



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

*Departamento de Biología Celular, Histología y
Farmacología*

*Grupo de Investigación Reconocido de Técnicas Ópticas
para el Diagnóstico*

***EFFECTOS DE DIFERENTES FACTORES DE
CRECIMIENTO RECOMBINANTES SOBRE UN
MODELO “IN VITRO” DE CICATRIZACIÓN DEL
ESTROMA CORNEAL HUMANO.***

*Presentada por Patricia Gallego Muñoz para optar al grado
de
Doctor por la Universidad de Valladolid,
Valladolid, septiembre de 2015.*

*Dirigida por
Dra. M. Carmen Martínez García*

Elige un trabajo que te guste y no tendrás que trabajar ni un solo día de tu vida

(Confucio)



Agradecimientos

Agradecimientos

Me gustaría que estas palabras sirviesen para expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado directa o indirectamente en la realización de este trabajo y sin las cuales no lo hubiese finalizado.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Carmen Martínez García, mi directora de Tesis, su confianza en mí desde el primer momento. Sin tu gran apoyo, disponibilidad y paciencia esto no había sido posible, gracias por haberme dejado participar en tus proyectos, en tus clases y por transmitirme todos los conocimientos que ahora tengo sobre la cicatrización corneal. Gracias también por todas las oportunidades que me has dado, y sobre todo por hacer que me sintiera como una compañera más cada día en el departamento contando conmigo para todo. No tengo palabras suficientes para agradecerte todo lo que has hecho por mí.

Al Dr. Jesús Merayo-Lloves, agradecerte que desde el primer día contases conmigo para llevar a cabo el PROFIT, y a partir de ahí agradecerte toda tu disposición para todo lo que he necesitado. Gracias por tu colaboración y mediación para la obtención de las muestras sin las cuales este trabajo no se podría haber realizado.

Al Dr. Manuel J. Gayoso, Director del Departamento de Biología celular, Histología y Farmacología, por su cercanía, su apoyo y por facilitarme todo lo que he necesitado en el departamento.

A mis compañeros del Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología de la Universidad de Valladolid, Luis, Tere, Giselle...de todos y cada uno de vosotros he aprendido siempre algo. Una mención especial

A Rober, por ser el mejor compañero y amigo que alguien puede tener dentro del laboratorio, y por supuesto fuera de él. Gracias por todos los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos, siempre has estado ahí y nunca lo olvidaré. Gracias por hacer que cada día en el laboratorio fuera especial y hacerme reír incluso cuando no tenía ganas.

A la Dra. Ibares (Luci), eres una gran compañera y amiga, gracias por todos esos ratos que hemos pasado juntas, buenos y malos lo sé, pero me quedo con los buenos.

A Pablo, un gran amigo que tuve la suerte de conocer en los primeros momentos de mi llegada al departamento, y con el que tengo la suerte de seguir coincidiendo en muchas ocasiones, aunque no todas las que me gustaría pero siempre es un placer estar contigo aunque sea un ratín.

A Roge, por estar siempre dispuesto a echarme una mano, dos o las que haga falta y sobre todo por su paciencia, en especial con mis manías, que no son pocas. Eres un gran compañero y te agradezco de todo corazón toda tu colaboración en esta etapa de mi vida.

Al Dr. Alí Al Majdalawi, por su compañía, sus conversaciones, sus chocolatinas y flores en matraces que conseguían siempre alegrarme el día.

Agradecimientos

Al Dr. Javier Agudo por transmitirme su amor hacia la enseñanza.

También me gustaría agradecer a todos los miembros de otras instituciones que han colaborado directa o indirectamente en algunos de los experimentos de la presente tesis:

Al Dr. J.A. Garrote, quien me enseñó a diseñar primers, elegir sondas y hacer RT-PCR, gracias sobre todo por tu inmensa paciencia y por tu gran disponibilidad siempre que te necesito.

Agradecer también a los miembros de la Unidad de Investigación Clínica en Infección e Inmunidad del Hospital Clínico de Valladolid, en especial al Dr. Jesús Bermejo por dejarme utilizar sus laboratorios y a Alicia y a Lucía por su disponibilidad en todo momento y su amabilidad.

Al grupo de la Dra. María L. Nieto, del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Consejo Superior de Investigaciones científicas-Universidad de Valladolid: Rubén, Claudia, Bea, Marita y en especial a Mabel por enseñarme a hacer Western blots y hacerme sentir como si estuviera en mi laboratorio.

A la Dra. Sagrario Callejo, del Departamento de Anatomía de la Universidad de Valladolid, por su ayuda con las fotografías del microscopio confocal, siempre dispuesta a ayudarme con una sonrisa, lo cual se agradece un montón.

Al Dr. Eduardo Arranz, del Departamento de Pediatría de la Universidad de Valladolid, por permitirme el uso de su laboratorio cuando he tenido problemas con mis cultivos, que no han sido pocos. A Enrique, Bea, Sara y en especial a Celia por estar siempre dispuesta a ayudarme cuando la he necesitado.

Al Dr. Agustín Mayo y a la Dra. María Cruz Valsero, del Departamento de Estadística de la Universidad de Valladolid, por su ayuda con el análisis estadístico de todos los resultados de la tesis, ha sido un gran trabajo para el cual siempre habéis estado dispuestos y os lo agradezco de corazón.

Al Dr. Ignacio Alcalde (Nachete), de la Fundación de Investigación Oftalmológica Fernández-Vega de Oviedo, por encargarse del envío de las muestras y sobre todo por el tiempo que tuve la suerte de compartir con él cuando llegué a Valladolid.

Al Dr. Fernández Bueno (Iván), eres un colega genial, gracias por todos los buenos ratos que hemos pasado juntos en todos estos años y espero que sean muchos más.

A Eri, una de mis mejores amigas, gracias por tus cafés, pinchos de tortilla, helados, cañas y copas...pero sobre todo por estar ahí durante tantos años, siendo mi apoyo y muchas veces mi paño de lágrimas.

A mis padres, gracias por no ponerme nada fácil en la vida, así he aprendido que con esfuerzo trabajo y constancia se puede conseguir lo que uno quiere y además la recompensa de este modo es mayor.

Agradecimientos

A mis abuelos, Carmen y Pipe, os debo todo lo que soy, simplemente gracias por estar ahí siempre.

A mi hermana y mejor amiga Sara, que sin comprender cómo me podía dedicar a esto, me ha apoyado siempre y ha sabido estar a mi lado cuando más la he necesitado.

A mis hermanas pequeñas, María e Irene, gracias por ser como sois.

A mi marido David, porque sin enterarse de mucho de lo que hago, siempre me ha apoyado, ha sabido comprender mis ausencias y el que tuviese que trabajar en horarios o días en los que los demás no lo tenían que hacer, sé que no ha sido fácil y te lo agradezco con todo mi corazón. Gracias por haber estado todos estos años a mi lado de manera incondicional.

Gracias finalmente a mi hijo Óliver, esa personita que sin darse cuenta ha hecho que toda esta aventura tenga sentido. Gracias por todas y cada una de tus sonrisas, esas que llegaron en el momento que más las necesitaba.

A todos, muchísimas gracias de todo corazón



Índice

ACRÓNIMOS	XIX
INTRODUCCIÓN	3
1. Anatomía e Histología de la córnea	3
1.1. El Epitelio corneal	5
1.2. La membrana o capa de Bowman	8
1.3. El estroma	9
1.3.1. Las células del estroma corneal.	10
1.3.1.1. Queratocitos.....	10
1.3.1.2. Células madre del estroma corneal.....	11
1.3.1.3. Células presentadoras de antígenos.	12
1.3.2. La matriz extracelular.....	13
1.3.2.1. El colágeno.	13
1.3.2.2. Los proteoglicanos (PG).....	15
1.3.2.2.1. El queratocano.	16
1.3.2.2.2. El perlecano.....	16
1.3.2.2.3. El sindecano 4.....	16
1.3.3. Moléculas de interacción célula-MEC: las integrinas.....	17
1.4. La membrana de Descemet	17
1.5. El endotelio	18
2. Inervación corneal	19
3. Desarrollo embrionario corneal	19
4. Cicatrización corneal	21
4.1. Citoquinas	21
4.1.1. El factor de crecimiento transformante β (TGF β).	23
4.1.2. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).....	24
4.1.3. El factor de crecimiento fibroblástico (FGF).....	25
4.2. Etapas del proceso de cicatrización corneal	27
5. Modelos de cicatrización corneal	36
5.1. Modelos “in vivo”	38
5.1.1. Heridas con mantenimiento de la membrana basal.....	38
5.1.2. Heridas realizadas con queratectomía manual superficial (MSK) y queratectomía fotorrefractiva (PRK).....	38
5.1.3. Heridas incisionales.....	39

Índice

5.1.4. Heridas causadas por agentes químicos.	39
5.2. Modelos “ex vivo”: cultivo de órganos.	40
5.3. Modelos “in vitro”: cultivos celulares.	41
6. Justificación.....	42
HIPÓTESIS.....	47
OBJETIVOS.....	51
MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
1. Obtención y cultivo de fibroblastos humanos del estroma corneal (HCF).....	55
2. Realización de las heridas.....	56
3. Elección de la concentración óptima de cada factor de crecimiento.....	58
4. Suplementación del medio de cultivo con las concentraciones óptimas de los factores de crecimiento.....	59
5. Determinación de los niveles de factores de crecimiento secretados.....	59
6. Cambios morfológicos.....	60
7. Actividad metabólica.....	62
8. Proliferación celular.....	63
9. Cierre de la herida y proliferación celular en diferentes zonas del cultivo.....	63
9.1. Recuento de células BrdU positivas.....	63
9.2. Medición de la anchura de las heridas durante el cierre.....	66
10. Detección inmunocitoquímica de αSMA.....	66
11. Cuantificación de la expresión del mRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).....	68
11.1. Extracción de RNA.....	68
11.2. Formación de cDNA o Retrotranscripción.....	70
11.3. PCR en tiempo real.....	71
12. Cuantificación de la abundancia de proteínas mediante Western-blot.....	74
12.1. Extracción de proteínas totales a partir de los cultivos celulares.....	75
12.2. Medida de la concentración de proteínas.....	76
12.3. Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida (SDS-PAGE).....	77
12.4. Electrotransferencia.....	78
12.5. Inmunoblotting.....	79
12.6. Análisis densitométrico de las bandas proteicas.....	80

13. Determinación inmunocitoquímica de proteínas implicadas en el proceso de migración.....	81
14. Análisis estadístico	82
RESULTADOS.....	87
1. Modelo de herida	87
2. Efecto de los factores de crecimiento: TGFβ1, PDGF-BB y bFGF, sobre el proceso de cierre de la herida	90
2.1. Concentración óptima de los factores de crecimiento utilizados.....	90
2.2. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la secreción autocrina de los mismos.....	92
2.3. Efecto de los factores de crecimiento sobre el proceso de cierre de la herida.	92
2.4. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la morfología celular.	94
2.5. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la actividad metabólica celular.....	96
2.6. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la proliferación celular.	97
2.7. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre el proceso de diferenciación miofibroblástica.....	98
2.7.1. Expresión de αSMA a nivel de su mRNA.	98
2.7.2. Detección de la proteína αSMA.	99
2.8. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la proliferación celular y la diferenciación miofibroblástica analizando diferentes zonas del cultivo asociadas a la herida.	100
2.9. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la expresión del mRNA y sobre la producción de proteínas implicadas en la síntesis de MEC y migración celular.	103
2.9.1. Queratocano como marcador de fenotipo nativo de queratocitos.....	103
2.9.2. Colágeno tipo I como marcador del proceso de recuperación normal del estroma.	103
2.9.3. Colágeno tipo III como componente de una MEC reparadora.	104
2.9.4. FAK como proteína implicada en el proceso de migración celular.....	105
2.9.5. Integrina α5β1 como marcador fenotípico miofibroblástico y de migración celular.....	106
2.9.6. SDC4 como proteína implicada en el proceso de migración celular.....	108
2.9.7. Perlecano como marcador de síntesis de una matriz reparadora del daño. ..	111
DISCUSIÓN.....	115
CONCLUSIONES.....	135
LIMITACIONES.....	139

Índice

DIFUSIÓN DE RESULTADOS	143
FINANCIACIÓN	147
COLABORACIONES DESINTERESADAS	151
BIBLIOGRAFÍA	155



Acrónimos

Acrónimos

Abs: absorbancia.

ACTB: actina beta, actina β , *β actin*.

ALDH3A1: aldehído deshidrogenasa 3A1, *aldehyde deshydrogenase 3A1*.

ALDH1A1: aldehído deshidrogenasa 1A1, *aldehyde deshydrogenase 1A1*.

α -SMA (α SMA, ACTA2): actina alfa de músculo liso, *α smooth muscle actin*.

α SMA+: células actina alfa de músculo liso positivas.

APC: células presentadoras de antígenos, *antigen presenting cells*.

ARVO: *Association for Research in Vision and Ophthalmology*.

bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico ó tipo 2 (FGF2), *basic fibroblast growth factor*.

bp: pares de bases, *base pairs*.

BrdU: bromodesoxiuridina, *5-bromo-2'-deoxyuridine*.

BrdU+: células bromodesoxiuridina positivas.

BSA: albúmina de suero bovino, *bovine serum albumin*.

C: zona denominada como resto del cultivo.

CB: capa de Bowman.

CCL: *corneal cross linking*.

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario, *complementary deoxyribonucleic acid*.

CK: citoquinas, *cytokines*.

Col I: colágeno tipo I.

Col III: colágeno tipo III o COL3A1.

CS: condroitín sulfato.

CSSC: células madre del estroma corneal, *corneal stroma stem cells*.

CXADR: virus de Coxackie y adenovirus receptor, *Coxackie virus and adenovirus receptor*.

D: dioptrías.

Acrónimos

DAB: 3,3'-diaminobencidina, 3,3'-*diaminobenzidine*.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, 4',6-*diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*.

DC: células dendríticas, *dendritic cells*.

DNA: ácido desoxirribonucleico, *deoxyribonucleic acid*.

dNTPs: solución de desoxinucleótidos fosfatados, *deoxynucleotide triphosphates solution*.

DS: dermatán sulfato.

dsDNA: DNA de cadena doble, *double strand DNA*.

dTTP: 2'-desoxitimidina, 5'-trifosfato.

dUTP: 2'-desoxiuridina, 5'-trifosfato.

ECL: quimioluminiscencia enzimática, *enzymatic chemiluminescence*.

EGF: factor de crecimiento epitelial, *epithelial growth factor*.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, *enzyme-linked immunosorbent assay*.

En: endotelio.

Ep: epitelio.

Es: estroma.

EVER: *European Association for Vision and Eye Research*.

FAK: quinasa de adhesión focal o proteína tirosina quinasa 2 (PTK2), *focal adhesión kinase*.

FBS: Suero bovino fetal, *fetal bovine serum*.

FGF: factor de crecimiento fibroblástico, *fibroblast growth factor*.

FGFR2: receptor del factor de crecimiento fibroblástico básico o tipo 2, *basic fibroblast growth factor receptor 2*.

GAG: glicosaminoglicanos.

GF: factores de crecimiento, *growth factors*.

H: zona de la herida.

Acrónimos

HCF: Fibroblastos corneales humanos, *human corneal fibroblasts*.

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos, *hepatocyte growth factor*.

HRP: peroxidasa de rábano, *horseradish peroxidase*.

HS: heparán sulfato.

HSPG: proteoglicanos de heparán sulfato, *heparan sulphate proteoglycans*.

HSPG2: proteoglicano de heparán sulfato tipo 2 ó perlecano, *heparan sulphate proteoglycan type 2*.

H₂O: agua.

IGF: factor de crecimiento semejante a la insulina, *insulin-like growth factor*.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgG: inmunoglobulina G.

IL-1: interleuquina 1.

ISOCB: *International Society for Ocular Cell Biology*.

ITGA5: integrina α5.

ITGβ1: integrina β1.

KERA: queratocano, *keratocan*.

KGF: factor de crecimiento de queratinocitos, *keratinocytes growth factor*.

KS: queratán sulfato.

KSPG: proteoglicanos de queratán sulfato, *keratan sulphate proteoglycans*.

LAP: péptido asociado de latencia, *latency associated peptide*.

LASEK: *Laser assisted subepithelial keratomileusis*.

LASIK: *Laser assisted in situ keratomileusis*.

LC: células de Langerhans, *Langerhans cells*.

LOEX: Laboratorio de Organogénesis Experimental, *Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale*).

M: zona de los márgenes de la herida.

Acrónimos

MALT: tejido linfoide asociado a la mucosa, *mucosa associated lymphoid tissue*.

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos, *mitogen activated protein kinases*.

MD: membrana de Descemet.

MEC: matriz extracelular.

MMP: metaloproteasas de la matriz, *matrix metaloproteases*.

mRNA: ácido ribonucleico mensajero, *messenger ribonucleic acid*.

MSK: queratectomía manual superficial, *manual superficial keratectomy*.

NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NGF: factor de crecimiento nervioso, *nerve growth factor*.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: solución amortiguadora de fosfatos, *phosphate buffered saline*.

PBSA: solución de BSA en PBS.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, *polymerase chain reaction*.

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas, *platelet derived growth factor*.

PDGF-AA: factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma AA, *platelet derived growth factor AA*.

PDGF-AB: factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma AB, *platelet derived growth factor AB*.

PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma BB, *platelet derived growth factor BB*.

PDGFR α : receptor del factor de crecimiento α , *platelet derived growth factor receptor α* .

PDGFR $\alpha\beta$: receptor del factor de crecimiento $\alpha\beta$, *platelet derived growth factor receptor $\alpha\beta$* .

PDGFR β : receptor del factor de crecimiento β , *platelet derived growth factor receptor β* .

PDK4: piruvato deshidrogenasa quinasa 4, *pyruvate deshydrogenase kinase 4*.

Acrónimos

PG: proteoglicanos.

PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa, *phosphoinositide 3 kinase*.

PIO: presión intraocular.

PIRTU: personal investigador de reciente titulación universitaria.

PM: peso molecular.

PRK: queratectomía fotorefractiva, *photorefractive keratectomy*.

PTDGS: prostaglandina D2 sintasa, *prostaglandine D2 synthase*.

PVDF: fluoruro de polivinilideno, *polyvinylidene fluoride*.

RNA: ácido ribonucleico, *ribonucleic acid*.

RT: transcriptasa reversa, *reverse transcriptase*.

RTK: receptores tirosina quinasas, *receptors tyrosin kinase*.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa, *reverse transcription polymerase chain reaction*.

SD: desviación estándar, *standard deviation*.

SDC4: sindecano 4.

SDS: dodecilsulfato sódico, *sodium dodecyl sulphate*.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.

SEBC: Sociedad Española de Biología Celular.

SFM: medio libre de suero, *serum free medium*.

SH: sin herida.

ssDNA: DNA de cadena simple, *simple strand DNA*.

TBS: solución amortiguadora tris, *tris-buffered saline*.

TGF β : Factor de crecimiento transformante, *transforming growth factor*.

TGF β 1: Factor de crecimiento transformante 1, *transforming growth factor 1*.

TGF β 2: Factor de crecimiento transformante 2, *transforming growth factor 2*.

Acrónimos

TGFβ3: Factor de crecimiento transformante 3, *transforming growth factor 3*.

TKT: transcetolasa, *transketolase*.

TNFα: factor de necrosis tumoral α, *tumor necrosis factor α*.

TTBS: solución de TBS y Tween 20

UDG: uracil-DNA-glicosilasa.

UVA: ultravioleta A.



Introducción

1. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA CÓRNEA

La **superficie ocular** se define como una unidad funcional, formada por los párpados, la conjuntiva y el limbo esclero-corneal.

Los párpados limitan el espacio de la superficie ocular expuesto al medio ambiente. Su estructura y movimiento son fundamentales para la protección frente a agresiones externas y para el mantenimiento y la dinámica de la película lagrimal. Una de las funciones fundamentales de los párpados es la de barrer con cada parpadeo la superficie corneal eliminando así células descamadas superficiales que han terminado su ciclo vital y cuerpos extraños que hayan podido entrar en la superficie ocular.

La conjuntiva es una mucosa con un epitelio poliestratificado no queratinizado, en el que se intercalan células caliciformes secretoras. Este epitelio descansa sobre un tejido conectivo muy laxo, bien vascularizado en el que se encuentran agrupaciones linfoides tipo MALT (tejido linfoide asociado a la mucosa) y diferentes glándulas lagrimales accesorias que vierten su contenido a la superficie ocular.

La película lagrimal se podría considerar la capa más superficial del epitelio corneal y de la córnea, aunque no forma parte estrictamente de la córnea. Aporta además de humedad, factores de crecimiento e inmunológicos que son críticos tanto para la salud corneal como para los procesos de reparación corneal.¹ Tiene un grosor variable entre 7-10 μm . Está constituida por tres capas: capa mucinosa (en contacto con la membrana de las células epiteliales más externas), capa acuosa y capa lipídica (en contacto con el medio externo). Dentro de la capa acuosa se encuentran mucinas responsables de la creación de un gradiente con capacidad de formar geles junto a otros componentes como la lisozima, IgA y transferrina. Entre sus funciones, todas ellas relacionadas con el mantenimiento de la salud de la superficie ocular, destacan la prevención de posibles infecciones y la formación de una interfase con el aire que da lugar a una superficie óptica lisa.

