración |           | Daño tisular                                                                          |
|---------------|---------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1</b>      | 900 mW        | Epitelio  | Vacuolización de células basales, condensación de Bowman, necrosis focal del epitelio |
|               | 0,3 s         | Estroma   | Vacuolización de la sustancia propia estromal                                         |
|               |               | Endotelio | Endotelio dañado con pérdida de sustancia                                             |
| <b>2</b>      | 900 mW        | Epitelio  | Deshidratación y disminución de espesor, vacuolización de células basales             |
|               | 0,4s          | Estroma   | Vacuolización y alteración de todo el estroma                                         |
|               |               | Endotelio | Dañado con perdida estructural                                                        |
| <b>3</b>      | 1200 mW       | Epitelio  | Condensación de epitelio deshidratado                                                 |
|               | 0,3 s         | Estroma   | Leve alteración de fibras colágeno                                                    |
|               |               | Endotelio | Dehiscencia por sectores                                                              |
| <b>4</b>      | 1200 mW       | Epitelio  | Condensación de epitelio deshidratado, condensación de Bowman por sectores            |
|               | 0,4 s         | Estroma   | Hialinización de fibras estromales                                                    |
|               |               | Endotelio | Pérdida de endotelio sectorial                                                        |

**Tabla 8.** Daño producido por Láser Nd-YAG

| Grupo cobayos | Configuración |           | Daño tisular                                                       |
|---------------|---------------|-----------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>1</b>      | 26 mW         | Epitelio  | Condensación y daño epitelial                                      |
|               | 0,2 s         | Estroma   | Moderada a severa alteración estructural de fibras de colágeno     |
|               |               | Endotelio | Pérdida de endotelio sectorial                                     |
| <b>2</b>      | 35 mW         | Epitelio  | Deshidratación epitelial y condensación sectorial de Bowman        |
|               | 0,2s          | Estroma   | Alteración moderada de arquitectura de fibras                      |
|               |               | Endotelio | Pérdida de endotelio sectorial                                     |
| <b>3</b>      | 39 mW         | Epitelio  | Hipercondensación cromatina basal y condensación de Bowman         |
|               | 0,2 s         | Estroma   | Moderada a severa alteración estructural de fibras colágeno        |
|               |               | Endotelio | Pérdida de endotelio sectorial                                     |
| <b>4</b>      | 41,5 mW       | Epitelio  | Vacuolización de epitelio basal, disminución del espesor epitelial |
|               | 0,2 s         | Estroma   | Alteración del sentido de fibras colágeno                          |
|               |               | Endotelio | Disminución de número de células                                   |

## **Análisis de los resultados de la primera etapa.**

El análisis de los resultados fue cualitativo, y se determinó la presencia o no de lesión de cada una de las capas de la córnea, se observaron los cambios morfológicos y se los comparó con córneas normales. Las variables observadas fueron el tipo de láser y la potencia usada para provocar una lesión definida.

De una población de córneas  $n=40$ , ( $n=8$  para cada tipo de láser y potencia y  $n=8$  en el grupo control), solamente en el grupo experimental del **láser argón**, en el que se utilizó una potencia de 350 mW, con 0,3 segundos de exposición y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, se observó que en las córneas de estos cobayos (100%) el resultado fue una lesión medioestromal que no llegó a lesionar el endotelio.

Todas las otras exposiciones, con diferentes láseres y diferentes potencias, provocaron lesión endotelial, es decir, la lesión fue muy profunda en la córnea (100%).

## **Resultados de la segunda etapa: Investigación de técnicas útiles para la evaluación de córneas de cobayos *in vivo*.**

Esta etapa, tuvo como objetivo desarrollar lesiones corneales con el láser argón utilizando distintas condiciones experimentales y encontrar equipamiento oftalmológico para realizar un seguimiento de las lesiones *in vivo*. La meta fue realizar estudios cuali y cuantitativos en la córnea de cobayos que nos permitieran evaluar cambios morfológicos y obtener valores del espesor corneal.

Investigamos nuevamente las córneas de cobayos por BM y con OCT (con este último aparato se utilizaron dos equipos (Visante y Cirrus)).

## **Resultados de la BM**

La observación biomicroscópica de las córneas de cobayos, reveló la presencia de leucomas (opacidad blanca de la córnea que aparece posteriormente a una lesión de la misma) cuya persistencia en el tiempo se correlacionó con la potencia de láser argón empleada.

La tabla 9 resume los resultados referidos a la formación y persistencia de leucomas en las corneas tratadas de distintas maneras con el láser argón. Con 500 y 400 mW los leucomas se observaron hasta el día 21. Con 350 mW, no se observaron leucomas en el día 21, solo llegaron a verse hasta el día 14. Con 300 y 150 mW los leucomas ya no se observaron en el día 7, es decir que solo se pudieron ver por 14 hs. Con 100 mW solo se vieron leucomas por una hora y a las 14 hs ya no se observaron.

Los leucomas se observaron fundamentalmente cuando se utilizaron altas intensidades y mayor número de disparos.

**Tabla 9:** Tiempo de presentación de los leucomas sobre la córnea, cuando se aplican diferentes potencias de láser argón (500 mW, 400 mW, 350 mW, 300 mW, 150 mW y 100 mW). Entre paréntesis se indica el número de disparos.

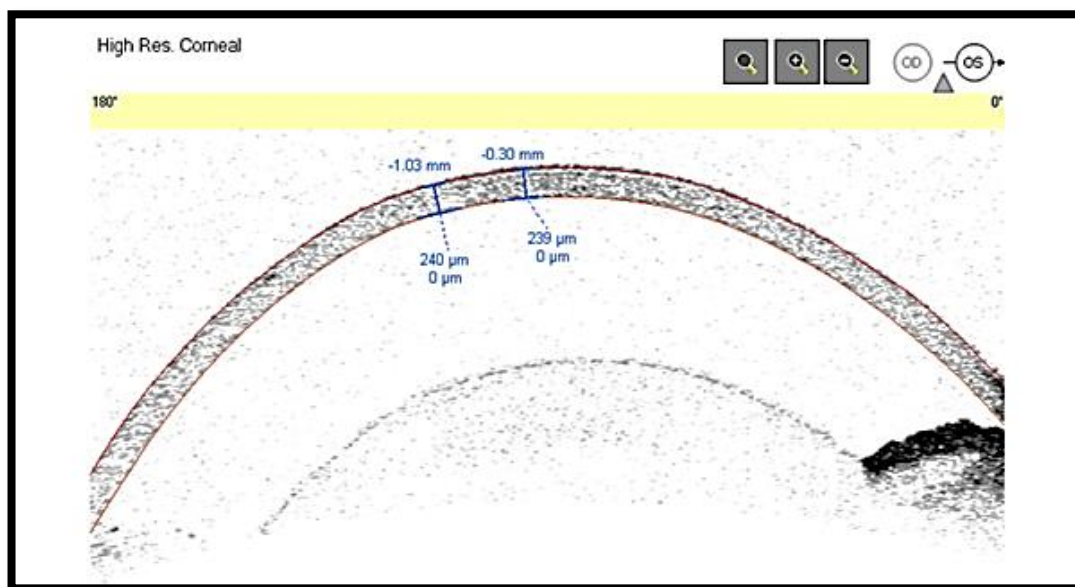
| Tiempo   | 500 mW<br>(7) | 400 mW<br>(7) | 350mW<br>(7)    | 350mW<br>(15)   | 300mW<br>(7)    | 150mW<br>(7)    | 100mW<br>(7)    |
|----------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 hora   | Leucoma       | Leucoma       | Leucoma         | Leucoma         | Leucoma         | Leucoma         | Leucoma         |
| 14 horas | Leucoma       | Leucoma       | Leucoma         | Leucoma         | Leucoma         | Leucoma         | Córnea<br>Clara |
| 7 días   | Leucoma       | Leucoma       | Leucoma         | Leucoma         | Córnea<br>Clara | Córnea<br>Clara | Córnea<br>Clara |
| 14 días  | Leucoma       | Leucoma       | Leucoma         | Leucoma         | Córnea<br>Clara | Córnea<br>Clara | Córnea<br>Clara |
| 21 días  | Leucoma       | Leucoma       | Córnea<br>Clara | Córnea<br>Clara | Córnea<br>Clara | Córnea<br>Clara | Córnea<br>Clara |

## Resultados OCT Visante

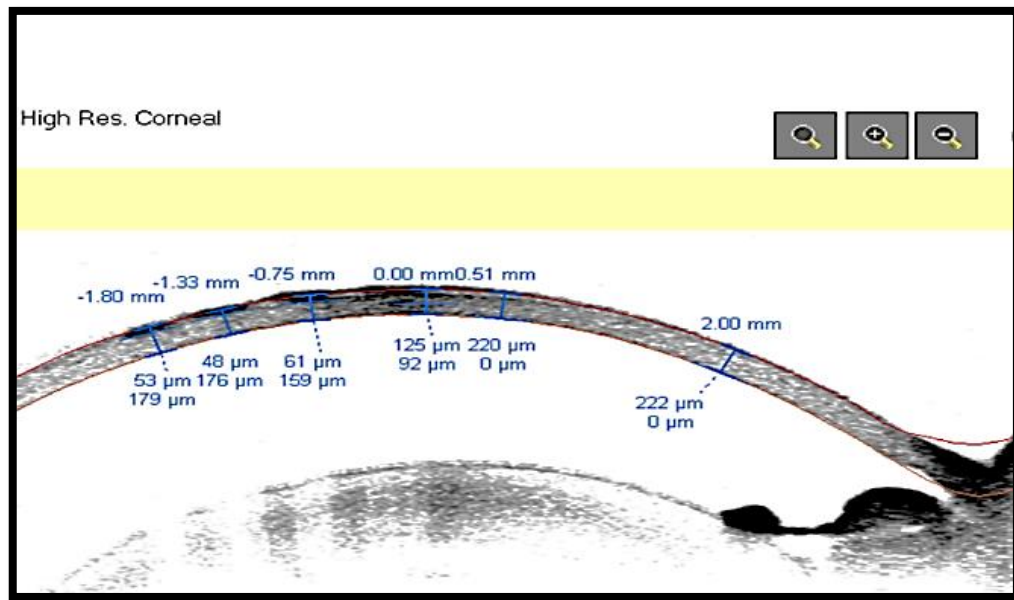
Por mediciones realizadas con OCT Visante (Fig. 13) se observó un adelgazamiento significativo del espesor corneal a la hora del tratamiento ( $p < 0,05$ ) en los animales tratados con 500, 400, 350 y 300 mW y 15 disparos, con respecto al grupo control (Fig. 14 y 15).



**Fig. 13.** Imagen de posicionamiento del cobayo para hacer OCT Visante.



**Fig. 14:** Registro de OCT Visante de córnea de cobayo de espesor normal. Se indican dos mediciones del espesor corneal.



**Fig. 15:** Registro de OCT Visante de córnea de cobayo una hora posterior a la aplicación de láser argón a 350mW.

A los 7 días ya se observó una completa recuperación del espesor corneal. La tabla 10 muestra todos los espesores corneales en los diferentes grupos obtenidos a los diferentes tiempos post-tratamiento.

**Tabla 10:** Resultados de la medición del espesor corneal en micras, utilizando OCT Visante (media y error estándar) en diferentes tiempos y con diferentes potencias de láser argón.

| Control       | 500             | 400             | 350 (7)        | 350 (15)               | 300            | 150           | 100            | Tiempo   |
|---------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------------|----------------|---------------|----------------|----------|
| 245,33 ± 4,73 | *178,33 ± 23,35 | *192,67 ± 12,74 | 243,00 ± 5,66  | <b>*223,67 ± 7,63</b>  | *215,67 ± 8,32 | 235,00 ± 2,65 | 229,67 ± 13,50 | 1 hora   |
|               | 243,67 ± 7,32   | 230,33 ± 6,11   | 231,67 ± 16,17 | <b>* 202,50 ± 7,58</b> | 223,33 ± 6,51  | 254,50 ± 2,12 | 226,00 ± 14,93 | 14 horas |
|               | 236,33 ± 2,08   | 223,00 ± 9,17   | 240,33 ± 5,03  | <b>230,67 ± 8,39</b>   | 239,00 ± 5,29  | 252,33 ± 2,08 | 243,67 ± 5,03  | 7 días   |
|               |                 |                 |                |                        |                | 237,67 ± 1,15 | 241,33 ± 8,14  | 14 días  |
|               |                 |                 |                |                        |                |               |                | 21 días  |

### Resultados de Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) Cirrus

Con el equipo OCT Cirrus pudimos obtener imágenes de la córnea similares a las obtenidas con OCT Visante, con la diferencia de que en el Cirrus no se pueden hacer mediciones del espesor corneal, por lo que este equipo se desechó como parte de la evaluación de la córnea cuando se lesiona y en su recuperación con el paso de los días.

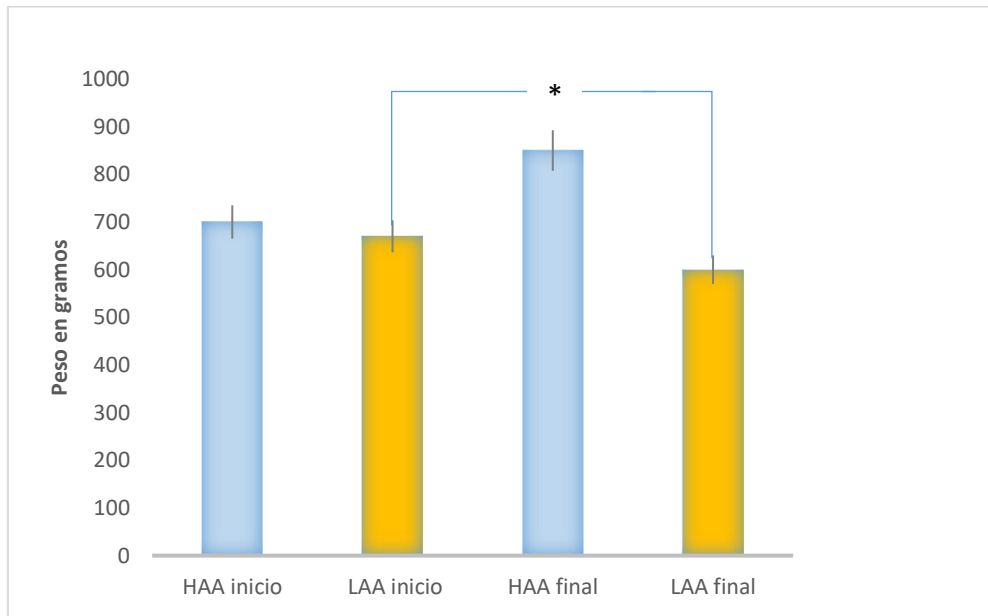
### Resultados de la tercera etapa: evaluación de la recuperación corneal en cobayos con deficiencia de ácido ascórbico (AA).