La córnea recubre una sexta parte de la superficie total del globo ocular. Es la superficie más externa del ojo y por lo tanto la primera barrera que ha de atravesar la luz para acceder al sistema visual. Representa cerca de 2/3 de la capacidad total de enfoque del ojo, aproximadamente 43 dioptrías (D).¹

La córnea es una de las pocas partes del cuerpo avascular, sin embargo está muy innervada (nervios sin vainas de mielina), con una configuración característica de las

Introducción

fibras de colágeno del estroma. Su estructura altamente especializada, le confiere su característica principal, la transparencia, presentando una transmitancia del 80-90%. Aunque la córnea humana en condiciones normales es avascular, esta depende de componentes sanguíneos para nutrirse y para permanecer sana. Estos componentes llegan a través de la película lagrimal y del humor acuoso, además son aportados por finos vasos localizados en el limbo y por las ramificaciones terminales tanto de la arteria facial como de la oftálmica.²

Tiene forma de casquete esférico, algo elíptica anteriormente, con un diámetro medio de 12,5 mm. Su espesor central es de 0,5 mm aproximadamente y el periférico de 0,65 mm. El radio de curvatura anterior es de 7,8 mm y el posterior es de 6,8 mm (**Fig.1**). Su poder de refracción en la superficie anterior es de + 48 D mientras que en la parte posterior es de - 5,8 D lo que resulta en un total de +43 D, es decir el 70% del poder de refracción del ojo.

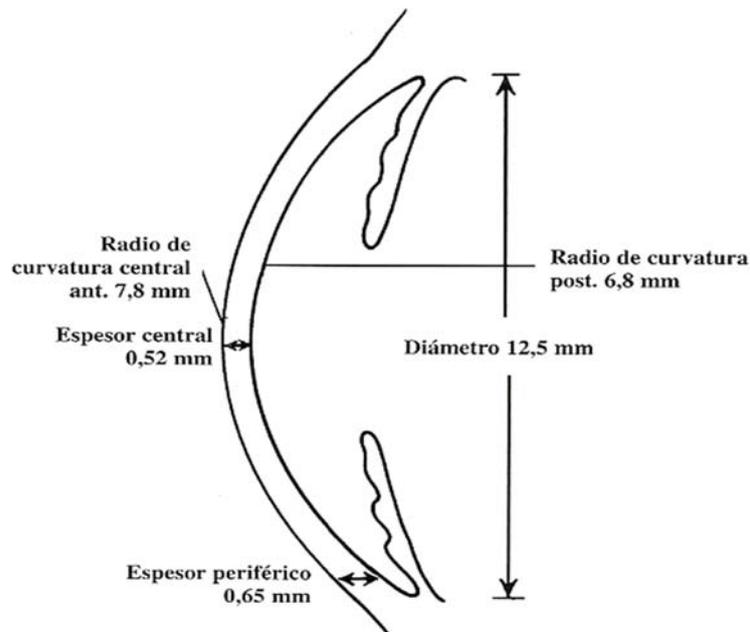


Figura.1. Esquema en el que se representa una córnea humana mostrando sus espesores (central y periférico), radios de curvatura (central anterior y posterior) y diámetro.

Está formada por diferentes tejidos que dan lugar a cinco capas: epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio o epitelio posterior (**Fig. 2**).

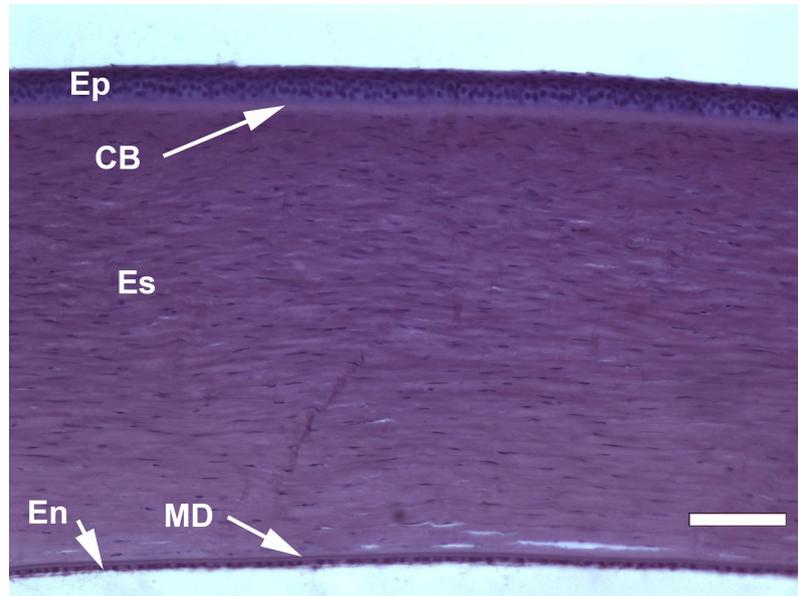


Figura 2. Imagen de una córnea humana teñida con hematoxilina y eosina mostrando cada una de sus capas. Ep: epitelio; CB: capa de Bowman; Es: estroma; MD: membrana de Descemet; En: endotelio). Barra de escala 100 μ m.

1.1. El Epitelio corneal.

El epitelio es la capa más superficial de la córnea y por lo tanto la primera barrera frente al medio exterior que, junto con la lágrima, constituye una superficie homogénea fundamental para la refracción. Está formado por células epiteliales en constante renovación, que se diferencian para formar un epitelio poliestratificado plano no queratinizado con gran potencial regenerativo.³ La superficie de estas células está cubierta por un glicocalix uniforme compuesto de residuos de azúcares ramificados unidos a proteínas. El grosor de esta capa de azúcares se extiende unos 300 nm por encima de la membrana apical.⁴ Uno de los principales componentes del glicocalix epitelial son las mucinas, glicoproteínas integrales de membrana que interaccionan con la película lagrimal estableciendo una superficie óptica lisa. La pérdida del glicocalix tras un daño o enfermedad da lugar a la pérdida de estabilidad de la película lagrimal lo cual conlleva a la ruptura del sistema óptico ocular.

El epitelio humano presenta 4-6 capas de células apiladas con un espesor de aproximadamente 50 μ m y está formado por tres tipos celulares que se diferencian por su morfología⁵ (**Fig. 3**).

Introducción

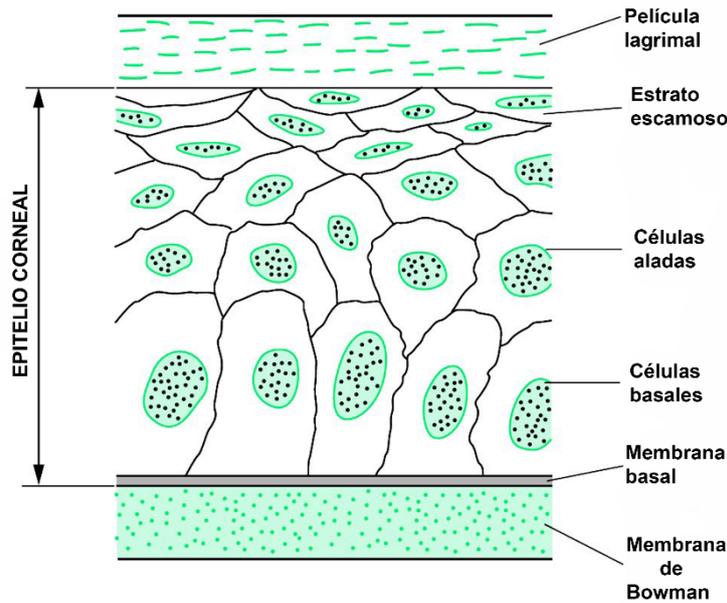


Figura 3. Esquema en el que se muestran las diferentes capas celulares del epitelio corneal.

Capa basal: se sitúa sobre la membrana basal y está formada por una única capa de células basales con capacidad proliferativa⁶, que dan lugar al **estrato germinativo** el cual presenta células jóvenes recién formadas con morfología cilíndrica. Estas células se originan a partir de las células madre localizadas en la capa basal del epitelio del limbo, situado en la periferia de la córnea.⁷ Las células basales se unen entre sí mediante desmosomas y a la membrana basal por hemidesmosomas lo cual previene la separación del epitelio del resto de capas corneales. Ambos tipos de uniones mantienen a las células unidas entre sí y estas a la membrana basal, además de aportar conexiones intracelulares con los elementos del citoesqueleto gracias a las proteínas presentes en las placas intracitoplasmáticas que contienen estas uniones lo cual contribuye a dar rigidez y estabilidad tanto a las células como al tejido. Además de las uniones anteriormente citadas, las células basales se comunican también mediante uniones gap (en hendidura, comunicantes o denexo) que permiten el intercambio de pequeñas moléculas e iones entre células adyacentes.

Capa media: a medida que tiene lugar la división de las células de la capa basal, las células hijas se desplazan hacia la superficie y comienzan a diferenciarse formando entre una y tres capas de **células aladas** unidas entre sí mediante numerosos desmosomas. Se denominaron así porque al abandonar la zona basal pierden su morfología columnar adquiriendo forma irregular con pequeñas prolongaciones.

Capa superficial: sobre las células aladas se localiza una capa de tres a cuatro células de grosor con morfología aplanada denominada **estrato escamoso**. Entre las células escamosas más superficiales se encuentran uniones estrechas (*zonula occludens*), aunque este tipo de unión también está presente en el estrato escamoso profundo y ocasionalmente en las células aladas. Su presencia en el epitelio es muy importante ya que este tipo de unión es el único que puede cerrar completamente el espacio intercelular restringiendo el paso de pequeñas moléculas e iones.

Estas células, al igual que las aladas, se unen unas a otras y a las aladas mediante desmosomas formando amplias y sinuosas rutas intercelulares. Las células más superficiales del estrato degeneran y se descaman de la superficie corneal en un proceso que da lugar al recambio de todo el epitelio cada 7 días aproximadamente.⁸ En las células más superficiales del estrato escamoso pueden observarse amplias microvellosidades apicales las cuales incrementan el área superficial de contacto y adherencia entre la capa mucinosa de la película lagrimal y la membrana celular.² En el citoplasma de dichas células se pueden observar vesículas de pinocitosis cuyo número aumenta a medida que las células tienden a desprenderse.

Las múltiples capas del epitelio, los diferentes tipos de uniones y las interdigitaciones presentes en las células hacen del epitelio una barrera frente al movimiento libre de agua y diferentes moléculas desde la película lagrimal hacia el estroma.

El **limbo corneal** constituye la zona de transición ricamente vascularizada, innervada y pigmentada entre la esclera, la córnea y la conjuntiva. El epitelio limbar es la zona de transición entre el epitelio conjuntival y el corneal. En el limbo se localizan unas estructuras fundamentales donde se localiza el nicho de las células madre del limbo, las **empalizadas de Vogh** (*Vogh palisades*).⁹ Anatómicamente, son unas zonas altamente pigmentadas donde, a diferencia de la córnea, se producen pliegues de la membrana basal epitelial que penetran en el estroma¹⁰(**Fig. 4**). Estas características anatómicas sugieren que las células madre epiteliales pueden interactuar en dicha zona con las estromales. El nicho presenta componentes extracelulares únicos como por ejemplo la laminina $\alpha 2\beta 2$ ¹¹ la cual no se expresa en el resto de la membrana basal. En esta zona, el estroma está fuertemente innervado¹² y vascularizado¹³ lo cual permite que lleguen hacia él, entre otras, células de la médula ósea.

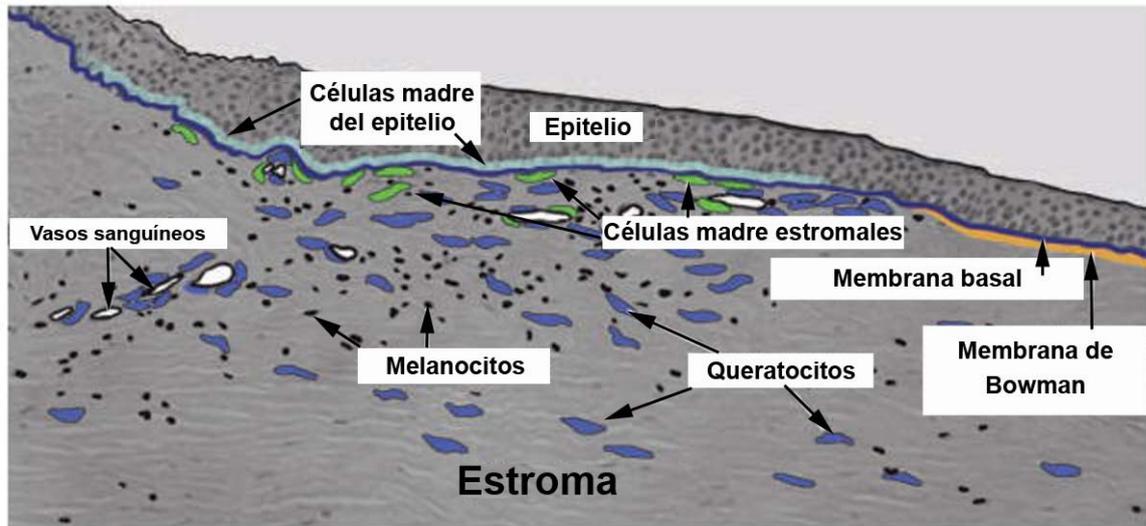


Figura 4. Imagen en la que se muestran las características anatómicas y celulares del nicho de las células madres presentes en el limbo corneal (empalizadas de Vogh). Imagen tomada y modificada de Pinnamaneni N. y Funderburgh JL., 2012.¹⁴

Las células madre del limbo se caracterizan por presentar un ciclo celular lento durante la homeostasis en vivo, pobre diferenciación con un citoplasma primitivo y gran capacidad de activación para proliferar en caso de daño. Su papel fundamental es la repoblación centripeta del epitelio corneal e impedir que el epitelio conjuntival invada la superficie corneal.^{9, 15}

La teoría XYZ de Thoft resume el movimiento de las células epiteliales en tres fases: X-desplazamiento centripeto, Y-desplazamiento vertical y Z-descamación de las células superficiales.¹⁶

En conjunto, el epitelio corneal es mantenido por el balance entre la mitosis de las células basales y de las nuevas células que migran desde el limbo, para reponer las que continuamente son descamadas desde el estrato superficial en cada parpadeo.

La membrana basal sobre la cual descansa el epitelio, presenta un grosor de 40-60 nm y está formada sobre todo por colágeno tipo IV y VII, lamininas, fibronectina, perlecano y nidogen.¹⁷

1.2. La membrana o capa de Bowman.

La capa de Bowman es una membrana acelular localizada entre la membrana basal del epitelio y el estroma. En los mamíferos sólo existe en los primates. En el ser humano tiene un espesor de 12 μm aproximadamente. Está formada por fibras de colágeno (principalmente tipo I y III) dispuestas de manera aleatoria y proteoglicanos. Esta capa

se puede considerar una modificación de la capa superficial del estroma. Se cree que actúa como barrera frente a la invasión corneal por microorganismos y proporciona resistencia a traumatismos. Carece de capacidad regenerativa y ha sido relacionada con el mantenimiento del epitelio sin embargo, se ha visto que aunque no regenere tras un daño, se puede formar y mantener un epitelio normal.¹⁸

1.3. El estroma.

El estroma o capa media constituye aproximadamente el 90% del espesor corneal^{19, 20}, está formado por un 78% de agua y un 22% constituido por: fibras de colágeno (80%), material extrafibrilar o sustancia fundamental (15% proteoglicanos, PG) y elementos celulares (5%) (**Fig. 5**). Su espesor varía considerablemente dependiendo de la especie presentando un valor de unas 500 μm en humanos.²¹⁻²³

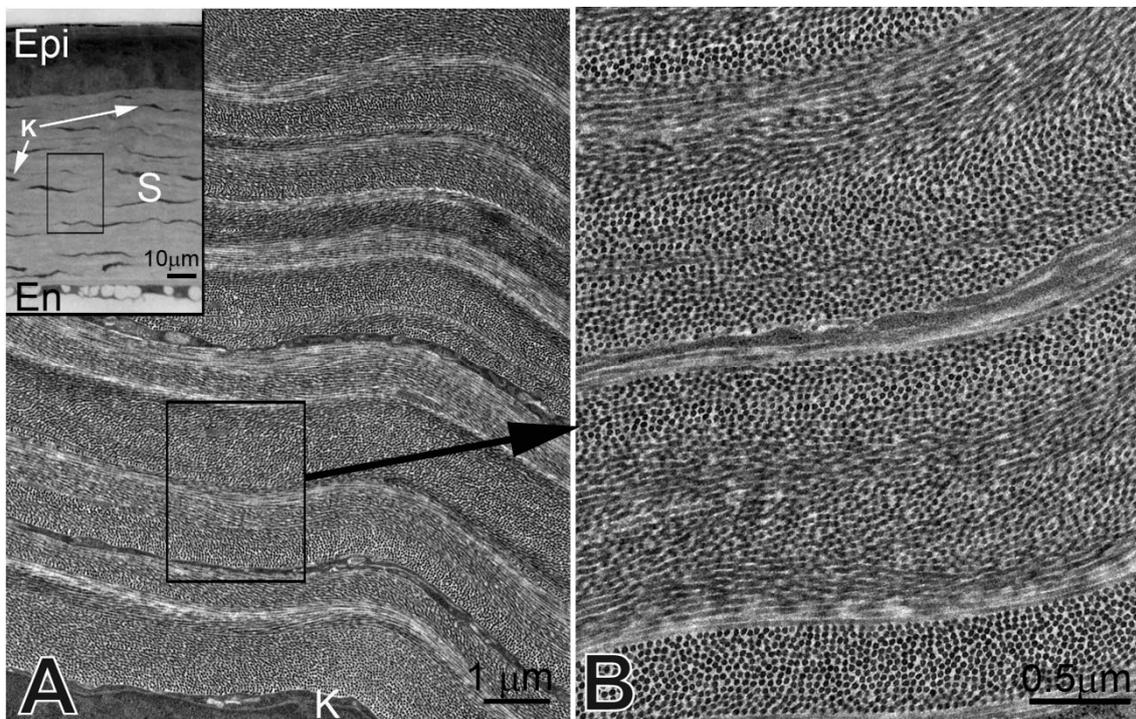


Figura 5. Ultraestructura del estroma corneal. En la esquina superior derecha de la imagen **A** se muestra un corte histológico de la córnea de ratón en la que se aprecian el epitelio (Epi), el estroma (S) y el endotelio (En). En el estroma se pueden ver los queratocitos (K) colocados de forma paralela a la superficie corneal entre las lamelas del estroma. La imagen **B** muestra en detalle la composición de las lamelas formadas por fibras de colágeno de pequeño diámetro empaquetadas de manera regular; las capas adyacentes forman aproximadamente un ángulo recto unas con otras; Las imágenes A y B son microfotografías de microscopía electrónica de transmisión. La figura ha sido tomada y modificada de Shoujun Chen, Michael J. Mienaltowski y David E. Birk (2015).²⁴

1.3.1. Las células del estroma corneal.

1.3.1.1. Queratocitos.

Los **queratocitos** son el principal tipo celular del estroma corneal y son los encargados de mantener la matriz extracelular (MEC). Son capaces de sintetizar moléculas de colágeno y PG, así como metaloproteasas de matriz (MMP), todos ellos cruciales para el mantenimiento de la homeostasis corneal. Estos constituyen un porcentaje muy bajo del volumen del estroma y la mayoría de ellos residen en el estroma anterior. Se caracterizan por tener un cuerpo compacto y morfología dendrítica, cuyas prolongaciones hacen que permanezcan interconectados en una malla tridimensional contactando unas células con otras por sus amplios procesos.^{25, 26} El cuerpo compacto minimiza el área superficial de los queratocitos expuestos a la luz, lo cual posiblemente sirve para reducir su dispersión (*scattering*). Además, estas células se caracterizan también por tener en su citoplasma altos niveles de cristalinas que representan el 25% o el 30% de las proteínas solubles de la célula. Estas proteínas aportan protección frente al estrés oxidativo²⁷⁻²⁹ y parecen ser responsables de reducir el *backscattering* de la luz y así mantener la transparencia.³⁰⁻³²

Cada queratocito presenta una organización escasa de microfilamentos de actina formando el cortex celular y definiendo los límites citoplasmáticos. Entre estos microfilamentos se distribuyen de igual manera las proteínas miosina y α -actinina (proteínas que se unen a la actina). La conexina-43 (*gap junction protein*) se localiza en los lugares de unión célula-célula. Los filamentos intermedios presentes son de vimentina, y se organizan formando un anillo perinuclear distribuyéndose de forma radial por todo el cuerpo celular.³³

Los queratocitos se caracterizan también por la expresión de genes específicos como ALDH3A1 (aldehído deshidrogenasa 3A1), CXADR (Coxsackie virus y adenovirus receptor), PTDGS (prostaglandina D2 sintasa) y PDK4 (piruvato deshidrogenasa quinasa 4). Además son positivos para la glicoproteína de superficie CD34 sugiriendo que esta molécula de adhesión los mantiene anclados entre las lamelas de colágeno.³⁴⁻

³⁶

Durante el desarrollo de la córnea y cuando son estimulados tras un daño, los queratocitos proliferan y son biosintéticamente activos pudiéndose diferenciar hacia miofibroblastos y/o fibroblastos (fenotipos activos) durante el proceso de curación³⁷, pero en córneas adultas y sanas se consideran quiescentes ya que se encuentran en fase G0 del ciclo celular. Como estas células presentan control externo del ciclo celular,

podrán entrar de nuevo en fase G1 en respuesta a estímulos externos abandonando el estado de quiescencia en el cual el nivel de proliferación y síntesis de MEC es bajo. Gracias a las reconstrucciones en tres dimensiones de alta resolución, se pueden describir tres subpoblaciones distintas de queratocitos en función de su localización. Los queratocitos del estroma anterior están caracterizados por ser grandes, con una morfología y orientación variable y numerosos procesos celulares cortos. En dicha localización su densidad es mayor que la observada en los estratos más profundos. Los queratocitos del estroma central se caracterizan también por presentar una morfología y orientación variables pero en general sus cuerpos celulares son más aplanados. En dicho estrato su densidad es claramente menor, existiendo una abundante matriz extracelular. Finalmente, los queratocitos del estroma posterior son más grandes cuando se comparan con los presentes en los estratos anteriormente citados, mostrando un contorno más redondeado con procesos celulares más cortos proyectados lateral y oblicuamente, para contactar con los cuerpos de las células vecinas.³⁸

1.3.1.2. Células madre del estroma corneal.

Las células madre del estroma corneal (CSSC) son una población de células de origen mesenquimal derivada de la cresta neural que se localiza en el limbo subyacente a la membrana basal del epitelio, en las empalizadas de Vogh (ver **Fig. 4**). Se cree que las células mesenquimales de esta región ayudan a mantener la población de células madre epiteliales del limbo.³⁹ Su identificación en el estroma corneal humano se consiguió mediante el aislamiento de una población de células capaces de eliminar Hoechst 33342, un colorante de unión al DNA.⁴⁰ Al eliminar dicho colorante se reduce la fluorescencia de dichas células y por lo tanto, es posible separarlas del resto mediante citometría de flujo. Esta población celular ha sido ampliamente investigada como fuente de células madre adultas.⁴¹ Pueden ser expandidas clonalmente mostrando características de células madre adultas por lo que se las denominó CSSC, pudiendo alcanzar hasta 100 pases y manteniendo un amplio potencial de diferenciación que las distingue del resto de células del estroma. Si se siembran en medio libre de suero expresan marcadores específicos de queratocitos como el queratocano o la aldehído deshidrogenasa 3A1.⁴⁰ Por otro lado, las CSSC expresan genes específicos que son débilmente expresados en los queratocitos como ABCG2, C166, cKIT y Notch1 y también genes específicos del desarrollo corneal temprano como PAX6 y Six2. Al diferenciarse expresan altos niveles de genes específicos de los queratocitos incluyendo el CD34 para el cual son negativas y dejan de expresar PAX6.

La capacidad de estas células para diferenciarse en queratocitos ha sido demostrada *in vivo*, al inyectar en el estroma de ratones CSSC humanas estas empiezan a expresar mRNA y proteínas específicas de queratocitos reemplazando la MEC del ratón por componentes de la matriz humana.⁴² Estos resultados indican que, al exponer a las CSSC a otro microambiente diferente del limbo, hace que pierdan sus características de células madre, sugiriendo además la necesidad de mantenerse en proximidad a las células madre del epitelio, denotando la existencia de una relación simbiótica entre ambas poblaciones celulares que hace que ambas mantengan su fenotipo de célula madre, pero más allá de estas observaciones poco se conoce sobre la participación de las CSSC en la homeostasis del estroma.

1.3.1.3. Células presentadoras de antígenos.

Otro tipo celular residente en el estroma corneal son las **células presentadoras de antígenos** (APC), derivadas de la médula ósea e implicadas en la respuesta inmune iniciada tras un trauma, una infección o un trasplante. Son las células dendríticas (DC) (entre las que se incluyen las células de Langerhans, LC) y los macrófagos, ambos esenciales para la protección del tejido y la erradicación de infecciones. Tanto la respuesta inmunitaria innata como la adquirida se inician por las APC. Hasta hace poco tiempo se creía que el mantenimiento de la transparencia corneal se debía, al menos en parte, a la ausencia de APC residentes capaces de iniciar la respuesta inflamatoria. Sin embargo, se ha demostrado un patrón de estratificación único de APC.⁴³⁻⁴⁵

En la córnea humana, en condiciones normales las células de Langerhans se localizan predominantemente en la zona basal del epitelio y los macrófagos en el estroma anterior.⁴⁴ El uso de marcadores específicos ha permitido determinar la localización en la córnea de diferentes estadios de maduración de las DC. La presencia de gránulos de Birbeck, gránulos cuyo principal componente es la langerina, una lectina con un importante papel en la endocitosis,⁴⁶ ha permitido identificar específicamente LC inmaduras.⁴⁷ Estas células derivan de células madre de la médula ósea de estirpe mieloide. Actualmente la función de las APC corneales no se conoce en profundidad pero sí su localización, lo cual es un primer paso para la comprensión del papel que dichas células juegan en la protección e inmunopatología de la córnea.

1.3.2. La matriz extracelular.

En la mayoría de tejidos conectivos la matriz extracelular (MEC) está formada por un almacén de colágeno muy regulado y específico de cada tejido. Asociados a este almacén se encuentran proteoglicanos (PG), glicosaminoglicanos (GAG) y proteínas no colágenas que dan lugar a grandes estructuras supramoleculares de diferentes combinaciones.⁴⁸ Uno de los rasgos distintivos de la MEC es que posee una organización temporal y espacial muy importante para su correcta fisiología. Las células que interactúan con los componentes de la MEC y su estructura lo hacen mediante la unión a receptores específicos, principalmente integrinas.⁴⁹ Aunque la MEC está en constante remodelación, la tasa de recambio de sus componentes es muy diferente. En general, la vida media de las moléculas de colágeno es larga mientras que la de otras proteínas, PG y otros es más corta.

El mantenimiento de la solidez estructural de la mayoría de tejidos conectivos se atribuye a las moléculas de colágeno.

1.3.2.1. El colágeno.

Como se ha descrito previamente, además de un número relativamente bajo de células, el estroma corneal está formado por una MEC abundante con una tasa de remodelación baja ⁵⁰, constituida por fibrillas de colágeno formadas sobre todo por colágeno tipo I y por colágeno de los tipos V y VI, aunque en menor cantidad.⁵¹ Las **fibrillas de colágeno** se organizan en haces paralelos denominados fibras, las cuales se empaquetan paralelamente a la superficie corneal en laminillas o capas. El estroma corneal humano contiene aproximadamente entre 200 o 250 laminillas, cada una dispuesta perpendicularmente en relación a las fibras de laminillas adyacentes ⁵² (ver **Fig. 5**). El estroma periférico es más grueso que el central y las fibras pueden cambiar de dirección al aproximarse al limbo.⁵³ La organización ultraestructural de las laminillas puede variar en base a la profundidad dentro del estroma. Las capas más profundas están más organizadas que las más superficiales.

Cada molécula de **colágeno** mide 280 nm de longitud y 1,4 nm de espesor y está formada por tres cadenas polipeptídicas alfa (α) formadas cada una por uno, dos o tres productos génicos diferentes. De los 28 tipos de colágeno que actualmente se conocen⁵⁴, al menos 22 tipos diferentes se han localizado tanto en ojos adultos como en desarrollo ^{55, 56}, siendo los del tipo I y V los principales colágenos formadores de fibras

Introducción

del estroma corneal adulto. La forma de asociarse ambos en fibras de estrecho diámetro es una característica esencial para el mantenimiento de la transparencia corneal.⁵⁷⁻⁵⁹

El **colágeno tipo I** se encuentra en la mayoría de tejidos conectivos y concretamente en la córnea representa el 75% del colágeno total.⁶⁰ Se localiza en el estroma y en la membrana de Bowman.^{56, 61}

Existen diferentes isoformas de colágeno tipo I, pero en la córnea la composición de sus cadenas es $\alpha 1 (I)_2 \alpha 2 (I)$. En el estroma se asocia al **colágeno tipo V** formando complejos heterodiméricos lo cual hace que las fibras tengan un diámetro pequeño y a su vez permite su organización en lamelas.⁶²

La presencia de colágeno tipo V es uno de los factores que influyen además de en el diámetro de las fibras en su ensamblaje inicial lo cual es esencial para la transparencia^{57, 63} (**Fig. 6**).

Otro tipo de colágeno presente en la córnea es el **colágeno tipo III ($\alpha_1\text{III}$)**, aunque en condiciones fisiológicas su expresión es baja.⁶⁰

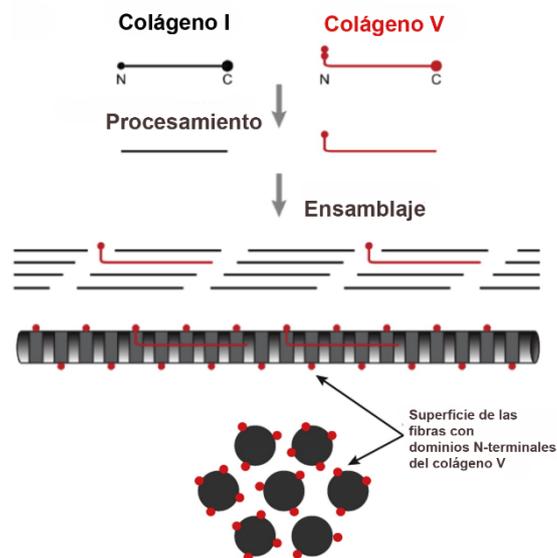


Figura 6. Esquema en el que se representa la asociación de fibrillas de los colágenos tipo I y V formando complejos heterodiméricos durante la formación de las fibras. Imagen tomada y modificada de Shoujun Chen, Michael J. Mienaltowski y David E. Birk (2015).²⁴

1.3.2.2. Los proteoglicanos (PG).

Asociados al armazón de colágeno de la MEC se encuentran los PG.⁶⁴ Son moléculas formadas por un núcleo proteico y una o más cadenas de GAG unidas covalentemente.⁶⁵ Los GAG son polisacáridos que contienen unidades repetidas de disacáridos, existiendo cuatro tipos principales: heparán sulfato (HS), queratán sulfato (KS), dermatán sulfato (DS) y condroitín sulfato (CS).

La sulfatación de las cadenas laterales de los PG en la córnea incrementa las propiedades de retención de agua (manteniendo así los niveles de hidratación), que junto con la distribución uniforme de las fibras de colágeno y el espaciado existente entre las mismas aporta transparencia corneal.^{52, 66}

Existe una gran diversidad de PG, los núcleos proteicos pueden ir desde 20 hasta 450 kDa. Las cadenas laterales de GAG pueden llegar a ser de hasta 70 kDa.⁶⁷ Hay 3 familias principales de PG, los que se intercalan en la membrana plasmática, los que se unen a ácido hialurónico y los que modulan la formación de fibras de colágeno.

En el estroma corneal adulto existen cuatro tipos denominados según la proteína central que presentan: decorina⁶⁸, lumicano^{69, 70}, queratocano^{71, 72} y mimecano.⁷³ En general, los tamaños de estos PG son suficientemente pequeños para encajar en los espacios entre el colágeno y regular así su espaciado⁷⁴⁻⁷⁷ (**Fig. 7**). Los ésteres de sulfato en KS son importantes como reserva hídrica y para mantener la solubilidad del PG en medio acuoso.⁷⁸ Los PG de KS (KSPG) representan la principal clase de PG del estroma corneal.

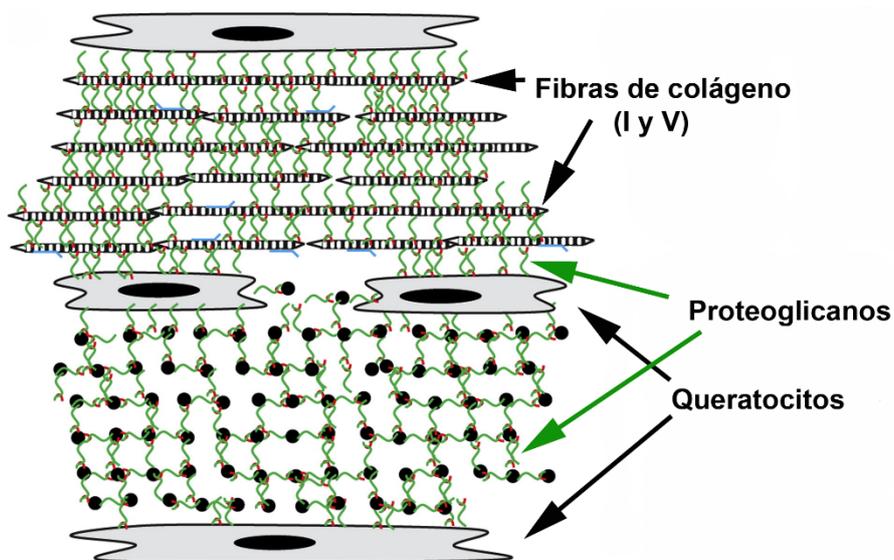


Figura 7. Esquema representativo de la localización de los proteoglicanos en la MEC entre las fibras de colágeno. Esquema tomado y modificado de Shoujun Chen, Michael J. Mienaltowski y David E. Birk (2015).²⁴

1.3.2.2.1. El queratocano.

Entre los KSPG localizados en la córnea y específicos del estroma está el **queratocano**. Es un marcador ampliamente aceptado del fenotipo de queratocito nativo.^{33, 79, 80} El núcleo es de 37 kDa y tiene unidas 3 cadenas de GAG de KS. La ausencia de queratocano da lugar a córneas con un estroma delgado con una ordenación irregular de las fibras de colágeno.⁸¹

1.3.2.2.2. El perlecano.

Otro PG localizado en la córnea es el **perlecano** (HSPG2, PG tipo 2 de HS). Fue el primer HSPG identificado en las membranas basales.⁸² Contiene un núcleo de entre 400 y 467 kDa al que se unen 3 cadenas de HS y 10 de CS. Estas cadenas varían en tamaño y secuencia de azúcares dependiendo del tejido donde se localice. La modulación de su síntesis es importante durante el proceso de remodelado que tiene lugar tras un daño en la córnea. En la córnea se localiza en las membranas basales de epitelio y endotelio, y se encuentra en niveles bajos en el estroma normal pero su síntesis aumenta tras un daño ^{76, 83, 84}, siendo su expresión en el estroma típica de fenotipos activados.^{76, 85, 86} Entre sus funciones destacan el mantenimiento de la adhesión celular y de la integridad de la matriz corneal además de la unión al colágeno tipo IV y laminina ^{87, 88} y ayuda a mantener la barrera selectiva de la membrana basal que controla el flujo de fluidos en el ojo.⁸⁹ Media en procesos de proliferación, diferenciación y migración en muchos tipos celulares, incluyendo los queratocitos.⁹⁰ Tales funciones son realizadas mediante el control de la capacidad de unión de diferentes factores de crecimiento a sus receptores ⁹¹, ya que tanto las cadenas de GAG como el núcleo pueden unirlos afectando a procesos tales como angiogénesis, proliferación y diferenciación.⁸²

1.3.2.2.3. El sindecano 4.

Otro grupo de HSPG son los que forman la familia de los **sindecanos**, formada por cuatro PG en mamíferos, todos son proteínas transmembrana. Los sindecanos unen una gran variedad de ligandos extracelulares mediante la unión covalente a sus cadenas de HS y juegan importantes papeles en adhesión célula-matriz y célula-célula, migración y proliferación.

Uno de los cuatro es el sindecano 4 (SDC4) el cual se localiza en uniones altamente organizadas célula-matriz de células adherentes denominadas adhesiones focales junto con integrinas.⁹² Estas estructuras contienen numerosas proteínas especializadas de

membrana y del citoesqueleto, y son lugares de unión a la membrana de los filamentos de actina.⁹³ Actualmente existen discrepancias sobre si el SDC4 es un componente obligatorio de las adhesiones focales que es requerido para su ensamblaje, o si es reclutado en una adhesión focal existente como resultado de la activación de un mecanismo de señalización celular.

La expresión del SDC4 es necesaria para que el proceso de cicatrización tenga lugar de forma adecuada, ya que se ha observado que su carencia da lugar a un retraso en el cierre causado por un proceso de migración comprometido de los fibroblastos.⁹⁴

1.3.3. Moléculas de interacción célula-MEC: las integrinas.

Las células interactúan con su MEC principalmente a través de integrinas dando lugar a estructuras específicas de adhesión a la matriz presentes en los queratocitos.⁹⁵ Son glicoproteínas de membrana formadas por una cadena α y una β dando lugar a heterodímeros. La unión de ligandos por las integrinas se realiza principalmente por la cadena α . Actualmente se conocen 24 subunidades α y 9 β . Cada subunidad presenta tres dominios: uno extracelular, otro transmembrana y otro intracelular o citoplasmático. Las cadenas α presentan un largo dominio extracelular y corto intracelular mientras que en las β los dos son largos. En un gran número de integrinas la cabeza del dominio extracelular reconoce una secuencia de aminoácidos específica arg-gly-asp (RGD), presente en los principales componentes de la MEC (fibronectina, vitronectina, colágeno y laminina). Las integrinas median en la adhesión celular y en el estrés mecánico dando lugar a conductos bidireccionales para señales que se originan desde fuera hacia el interior de la célula.⁹⁶

Hay tres familias principales de integrinas, las $\beta 1$, $\beta 2$ y αv , siendo la $\beta 1$ la más grande. La función principal de este grupo es modular las interacciones célula-matriz a través de la unión a ligandos presentes en colágeno, fibronectina o vitronectina. Los queratocitos expresan las siguientes integrinas de unión al colágeno: $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$.⁹⁷

1.4. La membrana de Descemet.

La membrana de Descemet es la membrana basal sobre la que descansa el endotelio y, en el ojo humano adulto, tiene un grosor de 10-15 μm . Se considera membrana basal del endotelio, principalmente, porque es secretada por las propias células epiteliales aunque carece de hemidesmosomas u otro tipo de uniones de anclaje entre esta y el endotelio. Sus principales componentes son colágeno tipo IV, laminina y fibronectina.

Se cree que esta capa actúa en la adhesión de las células endoteliales a la membrana.⁹⁸
⁹⁹ Aparece como una banda fina y transparente entre el endotelio y el estroma.

1.5. El endotelio.

El endotelio, capa interna o epitelio posterior es una monocapa de células poligonales localizada en la cara más posterior de la córnea, en contacto directo con el humor acuoso y que carece de capacidad de replicación en humanos. Esta monocapa tiene un espesor de unas 5 μm en el hombre adulto y se separa del estroma por la membrana de Descemet.¹⁰⁰ Constituye una capa de gran importancia ya que es fundamental para la nutrición del estroma. Permite el correcto aporte de carbohidratos, vitaminas y aminoácidos y participa en la secreción hacia el humor acuoso de sustancias como el dióxido de carbono y otros productos finales del metabolismo. Sus células presentan interconexiones complejas y son esenciales para el mantenimiento de la transparencia corneal, ya que constituyen una barrera de filtro entre el humor acuoso y el estroma. Presentan uniones estrechas puntuales (máculas) localizadas en el polo apical celular, por lo que el endotelio va a permitir el movimiento de moléculas y agua entre el humor acuoso y el estroma. Sus células son metabólicamente muy activas, presentando numerosas mitocondrias que estructuralmente son inusuales ya que presentan crestas que van en paralelo al eje longitudinal de la organela. La mayor parte de la actividad metabólica del endotelio se asocia a la bomba que mueve diferentes iones a través de las membranas celulares. Como consecuencia del bombeo se produce el movimiento de agua desde el estroma hacia el humor acuoso.¹⁰¹

Las células endoteliales forman un mosaico irregular en el cual las células individuales son polígonos irregulares, normalmente de seis caras. La densidad celular disminuye desde aproximadamente unas 3000 células/ mm^2 en el centro de la córnea a casi la mitad en la periferia. De media, las células tienen una anchura de unas 20 μm pero el tamaño está inversamente correlacionado con la densidad celular. Las células de la periferia son aproximadamente dos veces el tamaño de las centrales. El espacio entre células no es regular. Al aumentar la irregularidad también aumenta la variabilidad del área celular y el número de lados que presenta la célula.¹⁰² La regularidad en la morfología de las células endoteliales se ve afectada por patologías, la edad, traumas y el uso prolongado de lentes de contacto; en todos los casos se debe a la pérdida de células que no son reemplazadas. Por lo tanto, el endotelio mantiene su continuidad por migración y expansión de las células que permanecen en el mismo. Así, los endotelios más jóvenes presentan mayor densidad celular y son más regulares.