Esta última etapa tuvo como objetivo utilizar el modelo experimental de lesión con láser argón (potencia de 350 mW, 0,3 seg y un spot de 50  $\mu\text{m}$ ) y estudiar la recuperación corneal en animales con deficiencia y sin deficiencia de AA. El tipo de investigación de esta etapa se realizó evaluando los cambios morfológicos con BM, OCT Visante y por microscopía. Las variables tienen relación con las características de la córnea lesionada, los valores de espesor corneal y las características de las células del epitelio y estroma corneal observadas tanto con MO como ME. También se determinaron metaloproteinasas de matriz 9 y 10 (MMP-9 y MMP-10) para valorar los cambios en estas enzimas producidas luego de las lesiones corneales en ambos grupos de cobayos.

### **Modificaciones del peso de los cobayos antes de la aplicación con láser.**

Se presentan a continuación los resultados de la variación en el peso de los animales de ambos grupos al inicio de las dietas y 3 meses después (antes de las aplicaciones del láser de argón).





**Fig. 16:** Variaciones en el peso vivo de los cobayos (gramos) al comienzo de las dietas y luego de tres meses en ambos grupos experimentales. HAA vs LAA final (\*:p<0,05).

Como se observa en la Fig. 16, los animales con dieta deficiente (LAA), iniciaron con un peso promedio de 670 gr y luego de tres meses perdieron 11% de peso, llegando a pesar 600 gr en promedio.

El grupo HAA aumentó de un promedio de 700 gr, a 850 gr luego de tres meses de preparación, lo que significa un aumento del 21% de su peso corporal.

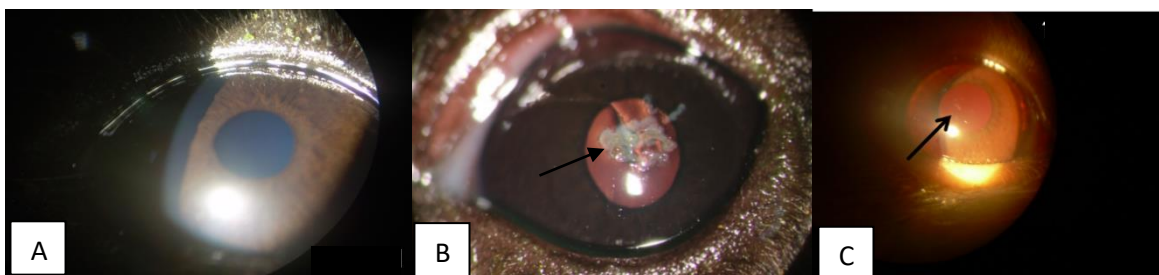
Si comparamos la variación del peso vivo al inicio de la dieta entre ambos grupos HAA y LAA, la diferencia de peso no es significativa (700 gr vs 670 gr), pero al final de los tres meses de dieta los valores de peso promedio del grupo HAA vs el grupo LAA fueron estadísticamente significativos (850 gr vs 600 gr).

Este dato nos aseguró que logramos una deficiencia parcial de vitamina C en el grupo LAA y por lo tanto continuamos con el estudio.

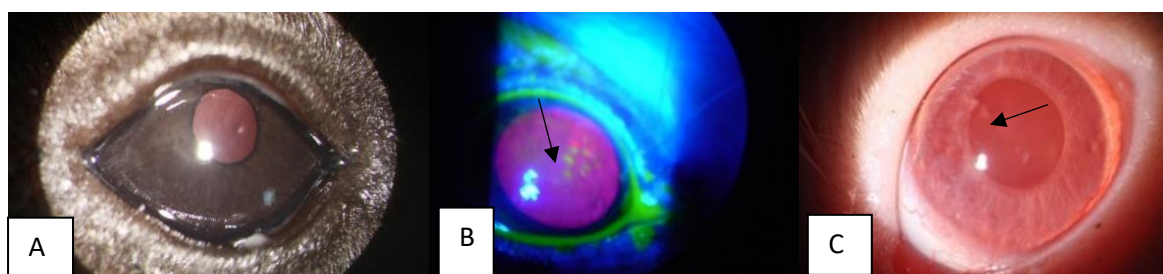
#### Resultados obtenidos por BM:

En estos estudios se observó y registró la presencia de leucomas (opacidades) en todos los animales a la hora de aplicación del láser. A medida que fue pasando el tiempo, las córneas se recuperaron gradualmente y los leucomas fueron desapareciendo hasta no

observarse en el día 15. Resultados similares se observaron tanto en el grupo de cobayos HAA como en el grupo LAA (Fig. 17 y Fig. 18).



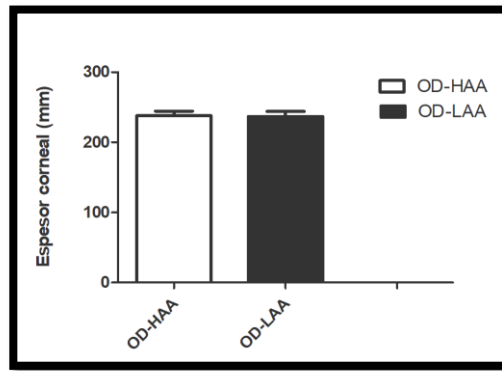
**Fig. 17:** Biomicroscopía de cobayos grupo HAA. A: control; B: 1 hs post láser; C: 7 días post láser. Las flechas marcan leucomas.



**Fig. 18:** Biomicroscopía de cobayos grupo LAA. A: control; B: 1 hs post láser; C: 7 días post láser. Las flechas indican los leucomas.

#### Resultados obtenidos con OCT Visante

**Córneas controles:** con OCT Visante se observó que las córneas de los ojos derechos de los animales de ambos grupos experimentales (HAA y LAA) tuvieron un espesor similar (Fig. 19).



**Fig. 19:** Espesor (mm) de la córnea derecha de los grupos HAA y LAA.

**Córneas experimentales:** Con OCT Visante se observó en la córnea izquierda de los animales de ambos grupos experimentales (HAA y LAA), un leve adelgazamiento a la hora y una significativa disminución del espesor corneal a las 18 hs, con respecto a los no tratados (controles). Sin embargo, los valores hallados de recuperación del espesor de las córneas izquierdas al séptimo día en los grupos HAA y LAA, no fueron significativamente diferentes. Las córneas lesionadas en ambos grupos de animales recuperaron su espesor al mismo tiempo, independientemente de la dosis de AA de la dieta (Tabla 10).

**Tabla 11:** Espesor de la córnea (media  $\pm$  ES) de animales de ambos grupos HAA y LAA en diferentes momentos luego de la aplicación del láser (\* $p < 0,05$ ).

| Control<br>(ojo derecho) | Argón 350 HAA<br>(ojo izquierdo) | Argón 350 LAA<br>(ojo izquierdo) | Tiempo |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------|
| 251,20 $\pm$ 6,40 $\mu$  | 234,70 $\pm$ 5,10 $\mu$          | 237,90 $\pm$ 5,30 $\mu$          | 1 hora |
|                          | 213,50 $\pm$ 6,20 $\mu$ (*)      | 219,10 $\pm$ 5,50 $\mu$ (*)      | 18 hs  |
|                          | 246,70 $\pm$ 8,30 $\mu$          | 244,60 $\pm$ 7,40 $\mu$          | 7 días |

## Resultados de Microscopía óptica en grupos HAA y LAA

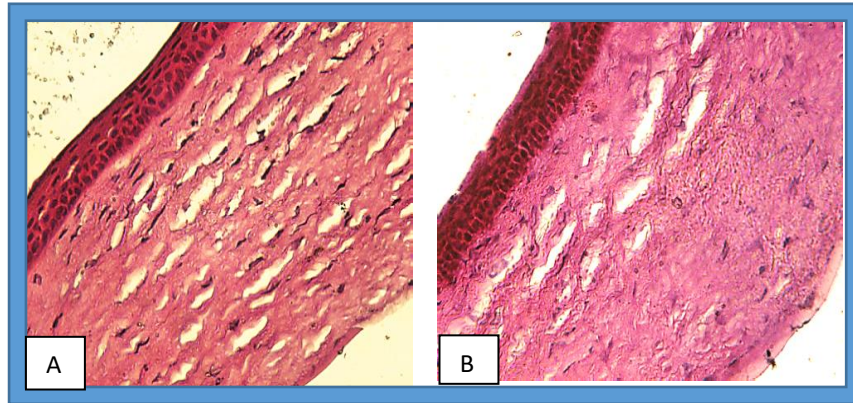
En los preparados, se evaluó el tipo y cantidad de infiltrado leucocitario de manera cuantitativa en el estroma superficial. En todos los casos la documentación de las observaciones se realizó mediante microfotografías obtenidas con cámara Nikon Sight DS-U, A.G. Heinze Inc, Tokyo, Japón, adosada al microscopio.

Como se muestra en la tabla 12 y en las figuras 20 a 22, el examen de los cortes histológicos indicó ausencia de proceso inflamatorio en las córneas controles de ambos grupos experimentales, y la existencia de una reacción inflamatoria en córneas lesionadas, fundamentalmente en el estroma anterior, que fue incrementándose gradualmente con el paso del tiempo luego de la producción de las lesiones con el láser, con un infiltrado de células inflamatorias muy importante a las 96 horas.

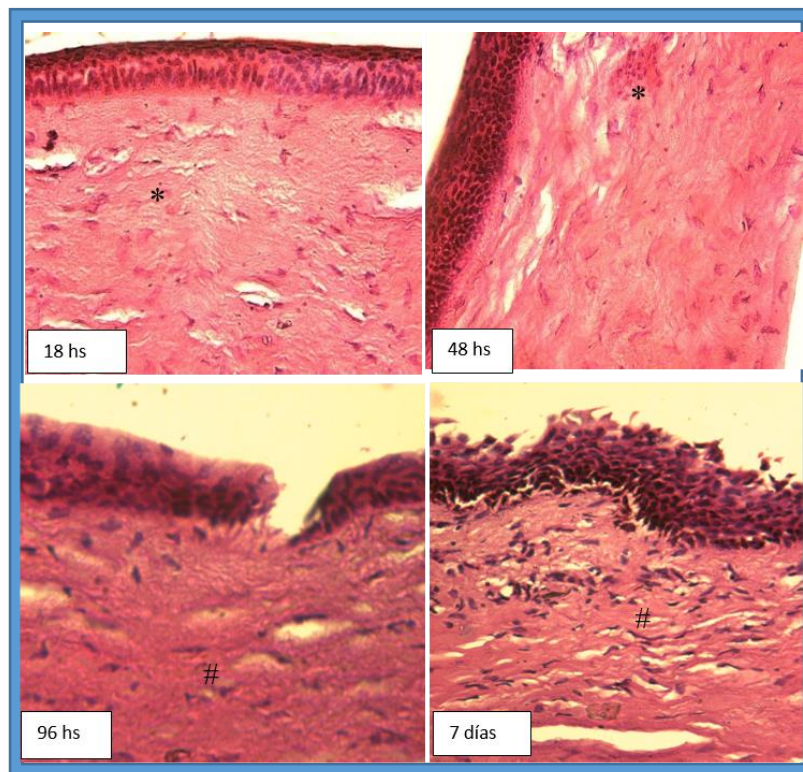
Tanto en el grupo HAA como en el grupo LAA, a las 18 hs post láser se observó un leve infiltrado celular mononuclear y con algunos eosinófilos. A las 48 hs se encontró un infiltrado leve a moderado de células mononucleares. Una mayor densidad de este mismo tipo celular se observó a las 96 hs, y aún a la semana de haberse producido la lesión el infiltrado linfoplasmocitario era intenso.

**Tabla 11:** Infiltrado leucocitario en córneas de ambos grupos a diferentes tiempos luego de la aplicación del láser.

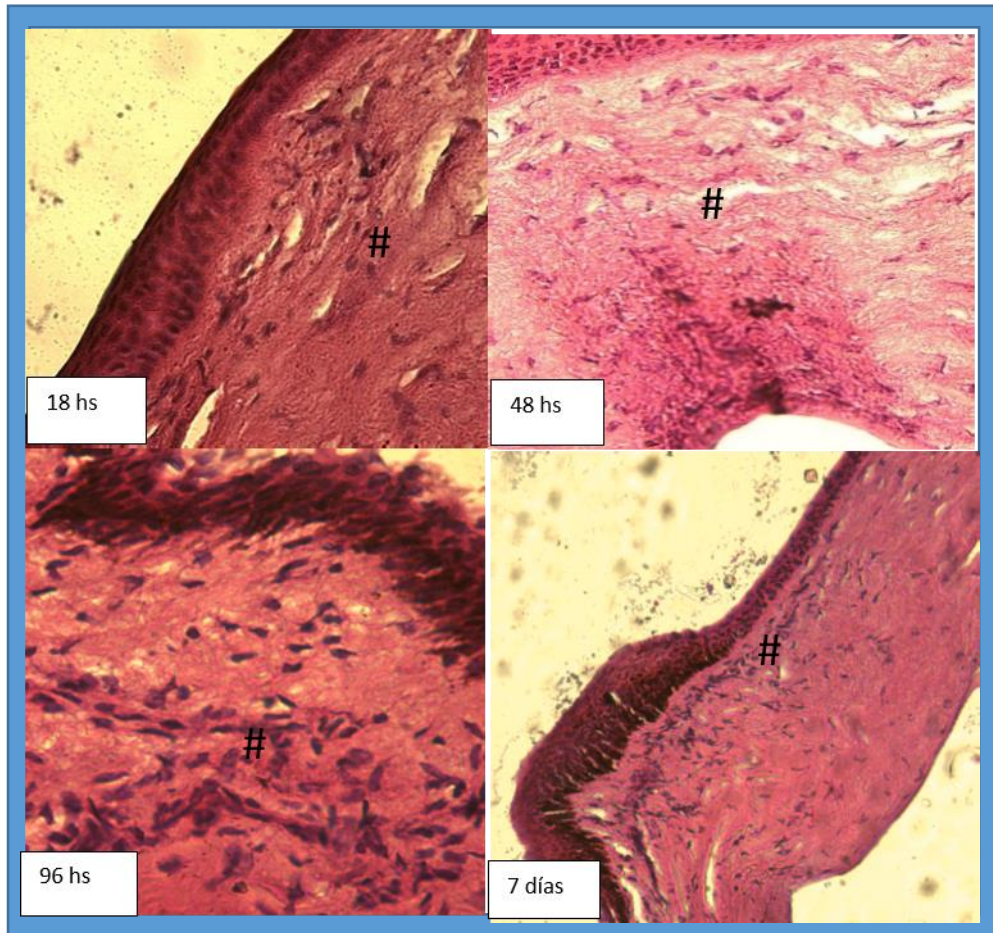
|     | Control | 18 hs | 48 hs | 96 hs | 7 días |
|-----|---------|-------|-------|-------|--------|
| HAA | Ausente | +     | ++    | +++   | +++    |
| LAA | Ausente | +     | ++    | +++   | +++    |



**Figura 20:** Imagen de córnea derecha (control) **A.** HAA. **B.** LAA. H&E 40X



**Figura 21:** Grupo HAA. Imagen de córnea izquierda luego de 18, 48, 96 hs y 7 días de la acción del láser. H&E 40X. Se observan escasos eosinófilos (\*) y células mononucleares(#) infiltrados en el estroma.