2. INERVACIÓN CORNEAL

La sensibilidad corneal, el metabolismo epitelial, la adhesión celular y el proceso de cicatrización dependen de que la inervación corneal esté intacta ya que la córnea es de los tejidos más inervados y sensibles del cuerpo humano. Los nervios corneales derivan de la rama oftálmica del nervio trigémino y responden a estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Los paquetes de nervios se introducen desde la periferia del estroma medio siguiendo un patrón radial, siguen una trayectoria hacia la parte más anterior y dan lugar a múltiples ramificaciones que inervan el estroma anterior y medio.¹⁰³ Las ramificaciones nerviosas localizadas en la zona anterior penetran la capa de Bowman a través del centro y de la periferia de la córnea. Estas entonces se dividen y corren paralelamente hacia la superficie corneal, entre la capa de Bowman y la zona basal del epitelio, configurando el plexo nervioso sub-basal que inerva el epitelio. Además de las fibras sensoriales, la córnea también contiene fibras nerviosas simpáticas autónomas.¹⁰⁴ La alta densidad de estructuras neurales sensibles dentro del epitelio es importante para detectar pequeños estímulos, por lo tanto, existe un reflejo de defensa muy sensible, crucial para la protección de la córnea y del ojo en su conjunto. Además la inervación también aporta funciones tróficas ya que ejerce una influencia sobre la regulación de la integridad epitelial, procesos de proliferación y de cicatrización.^{103, 105, 106} Tanto el reflejo del parpadeo como el de la secreción de lágrima tienen lugar por un arco reflejo que incluye la superficie ocular, la inervación corneal, la interconexión de los nervios desde la unidad funcional y las glándulas lagrimales. Cuando cualquier parte de este arco reflejo se ve comprometida se compromete también la salud ocular.¹⁰⁷

3. DESARROLLO EMBRIONARIO CORNEAL

Durante el desarrollo embrionario ocular en mamíferos, la acción inductiva de la vesícula del cristalino sobre el ectodermo superficial que cubre su superficie da lugar a un ectodermo de superficie, formado por una capa basal de células cúbicas que se estructuran en varias capas y que darán lugar al epitelio corneal entre la quinta o sexta semana de gestación. Dichas células experimentan un incremento en altura y comienzan a sintetizar colágeno tipo I, II y IX con lo que comienza a formarse el estroma acelular primario.¹⁰⁸ Posteriormente, se produce una primera oleada migratoria de células derivadas de la cresta neural hacia el espacio que queda entre el epitelio y la cápsula del cristalino formando el endotelio.¹⁰⁹ Las células que están formando el

Introducción

endotelio comienzan a sintetizar grandes cantidades de ácido hialurónico que se localiza rellenando amplios espacios en el estroma primario, lo cual da lugar a una segunda oleada migratoria de células de la cresta neural durante la séptima semana de gestación. Dichas células se van a localizar en los espacios del estroma primario ricos en ácido hialurónico y se denominan queratoblastos. Estos comienzan a proliferar y a sintetizar altos niveles de ácido hialurónico dando lugar a la MEC del estroma embrionario.¹¹⁰⁻¹¹² Esta matriz contiene amplios espacios ocupados por ácido hialurónico, agua y, de forma ocasional, fibras de colágeno.¹¹⁰ El núcleo proteico de los PG lumicano y queratocano puede ser ya detectado en este estadio aunque las cadenas de GAG no están sulfatadas todavía y son esencialmente glicoproteínas.¹¹³ La córnea en este momento es más gruesa de lo que será en el momento del nacimiento y ha alcanzado sólo el 40% de su transparencia final.¹¹¹ Los queratoblastos comienzan entonces a diferenciarse en queratocitos. Estas células continúan proliferando aunque a bajos niveles, pero ya sintetizan altos niveles de colágeno, KSPG y la enzima hialuronidasa, con lo que la MEC rica en ácido hialurónico y agua es reemplazada por una MEC con fibras de colágeno densamente empaquetadas similares a las observadas en la córnea adulta ^{110, 113-115} y se produce una disminución del grosor corneal. Los queratoblastos y queratocitos tienen niveles similares de mRNA para lumicano, pero los de queratocano son mayores en los queratoblastos.¹¹⁶ El biglicano también se expresa en este momento, donde actúa junto con la decorina para regular el diámetro de las fibras de colágeno.¹¹⁷ En este proceso también interviene la hormona tirosina secretada por la glándula tiroides en desarrollo, la cual hace que el endotelio bombee iones Na^+ desde el estroma hacia la cámara anterior y así se produce pérdida de agua del estroma, ya que las moléculas de agua van a seguir a los iones Na^+ .¹¹⁸ Cuando la producción de una MEC con fibras se completa, la córnea embrionaria presenta ya el 100% de la transparencia final.¹¹¹

Tanto la membrana de Bowman como la capa de Descemet son segregadas durante el desarrollo por las células epiteliales y endoteliales respectivamente.

Durante el desarrollo post natal, los queratocitos continúan proliferando y producen MEC, aunque a niveles más bajos que en el desarrollo embrionario tardío, lo que causa que la córnea siga creciendo en diámetro durante este periodo como resultado de una expansión uniforme.¹¹⁹ Se cree que este crecimiento diferencial puede dar lugar a la forma refractiva de la córnea.¹²⁰

4. CICATRIZACIÓN CORNEAL

Un daño en la córnea va a dar lugar a una cascada de procesos cuyo fin es la curación del daño producido y la recuperación de la visión. La cicatrización pone en marcha numerosos procesos biológicos como: apoptosis, proliferación, diferenciación, migración, secreción de nueva MEC y establecimiento de nuevas comunicaciones intercelulares. Todo ello engloba interacciones mediadas por citoquinas entre células epiteliales, queratocitos del estroma, terminaciones nerviosas, glándulas lagrimales, película lagrimal y células del sistema inmune. Esta respuesta es muy similar en las diferentes especies, sin embargo, dentro de la misma especie existe variabilidad dependiendo del tipo de daño que desencadena la respuesta (diferentes tipos de cirugía corneal, infecciones, traumas, quemaduras...).

4.1. Citoquinas.

La integridad de la superficie ocular y el proceso de curación de heridas corneales dependen de un delicado balance entre los procesos celulares anteriormente citados (proliferación, diferenciación, migración y apoptosis). Existe una gran variedad de citoquinas (CK) presentes en la córnea y en la lágrima que regulan estas funciones celulares. Estas CK juegan un papel transcendental en el mantenimiento de la función corneal normal, son un grupo de proteínas o glucoproteínas secretadas, de bajo peso molecular (por lo general menos de 30 kDa), producidas por diferentes tipos celulares pertenecientes al sistema inmune (ej: macrófagos y linfocitos T) o no pertenecientes al mismo (ej: fibroblastos y células epiteliales).

Estas proteínas, en la mayoría de los casos, actúan de forma auto- o paracrina produciendo efectos muy variables que comprenden: la modulación de la respuesta inmune, el crecimiento y diferenciación celular, la reparación tisular y la angiogénesis, entre otras. Estas son producidas como respuesta a un estímulo (daño), y se unen de forma transitoria a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción intracelular de señal que altera el patrón de expresión génica, de modo que las células diana dan lugar a una determinada respuesta biológica.

La producción de CK suele ser breve, limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo. En muchos casos esto es debido a que los correspondientes mRNA tienen una vida media corta.

Introducción

La afinidad de cada receptor hacia su CK correspondiente suele ser bastante alta, del orden de femtomolar (10^{-15} M) o picomolar (10^{-12} M).

Las citoquinas se clasifican en varios grupos, entre ellos está el de los **factores de crecimiento (Growth Factors, GF)**. Los GF representan en su conjunto un gran grupo de polipéptidos que tienen en común la capacidad de inducir la multiplicación celular tanto *in vivo* como *in vitro* y además poseen otras acciones importantes como el mantenimiento de la supervivencia celular, la estimulación de la migración y producción de cambios fenotípicos que influyen en la invasión celular o en los procesos de apoptosis.

Los GF actúan a muy baja concentración (pico gramo) y poseen receptores (tirocinquinasas o serina/treonina-quinatas) en las membranas de las células que permiten que se transduzcan señales a su interior. Al ser estimulados se fosforilan y activan una cascada de segundos mensajeros que finaliza con la activación de un conjunto de genes.

Entender la producción y función de determinados GF en tejidos oculares como la córnea, conlleva a mejorar el mantenimiento y la modulación del proceso de cicatrización, en el cual dichas citoquinas juegan un importante papel dirigiendo el comportamiento celular. Existen considerables evidencias de que los GF activan a los queratocitos para reparar el estroma corneal.^{121, 122} Estos pueden proceder de 4 fuentes diferentes:

- Procedentes de la lágrima.^{123, 124}
- Producidos por macrófagos transitorios presentes en la córnea y otras células inflamatorias como neutrófilos y linfocitos que invaden el estroma horas después del daño.¹²⁵⁻¹²⁷
- Procedentes del epitelio corneal dañado.^{128, 129}
- Procedentes de la producción autocrina de los propios queratocitos activados por el daño.¹³⁰

Entre los GF que intervienen en el proceso de cicatrización corneal en respuesta a un daño están: el factor de necrosis tumoral- α (TNF α), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Los tres últimos están presentes tanto en la lágrima como en las

diferentes capas de la córnea y activan a los queratocitos para que inicien procesos de proliferación, migración y/o diferenciación celular.

4.1.1. El factor de crecimiento transformante β (TGF β).

El **TGF β** fue descubierto en 1983 y desde entonces se ha establecido como uno de los GF más importantes durante el proceso de cicatrización en la mayoría de las especies y tejidos, incluyendo la córnea.¹³¹⁻¹³³ Está implicado en procesos de proliferación¹³⁴, diferenciación¹³⁵ y producción de MEC.¹³⁶ En vertebrados se han descrito dos tipos de receptores: el TGF β RI y el TGF β RII, pero sólo el TGF β RII es selectivo para el TGF β . Ambos receptores se localizan en las 3 capas celulares de la córnea, principalmente en la capa basal del epitelio.^{137, 138}

El TGF β es secretado generalmente asociado con un péptido de latencia (LAP) que forma un complejo inactivo que se une con alta afinidad a la MEC creando reservorios de TGF β en forma latente.¹³⁹ La activación del factor de crecimiento ocurre a través de disociaciones proteolíticas del complejo mediante uniones enzimáticas extracelulares o a la membrana celular.¹⁴⁰

En mamíferos, dentro de la familia del TGF β hay 3 isoformas (TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3) todas ellas son proteínas homodiméricas de 25 kDa homólogas aunque sus secuencias de aminoácidos son codificadas por tres genes diferentes lo cual hace que presenten funciones también diferentes. Las tres isoformas están presentes tanto en la lágrima como en la córnea y se expresan durante el proceso de cicatrización. El TGF β 1 y el TGF β 2 se localizan en el epitelio y en el estroma y ambos son constituyentes de la lágrima.¹⁴¹ Contribuyen a la activación de células estromales en la zona de la herida en fases tempranas de la cicatrización y también en la fase de fibrosis subepitelial temporal (activación de queratocitos y producción de MEC) que tiene lugar en fases más tardías de la misma. Las diferencias funcionales entre ambas isoformas no están muy claras, sin embargo, se especula que la implicación del TGF β 1 es más importante¹³⁷ debido a que en un estado basal, el TGF β 2 es detectado principalmente en córnea y en lágrima, mientras que el TGF β 1 se detecta como resultado de un daño corneal, jugando un importante papel durante el proceso de cicatrización.¹⁴¹ Aunque se ha aislado mRNA de la isoforma β 3 de córneas enteras a muy bajos niveles, su localización en el tejido no está clara y la proteína no ha sido detectada en córneas no patológicas.¹⁴²

El **TGFβ1** inhibe el crecimiento de células epiteliales (retrasando el proceso de re-epitelización), endoteliales y leucocitos y estimula la proliferación de queratocitos.^{143, 159} También potencia la repoblación del área cercana a la herida y promueve la transformación de los queratocitos en miofibroblastos, siendo el único factor de crecimiento capaz de inducir la expresión de actina-α de músculo liso en células estromales, tanto en cultivos celulares como en cultivos de córneas enteras.^{132, 144} Durante el proceso de cicatrización, los **miofibroblastos** corneales son los responsables de procesos de contracción de la herida y de la deposición y organización de la matriz extracelular.^{145, 146} El TGFβ1 ha sido identificado como el principal responsable de la diferenciación celular de los queratocitos a miofibroblastos en diferentes especies.^{132, 134, 144, 147-150} En ocasiones los miofibroblastos permanecen en la zona de la herida cuando el proceso de curación ha finalizado dando lugar a tejido fibrótico.^{151, 152} La presencia de fibrosis en la córnea puede producir opacidad corneal (haze)^{153, 154} o una mala progresión de una cirugía si el daño producido ha sido consecuencia de la misma.^{155, 156} Sus receptores se localizan en el estroma y en el epitelio¹⁵⁷ mientras que el propio GF se ha detectado en bajas cantidades en los tres tipos principales de células corneales.^{140, 158}

Los efectos del TGFβ en la córnea son mediados por las proteínas Smad y por otras vías independientes de las mismas dependiendo del tipo celular.^{147, 160, 161} La caracterización y modulación de estas vías en queratocitos y en células derivadas de la médula ósea está actualmente en investigación.

La interleuquina 1 (IL-1), es una citoquina con efectos opuestos al TGFβ1 en la viabilidad de los miofibroblastos, estando implicada en la apoptosis de los mismos.¹⁶² Es producida por células epiteliales, fibroblastos, queratocitos e incluso por células inflamatorias como monocitos, y puede actuar de forma paracrina o autocrina estimulando la apoptosis de los miofibroblastos cuando la estimulación por TGFβ1 para el desarrollo de los mismos disminuye. También se expresa en miofibroblastos y en células estromales αSMA negativas in situ tras la producción de un daño.¹⁶³

4.1.2. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

Otra citoquina implicada en el proceso de cicatrización corneal es el PDGF. El **PDGF** es un dímero formado por dos cadenas, A y B. Existen 3 isómeros (PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB) que presentan características biológicas diferentes.¹⁴⁰ Media sus efectos a través de la activación de receptores tirosina quinasas que también se encuentran en

forma heterodimérica (PDGFR- $\alpha\beta$) y monomérica (PDGFR α y PDGFR β) localizándose en fibroblastos corneales¹⁵⁷ y en células endoteliales.¹⁴⁰ Se han descrito dos principales vías de señalización: la vía Akt activada mediante la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) activada mediante ras (proteína G monomérica perteneciente a la familia de las pequeñas GTPasas).¹⁶⁴ La isoforma PDGF-BB es producida únicamente por el epitelio donde se acumula y se une a la membrana basal.¹⁶⁵ Tiene efectos mitogénicos¹⁶⁶ y quimiotácticos^{167, 168} sobre los fibroblastos corneales y media en la respuesta proliferativa de estos al TGF β , ya que es necesario para que se produzca la entrada de las células en el ciclo celular. Además, es necesario para que el proceso de diferenciación miofibroblástica tenga lugar actuando en sinergia con el TGF β .¹⁶⁹ Aunque el mecanismo molecular mediante el cual este proceso de diferenciación (de queratocito a miofibroblasto) tiene lugar es desconocido, se ha especulado que el TGF β induce la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$, de fibronectina y de PDGF facilitando la interacción de ligandos y receptores para que se produzca el ensamblaje de filamentos de actina y se formen contactos focales obteniendo como resultado la extensión celular, la entrada en ciclo de la célula y la expresión de actina α de músculo liso.¹⁶⁹

Al PDGF-BB también se le atribuye la pérdida de una de las principales cristalinas corneales, la transcetolasa (TKT), que tiene lugar durante la activación de los queratocitos mientras que no se ha observado una disminución de otra de las principales cristalinas corneales, la aldehído deshidrogenasa 1A1 (ALDH1A1), cuya expresión está controlada por las vías de señalización que son activadas por TGF β .¹⁷⁰ Un estudio reciente indica que el PDGF estaría actuando directamente sobre la estabilidad de la proteína TKT, que podría ser pasivamente diluida cuando las células comienzan a dividirse por la acción del mismo ya que los niveles de expresión de su mRNA no se ven afectados por dicho factor.¹⁷¹

4.1.3. El factor de crecimiento fibroblástico (FGF).

Otro factor de crecimiento implicado en el proceso de cicatrización corneal es el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Maltseva y cols., (2001)¹⁵¹ describieron que dicho factor era capaz de revertir el fenotipo miofibroblástico a un fenotipo fibroblástico *in vitro*, pero este hecho aún no ha sido demostrado *in vivo*.

El **bFGF** pertenece a la familia del **FGF** que está formada por aproximadamente 20 proteínas diferentes, las cuales se distribuyen en un amplio rango de tejidos regulando

diferentes procesos celulares como: la proliferación, diferenciación, migración, secreción de MEC y angiogénesis a través de varias vías de señalización.^{143, 172} Su actividad está mediada por la unión a proteoglicanos de heparán sulfato con baja afinidad que los protegen de la degradación y favorecen la unión a receptores de la superficie celular RTK (receptores tirosina quinasa) con alta afinidad ¹⁴³ (**Fig. 8**).

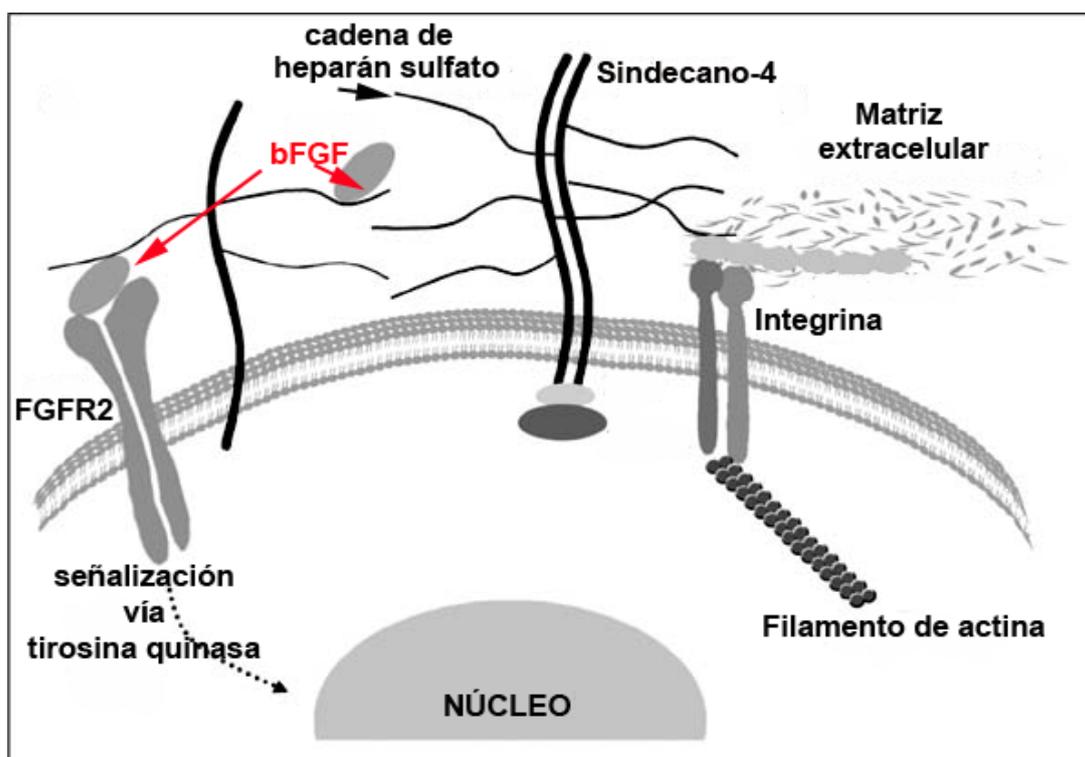


Figura 8. Esquema representativo de la unión del bFGF a su receptor de alta afinidad (FGFR2) en la superficie celular promoviendo la formación del complejo de señalización necesario para que se active la vía de señalización tirosina quinasa hacia el núcleo celular. Esquema tomado y modificado de Lopes C. C, Dietrich C. P, y Nader H. B., 2006.¹⁷³

El bFGF (también denominado FGF2) y su receptor (FGFR2, también denominado bek) se expresan en los tres principales tipos celulares corneales, aunque la expresión del receptor es mayor en los queratocitos y la de la proteína es mayor en células epiteliales.^{121, 158} Este factor de crecimiento tiene efecto mitogénico en células epiteliales, endoteliales y estromales. La adición de bFGF en cultivo incrementa la proliferación y la migración de las células estromales e inhibe la expresión de TGF β 1, mientras que la presencia inicial de TGF β 1 parece potenciar la subsiguiente producción y respuesta al bFGF mediante interacciones con proteoglicanos.¹⁴³ Ambos factores tienen efectos diferentes sobre el fenotipo celular. Las vías de señalización que utiliza cada factor son distintas: los receptores del bFGF son tirosina quinasa mientras que los del TGF β 1 son serina/treonina quinasa. Existen evidencias de que ambas vías convergen en la regulación de las proteínas Smad.^{174, 175} La activación transcripcional del TGF β 1

requiere la translocación de dichas proteínas hacia el núcleo ^{160, 176} y, por otro lado, el bFGF puede inducir la fosforilación de residuos de los dominios tanto estimuladores como inhibidores de las proteínas Smad provocando que la señalización a través del receptor del bFGF no permita la translocación al núcleo inducida por TGFβ ¹⁷⁴, en consecuencia el efecto del TGFβ se ve bloqueado.

4.2. Etapas del proceso de cicatrización corneal.

Las diferentes etapas del proceso de cicatrización han sido seguidas detalladamente en diferentes modelos animales. Como se ha descrito previamente, este proceso está regulado por un gran número de citoquinas (CK) presentes tanto en la lágrima como en la córnea, que actúan como importantes reguladores de todos los subprocesos que acontecen durante dicho proceso y cuya actuación va a tener lugar de forma secuencial y ordenada. Los primeros minutos después de que se haya producido el daño se van a secretar CK como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral-α (TNFα) por las células epiteliales dañadas y se cree que estas CK van a dar lugar a la **apoptosis** de las células del estroma (primera respuesta detectable en el estroma durante proceso de cicatrización).^{165, 177, 178}

La IL-1 es un regulador del proceso de cicatrización que incrementa la expresión de factores de crecimiento tanto en el epitelio como en el estroma.¹⁶⁵

Las células epiteliales más próximas al lugar del daño comienzan a cubrir la zona minutos después de la producción del daño, mediante una combinación de procesos de migración y extensión precedidos por cambios celulares a nivel anatómico, fisiológico y bioquímico, entre los que se incluyen la formación de extensiones en la membrana, desaparición de hemidesmosomas y un incremento en la producción energética mitocondrial. Esta fase temprana tiene lugar a una velocidad de unas 60-80 μm por hora.¹⁷⁹ Durante las primeras 12-24 h, existe una entrada de células inflamatorias dentro de la córnea desde los vasos del limbo y de la lágrima. Las citoquinas liberadas desde el epitelio dañado se unen a sus receptores en los queratocitos, lo cual estimula la producción de factores quimiotácticos para las células inflamatorias. El TGFβ1 es también un importante mediador para el paso de fibroblastos, monocitos y macrófagos hacia el foco inflamatorio. El incremento de la actividad del factor de crecimiento nervioso (NGF) facilita la supervivencia de células del sistema inmune. Estas células inflamatorias van a eliminar restos apoptóticos y van a liberar PDGF-BB, que media en el proceso de cicatrización.

Introducción

Aproximadamente 7 días después de que se haya producido el daño va a tener lugar una elevada producción del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) por los queratocitos. Esto, unido a la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGF), va a estimular la proliferación de las células epiteliales.¹⁸⁰ La liberación de otro factor de crecimiento como es el PDGF-BB desde las células epiteliales promueve la quimiotaxis de los fibroblastos ¹⁶⁵ y potencia la expresión de KGF y HGF, estimulando el crecimiento epitelial.¹⁵⁷ Posteriormente, las células epiteliales van a liberar activador del plasminógeno con lo cual se va a producir plasmina que activa el TGF β latente. El TGF β regula el efecto sobre la proliferación que tienen otros factores de crecimiento sobre las células epiteliales y además, media la respuesta migratoria de los fibroblastos.^{181, 182} En ese momento, las células epiteliales pueden entrar en comunicación con los fibroblastos, lo que a su vez afecta a la recuperación del epitelio a través de la producción de más factores de crecimiento. La curación del epitelio mediada por estos factores comienza horas después del daño para restaurar la función de barrera que ejerce el epitelio sobre la herida. Mientras que las células del limbo proliferan en respuesta a EGF y KGF en particular, las células separadas de la herida, comienzan a migrar a través de la formación de filamentos de actina y contactos focales,¹⁸³ inducidas por HGF ¹⁵⁷ y EGF ^{158, 183} sobre una matriz provisional de fibronectina que se acumula en la zona de la herida.¹⁸⁴ La fibronectina de la MEC se cree que es el elemento clave para la adhesión célula-sustrato y para la migración. Esta proteína no está presente en la membrana basal de células epiteliales en condiciones normales, pero se detecta durante las primeras 8 horas después de producirse la lesión.¹⁸⁵ Se cree que existe una producción endógena de fibronectina que es sintetizada por células epiteliales para promover la adhesión.¹⁸⁶

Una vez alcanzada la confluencia en el epitelio, las células proliferan y finalmente se diferencian para formar un epitelio normal estratificado;^{158, 183} la matriz de fibronectina desaparece y la composición de la membrana basal normal formada por colágeno y laminina, es restaurada.¹⁸³

La presencia de TGF β observada en estadios posteriores durante la cicatrización en el estroma, inhibe la expresión de HGF y KGF lo cual previene del exceso de proliferación epitelial.^{157, 187}

Una vez que el epitelio y la membrana basal han sido reparados, las células inflamatorias desaparecen y comienzan a tener lugar otro tipo de eventos que regulan el proceso de cicatrización, como es la interacción recíproca de las células con la MEC.

El proceso de cicatrización estromal engloba tres fases: **reparación, regeneración y remodelado.**⁹² De forma similar al proceso de cicatrización que tiene lugar en la piel,

La cicatrización en el estroma engloba citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas; Sin embargo cabe destacar una gran diferencia con la piel que es la carencia del componente vascular para la curación.¹⁸⁸

La activación de los queratocitos y la migración de los mismos son las primeras respuestas que se producen tras un daño en el estroma y pueden tener lugar horas después de la producción del mismo. Los queratocitos de la zona dañada sufren apoptosis, observándose (en el conejo) un pico 4 horas después del daño.¹⁸⁹ Este proceso de apoptosis modula la respuesta cicatricial ya que da lugar a la activación de los queratocitos adyacentes al área dañada. Estas células se activan y adquieren fenotipo fibroblástico ¹²⁹ (Fig. 9).

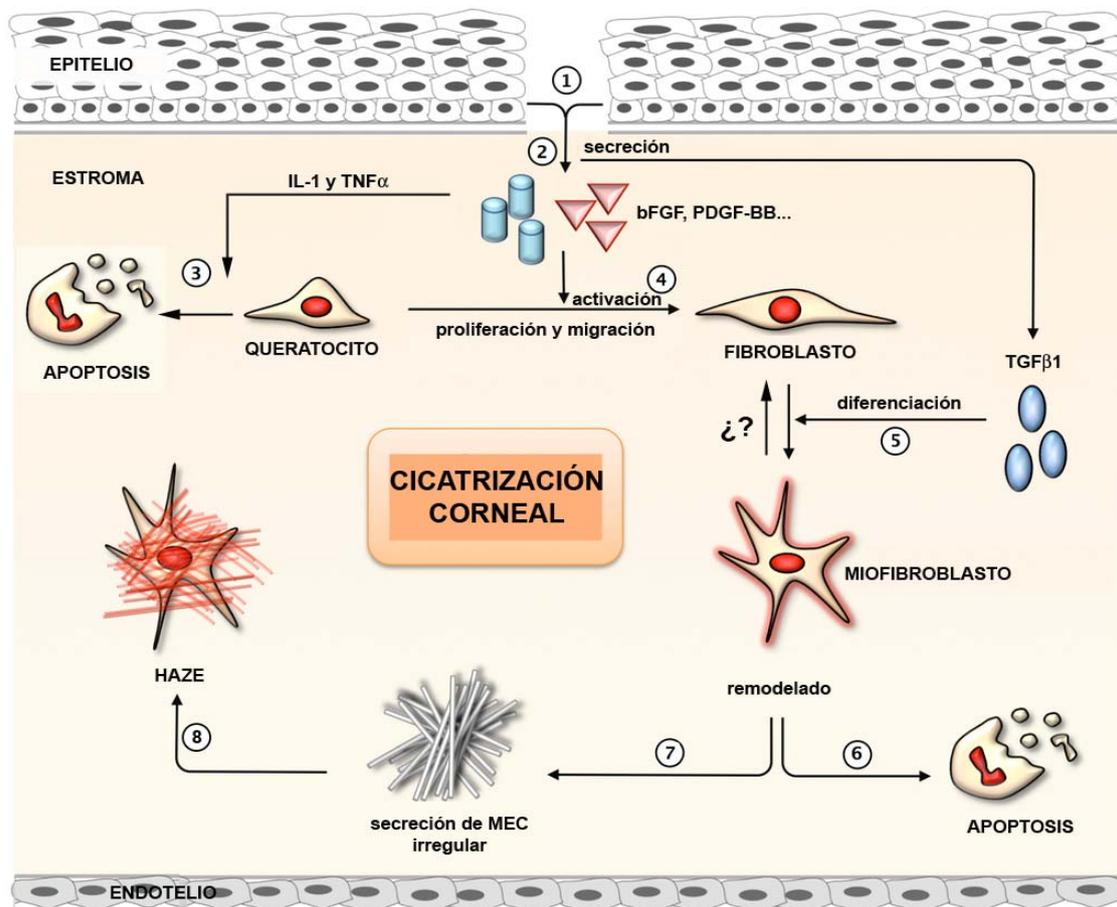


Figura 9. Representación esquemática del proceso de cicatrización corneal. (1) Ruptura epitelial con afectación de la membrana basal; (2) Liberación de citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento desde el epitelio hacia el estroma anterior; (3) Inducción de apoptosis de los queratocitos de la zona dañada; (4) Activación de los queratocitos presentes en la zona cercana a la herida y adquisición de fenotipo fibroblástico; (5) Diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos por acción del TGF β 1; (6) Entrada en apoptosis de los miofibroblastos una vez concluida la fase de reparación; (??) Diferenciación hacia fibroblastos; (7) Secreción de una matriz extracelular irregular por los miofibroblastos; (8) Observación clínica del hazy debido a la permanencia de miofibroblastos y a la presencia de una matriz extracelular irregular. Esquema tomado y modificado de Chaurasia S.S y cols 2015.¹⁹⁰

La **morfología de los queratocitos** sugiere una transición entre dos fenotipos, el de los queratocitos quiescentes y el de los fibroblastos o queratocitos activos, con forma fusiforme, múltiples nucléolos, retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, ribosomas libres, aparato de Golgi y numerosas vesículas en un citoplasma de mayor tamaño que el de los queratocitos quiescentes.¹³⁵

Estos cambios se producen aproximadamente **6 horas** después de la producción del daño, y durante las primeras **24 horas**, los **queratocitos activados** migran hacia la zona acelular que se ha producido tras la apoptosis inicial y a las **48 horas** alcanzan el margen de la herida (tiempos referidos al conejo).

La activación de los queratocitos, da lugar a la activación de la síntesis de la subunidad $\alpha 5$ de las integrinas lo cual da lugar a la formación del heterodímero $\alpha 5\beta 1$, principal receptor de la fibronectina. Esto tiene lugar de forma simultánea a la deposición de la misma en el área dañada. La formación de este receptor hace posible la formación de adhesiones focales, lo cual contribuye a la capacidad de los fibroblastos para migrar sobre la matriz provisional de fibronectina.¹⁹¹

En condiciones normales, esta integrina se localiza en la superficie de las células basales epiteliales, pero no está presente en el estroma. Sin embargo, la expresión de la subunidad $\alpha 5$ ha sido detectada en regiones de formación de cicatrices corneales.¹⁹² Estudios realizados en cultivos de fibroblastos de conejo muestran cómo esta integrina se expresa en fibroblastos pero no en los queratocitos.^{95, 193} Los fibroblastos *in vitro* producen las mismas integrinas que las localizadas *in situ* y además la $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$.⁹⁷ No se conoce bien si la conversión de queratocito a miofibroblasto *in vivo* está acompañada por cambios en la expresión y función de integrinas y si esto es reversible o no.

Las integrinas intervienen probablemente en el ensamblaje y mantenimiento del colágeno con los PG de la matriz aunque los datos en la córnea son escasos. Hay estudios que muestran cómo la polimerización de los colágenos tipo I y III depende de la fibronectina.¹⁹⁴ La formación del receptor de la fibronectina hace posible la formación de adhesiones focales, lo cual contribuye a la capacidad de los fibroblastos para migrar sobre la matriz provisional.¹⁹¹

La migración celular requiere del movimiento de los microfilamentos de actina del citoesqueleto en respuesta a señales desde el ambiente extracelular. Este proceso se realiza mediante el desensamblaje de adhesiones focales presentes en la parte posterior celular (*trailing edge*) y el ensamblaje o formación de nuevos complejos focales

en el margen delantero o frente de avance (*leading edge*).^{195, 196} Las adhesiones focales actúan como anclajes moleculares, aportando la tracción que impulsa el cuerpo celular hacia el frente de avance y media la retracción de la parte posterior del cuerpo celular. Por otro lado, tanto la presencia de un exceso de adhesiones focales entre la célula y el sustrato como la presencia de un número muy bajo de las mismas, dan como resultado la ausencia o enlentecimiento del movimiento celular.¹⁹⁷ Debido a este hecho, tiene que existir un balance óptimo entre el ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales para que la célula se pueda extender, elongar y migrar.

Las adhesiones focales están formadas por proteínas multiméricas que aportan la unión estructural de las integrinas de la superficie celular, ligando de forma bidireccional la MEC y el citoesqueleto intracelular formando complejos.¹⁹⁸ El correcto funcionamiento de estos complejos proporciona la regulación de procesos tales como el estiramiento, la proliferación y la supervivencia celular^{198, 199} ya que la formación de nuevas adhesiones focales es esencial para que el movimiento celular tenga lugar adecuadamente.^{198, 200-204}

Entre las proteínas localizadas en la parte intracelular de las adhesiones focales que se sitúan en el frente de avance celular está la **quinasa de adhesión focal (FAK)**, que es una proteína tirosina quinasa de 125 kDa implicada en diferentes procesos celulares entre los que se incluyen la diferenciación, la proliferación y la migración celular.²⁰⁰ Cuando se forman los complejos focales, FAK induce de forma directa la fosforilación de la paxilina (otra de las proteínas implicadas en la formación de adhesiones focales), que como efector de FAK genera vías de señalización que regulan la motilidad, supervivencia y proliferación celular.²⁰⁵ Todo ello indica la importancia del papel de FAK durante los diferentes eventos que tienen lugar para que el proceso de cicatrización se lleve a cabo correctamente.

Entre las **48 y 72 primeras horas** comienza la **proliferación** de los fibroblastos que han alcanzado la zona de la herida y continúa durante varios días después del daño (en el conejo).^{165, 206} En este momento, la actividad sintética de los fibroblastos se centra en la formación de una MEC provisional cuya composición es diferente a la del estroma no dañado. El principal cambio es la síntesis de fibronectina.¹⁴⁵ La proporción de los tipos de colágeno sintetizados también es diferente de los tipos encontrados en la MEC del estroma normal,^{207, 208} y lo mismo ocurre con la síntesis de PG.^{76, 208} La alteración de la composición de la MEC y la desorganización de su deposición contribuyen a la opacidad corneal que se produce durante el proceso de curación.

La liberación de PDGF-BB y TGF β 1 desde el epitelio hacia el estroma incrementa la proliferación y la migración celular.^{135, 165} Los factores de crecimiento PDGF-BB, EGF e IGF (factor de crecimiento semejante a la insulina) parecen jugar un papel importante inhibiendo la apoptosis de los fibroblastos que ha sido iniciada previamente como respuesta al daño.^{209, 210} En respuesta a la IL-1, los queratocitos se vuelven competentes para la producción de más IL-1 y entran en circuitos de auto-renovación modulando la producción de factores de crecimiento, la cicatrización epitelial y la remodelación de la matriz.^{135, 177}

Durante la etapa de contracción del proceso de cicatrización, aparece un nuevo tipo celular: **los miofibroblastos**.

Estas células se caracterizan por la expresión de actina- α de músculo liso (α -SMA).^{146, 211} Esta isoforma, a diferencia de la β y la γ que están presentes en todos los tipos celulares, normalmente sólo se localiza en células del tejido muscular liso. Sin embargo, la actina- α también puede ser expresada de forma transitoria en algunas células no musculares incluyendo los miofibroblastos tanto en tejido fibrótico como en cultivo. Su expresión coincide con la invasión temporal de los fibroblastos a la zona de la herida permaneciendo en las células alguna semanas, tiempo que coincide con el proceso de contracción durante la cicatrización ya que la expresión de dicha proteína aporta propiedades contráctiles a la célula.^{33, 146} Por otro lado, además de presentar más fibras de estrés y adhesiones focales que los fibroblastos, la expresión de actina- α inhibe la motilidad celular.²¹²

Estudios recientes sobre el origen de los miofibroblastos indican que dichas células, además de originarse a partir de los propios queratocitos estromales, provienen de células derivadas de la médula ósea que alcanzan el estroma corneal en respuesta a un daño epitelial, migrando desde el limbo hasta el estroma.²¹³⁻²¹⁶ Una vez alcanzada la zona en la que se ha producido el daño, dichas células precursoras comienzan un proceso de diferenciación ordenada que también tiene lugar en los queratocitos. En primer lugar comienzan a expresar altos niveles de vimentina, posteriormente se vuelven α SMA positivas y, en estadíos más tardíos, se vuelven también desmina positivas. La expresión de los tres marcadores es indicativa de la presencia de miofibroblastos maduros responsables de la presencia de un haze prominente.²¹⁷

Los miofibroblastos también se caracterizan por la producción elevada de HGF, KGF, heparán y queratán sulfato, colágeno y metaloproteasas de matriz para la remodelación del estroma.^{151, 165} Así mismo, el descenso de producción de cristalinas comparado con la que presentan los queratocitos también se asocia a la pérdida de transparencia debida a la presencia de miofibroblastos.³¹

Introducción

La diferenciación hacia este fenotipo es inducida por la presencia de TGF β 1¹⁵¹ y la acción del PDGF-BB, en sinergia con el TGF β 1, es necesaria para que se lleve a cabo este cambio fenotípico aunque la diferenciación inducida por PDGF-BB tiene lugar en estados avanzados del proceso de diferenciación, ya que en primer lugar este factor da lugar a una diferenciación hacia fenotipo fibroblástico, indicando que dicho fenotipo no limita la posibilidad de adquirir fenotipo miofibroblástico.¹⁶⁹ El epitelio produce niveles altos de TGF β 1 y PDGF-BB^{158, 168, 218} uniéndose con alta afinidad a la membrana basal,^{168, 219} por lo que probablemente no penetran en el estroma a niveles suficientemente altos como para modular el desarrollo de los miofibroblastos hasta que se produce un daño o ruptura de la membrana basal. Si el proceso de cicatrización no se produce adecuadamente y hay defectos estructurales o funcionales en la membrana basal epitelial, ambos factores de crecimiento continúan penetrando hacia el estroma anterior y mantienen el desarrollo de miofibroblastos.

Con el tiempo los fibroblastos se van a volver quiescentes y algunos miofibroblastos permanecen después del proceso de cicatrización.^{151, 165} Todavía no se conoce si los miofibroblastos entran en apoptosis o revierten al fenotipo propio de los queratocitos.^{151, 169}

Diferentes estudios han mostrado que el bFGF puede inducir la conversión de los miofibroblastos a fibroblastos en cultivo pero dicha respuesta no está probada *in vivo*.¹⁵¹ Además, mientras que inicialmente se ha observado un incremento significativo de uniones de TGF β 1 en el margen de la herida, se ha descrito que el bFGF inhibe la expresión de TGF β 1 modulando respuestas más tardías durante el cierre de la herida,¹⁴³ lo cual está indicando que existe una regulación temporal de ambos factores que controlan la diferenciación de las células estromales durante la cicatrización corneal.

Los miofibroblastos presentes en la zona de hiper celularidad pueden volverse miofibroblastos maduros que contienen α -SMA¹⁴⁶ y además producen altos niveles de colágeno, ácido hialurónico y biglicano así como bajos niveles de KSPG dando lugar a una matriz desorganizada y opaca. En esta matriz es característico encontrar niveles elevados de colágeno tipo III, considerado como uno de los principales marcadores del remodelado de la matriz observado tras un daño corneal ya que se expresa de forma abundante durante los primeros momentos de la cicatrización.⁸⁶ Actualmente, está considerado como signo de diferenciación miofibroblástica, daño corneal y fibrosis.^{60, 220, 221}

De forma alternativa, los miofibroblastos se pueden volver fibroblastos, los cuales, al igual que los queratocitos de la córnea en desarrollo, producen altos niveles de

colágeno, queratocano y lumicano con cadenas de KS, dando lugar a una MEC organizada que restaura la transparencia.^{75, 76, 84, 208, 222, 223}

La transparencia también puede ser restaurada a partir de la MEC desorganizada y opaca mediante recambio y producción de una MEC organizada.^{76, 86} En este caso, los miofibroblastos deberían convertirse en fibroblastos o ser reemplazados por ellos. Basándose en los niveles de proliferación y producción de la MEC, el proceso de cicatrización estromal puede dividirse en una fase inicial de hiper celularidad, que principalmente consiste en proliferación seguida de una fase de estratificación que consiste fundamentalmente en síntesis de PG y colágeno.

Semanas o meses después del daño y de la cicatrización, la córnea es restaurada a su estado normal, se eliminan las células inflamatorias y los fibroblastos y/o miofibroblastos, y las células estromales recobran su estado de quiescencia. A su vez, la expresión de factores de crecimiento y de sus receptores vuelve a su estado basal. También tiene lugar la remodelación de la matriz de colágeno del estroma, se elimina el tejido cicatricial y el epitelio recupera su espesor normal. Pero en ocasiones, el proceso de curación del estroma puede durar meses o años y el resultado final a veces es la pérdida de la transparencia.