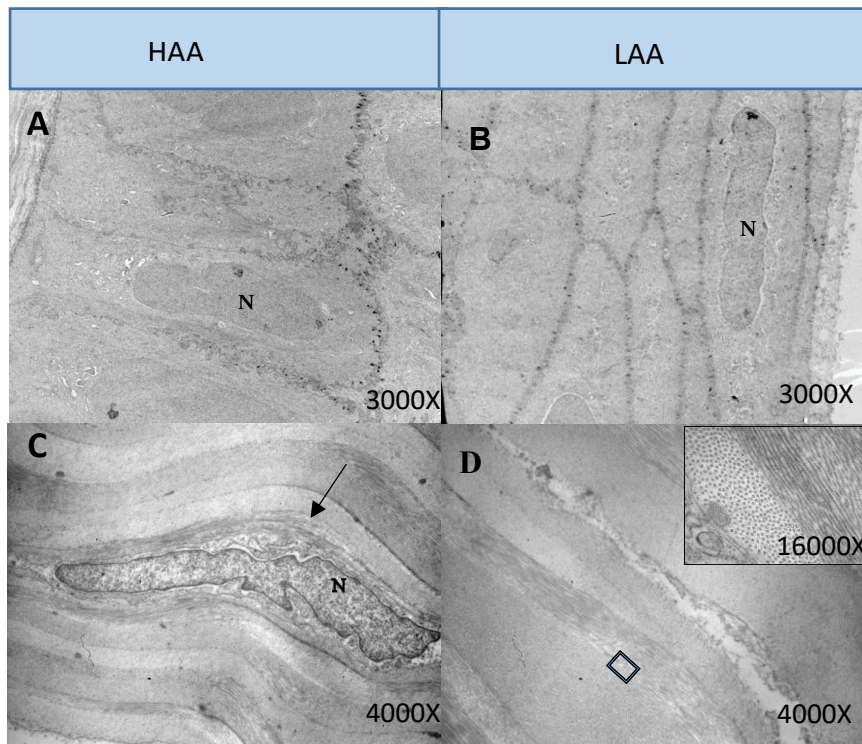
**Fig.22:** Grupo LAA. Imagen de córnea izquierda luego de 18, 48, 96 hs (40X) y 7 días (20X) de la acción del láser. La córnea presenta infiltrado mononuclear intenso (#) . H&E.

## Resultados de ME

Primero se presentan los resultados de corneas de ojo derecho (control) y luego las del grupo experimental (ojo izquierdo) para cada grupo (HAA y LAA). En todos los casos se muestran modificaciones halladas en el epitelio y estroma superficial.

### ME de córneas sin tratamiento (grupo control sin láser).

No se observaron diferencias entre las córneas de los grupos HAA y LAA que no fueron sometidas a láser (control), en ninguno de los tiempos experimentales. Las córneas del grupo **control** tanto de HAA como de LAA, mostraron un epitelio estratificado no queratinizado típico y un estroma anterior con queratocitos rodeados de matriz extracelular y fibras de colágeno regularmente ordenadas (Fig. 23).

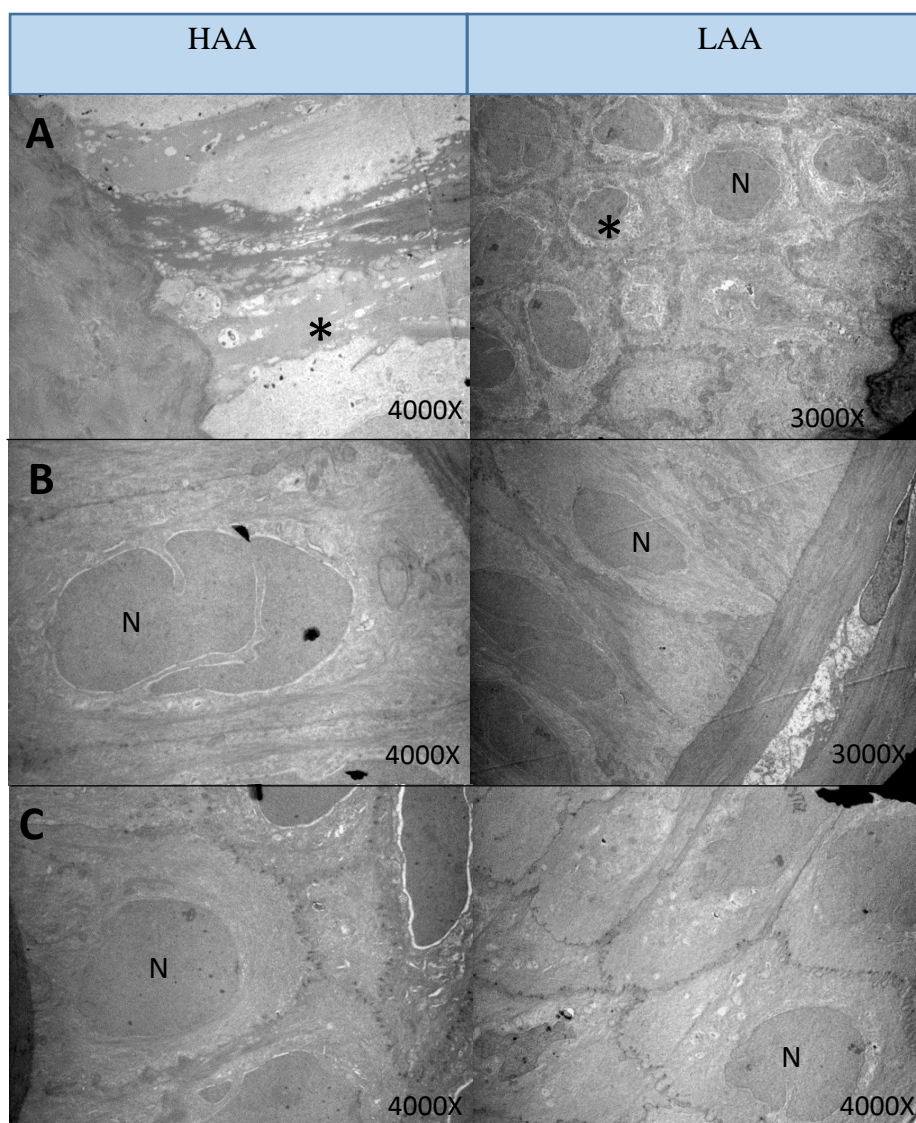


**Fig. 23:** Imágenes representativas de la ultraestructura de **córneas control**. **A)** HAA, capa basal del epitelio estratificado de aspecto columnar. **B)** LAA, epitelio estratificado con células que se van aplanando hacia la superficie corneal **N:** Núcleo. **(C)** HAA, el estroma anterior muestra el arreglo regular de las fibrillas colágenas características del mismo (paralelas entre sí), rodeando un queratocito con características similares a un fibroblasto (flecha). **(D)** LAA, estroma con fibras de colágeno ordenadas y paralelas entre sí. En el ángulo superior derecho se observa un mayor aumento de lo marcado con un rectángulo.

## ME de córneas lesionadas con láser

Las corneas izquierdas de los cobayos del grupo HAA y LAA, estudiadas a 1 y 18 hs post tratamiento con láser argón, exhibieron un epitelio extremadamente dañado.

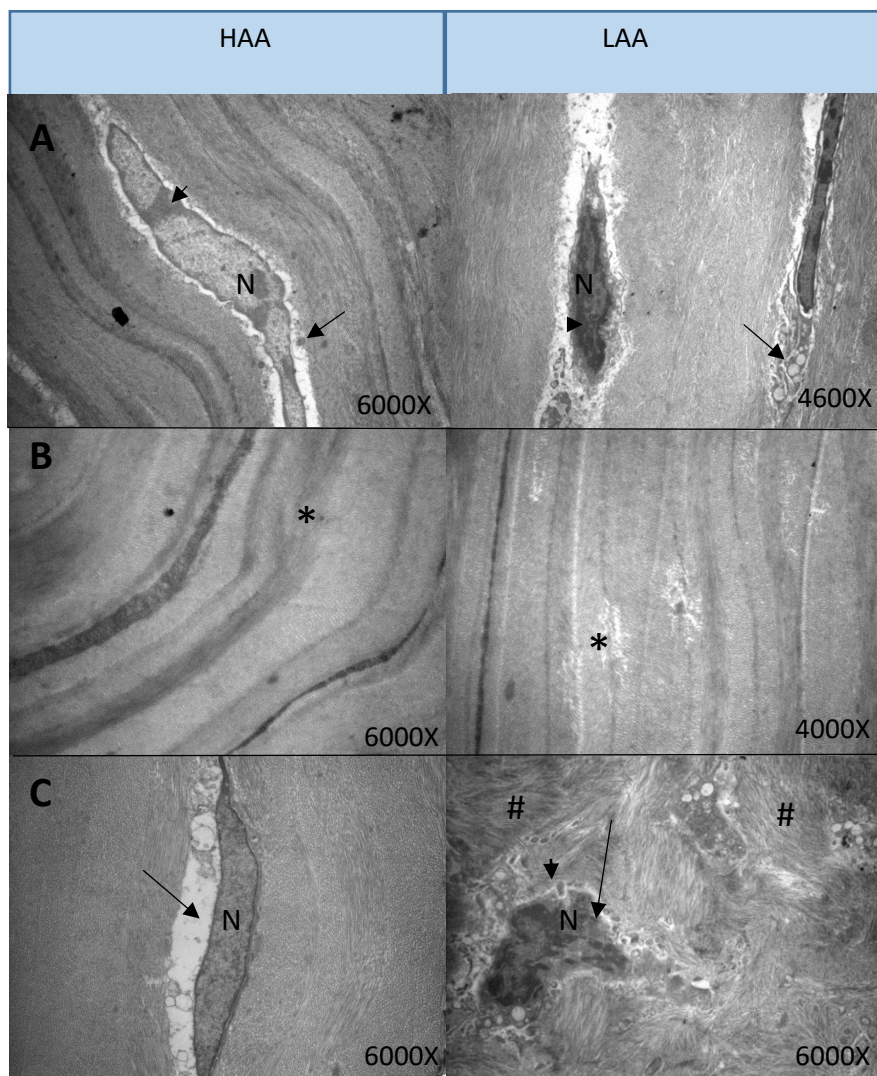
Luego de una semana, el epitelio corneal todavía presentaba algunas células picnóticas, pero había comenzado a recuperarse, para mostrar una ultraestructura normal hacia los 15 días en ambos grupos experimentales (Fig. 24).



**Fig. 24.** Imágenes representativas de microscopía electrónica de **epitelio corneal** de cobayos post-tratamiento con láser, HAA vs LAA. **A:** 1 hora post tratamiento, en el epitelio se visualizan células muertas (picnóticas) (\*) en ambos grupos, **B:** 7 días post láser, el epitelio se observa conservado, **C:** 15 días post láser, epitelio recuperado. **N:** Núcleo.

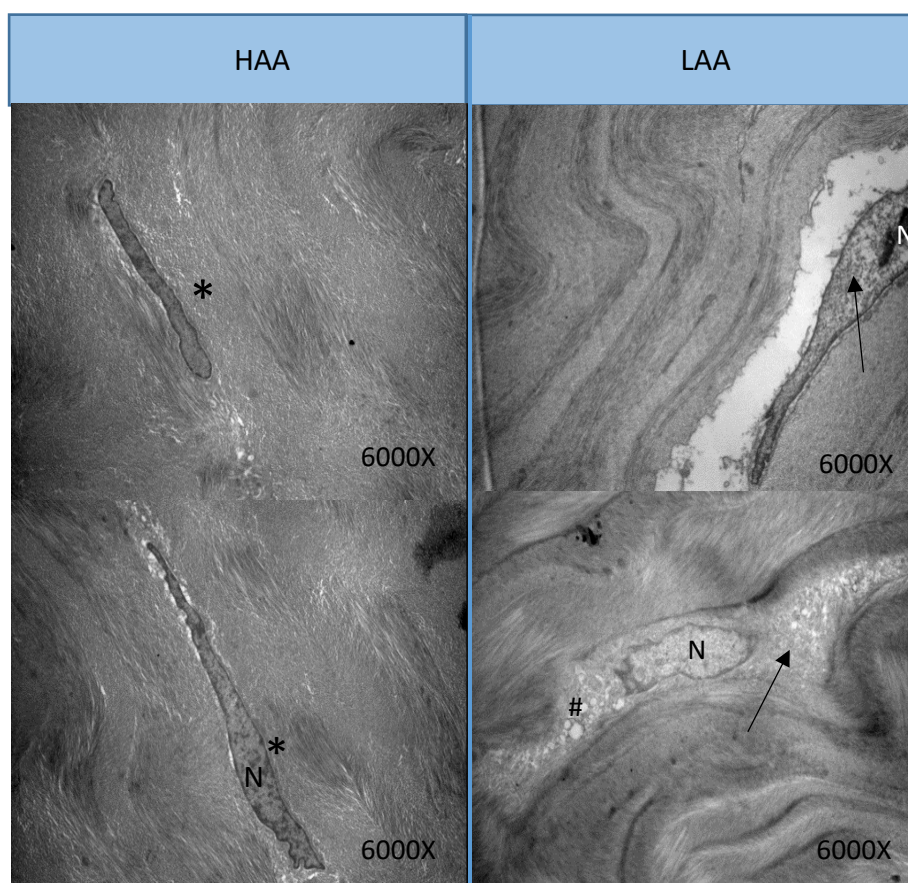


Durante los primeros 7 días y en ambos grupos experimentales, el estroma presentó anomalías. Existen queratocitos atípicos, algunos de ellos agrupados, con membranas celulares dilatadas y con citoplasma con zonas vacuolizadas y otras zonas de citoplasma condensado. Algunas zonas de colágeno se encuentran desorganizadas (Fig. 25).