El **proceso de remodelación** del tejido corneal reparado fue descrito en 1977 por Cintron y cols.,²⁰⁸ quienes documentaron el re-establecimiento en capas paralelas de las lamelas de colágeno de la zona dañada posterior a una deposición de tejido fibrótico opaco en la misma. Posteriormente observaron que el tamaño de las fibras de colágeno se vuelve progresivamente más regular y ordenado durante dicho periodo, que tiene lugar aproximadamente durante los 2 años siguientes tras la producción del daño, coincidiendo con la recuperación de la transparencia corneal después de una herida incisional.⁷⁵

Durante este periodo de remodelación, la tasa de recambio del colágeno es mucho más elevada que la que presenta la córnea en condiciones normales,²²⁴ y los principales mediadores del recambio que sufre el colágeno son cuatro miembros de la familia de las metaloproteasas de la matriz (MMP): la colagenasa, la estromelisin-1, la gelatinasa-A y la gelatinasa-B, todas ellas son enzimas proteolíticas ²²⁵⁻²²⁸ responsables del remodelado de la MEC, de la interacción célula-matriz, del reclutamiento de células inflamatorias y de la activación de citoquinas.²²⁹ En la córnea estas proteínas tienen gran importancia para que la reorganización del colágeno tenga lugar de manera adecuada tras el daño estromal.⁶² La sobreexpresión de MMP junto con la activación de citoquinas proinflamatorias pueden ser las responsables de la pérdida de colágeno IV específico

de la membrana basal epitelial y, por lo tanto, de la aparición del haze.²³⁰ Se cree que la interacción entre citoquinas, MMP y otros mediadores juega un papel decisivo en la regulación del remodelado durante el proceso de cicatrización, más que la mera presencia o ausencia de MMP.²³¹

En la córnea humana en estado normal únicamente se ha detectado la Gelatinasa A como proenzima asociada a su inhibidor.²³² Esta metaloproteasa reacciona frente a la fibronectina, al colágeno desnaturalizado y a componentes de la membrana basal, localizándose en el estroma pero también procede en gran parte de la difusión existente del humor acuoso.²³³

Por otro lado, el epitelio también controla la expresión de MMP durante la reparación del tejido, liberando sustancias como factores de crecimiento que pueden estimular o inhibir la producción de colagenasa por las células estromales.^{158, 234} Esta interacción entre epitelio y estroma es importante durante las primeras fases de la cicatrización, pero en fases más avanzadas, cuando la función barrera epitelial ya ha sido restaurada, la interacción entre ambos tejidos tiene menor importancia y es la interacción entre la MEC y las células estromales la que pasa a tener el control de los factores implicados en la expresión de MMP, como la colagenasa.²³⁵⁻²³⁷ En este proceso tiene un papel importante la IL-1, ya que la capacidad de los queratocitos para producirla en respuesta a las señales de remodelación independientes del epitelio, es esencial para la reparación del tejido. Esta capacidad aporta a la célula autonomía para controlar la producción de colagenasa y, por lo tanto, controlar el proceso de remodelación del tejido reparado en el cual las células residen.⁶²

Aunque no suelen ser frecuentes los **daños endoteliales**, hay que tenerlos en cuenta también a la hora de hablar del proceso de cicatrización corneal. Estos dan lugar a la ruptura rápida de la capa celular. Esta ruptura es similar a la producida por daños observados tras una excesiva curvatura corneal en cirugías en las que se realizan grandes incisiones tales como la extracción extracapsular de cataratas.² Las células endoteliales carecen de capacidad mitótica *in vivo*, por lo que cuando las células son dañadas, estas son reemplazadas rápidamente por crecimiento de las células que las rodean y por la migración centripeta de estas hacia la zona dañada. Este proceso tiene lugar en tres fases que se dan en varias semanas. La primera se caracteriza por el establecimiento de una cobertura inicial de la herida por migración de las células adyacentes que da lugar a una barrera temporal e incompleta con lugares de bombeo reducidos y uniones ocluyentes incompletas. En la segunda fase la barrera anteriormente formada adquiere un número y calidad de bombas similar al que presenta

el endotelio en su estado normal y las células forman polígonos irregulares. El espesor corneal recupera su estado normal y se restaura la transparencia. La tercera fase puede durar meses e implica la remodelación de las células endoteliales para que adquieran forma hexagonal más regular.¹⁰⁰

Cuando el daño es más severo, como en el caso de patologías como el queratocono, la membrana de Descemet puede rasgarse o romperse. Cuando esto ocurre, las células endoteliales que migran son requeridas para producir nueva membrana, en este momento se observaría edema endotelial el cual se resuelve cuando la membrana es reparada.²

5. MODELOS DE CICATRIZACIÓN CORNEAL

La aplicación de diferentes técnicas quirúrgicas que modifican el poder refractivo corneal ha adquirido gran incidencia durante las dos últimas décadas y con ello el incremento de los conocimientos sobre los mecanismos de reparación corneal. La cirugía refractiva corneal, de la misma manera que la cirugía intraocular, requiere extremar la atención tanto en la anatomía como en la fisiología de la córnea. La aparición del haze corneal y de la ectasia progresiva son complicaciones de este tipo de cirugía. El haze parece estar relacionado con un incremento inicial de citoquinas y con un aumento de la activación de los queratocitos cuando la membrana de Bowman se daña, dando lugar a una alteración de los procesos de curación del estroma.²³⁸ Estudios previos han mostrado la presencia de irregularidades en la configuración de la membrana basal, la presencia de vacuolas en los queratocitos del área dañada y de los que rodean a la misma, y la desorganización de la estructura lamelar del estroma, todo ello relacionado con la activación de los queratocitos.^{238, 239}

La incidencia del haze ha disminuido con los avances alcanzados en la tecnología láser así como en los tratamientos post-operatorios tales como la mitomicina-C.²⁴⁰

En determinados tipos de cirugías, como la queratectomía penetrante o de la queratectomía fotorefractiva (PRK), en las cuales además de daño epitelial se produce daño estromal con afectación de la membrana basal epitelial, se estimula una respuesta fibrótica cuya permanencia da lugar a la pérdida de la transparencia corneal.

En otros tipos de cirugía con Laser In Situ Keratomileusis (LASIK) la ablación estromal se produce tras la realización de un flap creado por un microqueratomo y la afectación de la membrana basal es mínima, ya que únicamente se ve afectada en los márgenes

del flap, la respuesta cicatricial es mínima, teniendo lugar sólo bajo los márgenes de la zona de ablación con ausencia de fibrosis.

Otro tipo de cirugía refractiva, en este caso aditiva, es la implantación de anillos estromales, en la cual, el daño epitelial es mínimo pero la evolución de la cicatrización estromal en ocasiones no es la adecuada pudiendo dar lugar a la aparición y permanencia de cicatrices. Los estudios llevados a cabo con las diferentes técnicas quirúrgicas buscan minimizar la respuesta fibrótica para así limitar el haz.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas quirúrgicas que suponen un nuevo desafío para el estudio de la respuesta cicatricial como la cirugía dirigida a incrementar los enlaces entre las fibras de colágeno (*Corneal Cross Linking*, CCL). Esta técnica se lleva a cabo mediante la aplicación de riboflavina en solución sobre la córnea desepitelizada seguida por la exposición a luz ultravioleta de tipo A (UVA).^{241, 242} La activación de la riboflavina da lugar a la formación de nuevas uniones covalentes entre las moléculas de colágeno que están formando las fibras del estroma incrementando así la fuerza de tensión y por lo tanto fortaleciendo la mecánica del estroma, haciendo que la córnea sea más resistente a la presión intraocular (PIO). A pesar de su utilidad para frenar la evolución del queratocono ²⁴³⁻²⁴⁵ esta técnica presenta la desventaja de que la riboflavina y la radiación UVA son tóxicas para los queratocitos, dando lugar a la apoptosis de los mismos en el estroma anterior.^{246, 247} Actualmente se han realizado estudios cuyo fin es mejorar la técnica manteniendo el epitelio intacto ^{248, 249} pero parece que su eliminación es necesaria para la penetración en el estroma de la riboflavina. También se está evaluando si la aplicación de rosa de bengala en vez de riboflavina y la exposición de luz verde, en vez de UVA, consiguen efectos similares en cuanto a la rigidez corneal, ya que sus efectos parecen ser menos tóxicos para los queratocitos pero estos estudios aún están en fase experimental.²⁵⁰ Si la respuesta cicatricial del estroma no tiene lugar de forma adecuada puede dar lugar al desarrollo de fibrosis con la consiguiente pérdida de visión.

Con la finalidad de desarrollar mejores tratamientos para pacientes con ceguera debida a la presencia de fibrosis corneal, se han desarrollado diferentes modelos para incrementar los conocimientos sobre la biología de la cicatrización corneal. Los estudios que se han realizado con este fin han dado lugar a diferentes modelos tanto *in vivo* como *ex vivo* e *in vitro*, empleando diferentes tipos de heridas con diferentes especies animales, existiendo actualmente un amplio abanico de posibilidades para los

investigadores a la hora de elegir el modelo más apropiado dependiendo del estudio determinado que se vaya a realizar.

Algunos de estos modelos son mejores para el estudio de la fibrosis corneal mientras que otros son más apropiados para la realización de estudios sobre la producción de erosiones recurrentes y defectos en la membrana basal.

5.1. Modelos “in vivo”.

5.1.1. Heridas con mantenimiento de la membrana basal.

Uno de los métodos más usados durante los años 80 fue la eliminación del epitelio preservando la membrana basal utilizando una hoja de cuchilla roma (*dulled blade*), o un *rotating burr*, delimitando previamente la zona con un trépano. Este tipo de herida se realizó por primera vez para mostrar el modo de cicatrización epitelial²⁵¹, y es útil para cuantificar la tasa de proliferación, la re-inervación y las respuestas inmunes innatas, utilizando como modelo animal el ratón, la rata o el conejo. Concretamente en el ratón, la re-epitelización es muy rápida, pudiendo conducir a erosiones epiteliales recurrentes a las 2-4 semanas tras la realización de la herida.²⁵² Actualmente, la mayoría de estudios en los cuales realizan este tipo de heridas emplean el *rotating burr* (AlgerbrushII).²⁵²⁻²⁵⁶ Mientras que este tipo de herida es útil para estudios a corto tiempo sobre la migración celular y las erosiones recurrentes en el ratón, existen otros tipos de heridas que están más indicadas para el estudio de la reparación de la barrera epitelial y el haz corneal, ya que este tipo de heridas no activan la expresión de α SMA en los queratocitos.²⁵⁷ Para estudiar la formación de miofibroblastos es necesario la realización de heridas más profundas que provoquen la interrupción de la membrana basal, tales como la queratectomía o heridas incisionales.

5.1.2. Heridas realizadas con queratectomía manual superficial (MSK) y queratectomía fotorrefractiva (PRK).

La MSK ha sido el tipo de herida elegida para estudios de formación de cicatrices corneales. Clínicamente orientó el uso del láser excímero para la generación de heridas mediante PRK tanto en ratones, como en ratas, conejos y gallinas.^{150, 153, 258-260} En el caso de la MSK el trépano se hace rotar aplicando una ligera presión en la córnea para poder penetrar en el estroma anterior. Aunque el riesgo de romper la córnea en este tipo de heridas causadas en ratones es mayor que en las anteriormente citadas, su

reproducibilidad se hace posible con la práctica y se ha usado como modelo de cicatrización corneal.²⁶¹ Para evitar la variabilidad a la hora de realizar la herida, los investigadores han optado por realizar PRK mediante un láser excímero. El proceso de cicatrización que ocurre tras la aplicación de ambos tipos de técnicas incluye re-epitelización, re-ensamblaje de la membrana basal, re-inervación y formación de una cicatriz corneal. Las células α SMA positivas generadas por ambos tipos de heridas son generalmente transitorias, permaneciendo durante varias semanas y desapareciendo posteriormente ^{188, 262}, mientras que las cicatrices ocasionadas pueden permanecer durante meses, lo cual sugiere que estos modelos pueden no ser tan útiles para estudios de cicatrices crónicas que pueden conducir a ceguera en pacientes con heridas incisionales.

5.1.3. Heridas incisionales.

El modelo de cicatrización en respuesta a este tipo de heridas, se produce mediante procedimientos en los que se tiene que acceder al cristalino o a la retina a través de una incisión realizada en la periferia de la córnea, cerca del limbo. Estas heridas inducen la producción de cicatrices y formación de miofibroblastos. En este caso, los miofibroblastos permanecen en el tiempo. Previamente a la realización de la incisión se aplica atropina para evitar el daño en el iris. Cuando no se aplica atropina el iris se pega a la parte posterior de la córnea y las células pigmentadas del iris migran hacia la herida, complicando la valoración de la formación de miofibroblastos y de cicatrices corneales.²⁶³ Este modelo se usa generalmente para estudiar la activación del estroma en respuesta al daño.

5.1.4. Heridas causadas por agentes químicos.

Los daños causados mediante la aplicación de agentes químicos (principalmente hidróxido sódico, NaOH) en el ojo han sido utilizados durante muchos años utilizando papel de filtro impregnado con dichos agentes directamente sobre la córnea. Los estudios realizados sobre la realización de dichos daños han servido para mejorar los tratamientos en pacientes que han sufrido quemaduras químicas corneales.²⁶⁴⁻²⁶⁸ Estas heridas inducen una respuesta inmune intensa y rápida, en la cual se ha observado un incremento de la proliferación de las células epiteliales y de la síntesis de proteínas necesarias para su ensamblaje y la formación de uniones entre dichas células. Este tipo

de herida se utiliza para estudiar la capacidad del epitelio para renovar su función barrera y seguir el daño ocasionado en el estroma.²⁶⁹⁻²⁷¹

5.2. Modelos “ex vivo”: cultivo de órganos.

El cultivo de córneas para el estudio de las respuestas a fármacos o diferentes tipos de daños dio lugar a una reducción en el número de estudios llevados a cabo en animales vivos. Los estudios llevados a cabo de esta manera han aportado conocimientos sobre la migración celular^{251, 272, 273}, el efecto y la señalización tras la aplicación de GF.²⁷⁴ Pero estos estudios se han limitado a la producción de heridas que mantienen la membrana basal. Recientemente se ha realizado un estudio en el cual se describe la cicatrización corneal utilizando córneas humanas cultivadas *ex vivo*.²⁷⁵ Debido a que la córnea toma nutrientes a partir del humor acuoso que contiene bajos niveles de proteínas derivadas del suero y GF, los medios utilizados en estudios que utilizan cultivos de córneas *ex vivo* tienen componentes definidos y carecen de suero o la cantidad de este es muy baja²⁷⁶⁻²⁷⁹, aunque hay grupos que emplean un 8%.²⁸⁰ Estos modelos pueden ser empleados para observar los efectos de GF sobre el proceso de cicatrización, sin embargo, la obtención de un número suficiente de córneas humanas para llevar a cabo dichos estudios es inviable. Este modelo se usa sobre todo con córneas procedentes de rata, conejo y cerdo. En la mayoría de los casos, las heridas se realizan tras el sacrificio del animal y previamente a la enucleación de los ojos, posteriormente se extraen las córneas dejando el anillo limbal y se rellenan dándoles la vuelta con medio que contiene agar o colágeno para mantener su curvatura. Posteriormente se invierten sobre una placa de cultivo, se añade medio y son cultivadas en una interfase de aire y medio acuoso.²⁷⁹ Este procedimiento tiene numerosas debilidades como la falta de inervación, la ausencia de flujo, tanto de los vasos sanguíneos como linfáticos que se localizan en el limbo, y la falta de tensión. Los nervios sensitivos que inervan a la córnea proceden del ganglio trigémino²⁸¹, y en la córnea sus fibras comienzan a desensamblarse al realizar el cultivo *ex vivo*.²⁸² Este modelo es útil para estudios sobre el impacto de la pérdida de terminaciones nerviosas y sobre la biología del epitelio, debido a que diferentes estudios han mostrado como el movimiento de las células epiteliales durante la reparación tiene lugar en ausencia de nervios sensitivos funcionales.^{272, 273}

5.3. Modelos “in vitro”: cultivos celulares.

Otra de las estrategias a seguir es el desarrollo de modelos *in vitro* cuyo fin es la obtención de córneas a partir de células humanas que puedan ser posteriormente trasplantadas, además de incrementar los conocimientos sobre la biología de dichas células.

De los modelos desarrollados hasta ahora, el más prometedor ha sido el llevado a cabo por el Laboratorio de Organogénesis Experimental (LOEX) cuyos autores desarrollaron un modelo para producir y caracterizar córneas humanas reconstruidas utilizando los tres tipos principales de células corneales mediante auto-ensamblaje (*self-assembly approach*). Sus resultados demostraron la viabilidad de las córneas creadas, cuyas características fueron muy similares a las córneas normales sin la necesidad de introducir biomateriales de forma exógena²⁸³, pero dicho estudio no mostró datos ópticos.

Hasta el momento, la mayoría de estudios se han centrado en el desarrollo de modelos de cultivos celulares en 2 o en 3 dimensiones. En los realizados en **2 dimensiones (2D)** las células crecen sobre superficies de plástico no cubiertas o bien cubiertas con MEC. Por otro lado, en los de **3 dimensiones (3D)** las células crecen dentro de geles y/o armazones fabricados mediante bioingeniería. Ambos tipos de cultivos se han adaptado y usado ampliamente en estudios de cicatrización corneal. Mientras que los cultivos en 3D son más recientes, caros y difíciles de manejar, los realizados en 2D han sido más utilizados en investigación. Diferentes estudios han utilizado células del estroma corneal derivadas de una gran variedad de especies.^{80, 284-286} Como las células del estroma corneal se localizan dentro de una matriz en 3D los trabajos realizados en 3D son más apropiados para algunos estudios, como por ejemplo, para ver la capacidad migratoria de las células.⁸⁰ Sin embargo, en los cultivos en 3D el análisis de proteínas es mucho más exigente debido a que las proteínas extraídas de las células sembradas en el gel pueden estar contaminadas con las proteínas del gel, por ejemplo el colágeno, y este tipo de estudios no se suelen realizar. Por otro lado, cuando se quieren realizar estudios sobre las células quiescentes (queratocitos), su cultivo implica el crecimiento de dichas células en condiciones libres de suero, para mantener las características fenotípicas lo más próximas a las de los queratocitos *in vivo*.^{33, 287} Como los leucocitos residentes en el estroma también se adhieren y tienen fenotipos similares a los de los queratocitos, este tipo de cultivo es probablemente una mezcla de queratocitos y diferentes clases de células del sistema inmune residentes del estroma.²⁸⁸ La realización de diversos pases

en estas células estromales da lugar a una población más homogénea, pero induce su activación y diferenciación a fenotipo fibroblástico o miofibroblástico.

La mayoría de estudios en los que se emplean cultivos en 2D con células tanto del estroma como del epitelio corneal se han realizado para observar la respuesta de dichas células a diferentes factores de crecimiento implicados en el proceso de cicatrización.^{140, 148, 151, 157, 167, 285, 287, 289-296} Sin embargo, existen muy pocos estudios que se hayan realizado tras la producción de un daño en el propio cultivo para ver la respuesta celular a tal estímulo.^{143, 297-299} En estos estudios, se realizan heridas lineales sobre el cultivo y se observa el comportamiento celular en respuesta al daño con un determinado tratamiento. Sin embargo, dentro de este grupo reducido de estudios, no hay ninguno realizado con células derivadas del estroma humano que describa el papel que tienen diferentes factores de crecimiento implicados en la cicatrización corneal en el cual se puedan observar y cuantificar los diferentes procesos que acontecen en el mismo tras la realización del daño, es decir, ver sus efectos durante el cierre de la herida cuantificando las tasas de proliferación y migración, el proceso de diferenciación y los cambios que tienen lugar a nivel de la MEC.

6. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con los datos ofrecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el plan de acción mundial para 2014-2019 contra la ceguera, en 2010 más de 285 millones de personas presentan una discapacidad visual y 39 millones son ciegos, siendo el 75% de los casos de ceguera en los adultos evitable mediante la prevención o el tratamiento. A nivel mundial, las enfermedades corneales, junto con las cataratas, son la principal causa de la pérdida de visión y de ceguera.³⁰⁰

La epidemiología de la ceguera corneal es complicada, ya que va acompañada de una gran variedad de enfermedades infecciosas, inflamatorias, traumáticas e incluso iatrogénicas.

Una importante cantidad de procesos patológicos y/o quirúrgicos, sobre la córnea, tienen como denominador común en su resolución la cicatrización corneal. Las heridas corneales debidas a traumatismos se producen en la mayoría de los casos en el medio laboral, en el cual, a veces, se producen inserciones de cuerpos extraños que modifican la respuesta cicatricial. Heridas producidas por quemaduras con ácidos o álcalis suelen

Introducción

ser frecuentes en accidentes domésticos o laborales, mientras que las quemaduras por agentes físicos como las radiaciones ultravioletas (queratitis fotoeléctrica) son frecuentes en determinados puestos de trabajo. Entre los procedimientos quirúrgicos esta la cirugía refractiva (PRK, LASIK y LASEK), la cirugía aditiva corneal (anillos y lentes intracorneales), los trasplantes corneales y la cirugía de cataratas.

Una vez producida la opacidad corneal y como consecuencia la ceguera corneal, el trasplante, es el único tratamiento, pero la demanda de córneas es muy superior a las reservas de las mismas, especialmente en países con bajo nivel de desarrollo.

Cuando se produce un daño corneal las principales partes afectadas son el epitelio, cuyo incorrecto proceso de cicatrización aumenta el riesgo de padecer erosiones epiteliales recurrentes³⁰¹, y el estroma, cuya incorrecta cicatrización produce opacidades.

Actualmente, hay una gran cantidad de estudios que muestran los datos obtenidos desde hace aproximadamente 70 años sobre el proceso de cicatrización corneal. Estos estudios han sido realizados utilizando diferentes especies animales y diferentes métodos de daño corneal y, todos ellos, están dirigidos a incrementar los conocimientos en cicatrización, reducir el sufrimiento ocasionado durante dicho proceso y, sobre todo, a restaurar la pérdida de visión ocasionada por el desarrollo de tejido fibrótico.

El incremento del conocimiento de la biología del proceso de cicatrización corneal obtenido gracias a la utilización de modelos apropiados tanto *in vivo* como *ex vivo* o *in vitro*, nos permite adoptar nuevos abordajes terapéuticos para pacientes con ceguera evitable causada por la presencia de cicatrices corneales.

Cada noxa y cada patología tienen un efecto diferente sobre los procesos biológicos que tienen lugar durante la cicatrización de forma que no todos pueden ser tratados de la misma forma. Conocer cómo afecta al proceso de cicatrización la aplicación en un determinado momento, de un factor de crecimiento, es una herramienta importante a la hora de tratar diferentes tipos de heridas corneales y así poder acelerar dicho proceso y/o reducir el tiempo de permanencia de los miofibroblastos, causa principal de aparición de opacidades.

Introducción

Actualmente, las relaciones entre la señalización llevada a cabo por los factores de crecimiento y las respuestas celulares específicas a las que dan lugar no se conocen en profundidad.

Esta tesis tiene como finalidad mostrar las diferentes respuestas que los factores de crecimiento estudiados ejercen sobre fibroblastos corneales humanos cultivados *in vitro* y sometidos a un daño manual, para incrementar los conocimientos sobre la biología del proceso de cicatrización corneal en respuesta a cada factor de forma individual y a lo largo del tiempo.



Hipótesis

Hipótesis

El desarrollo de un modelo “in vitro” de herida estromal, nos servirá para conocer los diferentes papeles que juegan los factores de crecimiento (TGF β 1, PDGF-BB y bFGF) en el proceso de cicatrización corneal.



Objetivos

Objetivos

1. *Desarrollar un modelo de herida estromal "in vitro" a partir del cultivo de fibroblastos corneales humanos.*
2. *Determinar cómo se produce el cierre de este modelo de herida a lo largo del tiempo y cómo actúan sobre él los tres factores de crecimiento objeto de estudio.*
3. *Estudiar la liberación de los propios factores objeto de estudio en respuesta al daño ocasionado durante el periodo de cierre de la herida.*
4. *Determinar los efectos que cada factor de crecimiento, aplicado individualmente, ejerce sobre los procesos de migración, proliferación y diferenciación celular durante el cierre de la herida estromal.*
5. *Estudiar los cambios que tienen lugar a nivel de la matriz extracelular secretada durante el proceso de cierre de la herida y tras la aplicación de cada factor de crecimiento.*



Material y métodos

1. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS HUMANOS DEL ESTROMA CORNEAL (HCF)

La obtención de fibroblastos humanos del estroma corneal (HCF) se realizó a partir de anillos corneales humanos sobrantes de la realización de trasplantes y obtenidos del Banco de Ojos del Principado de Asturias (Oviedo, España). Todos los procedimientos se llevaron a cabo según los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Declaración de Helsinki y con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Valladolid.

A los anillos se les eliminó el endotelio y el epitelio, bajo el microscopio de disección, con una legra utilizando una placa petri estéril como base. Posteriormente, el tejido fue troceado mecánicamente utilizando un bisturí. Los trozos de tejido obtenidos se introdujeron en un tubo de plástico estéril conteniendo medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco y una mezcla de nutrientes F12 (DMEM:F12 (1:1) W/HEPES (CE), 31330-038 GIBCO, Carlsband, CA) suplementado con solución de antibióticos-antimicóticos (*Antibiotic Antimycotic Solution 100x stabilized*, A5955, Sigma, St. Louis, MO. Al 1%; Fungizone® Antimycotic, 15290-018, GIBCO. A 2.5 µg/mL). Una vez introducidos los trozos de tejido en el tubo, se añadió colagenasa tipo II, 2 mg/mL (17101-015, GIBCO) y se introdujo en una estufa a 37°C (modelo: 2001242, J.P. Selecta) durante 3 horas para se produzca la digestión enzimática del tejido y los queratocitos sean liberados. Transcurrido el tiempo de digestión, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 3 minutos en una centrífuga (modelo 5702, Eppendorf, Hamburg, Alemania). Cada pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de medio DMEM-F12 suplementado con solución de antibióticos-antimicóticos y suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*, FBS, F9665, Sigma) al 10% (medio completo). Las células obtenidas se sembraron en placas de cultivo primario de 35 mm de diámetro (Primaria Easy Gip, 353801, Falcon®) con 2 mL de medio/placa y permanecieron en un incubador (Incubador CO₂ HERAcCell®, Kendro Laboratory, Alemania) a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂, hasta obtener un cultivo de células confluentes, cambiando el medio de cultivo cada dos días.

En cada cambio se eliminó todo el medio de las placas mediante aspiración y se añadieron 2 mL de medio completo nuevamente. La confluencia celular se alcanzó a la semana, momento en el cual se realizan los pases. Cada pase se realizó mediante tripsinización realizando previamente un lavado durante un minuto con 1 mL/placa de solución de sales de Hank (*Hanks' balanced salt solution*, H6648, Sigma). Una vez retirada la solución de Hank se añadió la solución de disociación celular que contiene 0,5 g/L de Tripsina (*Trypsin from porcine pancreas*, T7409, Sigma) en solución de sales

de Hank, y se introdujeron las placas en el incubador a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂ durante 5 minutos aproximadamente. Una vez finalizada la disociación se añadió medio completo para detener la acción de la enzima (se añadió el mismo volumen de medio de cultivo que el que se había añadido previamente de la solución de disociación). La suspensión celular, obtenida en cada placa, se introdujo en tubos de plástico estéril y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos (centrífuga modelo 5702, Eppendorf). El pellet celular obtenido se resuspendió en 1 mL de medio completo y se contaron las células obtenidas utilizando azul tripán en una cámara de Neubauer bajo un microscopio invertido (modelo Axiovert 25, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Una vez realizado el conteo de las células, estas se sembraron a una densidad de 2×10^5 células por placa en placas de 35 mm de diámetro (*Tissue Culture Dish*, 353001, Falcon®) con 2 mL de medio completo, ya que es una densidad celular que las permite adherirse y dividirse para llegar a una confluencia cercana del 90% en un plazo corto de tiempo (tres días).

Los fibroblastos corneales (queratocitos que han sido sometidos a pases sucesivos y expuestos a FBS) se mantuvieron en cultivo hasta el pase 7 (7P), en el cual se obtuvo el número necesario de células para realizar los diferentes experimentos. Este número de pase fue elegido también teniendo en cuenta que no existe un consenso en cuanto al pase a utilizar para trabajar con este tipo celular.^{42, 168, 302}

2. REALIZACIÓN DE LAS HERIDAS

Para reducir la activación celular debida a la estimulación producida por el FBS y, para poder estudiar los efectos de cada factor de crecimiento de forma individual durante los diferentes procesos que tienen lugar durante el cierre de las heridas, tres días después de la realización del 7P, el medio completo DMEM-F12 suplementado con antibióticos y antimicóticos y suero bovino fetal (FBS) al 10%, fue reemplazado por DMEM-F12 suplementado únicamente por antibióticos y antimicóticos (medio libre de suero, *serum free medium*, SFM). Dependiendo del experimento que se fuera a realizar, los fibroblastos en 7P se sembraron a una densidad de 2×10^5 células por placa (en placas de 35 mm de diámetro; en las placas que posteriormente iban a ser utilizadas para su visualización en el microscopio confocal, en el fondo de la placa se colocó un cubre de cristal estéril de 22 x 22 mm, Menzel-Glaser, Thermo Scientific) o a 3×10^3 células por pocillo (en placas de 96 pocillos, MICROTEST™ *Tissue Culture Plate*, 96 Well, 353072, Falcon®). Tres días después de la retirada del FBS del medio se procedió a la realización de una herida lineal en el centro de cada placa o pocillo. Para la realización

Material y métodos

de las heridas se retiró el medio de cultivo y con una punta de pipeta estéril y desechable de 10 μL realizando una raya vertical desde el polo superior hasta el polo inferior de la placa o pocillo como se muestra en la **figura 10**. Una vez realizada la herida se hizo un lavado con medio SFM para eliminar posibles restos celulares y posteriormente se añadió el medio suplementado con los diferentes factores de crecimiento para poder seguir el tiempo de cierre y observar sus efectos durante el mismo. Las dimensiones de las heridas se obtuvieron con el programa de *Soft Cell^A Imaging Software for Life Science Microscopy* (Olympus, Olympus Corporation, Tokyo, Japón) siendo 4.6 mm^2 las de los pocillos y 28.8 mm^2 las de las placas.

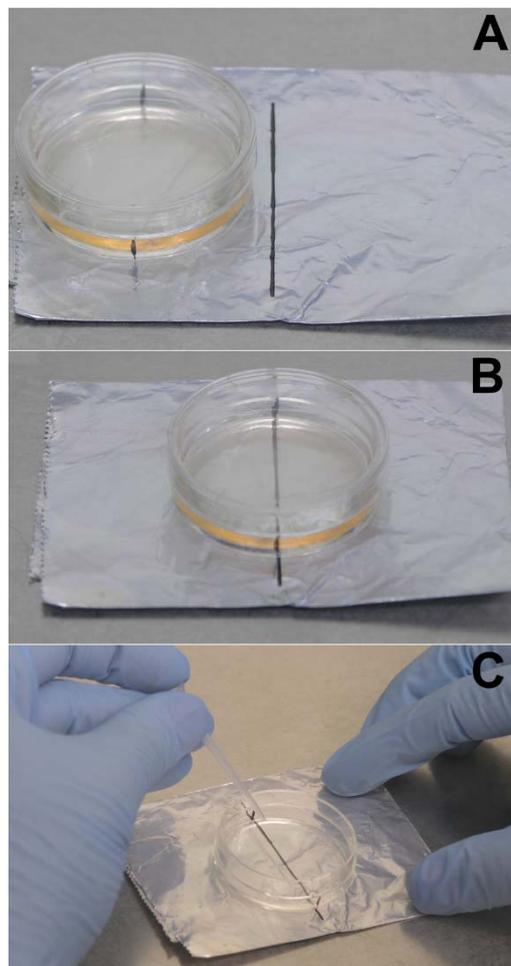


Figura 10. Imágenes en las cuales se muestran los diferentes pasos seguidos para la realización de la herida en una placa de 35 mm. Se siguió el mismo procedimiento en las células sembradas en pocillos. **(A)** En primer lugar se realizan dos marcas, en polos opuestos de la placa, con un rotulador. Sobre un papel se traza una línea vertical que sirva como referencia al colocar la placa sobre él. **(B)** Colocación de la placa sobre el papel haciendo coincidir las marcas de la placa con la línea trazada sobre el papel. **(C)** Realización de la herida con una punta de pipeta de 10 μL siguiendo la línea marcada previamente en el papel y habiendo retirado el medio de cultivo.

3. ELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE CADA FACTOR DE CRECIMIENTO

Todos los factores de crecimiento fueron obtenidos de GIBCO.

- **TGFβ1**: Factor de crecimiento transformante beta 1 (Recombinant Human Transforming Growth Factor-β1, PHG9204)
- **bFGF**: Factor de crecimiento fibroblástico básico (Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-basic, PHG0024)
- **PDGF-BB**: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma BB (Recombinant Human Platelet Derived Growth Factor-BB, PHG0046)

Las concentraciones de los factores de crecimiento utilizadas fueron determinadas mediante experimentos de dosis-respuesta utilizando el reactivo WST-1 (05015944001, Roche, España) y siguiendo las instrucciones aportadas por el mismo.

Este ensayo está basado en la bio-reducción de las sales de tetrazolio (contenidas en el reactivo) a formazán soluble que es dependiente de la producción glicolítica de NAD(P)H que tiene lugar en células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazán formado está directamente correlacionada con la cantidad de células metabólicamente activas en el cultivo. La obtención de los datos se realizó mediante lecturas de absorbancia a 450 nm (longitud de onda estipulada para medir la absorbancia del formazán) en un lector de absorbancia Sunrise RC Básico para microplacas (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).

Para cada factor de crecimiento se probaron las siguientes concentraciones en medio DMEM-F12, suplementado con antibióticos y antimicóticos (libre de suero, SFM), expresadas en ng/mL: 0, 1, 10, 20, 50 y 100. Los tiempos de estudio fueron 1, 4 y 7 días tras la realización de la herida en HCF en 7P sembrados en pocillos de placas de 96 pocillos.

En cada tiempo de estudio, el WST-1 fue añadido al medio (medio sin FBS) al 10%. Una vez añadido sobre los diferentes pocillos estos se incubaron durante 1h y se procedió a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm y como referencia 620 nm.

Cada concentración se probó en 3 pocillos con herida y 3 sin la realización de la misma.

Los resultados obtenidos se expresan como la media de los tres valores obtenidos por cada concentración de factor de crecimiento probada \pm su desviación estándar (SD), tanto con herida como sin herida.

4. SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO CON LAS CONCENTRACIONES ÓPTIMAS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

En todos los experimentos que se detallan a continuación se siguió el mismo protocolo de adición al medio de cultivo de cada factor de crecimiento. Después de la realización de las heridas a los cultivos de HCF en 7P, el medio de cultivo DMEM-F12 (SFM) con solución de antibióticos y antimicóticos fue suplementado con la concentración óptima previamente elegida para cada factor de crecimiento. Este medio de cultivo se utilizó en cada cambio de medio que se realizó cada 2 días.

5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE FACTORES DE CRECIMIENTO SECRETADOS

Para determinar si la realización de la herida induce la secreción autocrina de los factores de crecimiento estudiados por las propias células y si los factores de crecimiento aplicados al medio de forma individual inducen cambios en dicha secreción, se recogió el medio de cultivo de las placas control de 35 mm de diámetro sembradas con HCF en 7P (SFM) y de las placas sometidas a los diferentes factores de crecimiento durante diferentes tiempos tras la realización de las heridas (1, 4 y 7 días).

La determinación cuantitativa de los niveles de diferentes factores de crecimiento en el medio de cultivo se realizó utilizando los siguientes kits de ELISA comerciales:

- Multispecies TGF- β 1 ELISA kit (KAC1688, Invitrogen, Life Technologies)
- Human FGF basic ELISA kit (KHG0021, Invitrogen, Life Technologies)
- Human PDGF-BB ELISA kit (DBB00, R&D Systems Europe, Ltd)

En el caso de los medios de cultivo que contenían un determinado factor de crecimiento, se estudió la presencia o no de los otros dos factores objeto de estudio.

El medio de cultivo se analizó en los tiempos 1, 4 y 7 días. Para realizar las determinaciones se procedió de acuerdo con las instrucciones aportadas por el fabricante de cada kit. Las lecturas de absorbancia del ELISA se realizaron en un lector

de placas Sunrise RC básico (Tecan), y la concentración de cada factor de crecimiento en las muestras problema se calculó mediante análisis de regresión lineal. Todas las muestras se analizaron por duplicado y los resultados se muestran como la media obtenida por cada tratamiento \pm su SD, en pg/mL.

6. CAMBIOS MORFOLÓGICOS

Para observar los cambios morfológicos inducidos por cada factor de crecimiento durante el cierre de la herida, se tomaron fotografías con una magnificación de 100x durante los diferentes tiempos de cierre (0, 1, 4, 7, 10 y 15 días), en las placas de 35 mm, mediante un microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 con una cámara digital incorporada Nikon DXM1200 (Nikon Instruments, Inc. Melville, New York, USA).

A su vez, estos cambios morfológicos fueron contrastados en primer lugar realizando una tinción celular con solución de Giemsa. Esta solución permite la tinción diferencial de los componentes celulares pudiendo observarlos en varias tonalidades de azul-violeta dependiendo de la naturaleza de los mismos, por ejemplo las zonas con alto contenido en DNA, como los núcleos adoptan una coloración violeta oscura gracias al azul de metileno (componente de la solución de Giemsa de carácter básico).

En segundo lugar, los cambios morfológicos también fueron estudiados mediante la visualización de microfilamentos de actina (actina-f) en las células. Estos microfilamentos son uno de los principales constituyentes del citoesqueleto celular y se localizan en el cortex celular, lo cual permite la observación de la morfología celular. Para realizar la tinción con solución de Giemsa se utilizaron HCF sembrados en placas de 35 mm y para el estudio de la localización de la actina-f, se utilizaron HCF sembrados sobre cubres colocados en placas de 35 mm de diámetro. Se emplearon 3 placas de cada tipo de medio de cultivo que fueron fijadas 4 días después de la realización de las heridas (por cada método aplicado). El método de tinción con Giemsa se detalla en la **tabla 1** y el de la detección de la actina-f se detalla en la **tabla 2**.

El tiempo de 4 días fue elegido en base a que en este tiempo las células de los márgenes de la herida, o las que están ya ocupando la misma, son más fácilmente visualizables que en tiempos posteriores, cuando la abundancia de células en dichas zonas es mayor y a que a partir de ese tiempo los cambios en morfología se mantuvieron sin modificaciones a lo largo del tiempo de estudio como previamente observamos bajo el microscopio invertido.

La visualización y toma de imágenes de las muestras se realizó con el microscopio confocal Leica (Leica TCS SP, Wetzlar, Germany) y el *software Leica Application Suite*

Material y métodos

Advanced, en el caso de la actina-f. Todas las imágenes de los cultivos celulares fueron tomadas con el objetivo de 40x bajo inmersión y realizadas con un láser de excitación para las longitudes de onda 488 y 543 nm, manteniendo en todo momento las mismas condiciones de intensidad de láser, contraste, brillo y pinole para así poder comparar el marcaje.

Para la visualización y toma de imágenes de los cultivos teñidos con Giemsa, las placas fueron examinadas bajo el microscopio de luz (BX41 Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) y se obtuvieron fotografías con una cámara digital Olympus DP20 incorporada (Olympus).

Tabla 1: Método de coloración celular con solución de Giemsa

1. Retirar el medio de cultivo de las placas y añadir paraformaldehído tamponado al 4% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 durante 30 minutos.
2. Realizar 3 lavados de 5 minutos con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, phosphate buffered saline) pH 7,4.
3. Añadir solución de Giemsa filtrada al 20% en PBS (Giemsa's azur eosin methylene blue solution, Merck Kga, Darmstadt, Alemania) durante 1 hora.
4. Lavar con abundante agua destilada.
5. Dejar secar y visualizar.

Tabla 2: Método para la detección de actina-f

1. Fijar con paraformaldehído tamponado al 4% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 durante 10 minutos.
2. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS.
3. Sumergir los cubres en acetona preenfriada a -20°C durante 10 minutos.
4. Dejar secar.
5. Añadir faloidina (P5282, Sigma) durante 30 minutos.
6. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS.
7. Montar los cubres sobre portaobjetos con Anti Fade (H-1000, Vectashield R, Vector Laboratories, California USA).

7. ACTIVIDAD METABÓLICA

Para analizar los cambios en la actividad metabólica inducidos por cada factor de crecimiento durante el proceso de cierre de las heridas se utilizaron HCF sembrados en pocillos de placas de 96. Para ello se utilizaron 10 pocillos por cada factor de crecimiento y tiempo de estudio (1, 4 y 7 días). Tras la realización de las heridas y de la suplementación con los factores de crecimiento, se midió la actividad metabólica con el mismo reactivo previamente utilizado para determinar la concentración óptima de los tres factores, el WST-1.

Los diferentes medios fueron reemplazados cada 2 días hasta el momento de la lectura de la absorbancia.

Los resultados obtenidos de la medida de la actividad metabólica se representan como la media \pm la SD de los valores de absorbancia obtenidos en los 10 pocillos del mismo medio de cultivo en cada tiempo estudiado.

8. PROLIFERACIÓN CELULAR

Para determinar el efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la proliferación celular durante el proceso de cierre de las heridas se empleó el kit de proliferación celular CyQUANT NF (*CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit*, C35007, Invitrogen). Este ensayo se basa en la medición del contenido de DNA celular mediante la unión de un colorante fluorescente que contiene el kit, la digitonina. Transcurrido el tiempo de incubación indicado, el contenido en DNA se mide mediante la lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector Sunrise RC Básico para microplacas (Tecan). El grado de proliferación se determinó comparando la cantidad obtenida en células sometidas a diferentes tratamientos con la misma cantidad de células sin tratar (SFM, control). El contenido en DNA se midió en 10 pocillos por cada factor de crecimiento durante diferentes tiempos (1, 4 y 7 días) después de realizar las heridas. Los diferentes medios de cultivo fueron cambiados cada 2 días hasta el momento de la lectura de la absorbancia. Los resultados obtenidos de la medida de la proliferación celular se representan como la media \pm la SD de los valores de absorbancia obtenidos en los 10 pocillos del mismo medio de cultivo en cada tiempo estudiado.

9. CIERRE DE LA HERIDA Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN DIFERENTES ZONAS DEL CULTIVO

9.1. Recuento de células BrdU positivas

Para conocer dónde y cuándo se produce la proliferación celular con los diferentes factores de crecimiento durante el cierre de las heridas y además poder obtener datos de la anchura de las mismas, se usaron HCF en 7P sembrados en placas de 35 mm de diámetro. En estos experimentos los diferentes medios de cultivo fueron suplementados con 2×10^{-7} M de bromodesoxiuridina (BrdU, B5002-5G, Sigma) como marcador de síntesis de DNA. Los medios de cultivo fueron reemplazados cada dos días. Los diferentes tiempos estudiados fueron 1, 4, 10 y 15 días. Se fijaron 3 placas de cultivo por cada factor de crecimiento y tiempo de estudio.

La BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora en las células en fase de síntesis del DNA, previa a la mitosis.³⁰³ Al unir a esta molécula un anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa, junto con la posterior adición de diaminobencidina (DAB) para la localización de la actividad peroxidasa, hace que los núcleos de las células que

han incorporado la BrdU sean visibles bajo el microscopio de luz en color marrón. Para poder observar los núcleos de las células no proliferativas se realizó una contratinción con solución de Giemsa, lo cual nos permite distinguir bajo el microscopio óptico el núcleo que adopta una coloración violeta gracias al azul de metileno. El método de realización de la técnica para la detección de células BrdU positivas se detalla en la **tabla 3**. Las placas fueron examinadas bajo el microscopio de luz (BX41 Carl Zeiss) y se obtuvieron fotografías con una cámara digital Olympus DP20 (Olympus) incorporada para poder contar el número de células BrdU positivas en los diferentes cultivos y poder medir la anchura de la herida durante el cierre.