**Fig. 25:** Imágenes representativas de microscopía electrónica de **estroma corneal** de cobayos post-tratamiento con láser, HAA vs LAA. **A:** 1 hora post tratamiento las fibras de colágeno aún conservan su estructura, pero en los queratocitos se observa acúmulo de vacuolas en citoplasma (flecha larga) y material picnótico en el núcleo (flecha corta), **B:** 18 hs post láser, estroma con separación entre las fibras de colágeno (\*), **C:** 7 días post láser, el estroma presenta queratocitos con núcleo más denso y citoplasma con vacuolas y material condensado (flecha larga). Matriz extracelular desorganizada con fibras colágenas entrecruzadas (#) asociadas a queratocitos atípicos (miofibroblastos) (flecha corta). N: Núcleo.

La gran diferencia entre córneas lesionadas con el láser de los 2 grupos experimentales se observa en el día 15 post-tratamiento, porque en el estroma corneal del grupo HAA, los queratocitos eran de aspecto normal, y las fibras de colágeno se encontraron bastante organizadas. Mientras que en córnea de cobayos LAA, el estroma se observó desorganizado y en los queratocitos se hallaron acúmulos de material en su citoplasma y presencia de grandes vesículas de distinto tamaño con contenido finamente granular en el citoplasma (Fig. 26).

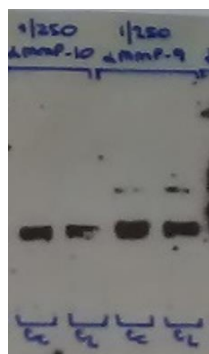


**Fig. 26:** Imágenes representativas de microscopía electrónica de estroma corneal de cobayos 15 días post-tratamiento con láser HAA vs LAA. Queratocitos normales (\*) con matriz extracelular organizada (+). Queratocitos anormales con acúmulo de material citoplasmático (flechas) y vesículas intracitoplasmáticas (#).

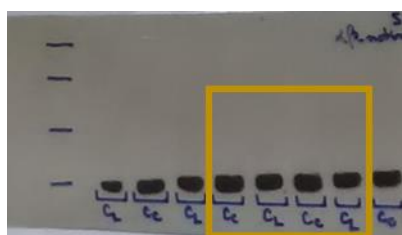
### Resultados de WB para MMP-9 y MMP-10

Se evaluaron por esta técnica, los niveles de estas enzimas a diferentes tiempos, luego de la lesión inducida en la córnea de animales con dietas HAA y LAA. Primeramente, se determinaron las concentraciones de anticuerpos apropiadas contra las MMPs y  $\beta$ -

actina para obtener una buena imagen en las membranas y así obtener por densitometría el valor MMP /  $\beta$ -actina (Fig. 27 y 28).

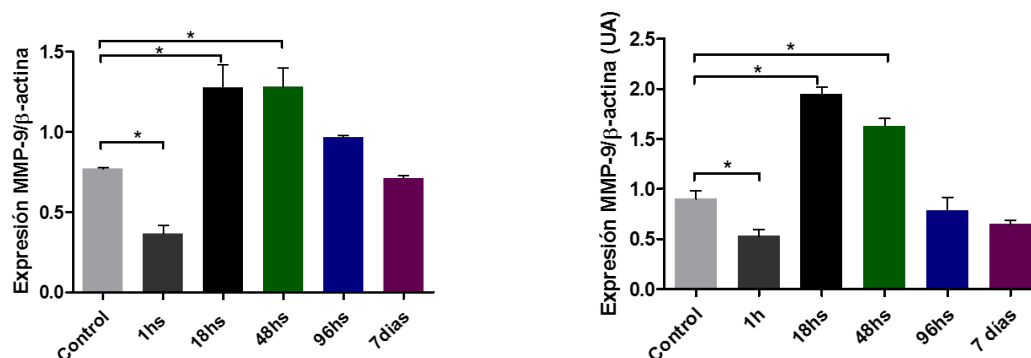


**Fig. 27.** Imagen de las bandas detectadas de MMP-10 y MMP-9 utilizando diluciones de anticuerpos primarios 1/250 en diferentes muestras corneales.



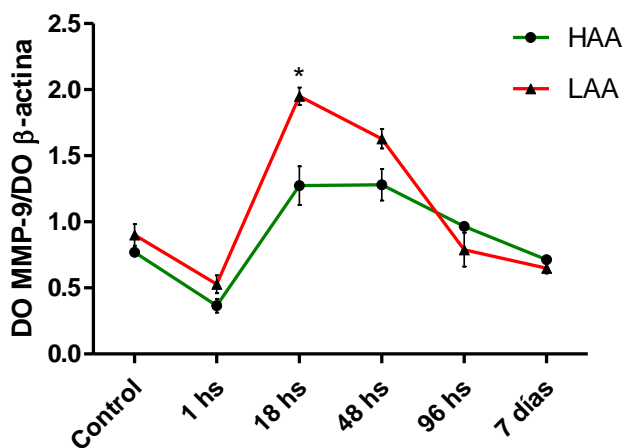
**Fig. 28.** Bandas de  $\beta$ -actina (utilizando una dilución del anticuerpo primario de 1/3000) en diferentes muestras corneales.

### Resultados de Western Blot para MMP-9



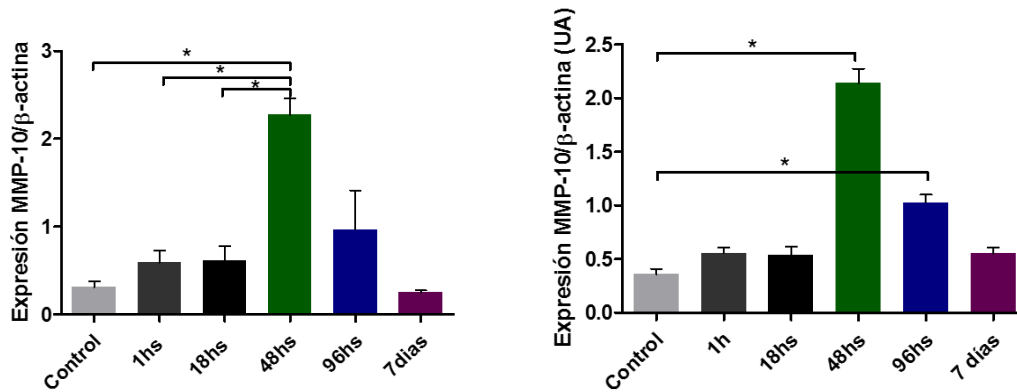
**Fig. 29:** Gráficos de barra de valores de MMP-9 en los grupos HAA (izquierda) y LAA (derecha) en córnea control, y a diferentes tiempos post aplicación del láser (\*:p<0,05).

Como se puede observar en la figura 29, al comparar los valores de MMP-9 encontrados en ambos grupos a diferentes tiempos, podemos observar que hay diferencias significativas cuando se compara la córnea control con las tratadas con láser a la hora, 18 hs y 48 hs. El incremento temporal de esta gelatinasa también fue graficado como curvas de expresión de las MMP-9 comparando las córnea HAA vs LAA, y claramente se puede observar que los valores en la mayoría de los tiempos analizados, con excepción de las 18 horas de ambos grupos, no son significativamente diferentes para cada tiempo experimental (Fig. 30). Los niveles de MMP-9 en los homogenatos corneales mostraron un aumento máximo a las 18 horas en ambos grupos experimentales (HAA y LAA) con una posterior disminución hasta alcanzar niveles basales a los 7 días.



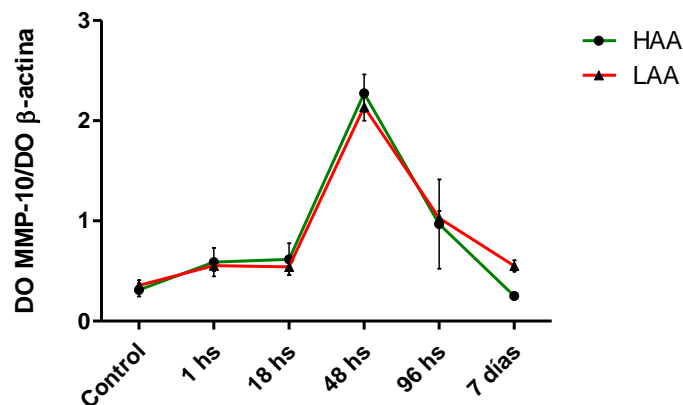
**Fig. 30:** Comparación de los niveles de MMP-9 en homogenatos corneales en ambos grupos experimentales (HAA y LAA) (\*:  $p < 0,05$ ).

## Resultados de Western Blot para MMP-10



**Fig. 31:** Gráficos de barra de valores de MMP-10 en los grupos HAA y LAA en córnea control, y a diferentes tiempos post aplicación del láser (\*:  $p < 0,05$ ).

Al comparar los valores de MMP-10 a diferentes tiempos (Fig. 31), podemos observar que hay diferencias significativas entre la córnea control con las tratadas con láser a las 48 hs en ambos grupos y a las 96 hs solamente en el grupo LAA. El aumento temporal de esta estromelisinina 2 fue graficado como curvas de expresión de las MMP-10 comparando las córnea HAA vs LAA, y se puede observar claramente que los valores de ambos grupos no son significativamente diferentes para cada tiempo experimental (Fig. 32). Los niveles de MMP-10 en los homogenatos corneales mostraron un aumento máximo a las 48 horas en ambos grupos experimentales (HAA y LAA) y una posterior disminución hasta alcanzar niveles basales a los 7 días.



**Fig. 32:** Comparación de los niveles de MMP-10 en homogenatos corneales en ambos grupos experimentales (HAA y LAA) (\*:  $p < 0,05$ ).

Se observa en las distintas gráficas, que las mediciones de MMP-9 y 10 mostraron una curva similar para ambos grupos, con picos de elevación máximo a las 48 hs. A las 18 horas post lesión, hay una diferencia significativa en la MMP-9 cuando se compara el grupo LAA vs el HAA. Ambas enzimas retornaron a sus valores basales a los 7 días tanto en el grupo de cobayos con dieta alta como baja en AA.

## 5. Discusión

El primer objetivo de este trabajo de investigación fue conseguir un método que permitiera reproducir lesiones sobre la córnea de manera controlada y consideramos que la tecnología láser sería la indicada. Entonces debíamos determinar qué láser, qué potencia y cuánto tiempo, es necesario para provocar erosiones reproducibles, que afecten la córnea desde el epitelio hasta el estroma superficial, con el fin de utilizar este método de erosiones, como una variable para intentar desarrollar un modelo experimental de QCE.

Logramos desarrollar lesiones corneales en epitelio y estroma anterior de cobayos de manera reproducible mediante el uso de láser argón a una configuración de 350 mW, 0,3 segundos, 50  $\mu\text{m}$  de diámetro (Suárez AC et al., 2015).

Este modelo, utilizado en forma crónica, podría utilizarse en un futuro para intentar obtener un modelo experimental de QCE, así como también para estudiar mecanismos moleculares involucrados en los procesos de regeneración corneal.

Los estudios sobre recuperación de heridas provocadas en la córnea tienen una larga historia, ya que comenzaron hace aproximadamente 7 décadas. Desde que Friedenwald y Buschke en el año 1944 publicaron uno de los primeros trabajos acerca de recuperación del epitelio corneal luego de erosiones inducidas por aguja en córnea de rata (Friedenwald y Buschke, 1944), muchos otros estudios han sido realizados describiendo distintos tipos de erosiones (químicas o mecánicas) y cómo se produce la recuperación de la córnea. La respuesta de cicatrización corneal es una compleja interacción entre células estromales, epiteliales e inmunes, en la cual participan activamente citocinas, factores de crecimiento y sus receptores (Netto et al., 2005; Dupps y Wilson, 2006).

Para estudiar las variaciones en la respuesta de la córnea de diferentes animales a los distintos tipos de erosiones, e investigar mecanismos celulares de migración, proliferación, y diferenciación, como también mecanismos de barrera, cicatrización, e inflamación, entre otros, es por lo que se han empleado diversos instrumentos para generar lesiones. Las ventajas de utilizar los distintos tipos de lesiones, así como los conocimientos obtenidos del empleo de cada uno de ellos sobre los mecanismos

moleculares involucrados en los procesos de cicatrización, han sido publicados en una revisión de Stepp et al., (2014).

Entre los instrumentos más usados para producir lesiones corneales, se encuentran la espátula roma (Pal-Ghosh et al., 2011a) y la fresa rotativa, (Pal-Ghosh et al., 2011b; Terai et al., 2011; Boote et al., 2012). En las heridas por desbridamiento, la membrana basal queda sobre el estroma, mientras que en las heridas por queratectomía, se elimina la membrana basal (Pal-Ghosh et al., 2011b). Para preservar la membrana basal, se utiliza una espátula roma que elimina el epitelio dentro de una zona marcada con un trépano (Gipson y Kiorpes, 1982; Sta Iglesia y Stepp, 2000). Las heridas con desbridamiento circular son ideales para algunos análisis, como la cuantificación de re-epitelización, las tasas de proliferación celular, re-inervación, y las respuestas inmunitarias innatas.

En nuestro modelo experimental lesionamos la córnea de cobayos en forma térmica, con el láser de argón, dañando epitelio, membrana basal y estroma superficial (Suárez AC et al., 2015).

Pal-Ghosh et al. (2014), comparando la lesión producida por la espátula roma y la fresa rotativa, evaluaron la morfología de los leucocitos frente a la presencia de diferentes citoquinas, y el reclutamiento inicial de monocitos y células  $\gamma\delta T$ . Estos autores encontraron una rápida respuesta de los leucocitos residentes y reclutados, sobre todo cuando se lesionaba la córnea con una espátula roma, hallando un aumento de leucocitos CD45+ en el borde de la herida, 3 a 6 hs después de la lesión. En pocos minutos, los leucocitos cambian su forma en el estroma expuesto, observándose células más redondas, preparadas para migrar. En 6 hs luego de la lesión con espátula roma, aumenta el reclutamiento de monocitos y células  $\gamma\delta T$ , mientras que la lesión con fresa rotativa provoca menor respuesta y activación celular, debido a la remoción de citoquinas de la superficie estromal. Cuando en la herida corneal, se presentan también las bacterias, se induce una respuesta inmune con mayor daño del tejido (Pal-Ghosh et al., 2014).

En 24 h, una herida de 1,5 mm hecha en un ratón adulto, está cerrada. En cuestión de horas después de la herida, los leucocitos residentes se activan y reclutan leucocitos que entran en el estroma desde la vasculatura del limbo (Li et al, 2006; Petrescu et al., 2007; Li et al., 2011 a; Li et al., 2011 b).



La lesión corneal por queratectomía superficial manual y queratectomía fotorrefractiva (PRK), incluye reepitelización sobre la membrana basal, reinervación y cicatrización de la córnea. La PRK es producida por un excímer láser, y ocasiona formación de radicales libres e infiltración de leucocitos polimorfonucleares en la córnea en pocas horas (Bilgihan et al., 1998; Bilgihan et al., 2003; Gan et al., 2001). La presencia de estas células acelera la recuperación de la herida corneal posiblemente por proteínas antimicrobianas encontradas dentro de los gránulos de los neutrófilos como CAP37, LL-37, HBD-1 y BPI (Griffith et al., 2014).

En nuestro modelo experimental también hallamos infiltración leucocitaria al poco tiempo de producirse la lesión con el láser argón, y no hubo diferencia entre el infiltrado leucocitario observado en los grupos HAA y LAA.

Las heridas por desbridamiento no activan la expresión de  $\alpha$ -SMA en los fibroblastos del estroma en el ratón. Se deben utilizar heridas más profundas, que alteren la membrana basal, tales como la queratectomía y las incisiones de espesor completo, para evaluar la formación de miofibroblastos (Pal-Ghosh et al., 2011 b; Boote et al., 2012). Las células positivas a  $\alpha$ -SMA que se generan por este tipo de heridas son transitorias. Permanecen durante varias semanas antes de desaparecer (Netto et al., 2005; Ruberti y Zieske, 2008).

Si bien nosotros no estudiamos la expresión de  $\alpha$ -SMA en los fibroblastos estromales, los estudios de ME en las córneas de cobayos lesionados por el láser argón, mostraron la presencia de células estromales compatibles con miofibroblastos.

Las heridas incisionales también se pueden emplear para estudiar la córnea (Azar et al., 1998; Kato et al., 2003; Stramer et al., 2003; Blanco-Mezquita et al., 2013; Saika et al., 2013). Las heridas incisionales inducen miofibroblastos y cicatrices en la córnea (Bron, 2001). Estos miofibroblastos se mantienen a través del tiempo y se distinguen de los miofibroblastos que se forman después de las heridas por queratectomía manuales. Las suturas colocadas en la córnea central inducen una respuesta inmune y angiogénesis (Streilein, 1996; Amescua et al., 2008). En nuestro modelo no encontramos neovascularización de la córnea lesionada, aunque esta ausencia podría deberse a que el seguimiento no fue muy extendido.

El uso de cultivo de células para estudiar las respuestas de la córnea a diferente tipo de lesiones epiteliales ha reducido el número de procedimientos realizados en animales

vivos. Estudios de cultivo de órganos han revelado aspectos básicos de la migración de células y han permitido la investigación de los efectos de adición de señalización y factores de crecimiento, drogas, bacterias y células, en la reepitelización de las heridas corneales por desbridamiento (Gipson et al., 1984; Trinkaus-Randall y Gipson, 1984; Zieske y Gipson, 1986; Spurr-Michaud et al., 1988; Yamada et al., 2004; Ma et al., 2011).

Se pueden añadir a los cultivos de órganos, factores de crecimiento, anticuerpos que bloquean funciones y varios activadores e inhibidores para evaluar su impacto sobre la migración celular, la proliferación y/o la cicatrización (Terai et al, 2011). Beals et al. (1999), observaron en cultivo celular de córnea bovina, el efecto que causa el suero bovino sobre el fenotipo de los queratocitos y la síntesis de glucosaminoglicanos, simulando las células, una córnea en proceso de cicatrización.

Las córneas más utilizadas para los estudios de cicatrización corneal en cultivos de órganos son las de rata, conejo, cerdo y las córneas humanas de los bancos de ojos (Yin y Yu, 2010; Notara et al., 2011). La reepitelización tiene lugar en cultivo de órganos en un tiempo similar como lo hace *in vivo* aun en ausencia de los nervios sensoriales funcionales (Trinkaus-Randall y Gipson, 1984; Zieske y Gipson, 1986).

La elección del animal adecuado para estos estudios de lesión y recuperación corneal no es menos importante que la selección del instrumento a utilizar. La investigación de la cicatrización corneal ha hecho uso de varios animales, desde animales de laboratorio hasta animales domésticos de compañía, reconociendo que cada uno tiene ventajas y desventajas. La córnea de pollo en desarrollo es grande y fácil de obtener. Las imágenes de la membrana basal del epitelio corneal y del colágeno del estroma permiten una mejor comprensión de la biosíntesis del colágeno y de glucosaminoglicanos y la formación de la matriz extracelular y destacan la importancia de la membrana basal en el desarrollo y la patología corneal (Conrad, 1970; Trelstad, 1973; Svoboda et al., 1988; Kubilus y Linsenmayer, 2010 a; Linsenmayer, 2010 b).

En 1944, Friedenwald y Buschke examinaron la proliferación celular y la progresión del ciclo celular en el epitelio de las córneas de ratas sanas y con lesiones por desbridamiento. Las ventajas del uso de ratas incluyen el tamaño de la córnea (diámetro 5 mm) que permite hacer heridas precisas y proporciona tejido adecuado para los análisis bioquímicos y moleculares. Los estudios que utilizaron ratas a partir del periodo 1970-

1990 dieron información importante sobre las proteínas y moléculas que regulan el metabolismo epitelial celular, la adhesión y la migración, en la córnea (Anderson, 1977; Zieske y Gipson, 1986; Murakami et al., 1992; Gipson et al., 1994; Stepp et al., 1993).

Los conejos tienen una córnea similar en tamaño a la del hombre; esto permite a los médicos especialistas utilizar los mismos instrumentos y métodos de evaluación que utilizan en los pacientes. Los modelos en conejo fueron fundamentales en los estudios que condujeron a la implementación clínica de los procedimientos de PRK y LASIK (Pallikaris et al., 1990). La córnea del conejo responde de manera similar a la córnea humana en términos de la sincronización, el grado de cicatrización, y formación de miofibroblastos (Helena et al., 1998, Imanishi et al., 2000, Mohan et al., 2003, Netto et al., 2006). Las desventajas de realizar investigaciones en conejos incluyen mayor costo que las ratas para la compra y mantenimiento, disponibilidad restringida de anticuerpos contra diversas proteínas de interés, y menor disponibilidad de cepas genéticamente diversas y animales transgénicos.

La medicina veterinaria con sus animales domésticos de compañía, perros y gatos, ha estado en la vanguardia del desarrollo de mejores tratamientos para los defectos de la superficie ocular (Morgan y Abrams, 1991; Murphy et al., 2001; Gosling et al., 2013). Estos estudios, además, han informado y mejorado los tratamientos para los seres humanos. Los gatos domésticos han sido estudiados para determinar la mejor manera de reducir la cicatrización corneal después de las infecciones de virus herpes ocular simple (VHS) (Gould, 2011). Los gatos y los conejos responden de manera similar a los seres humanos en términos de cicatrización de la córnea (Nagy et al., 2007). Las desventajas de usar los animales de compañía para la investigación de cicatrización corneal incluyen su gran tamaño, el alto costo, y su heterogeneidad genética.

Hasta lo que se conoce, los cobayos no han sido muy utilizados para estudios de recuperación de la córnea luego de lesiones que llegan al estroma superficial. El cobayo es un animal dócil, de tamaño pequeño y no muy costoso para criar. La córnea de esta especie animal es morfológicamente similar al humano y no sintetiza AA a partir de glucosa, ni concentra este antioxidante en la córnea, a no ser que el animal sea alimentado con un suplemento que contenga esta vitamina (igual que los humanos). Por todo esto seleccionamos cobayos para este trabajo de tesis.

El excímer láser se ha utilizado para estudiar la cicatrización corneal, ya que la recuperación implica reepitelización, ensamblaje de la membrana basal, reinervación y cicatrización (Azar et al., 1998; Kato et al., 2003). El láser argón, que se diferencia en su mecanismo de acción con respecto al excímer láser, fue utilizado en este trabajo para evaluar la lesión producida en córneas de cobayos (Suárez AC et al., 2015) y la recuperación de las córneas en animales normales y deficientes en AA.

Diferentes estudios han sido realizados en oftalmología para investigar las aplicaciones y ventajas de los 4 tipos de láser que nosotros probamos inicialmente en este trabajo (Suárez AC et al., 2015). Aplicaciones del láser de CO<sub>2</sub> en córnea humana, bovina, porcina y de conejo han demostrado cambios en el epitelio y en el estroma cuando las córneas se examinaron por MO (McCally et al., 1983; Krauss et al., 1986; Keates et al. 1981; Chandonnet et al., 1992; Widder et al., 1990).

De acuerdo con los estudios realizados por Gilmour (2002), el láser de CO<sub>2</sub> debe ser usado con mucha precaución en el tejido corneal porque puede provocar daños en todas las estructuras corneales e incluso perforar este tejido. Si bien la aplicación de este láser no perforó la córnea de cobayos en nuestro estudio, indujo importantes daños en todas las estructuras de este tejido.

El láser de Nd-YAG se utiliza para resolver la opacificación de la cápsula posterior, que puede ocurrir luego de la facoemulsificación, mediante una capsulotomía posterior (Gilmour, 2003).

El láser de argón, además de emplearse frecuentemente en fototerapia de retina, ha sido utilizado con otras finalidades en oftalmología. Vieira et al. (2004), emplearon este láser, con foco intraestromal, para retirar suturas de la córnea, con una potencia de 340 mW, 0,1 s, y diámetro de 5 a 100  $\mu$ , sin observar úlceras ni infecciones. Kremer et al. (1996), encontraron que el láser argón a potencias y tiempos variados induce, en córneas de cobayos teñidas con rosa de bengala como fotosensibilizador, desde un mínimo daño, hasta importante disrupción lamelar. Resultados similares fueron observados en nuestro estudio utilizando este láser sobre córneas de cobayos teñidas con fluoresceína.

El láser de diodo se utiliza, entre otras cosas, para tratamiento de retinopatía del prematuro y glaucoma. Chew et al. (2000), utilizando láser de argón y diodo, compararon la transmisibilidad de córneas humanas y los efectos fototérmicos sobre córnea e iris. Estos investigadores utilizaron córneas claras, intermedias y opacas e

hicieron foco en estroma medio. La energía empleada con láser argón de 488 nm y diodo de 810 nm fue de 1.000 mW durante 0,1 s y de 980 mW durante 0,1 s, respectivamente. El láser diodo no produjo daño térmico en la córnea y la transmisibilidad fue del 89, 87 y 85% en los 3 tipos de córnea usados. Con el láser de argón, los autores observaron una transmisibilidad de 78, 73 y 70% y daño en las córneas opacas. Estos autores concluyeron que el láser diodo podría ser el ideal para la iridotomía/iridoplastia en glaucoma de ángulo cerrado agudo con córnea opaca. Las diferencias observadas con nuestro modelo experimental pueden deberse a la utilización de distintos tipos de córneas y de configuración del láser diodo.

Nuestro objetivo inicial fue encontrar qué láser y qué condiciones de aplicación dañaban solamente la córnea desde el epitelio hasta la porción anterior del estroma. Debido a que el láser de argón a 350 mW, por 0,3 s, y 50  $\mu$  de diámetro, lesionó solamente la porción anterior de la córnea, se continuaron los estudios con este láser y esas condiciones.

Posteriormente buscamos y pusimos a punto métodos que permitieran estudiar las lesiones y su posterior recuperación luego de la aplicación del láser argón.

Utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro* estudiamos las lesiones inducidas, el proceso de recuperación de la córnea y la existencia o no, de cicatrices.

La BM, se utilizó para ver el segmento anterior del ojo, específicamente para evaluar la apariencia corneal, en córneas lesionadas o no, con la configuración previamente elegida de láser argón en animales normales.

Otra tecnología que utilizamos para la observación de la córnea *in vivo* fue OCT (Visante y Cirrus). Tal como fue explicado anteriormente, la técnica de Cirrus no fue útil, pues no permite hacer mediciones de la córnea, por lo que elegimos, el OCT Visante que sí proporciona datos sobre el espesor corneal. Esta técnica, no ha sido empleada frecuentemente como parte de la investigación de los ojos de cobayos, tanto es así que solo se pudieron encontrar referencias anteriores del empleo de OCT en cobayos en la presentación en congreso de Suárez MF et al. (2013) y en el trabajo publicado de Lisa Ostrin et al. (2014), quienes utilizaron OCT para medir el diámetro pupilar y la profundidad de la cámara anterior de cobayos luego de la aplicación de pilocarpina.

Otros investigadores como Xiangtian Zhou et al. (2008), han utilizado OCT especialmente fabricado para uso de pequeños roedores (ratones) para medir el espesor de distintos componentes oculares en animales normales y anormales.

Una revisión de Lara-Medina et al. (2012), relacionada con el uso y los principios de funcionamiento de la OCT del segmento anterior y posibles ventajas frente a la biomicroscopía ultrasónica (BMU), describe que la OCT permite la obtención de imágenes con una mayor resolución espacial que la BMU. Todos los datos informados por estos autores corresponden solo a pacientes humanos. Por todos estos resultados, es que concluimos que la utilización de la OCT en córnea de cobayos para evaluar lesión y recuperación corneal es una técnica original en su empleo y servirá para futuros investigadores como referencia. OCT nos permitió medir perfectamente los espesores de córneas normales y las variaciones del espesor corneal luego de ser lesionadas y su evolución a lo largo del tiempo.

La MO es la técnica de estudio *in vitro* por más tiempo utilizada en las investigaciones histopatológicas. Los datos que aporta sobre la córnea se refieren a las características morfológicas de la estructura celular, membranas basales (epitelial y endotelial), queratocitos, infiltración de células inflamatorias y presencia de vasos sanguíneos entre otras cosas. La primera descripción de córnea de cobayos sanos, con datos sobre estructura y función, es la presentada por Cafaro et al. (2009). En ese trabajo, los autores incluyeron descripción y fotografías de córnea de cobayos sanos mediante la técnica de MO y ME.

Kremer et al. (1996), observaron en córnea de cobayos lesionados con láser argón verde de 514 nm, una mínima coagulación cuando se usó 0,05 W y 50  $\mu$ , una moderada coagulación del estroma anterior con potencias de 0,07-0,6 W y un spot de 100-200  $\mu$ . Potencias de 0,7 y 0,8 W, mostraron una clara disrupción lamelar.

El objetivo final de este trabajo fue investigar si existen diferencias en la recuperación de las lesiones producidas por el láser argón en animales con dieta normal o deficiente en AA, utilizando las diferentes técnicas y metodologías mencionadas al comienzo del trabajo.

Después de una lesión corneal, se desata una serie de eventos en cascada mediados por interacciones autócrinas y paracrinas de citoquinas, producidas por distintos tipos de células que intentan restaurar la estructura dañada sin dejar secuelas. Las lesiones que involucran solo al epitelio curan por migración, mitosis y diferenciación de células, sin dejar cicatriz. Si en cambio, se lesiona la membrana basal, la transparencia corneal puede verse afectada. La apoptosis de los queratocitos libera enzimas proteolíticas que dañan

la matriz extracelular y el tejido alrededor de las células (Andre y Torricelli, 2014). Algunos queratocitos quedan en el estroma periférico y posterior (profundo) y comienzan a sufrir mitosis 12 a 24 hs después de la lesión. Esta proliferación genera precursores de miofibroblastos. Cuando hay muchos miofibroblastos, la opacidad de las células y la matriz extracelular desorganizada que ellos producen, puede generar una opacidad corneal. Los miofibroblastos tienen características de células musculares lisas como actina del musculo liso ( $\alpha$ -SMA) que se puede usar como marcador. La generación de miofibroblastos es beneficiosa para la incisión estromal porque facilitan el cierre de la herida, pero su aparición puede generar una cicatriz indeseada (Andre y Torricelli, 2014).

Los proteoglicanos normales como el queratán sulfato, regulan del diámetro y espacio de las fibrillas de colágeno asociadas a la transparencia. Los miofibroblastos, expresan pocas cristalinas corneales como la transquetolasa y la ALDH 1, comparado con los queratocitos normales. La producción disminuida de cristalinas lleva a la opacidad. El factor TGF- $\beta$  es clave en el desarrollo de los miofibroblastos, estimula la producción de proteínas de la MEC, inhibe las MMPs y modula la respuesta cicatrizal. Los factores TGF- $\beta$  1 y 2 favorecen la cicatrización mientras que el tipo 3, la retrasa (Finsson et al., 2013). Durante la recuperación de la herida corneal aumenta la expresión del factor IGF2R (insulin like growth factor 2 receptor) en los miofibroblastos estromales, que regula la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (Bohnsack et al., 2014.)

A pesar de no haber investigado la existencia de estas moléculas encontramos en los estudios de ME, miofibroblastos en las córneas de cobayos lesionados con el láser argón.

Los queratocitos son los encargados de producir el colágeno y la MEC, pero cuando cambian a miofibroblastos por los factores antes enunciados, tanto las proteínas como los proteoglicanos y glucosaminoglicanos, se modifican. El estroma corneal es una estructura altamente organizada que necesita producir la mínima dispersión de la luz para contribuir a la transparencia corneal (Hassell y Birk, 2010). Las anomalías en la organización del colágeno resultan en una pérdida de la transparencia corneal (Maurice, 1957; Meek et al., 2003).

Considerando la importancia del colágeno en la estructura y transparencia de la córnea, el metabolismo del AA y su participación en la síntesis ha sido ampliamente estudiado por muchos años (Wu et al., 2004). Además de su papel como un antioxidante, el AA

también es un cofactor en la síntesis del colágeno ya que es necesario para la hidroxilación de la prolina y la lisina que permiten la formación adecuada de fibrillas de colágeno estables y la asociación específica con glucosaminoglicanos (Pinnell, 1975; Peterkofsky, 1991).

Ha habido diferentes evidencias de que el AA participa directa o indirectamente en la biosíntesis de colágeno. Chojkier et al. (1983), observaron en un modelo *in vitro* de animales con escorbuto, que después de 2 semanas con una dieta deficiente en AA, la biosíntesis de colágeno disminuyó significativamente, mientras que la hidroxilación de prolina no se vio afectada. Al añadir AA, la hidroxilación de prolina fue restaurada, no así la síntesis de colágeno, relacionando esta disminución con la menor ingesta característica del escorbuto.

Se demostró que la adición de AA en los cultivos de tendón de ave induce la secreción de procolágeno y aumenta la velocidad de secreción (Schwarz, 1985).

En una publicación de Oyamada et al. (1988), los fibroblastos humanos expuestos a suero de cobayos con escorbuto mostraron una reducción de la síntesis de colágeno. Esta inhibición podría ser revertida con la adición de IGF-I, que estimula la síntesis de colágeno y proteoglicanos.

Pacifici y Iozzo (1988), estudiaron el papel del AA en la remodelación del retículo endoplasmático rugoso (RER) durante la secreción de procolágeno. Después de la adición de AA a un cultivo de condrocitos escorbúticos el procolágeno es totalmente secretado en 24 hs. También demostraron que, durante el tratamiento con AA, el RER sufre una remodelación, con formación de grandes cisternas como sacos, y muchas cisternas aplanadas. Después que la redistribución de procolágeno se lleva a cabo, las cisternas grandes y planas se comunican y se produce la secreción.

En un estudio de 2011, se evaluó el efecto de la deficiencia de ascorbato y la exposición a RUV-B sobre la ultraestructura del estroma corneal del cobayo. Los cambios inducidos por los RUV-B en la ultraestructura corneal, fueron más pronunciados en animales alimentados con dieta deficiente en AA. Esto sugiere, que el AA desempeña un papel fundamental en la organización del estroma y en la protección de los efectos nocivos de los RUV-B (Hayes et al., 2011).

Karamichos et al. (2010), utilizaron el AA junto al TGF-B1 para crear un modelo *in vitro* de fibrosis corneal humana. El AA (en cultivo celular) estimula la síntesis y



secreción de colágeno y componentes de la matriz extracelular y permite la estabilización del colágeno formado, lo cual colabora con la estratificación de las células y la acumulación de material entre ellas.

El AA aumenta la estratificación celular *in vitro*, pero también incrementa la expresión de proteínas contráctiles como la  $\alpha$ -SMA, la cual está relacionada con la pérdida de transparencia corneal *in vivo* (Jester et al., 1995; Phu y Orwin, 2009). Es así que la deficiencia de AA podría producir más cicatrices corneales que lo normal.

Cuando ocurre una lesión corneal importante como la producida por un láser, se puede perder el equilibrio de óxido-reducción intracelular con exceso de producción de especies reactivas de oxígeno como  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $HO^-$  y ocurre el daño celular. Entre las defensas antioxidantes naturales podemos mencionar a enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y a ciertas vitaminas (Vit. C, E y A) (Ríos, 2007). Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado el rol protector de la vitamina C en la generación de QCE en individuos cuyas córneas han estado expuestas a RUV y a lesiones frecuentes (Suárez MF et al., 2015 a).

En resumen, la deficiencia de AA puede ser responsable de disminución de producción de proteínas corneales, alteración de factores que pueden llevar a la pérdida de transparencia corneal y ocasionar cambios celulares como consecuencia de modificaciones del equilibrio de óxido-reducción.

La observación de los daños producidos por láser argón en córneas y su recuperación en animales con deficiencia de AA, fue uno de nuestros objetivos.

La deficiencia de AA en cobayos provoca signos clínicos a partir de los 15 días de privación (Mody et al., 2005) y es por lo que durante 3 meses sometimos a un grupo de cobayos a una dieta deficiente en AA y a lo largo de ese tiempo comenzamos a ver uno de los signos que indican deficiencia como es la pérdida de peso, pues los animales sufren de anorexia y debilidad y tienen dificultades para comer por lesiones bucales (Durán y Hernández, 2009).

La BM resultó insuficiente para señalar diferencias de cicatrización entre los animales deficientes en AA y animales con dieta normal de AA, puesto que la observación de los leucomas seguía la misma evolución de grado y recuperación para ambos grupos y los leucomas desaparecieron a los 15 días.

No encontramos diferencias, en la recuperación del espesor corneal (medido por OCT) entre animales con ingesta normal de AA, versus animales con dieta deficiente en AA.

La MEC está formada por gran cantidad de componentes. Tal variedad de moléculas se encuentra interconectadas y requieren de MMPs para organizar la MEC en condiciones patológicas. La medición de las MMPs se emplea para identificar los factores que aumentan o disminuyen la capacidad de regeneración sin dejar opacidad corneal (Angosto y Álvarez-Gómez, 2010; Holopainen et al., 2011; Holopainen et al., 2012; Wu et al., 2015).

Las heridas por desbridamiento en el ratón reepitelizan rápidamente, pero también pueden conducir a erosiones recurrentes a través de mecanismos que implican sobrerregulación de la MMP-9 dentro de las células epiteliales corneales (Pal-Ghosh et al., 2011 a). Mientras que el exceso de MMP-9 contribuye a la formación de la erosión, es necesaria para la curación de la herida corneal eficiente, ya que los ratones que carecen de MMP-9 curan mal (Mohan et al., 2002).

Las MMP-2 y MMP-9 participan en la cicatrización de heridas de la córnea, y en la patogénesis de enfermedades inflamatorias de la misma (Garrana et al., 1999). El aumento de la MMP-9 está asociada a la falla en la reepitelización porque favorece la disolución de la membrana basal. Después de 18 hs de una lesión corneal, la MMP-9 aparece en el frente de migración epitelial, le siguen la MMP-10 detrás y la MMP-13 en toda la zona de la herida. Cuando se cierra completamente la herida en 24 hs, se observa sobrerregulación de la MMP-1a, 1b y 13 y aumenta la expresión de la MMP-9. Luego de 24 hs no se encuentran ni la MMP-9, ni MMP-10 ni la MMP-12. Durante el proceso de reepitelización están aumentadas las MMPs y las TIMP. La MMP-9 tiene un papel importante en la modulación de la dinámica celular, pues afecta moléculas de señalización en el microambiente celular y se necesita para remover la matriz provisoria sobre la cual migran las células epiteliales (Kavosova et al., 2003; Sivak y Finia, 2002; Gordon et al., 2011).

Los valores de MMPs hallados en nuestra investigación mostraron para los grupos HAA y LAA, una elevación de MMP-9 a las 18 hs y una posterior disminución a partir de las 48 hs, hasta llegar en 7 días a niveles basales. La MMP-10, en nuestro trabajo, se elevó a las 24 hs, e inmediatamente disminuyó su valor. Resultados similares a los nuestros,

pero estudiando RNA mensajero para MMP-9, fueron reportados hace unos años por el grupo de la Dra. Fini en California (Gordon et al., 2011).

La presencia de AA no modificó la curva de aumento y disminución de estas MMPs, aunque sí hubo alguna diferencia en los valores encontrados, cuando se comparaba la MMP-9 en el mismo momento, observándose que a las 18 hs, el grupo LAA expresó valores más altos que los del grupo HAA.

En nuestro trabajo de investigación, la MO permitió, distinguir el grado de lesión producido por cada láser, con diferentes potencias, logrando establecer que el único láser que no lesionó el endotelio y cuyo daño se observó en epitelio y estroma fue el láser de argón con una configuración de 350 mW con 0,3 s, y un diámetro de 50 $\mu$  de spot. En la comparación de recuperación de córneas lesionadas de animales con dieta normal vs con dieta deficiente en AA, no se pudieron encontrar diferencias en el grado de lesión, ni del tipo de infiltrado ni en la cantidad de células infiltradas. Esto nos puede llevar a la conclusión de que el AA no tiene influencia en la reacción inflamatoria, al menos, no en lo que se puede observar microscópicamente sin ninguna otra técnica de tinción especial o de inmunohistoquímica.

La otra técnica empleada fue la de ME. Los estudios de la córnea con ME datan de muchos años atrás. McTigue et al. (1967), describen características de la córnea humana normal y córneas con distrofia, en la que se puede ver en el estroma superficial, células con material electrodense acumulado en grandes vesículas que se asemejan a las mezclas de mucopolisacáridos ácidos.

Polack en 1976, analizaba el impacto de la ME en el estudio de las córneas patológicas y confirmaba muchos estudios realizados previamente con microscopía óptica. La ME es de gran utilidad en la identificación de los lugares y tipos de cambios patológicos en distrofias y degeneraciones corneales. También incluye una revisión de algunas condiciones inflamatorias de la córnea, así como trastornos metabólicos que afectan a su transparencia.

En nuestro trabajo, se observaron las células epiteliales, membrana basal epitelial, estroma anterior, queratocitos, miofibroblastos, fibras de colágeno y MEC con ME, y se pudieron encontrar diferencias entre las córneas lesionadas del grupo con deficiencia de AA y el grupo con dieta normal en AA.

Por ME, se observaron las córneas de los cobayos del grupo HAA, las cuales inicialmente exhibieron un epitelio muy alterado. Luego de una semana el epitelio corneal en general estaba conservado, mientras que en el estroma se observaban miofibroblastos rodeados de una matriz extracelular bastante desorganizada. Quince días post-tratamiento, el epitelio y el estroma estaban normales.

En el grupo LAA, se observó por ME inicialmente un epitelio dañado. Luego de 7 días el epitelio se observó necrosado y el estroma apareció desorganizado con fibras colágenas entrecruzadas asociadas a queratocitos atípicos, con presencia de grandes vesículas con contenido finamente granular en el citoplasma. A los 15 días post láser, el epitelio se observó bien conservado, el estroma desorganizado y en los queratocitos se hallaron acúmulos de material en su citoplasma.

Todas estas anormalidades en el estroma, luego de la recuperación total del epitelio corneal observadas solamente en el grupo LAA, confirman la importancia del AA en la síntesis y liberación del colágeno.

Es importante remarcar que cuando estudiamos la recuperación de la córnea por BM, OCT y MO no encontramos diferencias entre ambos grupos experimentales. Solamente se observaron anormalidades en la recuperación del estroma corneal utilizando ME en el grupo LAA.

## 6. Conclusiones

Fue posible comparar diferentes tipos de láser y de potencias en disparos sobre la córnea de cobayos sanos. Inmediatamente después del disparo, se pudo observar la lesión en la córnea a simple vista, con tinción de fluoresceína y con BM.

Con los valores de disparo elegidos, en ningún caso se produjo la perforación de la córnea.

El estudio histopatológico demostró que los láseres de CO<sub>2</sub>, diodo y Nd-YAG, fueron muy potentes al provocar la lesión, incluso utilizando energía y tiempo mínimos; en tanto el láser argón fue menos agresivo.

En todos los grupos (distintos láser y potencias de los mismos) estuvieron comprometidos epitelio, estroma y endotelio.

Por MO, se pudo observar:

- En epitelio: los daños más frecuentes fueron condensación, vacuolización y disminución del espesor.
- En estroma: alteración de la disposición de las fibras colágeno y en algunos casos, vacuolas en la matriz extracelular propia.
- En endotelio: pérdida de células en las áreas relacionadas con el impacto y dehiscencia de la capa endotelial.

La observación más importante de esta primera etapa fue que el endotelio corneal solo se mantuvo indemne con el láser argón, a 350 mW 0,3 s de exposición y 50  $\mu$  de spot. De esta manera quedó determinado por BM y MO, cual es el mejor láser y bajo que configuración es posible desarrollar lesiones en epitelio y estroma anterior de córneas de cobayos, que pueden repetirse de manera controlada, sin llegar a lesionar el endotelio.

Con los resultados obtenidos en esta primera etapa se llevó a cabo la segunda etapa, continuando la experimentación solo con láser argón.

Cada uno de los estudios realizados (BM, OCT Visante, MO, ME y WB) fue muy útil porque nos permitió avanzar en el conocimiento del rol del AA en la curación de la córnea luego de haber sido lesionada con láser argón.

La BM permitió observar inicialmente las lesiones, luego los leucomas, y posteriormente la recuperación y la desaparición de los leucomas en la córnea.

Con la utilización de OCT Visante, fue factible cuantificar los espesores corneales normales y los dañados por el láser a diferentes tiempos, para poder precisar en qué momento la recuperación fue total. El resultado obtenido con este equipo, si bien no logró diferenciar los grupos HAA y LAA, significa un aporte original al estudio de la córnea de cobayos.

La MO, en esta instancia, fue utilizada para estudiar la naturaleza de las células involucradas en la inflamación post láser, mientras que la ME aportó datos sobre cambios ultraestructurales en el epitelio y estroma superior de córneas lesionadas con el láser.

La realización de WB para MMP-9 y MMP-10 nos permitió afirmar que ambas MMPs participaron activamente, a diferentes tiempos, en el proceso de curación de las lesiones corneales.

La conclusión, obtenida luego de comparar todos estos estudios entre ambos grupos experimentales (HAA y LAA), fue que un contenido deficiente de AA en la dieta no influyó en los hallazgos observados con BM, OCT Visante, quimiotaxis ni extravasación de ciertos leucocitos. Tampoco hubo grandes cambios en la cinética de producción de MMP-9 y MMP-10.

Si bien los hallazgos ultraestructurales (ME) que ocurrieron durante el proceso de recuperación corneal no permitieron observar diferencias en el daño y posterior recuperación del epitelio, fueron muy importantes para descubrir cambios en el estroma corneal cuando se compararon córneas provenientes de animales con dieta normal de ácido ascórbico (HAA) vs aquellas córneas de animales sometidos a deficiencia parcial de AA (LAA). Estas diferencias (ordenamiento de las fibras de colágeno y características morfológicas de los queratocitos) comenzaron a observarse hacia el día 7° post tratamiento con láser y se mantuvieron hasta el final del estudio. Sería entonces esta técnica la única lo suficientemente sensible para detectar cambios metabólicos en la síntesis de colágeno y en la regeneración de la córnea después de una lesión superficial.

## 7. Bibliografía

- Amescua G, Collings F, Sidani A, Bonfield TL, Rodriguez JP, Galor A, et al. Effect of CXCL-1/KC production in high risk vascularized corneal allografts on T cell recruitment and graft rejection. *Transplantation*. 2008; 85:615-625.
- Anderson RA. Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977; 16:161-166.
- Andre AM, Torricelli SW. Cellular and extracellular matrix modulation of corneal stromal opacity. *Exp Eye Res*. 2014; 129:151-160.
- Angosto MC y Álvarez-Gómez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm*. 2010; 76:59-84.
- Arffa RC. Grayson. *Enfermedades de la cornea*. Cuarta edición. Harcourt Brace: Mosby. 1999; pp 6-18.
- Azar DT, Pluznik D, Jain S, Khoury JM. Gelatinase B y A expression after láser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol*. 1998; 116:1206–1208.
- 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.
- Beals M, Furderburgh J, Jester J, Hassell J. Proteoglycan synthesis by bovine keratocytes and corneal fibroblasts: maintenance of keratocyte phenotype in ulture. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40:1658-1663.
- Bilgihan A, Hasanreisoglu B, Turkoskan N. Corneal aldehyde dehydrogenase and glutathione S-transferase activity after excimer laser keratectomy in guinea pigs. *Br J Ophthalmol*. 1998; 82:300-302.
- Bilgihan A, Bilgihan K, Yis O, Sezer C, Akyol G. Effects of topical vitamin E on corneal superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and polimorphonuclear leucocyte infiltration after photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmol Scand*. 2003; 81:177-180.

- Blanco A. Vitaminas. En: Blanco A (editor). Química Biológica. 8° ed. Buenos Aires: El Ateneo 2006; pp 447-479.
- Blanco-Mezquita JT, Hutcheon AE, Stepp MA, Zieske JD. Rol the trombospondin-1 in repair of penetrating corneal wounds. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54:6262-6268.
- Bohnsack RN, Warejcka DJ, Wang L, Gillespie SR, Berstein AM, Twining SS, et al. Expression of insulin-like growth factor 2 receptor in corneal keratocytes during differentiation and response to wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55:697-708.
- Boote C, Du Y, Morgan S, Harris J, Kamma-Lorger CS, Hayes S. Quantitative assessment of ultrastructure and lightscatter in mouse corneal debridement wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53:786-795.
- Boyd S, Argawal A, Boyd S. Cirugía ocular con láser. Ed. Highlights of Ophthalmology, 2005.
- Bron AJ. The architecture of the corneal stroma. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85:379-383.
- Cafaro T, Ortiz S, Maldonado C, Espósito FE, Croxatto JO, Berra A, et al. The cornea of guinea pig: structural and functional studies. *Vet Ophthalmol.* 2009; 12:234-241.
- Cerviño A, Montés-Micó R, Ferrer T. Tomografía Óptica de Coherencia (OCT) de segmento anterior. Sociedad Española de oftalmología. Disponible en <http://www.ofthalmoseoformacion.com/wp-ofthalmoseo/documentacion/p2008/Cap023.pdf>
- Chandonnet AB. Preliminary study of CO<sub>2</sub> laser annular thermokeratoplasty. *Lasers Surg Med.* 1992; 12:266-273.
- Chew PT, Wong JS, Chee CK, Tock EP. Corneal transmissibility of diode versus argón lasers and their photothermal effects on the cornea and iris. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2000; 28:53-57.
- Chojkier M, Spanheimer R, Peterkofsky B. Specifically decreased collagen biosynthesis in scurvy dissociated from an effect on proline hydroxylation and



- correlated with body weight loss. In vitro studies in guinea pig calvarial bones. *J Clin Invest.* 1983; 72:826-835.
- Conrad GW. Collagen and mucopolysaccharide biosynthesis in mass cultures and clones of chick corneal fibroblasts in vitro. *Dev Biol.* 1970; 21:611-635.
  - Di Mattio J. Ascorbic acid entry into cornea of rat and guinea pig. *Cornea.* 1992; 11:53-65.
  - Dua H, Faraj L, Said D, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-descemet's layer (Dua's Layer) *Ophthalmology.* 2013; 120:1778-1785.
  - Dua HS, Gomez JAP, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol.* 1994; 78:401-408.
  - Dupps WJ Jr, Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Exp Eye Res.* 2006; 83:709-720.
  - Durán R, Hernández A. Deficiencia de la vitamina C en Cobayos. *Bioterio-INIA-CENIAP.* Diciembre 2009. ISSN:1856-9951.
  - Fini ME, Parks WC, Rinehart WB, Girard MT, Matsubara M, Cook JR. Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. *Am J Pathol.* 1996; 149:1287-1302.
  - Finson KW, McLean S, Digluglielmo GM, Phillip A. Dynamics of transforming grow factor beta signaling in wound healing and scarring. *Adv Wound Care.* 2013; 2:195-214.
  - Forsius H. Climatic changes in the eyes of eskimos, lapps and cheremisses. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1972; 50:532-538.
  - Friedenwald JS, Buschke W. Some factors concerned in the mitotic and wound-healing activities of the corneal epithelium. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1944; 42:371-383.
  - Gan L, Hamberg-Nyström H, Fagerholm P, Van Setten G. Cellular proliferation and leukocyte infiltration in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy. *Acta Ophtalmol Scand.* 2001; 79:488-492.

- Garrana RMR, Zieske JD, Assouline M, Gipson IK. Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40:1266-1270.
- Gelatt KN; Ophthalmic embryology and anatomy. En *Veterinary Ophthalmology*, 2nd ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1991; pp 3-124.
- Gilmour MA. Lasers in Ophthalmology. *Vet Clin North Am Small Pract.* 2002; 32:649-672.
- Gilmour MA. Laser applications for corneal disease. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2003; 18:199-202.
- Gipson IK, Kiorpes TC. Epithelial sheet movement: protein and glycoprotein synthesis. *Dev. Biol.* 1982; 92:259-262.
- Gipson IK, Kiorpes TC, Brennan SJ. Epithelial sheet movement: effects of tunicamycin on migration and glycoprotein synthesis. *Dev. Biol.* 1984; 101:212-220.
- Gipson IK. Anatomy of the conjunctiva, cornea and limbus. En *The Cornea* (Ed G Smolin, RA Thoft) 3rd ed. Little Brown, Boston. 1994; pp 3-24.
- Gordon GM, Austin JS, Sklar AL, Feuer WJ, LaGier AJ, Fini ME. Comprehensive gene expression profiling and functional analysis of matrix metalloproteinases and TIMPs, and identification of ADAM-10 gene expression, in a corneal model of epithelial resurfacing. *J Cell Physiol.* 2011; 226:1461-1470.
- Gosling AA, Labelle AL, Breaux CB. Management of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) in dogs with diamond burr debridement and placement of a bandage contact lens. *Veterinary Ophthalmol.* 2013; 16:83-88.
- Gould D. Feline herpesvirus-1: ocular manifestations, diagnosis and treatment options. *J Feline Med Surg.* 2011; 13:333-346.
- Griffith G, Kasus-Jacobi A, Lerner M, Pereira A. Corneal wound healing, a new identified function of CAP37, is mediated by protein kinase C delta (PKC $\delta$ ). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55:4886-4895.

- Hart WM; Adler, Fisiología del Ojo, 9na. ed., Mosby Doyma, Madrid, 1994; pp 29-71.
- Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res.* 2010; 91:326-335.
- Hayes S, Cafaro T, Boguslawska P, Kamma-Lorger CS, Boote C, Harris J, et al. The effect of vitamin C deficiency and chronic ultraviolet-B exposure on corneal ultrastructure a preliminary investigation. *Mol Vis.* 2011; 17:3107-3115.
- Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, Wilson SE. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39:276-283.
- Hoffman A, Ownby C, Lehenbauer TW, Samuelson D, Gilmour M, Bartels K. Light and electron microscopic evaluation of canine corneal endothelium following CO2 photokeratotomy. *Veterinary Ophthalmology.* 2009; 12:28-34.
- Holopainen JM, Robciuc A, Cafaro TA, Suárez MF, Konttinen YT, Alkatan HM, et al. Pro inflammatory cytokines and gelatinases in climatic droplet keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53:3527-3535.
- Holopainen JM, Serra HM, Sánchez MC, Sorsa T, Zalentein WN, Barcelona PF, et al. Altered expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as possible contributors to corneal droplet formation in climatic droplet keratopathy. *Acta Ophthalmol.* 2011; 89:569-574.
- Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 2000; 19:113-129.
- Jester J, Petroll WM, Barry PA, Dwight Cavanagh H. Expression of  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SM) actin during corneal stromal woundh. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36:809-819.
- Joe A, Yeung S. Concise review: Identifying limbal stem cells: classical concepts and new challenges. *Stem Cells Transl Med.* 2014; 3:318-322.
- Johnson GJ, Overall M. Histology of Spheroidal degeneration of the cornea in Labrador. *Br J Ophthalmol.* 1978; 62:53-61.

- Kabosova A, Kramerov AA, Aoki AM, Murphy G, Zieske JD, Ljubimov AV. Human diabetic corneas preserve wound healing, basement membrane, integrin and MMP-10 differences from normal corneas in organ culture. *Exp Eye Res.* 2003; 77:211-217.
- Karamichos D, Guo X, Hutcheon A, Zieske J. Human corneal fibrosis: an in vitro mode. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:1382-1388.
- Kato T, Chang JH, Azar DT. Expression of type XVIII collagen during wounds healing of corneal incisions and keratectomy wounds. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:78-85.
- Keates RH, Pedrotti LS, Weichel H. Carbon dioxide laser beam control for corneal surgery. *Ophthalmic Surg.* 1981; 12:117-122.
- Krauss JM, Puliafito CA, Steinert RF. Laser interactions with the cornea. *Surv Ophthalmol.* 1986; 31:37-53.
- Kremer I, Even A, Sandbank J, Giler S, Yassur Y. Effect of green argón (514 nm) laser exposure on rose bengal-stained guinea pig cornea. *Isr J Med Sci.* 1996; 32:1243-1248.
- Kubilus JK, Linsenmayer TF. Developmental corneal innervation: interactions between nerves and specialized apical corneal epithelial cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010 a; 51:782-789.
- Kubilus JK, Linsenmayer TF. Developmental Guidance of Embryonic Corneal Innervation: Roles of Semaphorin 3A and Slit2. *Dev Biol.* 2010 b; 344:172-184.
- Lara-Medina FJ, Ispa-Callén MC, Nuñez A, López-Romero S, López-Monéjar E, Zarco JM, et al. Exploración del segmento anterior mediante tomografía óptica de coherencia. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2006; 81:647-652.
- Li Z, Burns AR, Han L, Rumbaut RE, Smith CW. IL-17 and VEGF are necessary for efficient corneal nerve regeneration. *Am J Pathol.* 2011 a; 178:1106-1116.
- Li Z, Burns AR, Miller SB, Smith CW. CCL20, gammadelta T cells, and IL-22 in corneal epithelial healing. *FASEB J.* 2011 b; 25:2659-2668.

- Li Z, Burns AR, Smith CW. Two waves of neutrophil emigration in response to corneal epithelial abrasion: distinct adhesion molecule requirements. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:1947-1955.
- Ma A, Zhao B, Boulton M, Albon J. A role for notch signaling in corneal wound healing. *Wound repair Regen.* 2011; 19:98-106.
- 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.
- Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol.* 1957; 136:263-286.
- McCally RL, Bargeron CB, Green WR, Farrel RA. Stromal damage in rabbit corneas exposed to CO<sub>2</sub> laser irradiation. *Experimental Eye Research.* 1983; 37:543-550.
- McMenemy PG, Steele C, McGhee CNJ. Cornea anatomy, physiology and healing. En *Excimer lasers in Ophthalmology*. Editor Charles McGhee. Martin Dunitz, Londres. 1997; pp 41-63.
- McTigue JW. The human cornea: A light and electron microscopic study of the normal cornea and its alterations in various dystrophies. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1967; 65:591–660.
- Meek KM, Leonard DW, Connon CJ, Dennis S, Khan S. Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. *Eye (Lond).* 2003; 8:927-936.
- Menegay M, Lee D, Tabbara K, Cafaro T, Urrets-Zavalía J, Serra H et al. Proteomic Analysis of Climatic Keratopathy Droplets, *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49:2829-2837.
- Mody VC Jr, Kakar M, Elfving A, Soderberg PG, Löfgren S. Ascorbate in the guinea pig lens: dependence on drinking water supplementation. *Acta Ophthalmol Scand.* 2005; 83:228-233.
- Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WV, Mc Cab F, Russo LA, et al. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem.* 2002; 277:2065-2072.

- Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, Hong J, Lee J, Mohan RR, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res.* 2003; 76:71-87.
- Morcillo Laiz R, Arnalich Montiel F. Cómo realizar tomografía de coherencia óptica (OCT) de segmento anterior con dispositivos convencionales. *Boletín de la Soc. Oftalmo. de Madrid* N.º 50, 2010.
- Morgan RV, Abrams KL. Topical administration of cyclosporine for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1991; 199:1043-1046.
- Müller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85:437-443.
- Müller LJ, Pels E, Vrensen GF. Ultrastructural organization in human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37:476-488.
- Murakami J, Nishida T, Otori T. Coordinated appearance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. *J Lab Clin Med.* 1992; 120:86-93.
- Murphy CJ, Marfurt CF, McDermott A, Bentley E, Abrams GA, Reid TW, Campbell S. Spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCED) in dogs: clinical features, innervation, and effect of topical SP, with or without IGF-1. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:2252-2261.
- Nagy LJ, MacRae S, Yoon G, Wyble M, Wang J, Cox I, Huxlin KR. Photorefractive keratectomy in the cat eye: biological and optical outcomes. *J Cataract Refract Surg.* 2007; 33:1051-1064.
- Netto MV, Mohan RR, Ambrosio Jr R, Hutcheon AE, Zieske JD, Wilson SE. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea.* 2005; 24:509-522.
- Netto MV, Mohan RR, Sinha S, Sharma A, Dupps W, Wilson SE. Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK. *Exp Eye Res.* 2006; 82:788-797.

- Notara M, Schrader S, Daniels JT. The porcine limbal epithelial stem cell niche as a new model for the study of transplanted tissue-engineered human limbal epithelial cells. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17:741-750.
- Ostrin LA, Garcia MB, Choh V, Wildsoet CF. Pharmacologically Stimulated Pupil and Accommodative Changes in Guinea Pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55:5456-5465.
- Oyamada I, Bird TA, Peterkofsky B. Decreased extracellular matrix production in scurvy involves a humoral factor other than ascorbate. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 152:1490-1496.
- Oyamada I, Palka J, Schalk EM, Takeda K, Peterkofsky B. Scorbutic and fasted guinea pig sera contain an insulin-like growth factor I-reversible inhibitor of proteoglycan and collagen synthesis in chick embryo chondrocytes and adult human skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*. 1990; 276:85-93.
- Pacifici M, Iozzo RV. Remodeling of the rough endoplasmic reticulum during stimulation of procollagen secretion by ascorbic acid in cultured chondrocytes. A biochemical and morphological study. *J Biol Chem*. 1988; 263:2483-2492.
- Pal-Ghosh S, Blanco T, Tadvalkar G, Pajooohesh-Ganj A, Parthasarathy A, Zieske JD, Stepp MA. MMP-9 cleavage of the beta4 integrin ectodomain leads to recurrent epithelial erosions in mice. *J Cell Sci*. 2011 a; 124:2666-2675.
- Pal-Ghosh S, Pajooohesh-Ganji A, Tadvalkar G, Stepp MA. Removal of the basement membrane enhances corneal wound healing. *Exp Eye Res*. 2011b; 93:927-936.
- Pal-Gosh S, Pajooohesh-Ganji A, Menko A, Oh H, Tadvalkar G, Saban D, Stepp MA. Cytokine deposition alters leukocyte morphology and initial recruitment of monocytes and  $\gamma\delta$ T cells after corneal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55:2757-2765.
- Pallikaris IG, Papatzanaki ME, Stathi EZ, Frenschock O, Georgiadis A. Laser in situ keratomileusis. *Lasers Surg Med*. 1990; 10:463-468.
- Pearse E. *Histochemistry. Theoretical and Applied*, 2nd edn. Great Britain, London, J&A Churchill; 1960.

- Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54:1135-1140.
- Petrescu MS, Larry CL, Bowden RA, Williams GW, Gagen D, Li Z, et al. Neutrophil interactions with keratocytes during corneal epithelial wound healing: a rol for CD18 integrins. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48:5023-5029.
- Phu D, Orwin EJ. Characterizing the effects of aligned collagen fibers and ascorbic acid derivatives on behavior of rabbit corneal fibroblasts. 31st Annual International conference of the IEEE EMBS, Minneapolis, Minestota, USA, September 2-6, 2009.
- Pinnell SR. Abnormal collagens in connective tissue diseases. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1975; 11:23-30.
- Polack FM. Contributions of electron microscopy to the study of corneal pathology, *Surv Ophthalmol.* 1976; 20:375-414.
- Ríos, M. El estrés oxidativo y el destino celular. *Química Viva.* 2007; 2:17-28. Disponible en; [http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/estres%20 oxidativo.htm](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/estres%20oxidativo.htm).
- Rózsa AJ, Beuerman RW. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain.* 1982; 14:105-120.
- Ruberti JW, Zieske JD. Prelude to corneal tissue engineering e gaining control of collagen organization. *Prog Retin Eye Res.* 2008; 27:549-577.
- Saika S, Sumioka T, Okada Y, Kitano A, Miyamoto T, Shirari K, et al. Wakayama Symposium: Modulation of wound healing response in the corneal stroma by osteopontin and tenascin-C. *Ocular Surf.* 2013; 11:12-15.
- Schwarz RI. Procollagen secretion meets the minimum requirements for the rate-controlling step in the ascorbate induction of procollagen synthesis. *J Biol Chem.* 1985; 260:3045-3049.
- Scott JE. Proteoglycan collagen interaction and corneal ultrastructure. *Biochem Soc Trans.* 1991; 19:887-881.



- Segura B, Rupérez Calvo MJ. NTP 654: Láseres: nueva clasificación del riesgo (UNE EN 60825-1 /A2:2002), Centro Nacional de Nuevas Tecnologías, 2002. Disponible en [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/ Documentacion /FichasTecnicas/NTP/Ficheros/601a700/ntp\\_654.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/ Documentacion /FichasTecnicas/NTP/Ficheros/601a700/ntp_654.pdf)).
- Serra HM, Cafaro TA. Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2007; 41:525-32.
- Serra HM, Holopainen JM, Beuerman R, Kaarniranta K, Suárez MF, Urrets-Zavalía J A. Climatic Droplet Keratopathy: An Old Disease In New Clothes. *Acta Ophthalmol*. 2015; 93:496-504.
- Serra HM, Suárez MF, Esposito E, Urrets-Zavalía JA. Vitamina C functions in the cornea: ultra-structural features in ascorbate deficiency. En *Handbook of Nutrition, Diet and the Eye*. Edited by Victor R. Preedy. King's College London, Elsevier Saunders, St. Louis Mo, USA, 2014. Chapter 31, pp 311-320. ISBN 978-0-12-401717-7.
- Shaheen BS, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol*. 2014; 59:263-285.
- Shetty R, Ghosh A, Lim RR, Subramani M, Mihir K, Reshma AR, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56:738-750.
- Sivak JM, Finia ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res*. 2002; 21:1-14.
- Spiess B. The use of laser in veterinary ophthalmology: Recommendations based on literature. *Photon Lasers Med*. 2012; 1:95-102.
- Spurr-Michaud SJ, Barza M, Gipson IK. An organ culture system for study of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to normal and wounded corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988; 29:379-386.
- Sta Iglesia DD, Stepp MA. Disruption of the basement membrane after corneal debridement. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41:1045-1053.

- Stepp MA, Spurr-Michaud S, Gipson IK. Integrins in the wounded and unwounded stratified squamous epithelium of the cornea. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34:1829-1844.
- Stepp MA, Zieske JD, Trinkaus-Randall V, Kyne BM, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Pajooohesh-Ganji A. Wounding the cornea to learn how it heals. *Exp Eye Res.* 2014; 121:178-193.
- Stramer BM, Zieske JD, Jung JC, Austin JS, Fini ME. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:4237-4246.
- Streilein D, Streilein JW. Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37:2485-2494.
- Suárez MF, Correa L, Crim N, Espósito E, Monti R, Urrets-Zavalía JA, et al. Climatic Droplet Keratopathy in Argentina: Involvement of Environmental Agents in Its Genesis Which Would Open the Prospect for New Therapeutic Interventions. Hindawi Publishing Corporation. *BioMed Research International Article.* 2015 a; ID 527835.
- Suárez MF, Espósito E, Correa LJ, Gonzalez Castellanos ME, Insfrán C, et al. Histological and Ultra Structural Studies of Pre Descemet Cornea Zone in a Non H. Sapiens Species: Rodent *Cavia Porcellus*. XXXI Congreso Panamericano de Oftalmología, agosto 4-8, 2015 b. Bogotá, Colombia.
- Suárez MF, Suárez AC, Maldonado C, Monti Rd, Crim Nd, Espósito Ed, et al. Fotoqueratitis inducida con láser de argón en cobayos deficientes en ascorbato: modificaciones ultraestructurales de córnea. X Congreso Nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) 15 de noviembre de 2013, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Suárez AC, Suárez MF, Crim N, Monti R, Urrets-Zavalía, Serra HM. Effects produced by different types of laser in cornea of guinea pigs: identification of a laser capable of producing superficial lesions without leaving scars. *Arch Soc Oftalmol.* 2015; 90:458-466.

- Svoboda KK, Nishimura I, Sugrue SP, Ninomiya Y, Olsen BR. Embryonic chicken cornea and cartilage synthesize type IX collagen molecules with different amino-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1988; 85:7496-7500.
- Taylor HR, West S, Muñoz B, Rosenthal FS, Bressler SB. The long term effects of visible light on the eye, *Arch Ophthalmol.* 1992; 110:99-104.
- Taylor S, Posch C. The design of a quantitative western blot experiment. *BioMed Research International.* 2014; ID 361590, 8 p.
- Terai K, Call MK, Liu H, Saika S, Liu CY, Hayash Y. Crosstalk between TGF-beta and MAPK signaling during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52:8208–8215.
- Trelstald RL. The developmental biology of vertebrate collagens. *J. Histochem Cytochem Off. J. Histochem. Soc.* 1973; 21:521-528.
- Trinkaus-Randall V, Gipson IK. Role of calcium and calmodulin in hemidesmosome formation in vitro. *J Cell Biol.* 1984; 98:1565-1571.
- Urrets-Zavalía JA, Croxatto JO, Holopainen JM, Cafaro TA, Esposito F, Neira W, Serra HM. In vivo confocal microscopy study of climatic droplet keratopathy. *Eye (Lond).* 2012; 26:1021-1023.
- 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.
- Vieira E, Watzl V, Azevedo M, Souza WF, Dos Santos RX, Ruiz SA. Utilização do laser de argônio na remoção de sutura corneana. *Arq Bras Oftalmol.* 2004; 67:901-904.
- Waring GO 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982; 89:531-590.
- Widder RA, Severin M, Kirchhof B, Krieglstein GK. Corneal injury after carbon dioxide laser skin resurfacing. *Am J Ophthalmol.* 1998; 125:392–394.

- Wu K, Kojima M, Shui YB, Sasaki H, Sasaki K. Ultraviolet B-induced corneal and lens damage in guinea pigs on low-ascorbic acid diet. *Ophthalmic Research*. 2004; 36:277–283.
- Wu ZQ, Zhang ZL, Nie SW, Yuan J, Yang YN. Activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cultured rabbit corneal epithelium cells stimulated by tumor necrosis factor alpha. *Genet Mol Res*. 2015; 14:6360-6368.
- Yamada N, Yanai R, Nakamura M, Inui M, Nishida T. Role of the C domain of IGFs in synergistic promotion, with a substance P-derived peptide, of rabbit corneal epithelial wound healing. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45:1125-1131.
- Yin J, Yu FS. LL-37 via EGFR transactivation to promote high glucose attenuated epithelial wound healing in organ-cultured corneas. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51:1891-1897.
- Zhou X, Xie J, Shen M, Wang J, Jiang L, Qu J, Lu F. Biometric measurement of the mouse eye using optical coherence tomography with focal plane advancement. *Vision Research*. 2008; 48:1137-1143.
- Zieske JD, Gipson IK. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1986; 27:1-7.

## 8. Anexo: Publicaciones

### Publicación en Revista Internacional

1. Effects produced by different types of laser in cornea of guinea pigs: identification of a laser capable of producing superficial lesions without leaving scars. Suárez AC, Suárez MF, Crim N, Monti R, Urrets-Zavalía JA, Serra HM. Arch Soc Esp Oftalmol. 2015, 90:458-466.

### Comunicaciones Científicas en Congresos

1. Alteraciones en epitelio y estroma superficial de córnea de cobayos inducidas por Láser Argón. Autores María F. Suárez, Alicia Suárez, Cristina Maldonado, Rodolfo Monti, Nicolás Crim, Julio Urrets-Zavalía y Horacio Serra. Segunda Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos. Ciudad Universitaria, 22 al 25 de octubre de 2013, Córdoba, Argentina. UNC 2013.
2. Fotoqueratitis inducida por Láser Argón en cobayos deficientes en ascorbato: Modificaciones ultra estructurales de córnea. Autores: Alicia C. Suárez, María F. Suárez, Cristina Maldonado, Rodolfo Monti, Nicolás Crim, Evangelina Espósito, Julio A. Urrets-Zavalía, Horacio M. Serra. Reunión Anual AIVO. 15 de noviembre de 2013. Córdoba.