Tabla 3: Método de realización de la técnica para la detección de células BrdU positivas

1. Retirar el medio de cultivo de las placas y añadir paraformaldehído tamponado al 4% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 durante 30 minutos.
2. Realizar 3 lavados de 5 minutos con tampón tris pH 7,5 (TBS, *Tris-buffered saline*).
3. Desenmascarar el antígeno mediante digestión con tripsina (*Trypsin Enzymatic Pretreatment*, TA 015-TR, Thermo Scientific) durante 10 minutos a 37°C.
4. Lavar con abundante agua destilada.
5. Desnaturalizar en HCl 2M a 37°C durante 1 hora.
6. Lavar con abundante agua destilada.
7. Realizar 3 lavados de 5 minutos en TBS.
8. Neutralizar con Tris Borato 0,2 M pH 8,5 durante 10 minutos.
9. Realizar 3 lavados de 5 minutos en TBS.
10. Bloquear antígenos no específicos con suero de cabra (*Goat Serum*, G9023, Sigma) diluido al 2% en TBS durante 20 minutos.
11. Incubar con IgG anti-BrdU monoclonal de ratón (dilución 1:20 en TBS, M0744, Dako, Barcelona, España) durante 24 horas a 4°C.
12. Detectar el anticuerpo primario con el kit *Mouse Extravidin® Peroxidase* producido en cabra (Extra2-1KT, Sigma) durante 1 hora.
13. Realizar 3 lavados de 5 minutos en TBS.
14. Localizar la actividad peroxidasa mediante adición de 3,3'-Diaminobencidina (DAB, D4168, Sigma) controlando la intensidad de tinción bajo el microscopio.

15. Realizar 3 lavados de 5 minutos en TBS.
16. Lavar con abundante agua destilada.
17. Contrateñir con solución de Giemsa filtrada al 20% en TBS durante 1 hora.
18. Lavar con abundante agua destilada.

Las células BrdU positivas (**Fig. 11A**) fueron contadas a una magnificación de 200x en tres áreas diferentes del cultivo por cada placa como se muestra en la **figura 11B**: zona de la herida (**H**), zona de los márgenes de la herida (**M**) y zona del resto del cultivo (**C**). El conteo en cada zona de la placa se realizó en tres campos de la misma como se muestra en la **figura 11C**. Se realizó la media del conteo de los dos márgenes (M) en cada campo al igual que de las dos zonas denominadas como cultivo (C), tomando dos áreas cuya suma equivale a una en la zona de la herida y así poder comparar con los resultados obtenidos en la zona de la herida (H) en cada campo. Una vez obtenidos los resultados por campo, se realizó la media de las medidas obtenidas en los 3 campos de cada placa. Los resultados obtenidos se expresan como número de células BrdU positivas por cm^2 (densidad), y corresponden a la media de los datos de las tres placas utilizadas por cada medio de cultivo y tiempo de estudio \pm la SD.

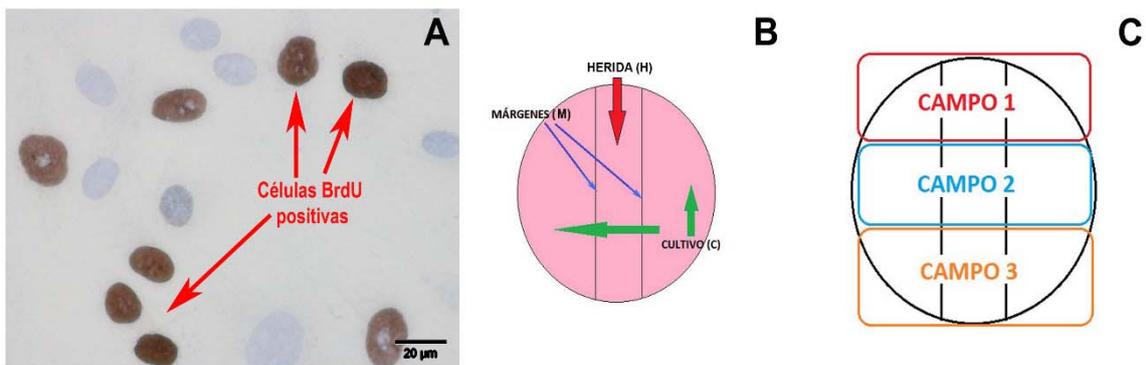


Figura 11. (A) Microfotografía en la que se muestra el resultado de la técnica de detección de células BrdU positivas. Los núcleos de las células BrdU positivas se visualizan de color marrón y los de las BrdU negativas en color azul. Barra de escala 20 μm . (B) Esquema que muestra las tres áreas de la placa de cultivo donde se realiza el conteo de las células BrdU positivas. (C) Esquema en el que se representan los tres campos utilizados para la realización del conteo de células BrdU positivas.

9.2. Medición de la anchura de las heridas durante el cierre.

La anchura de las heridas fue obtenida mediante el programa *Soft Cell^A Imaging Software for Life Science Microscopy* (Olympus) como se muestra en la **figura 12**. Las medidas obtenidas en cada placa se usaron para calcular la media de los datos presentados en μm . En cada placa se tomaron 5-6 medidas y se obtuvieron los valores de 3 placas tratadas con el mismo medio de cultivo por cada tiempo de estudio. La media final obtenida y utilizada para los resultados fue la resultante de tres valores obtenidos de las 3 placas del mismo tratamiento.

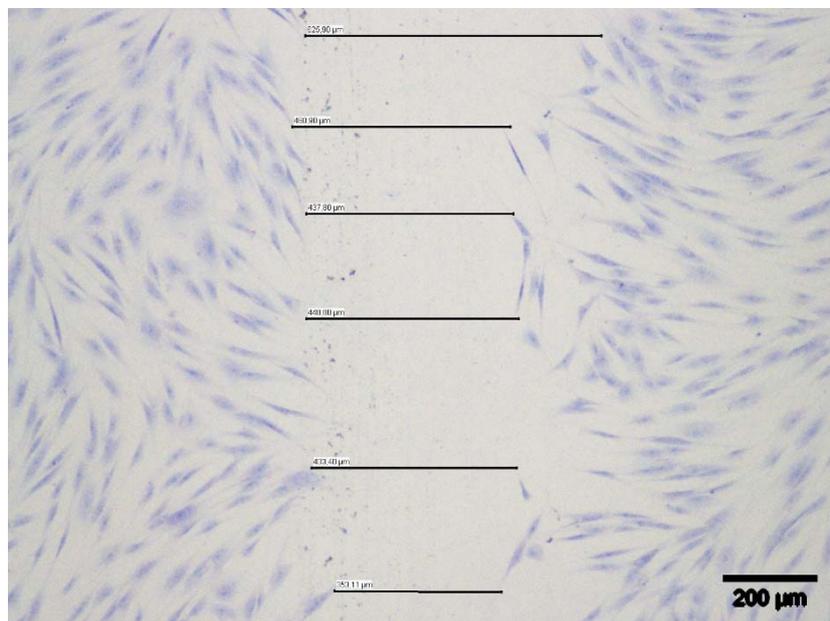


Figura 12. Imagen obtenida de la toma de medidas de la anchura de la herida utilizando el programa *Soft Cell^A Imaging Software for Life Science Microscopy*. Barra de escala 200 μm .

10. DETECCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE αSMA .

Para determinar el efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la diferenciación de los HCF a miofibroblastos, se llevó a cabo una técnica inmunocitoquímica para la detección de actina- α de músculo liso ($\alpha\text{-SMA}$) debido a que la característica fundamental de estas células es la aparición de dichos microfilamentos en su citoplasma. Para este estudio, se utilizaron HCF sembrados en placas de 35 mm de diámetro. Los medios de cultivo fueron reemplazados cada dos días. Se emplearon 3 placas de cada medio de cultivo, por tiempo estudiado (1, 4, 10 y 15 días). El método para la realización de la técnica de detección se muestra en la **tabla 4**. Las placas fueron examinadas bajo el microscopio de fluorescencia Axiophot (426510-9901-000, Carl

Zeiss) y las células α -SMA positivas (**Fig. 13**) fueron contadas a una magnificación de 400x, pero del mismo modo que se realizó el conteo de células BrdU positivas. Los resultados obtenidos se corresponden a la media de los datos de las tres placas utilizadas por cada tipo de medio de cultivo y tiempo de estudio \pm la SD, expresados como número de células α -SMA positivas/cm².

Tabla 4: Método de realización de la técnica para la detección de células α -SMA positivas

1. Retirar el medio de cultivo de las placas y añadir paraformaldehído tamponado al 4% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 durante 30 minutos.
2. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS-TritonX-100 (T9248, Sigma) al 0,2%, pH 7,4.
3. Bloquear antígenos no específicos con suero de cabra diluido al 1,5% en PBS durante 20 minutos.
4. Incubar con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-actina- α de músculo liso humano preparado para su uso directo (IS611, Dako) durante 30 minutos.
5. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS.
6. Incubar con el anticuerpo secundario *Texas red* anti IgG de ratón producido en cabra (T6390, Molecular Probes, Barcelona, España) dilución 1:100 durante 2 horas.
7. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS.
8. Añadir DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*, D9542, Molecular Probes) en concentración 0,2 μ g/ml durante 10 minutos.
9. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS.
10. Montar con Anti Fade.

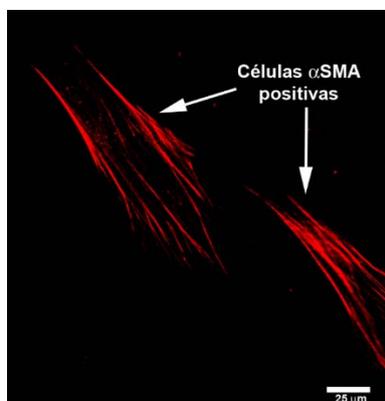


Figura 13. Microfotografía en la que se muestra el resultado de la técnica inmunocitoquímica aplicada para la detección de microfilamentos de actina α de músculo liso y, por lo tanto, de células α SMA positivas. Barra de escala 25 μ m.

11. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA REVERSA (RT-PCR).

Para determinar si los diferentes factores de crecimiento utilizados producen cambios en la síntesis de MEC y de proteínas implicadas en la migración celular durante el proceso de cierre de las heridas, se realizó un estudio de la expresión a nivel de los RNA mensajeros (mRNA) de los genes que codifican para diferentes proteínas implicadas en el proceso de cicatrización. Estas proteínas fueron el colágeno tipo III (Col III), el perlecano (perlecan), el sindecano 4 (SDC4), el queratocano (KERA), la quinasa de adhesión focal (FAK), la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la actina α de músculo liso (α -SMA).

El RNA, a diferencia de las proteínas, puede ser fácilmente amplificado haciendo posible que, en una pequeña muestra de tejido, puedan ser analizados una gran cantidad de parámetros de forma muy precisa gracias a la RT-PCR. Hay que tener en cuenta que la presencia del mRNA que codifica una proteína en una muestra determinada, no implica que esta esté presente y en el caso de estar tampoco indica que lo esté en su forma activa, ya que aparte de la regulación transcripcional que da lugar a la producción del mRNA, existe una compleja regulación postranscripcional.

Debido a la facilidad con la que es degradado el RNA por RNasas que están presentes en el entorno, su manejo presenta dificultades. Por ello, debe prestarse especial cuidado al recoger, procesar y conservar las muestras para evitar la degradación del RNA.

11.1. Extracción de RNA.

Se utilizaron HCF en 7P sembrados en placas de 35 mm de diámetro. Los medios de cultivo fueron reemplazados cada dos días. Todas las muestras se obtuvieron en el tiempo de 7 días, tiempo en el cual aún no se había producido el cierre con ninguno de los tratamientos. En dicho tiempo se extrajo el RNA de los cultivos de 4 placas por cada medio utilizado, obteniendo un *pool* celular por cada tratamiento.

Para extraer y purificar el RNA de los cultivos se utilizó un reactivo comercial llamado Trizol® (TRI REAGENT SOLN "TRIZOL", AM9738 Applied Biosystems, ABI). La utilización de este reactivo permite la obtención de RNA de gran pureza con bajo coste. El método de extracción del RNA se muestra en la **tabla 5**.

Material y métodos

La concentración y pureza de las muestras de RNA obtenidas se midió en un espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific). La concentración de los ácidos nucleicos se determinó a 260 nm. Las proteínas absorben a 280 nm por ello, para conocer la pureza del RNA se emplea el ratio 260/280 que nos indica una posible contaminación proteica. Una muestra de RNA puro debería de tener un valor ideal de 2,0, o por lo menos mayor de 1,8 por lo que las muestras cuyos valores estaban por debajo de 1,8 fueron descartadas. Después de la lectura de la concentración y pureza, las muestras fueron congeladas a -20°C para su conservación y almacenamiento hasta su posterior uso.

Tabla 5: Método de extracción del RNA

1. Retirar el medio de cultivo.
2. Añadir 250 μ L de Trizol por placa.
3. Recolectar la suspensión obtenida de las 4 placas y transferirla a un microtubo libre de RNAsas.
4. Homogeneizar pipeteando durante 2 minutos y dejar reposar durante 5 minutos.
5. Añadir 200 μ L de cloroformo (131252 Panreac Química SL. Barcelona, España) y agitar manualmente durante 15 segundos.
6. Dejar reposar 3 minutos.
7. Centrifugar durante 15 minutos a 4°C y 12.000 g (centrifuga Eppendorf 5415R)
8. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo microtubo libre de RNAsas.
9. Añadir 500 μ L de isopropanol (141090 Panreac) y 1,5 μ L de Glycoblue (AM9515, ABI)
10. Dejar reposar 10 minutos y centrifugar durante 10 minutos a 4°C y 12.000 g.
11. Eliminar el sobrenadante y añadir 1 mL de etanol al 75%.
12. Agitar en vortex y centrifugar durante 5 minutos a 4°C y 7.500 g.
13. Colocar el tubo inclinado en una estufa a 37°C dejar evaporar el etanol durante 45 minutos.
14. Resuspender el RNA en 60 μ L de agua libre de RNAsas.

11.2. Formación de cDNA o Retrotranscripción.

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), implica la transformación del RNA, previamente extraído, en cDNA, para que sirva de molde para la PCR y nos permita determinar la presencia de los mRNA de las distintas proteínas en los cultivos celulares sometidos a estudio. Para ello, se llevó a cabo una transcripción reversa o retrotranscripción, utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (4374966,ABI). Por cada reacción (muestra) se utilizaron los siguientes componentes en los volúmenes indicados:

COMPONENTES DEL KIT	VOLUMEN (μL)
<i>RT-Buffer (10X)</i>	1
<i>dNTPs (25X) (100nM)</i>	0,4
<i>RT random primers (10X)</i>	1
<i>RT (reverse transcriptase)</i>	0,5
<i>RNAsa Inhibitor</i>	0,5
H2O libre de nucleasas	1,6
Muestra de RNA	5

Se usó un termociclador *MultiGene Gradient TC9600-G* (Labnet International, Inc. NY, USA) con el programa de ciclos que se describe a continuación:

CICLOS	1	2	3	4
Tª (°C)	25	37	85	4
Tiempo (min)	10	120	5	∞

11.3. PCR en tiempo real.

Para la detección y cuantificación de las diferentes dianas de mRNA objeto de estudio se utilizaron sondas TaqMan (*TaqMan®Gene Expression Assays*) diseñadas y optimizadas para funcionar con una mezcla de reacción TaqMan® (*TaqMan® gene expression master mix*, 4369514, ABI) utilizando condiciones de ciclos térmicos universales. Cada *TaqMan®Gene Expression Assay* contiene una sonda TaqMan MGB con marcaje con fluorocromo FAM™ en un solo tubo preformulado. Las diferentes sondas comerciales utilizadas fueron:

Diana	Applied Biosystems TaqMan®Gene Expression Assay	bp
Perlecano (HSP2)	Hs00194179_m1	70
Sindecano 4 (SDC4)	Hs00161617_m1	120
Queratocano (KERA)	Hs00559942_m1	67
FAK (PTK2)	Hs01056457_m1	76
Integrina α 5 (ITGA5)	Hs01547673_m1	54
Integrina β 1 (ITG β 1)	Hs00559595_m1	75
Colágeno tipo III α 1 (COL3A1)	Hs00943809_m1	65
α -SMA (ACTA2)	Hs00909449_m1	64
ACTB (actina beta)	Hs99999903_m1	171

La medida de la expresión génica por medio de la PCR a tiempo real es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno o *housekeeping*). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico, o normalizar respecto a la diferente concentración de RNA total de las muestras, ya que si la cantidad de control endógeno varía es debido a cambios en la cantidad de RNA total empleada en la síntesis de cDNA, no a cambios en su expresión. En este estudio se utilizó como control endógeno la actina-beta (ACTB).

Material y métodos

La PCR en tiempo real fue llevada a cabo en un equipo LightCycler 480 System-96 (Roche), utilizando los siguientes componentes por cada muestra a analizar:

H₂O libre de nucleasas	2 µL
Mezcla de reacción TaqMan®	5 µL
TaqMan®Gene Expression Assay	0,5 µL
cDNA muestra	2,5 µL

La mezcla de reacción TaqMan incorpora una AmpliTaq Gold® DNA Polimerasa UP cuyo centro activo se encuentra inicialmente bloqueado, y la enzima sólo empieza a funcionar tras una incubación de 10 minutos a 95°C, que se realiza al inicio de la PCR. Con el objetivo de evitar contaminaciones por productos previos de PCR y para reducir los artefactos, la mezcla de reacción contiene el nucleótido dUTP en vez de dTTP; la mezcla contiene también Uracil-DNA-Glicosilasa termolábil (UDG) así, los productos previos de PCR que contengan dUTP son degradados para que no actúen como molde para la polimerasa, y al ser termolábil se degrada cuando la PCR alcanza los 95°C.

El programa de PCR para la detección de amplificados con Sondas TaqMan® fue el siguiente:

1. **1 ciclo:** 95°C/10 min
2. **45 ciclos:** 95°C/15 s (desnaturalización de las moléculas de DNA de doble cadena (dsDNA))

60°C/1 min (unión específica de la sonda a las hebras de DNA de cadena simple (ssDNA) donde se localiza la diana y unión de la polimerasa)

72°C/30 s (amplificación del DNA por la polimerasa; la sonda presenta dos marcajes, un fluorocromo notificador unido en 5' y uno apantallador en 3'; a medida que se produce la extensión, la polimerasa libera el notificador y una vez liberado del apantallador, el notificador emite la fluorescencia característica)

(Son 45 ciclos de amplificación en los cuales se realiza la lectura de la fluorescencia ciclo a ciclo.)

3. **1 ciclo:** 40°C/1 min (enfriamiento del termociclador)

Material y métodos

El software de análisis proporciona información de dos tipos: *crossing point* y la curva de fusión o de *melting*. El *crossing point* da idea de lo temprana o tardía que es una amplificación. Matemáticamente, es el punto en que cambia la forma de la curva.

Mediante unas PCR anteriores de diluciones seriadas de los controles, se obtuvieron las rectas de calibración. Es decir, para cada *crossing point* de las muestras, la recta patrón nos dará una cantidad de amplificación. Para obtener esta información, durante la PCR se hace una lectura de fluorescencia de cada muestra en todos los ciclos, normalmente al final de la fase de extensión, dando una idea de la evolución de la reacción, y de cómo va aumentando la cantidad de amplificado en cada ciclo.

La curva de fusión es el último paso del programa de PCR, y que consiste en una medición continua de la fluorescencia al mismo tiempo que se produce un lento incremento de la temperatura (0,1°C/s). Es una determinación indirecta de los productos obtenidos en la reacción. Cada producto tiene una temperatura de fusión característica y que está determinada por el contenido en citosina-guanina de su secuencia. Al aumentar lentamente la temperatura, se producen bruscos descensos de la fluorescencia emitida a aquellas temperaturas que coinciden con la fusión del producto de PCR. Se hace un análisis matemático del patrón de fluorescencia obtenido, realizando la derivada de la curva. Matemáticamente, un cambio en la pendiente de la curva inicial se visualiza en la derivada como un pico.

De esta forma podemos fácilmente distinguir aquellas zonas que siguen un comportamiento basal de aquellas otras en las que hay un cambio de pendiente, con lo que vemos picos.

Como controles positivos, tanto para estandarizar las PCR como para generar las rectas patrón, se utilizó RNA procedente de:

Fibroblastos de piel humana (NHDF pellet, normal human dermal fibroblasts 1x10⁶ cells in RNA later, C-14030, Labclinics/promocell). Este control positivo se utilizó para todas las sondas a excepción del queratocano y de la actina α de músculo liso (α -SMA).

RNA procedente de miofibroblastos obtenidos a partir de fibroblastos sembrados en medio con TGF β 1 durante 4 días. Control positivo de α -SMA.

RNA procedente del estroma de anillos corneales humanos. Control positivo del queratocano.

Las diluciones realizadas para la obtención de las rectas patrón fueron: 1, 1:5, 1:10, 1:50 y 1:100.

Para valorar las muestras se realizaron dos réplicas (reacciones idénticas que contienen componentes y volúmenes idénticos) por cada muestra. Se valoraron todas las muestras para cada sonda más 2 puntos de su correspondiente recta patrón y un blanco.

Una vez obtenidos todos los resultados, estos fueron normalizados con los obtenidos de la valoración de la ACTB y relativizados con los obtenidos de las muestras control (SFM) a los que se les dio un valor de 1. Estos se representan como la media de los resultados obtenidos de las dos réplicas por muestra \pm la SD.

12. CUANTIFICACIÓN DE LA ABUNDANCIA DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN-BLOT.

El Western-Blot es una técnica que nos permite detectar proteínas en un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa, de fluoruro de polivinilideno (PVDF), etc).

En primer lugar, se realizó una separación de las proteínas según su peso molecular (PM) mediante electroforesis en acrilamida en condiciones desnaturizantes y posterior electrotransferencia de las proteínas a una membrana.

La segunda parte del proceso es el *immunoblotting*, que consiste en la detección de la proteína mediante un anticuerpo específico frente a la proteína, o proteínas, que queremos detectar.

El objetivo de la aplicación de esta técnica fue determinar si los diferentes factores de crecimiento utilizados, producen cambios en los niveles de diferentes proteínas de la MEC y de aquellas implicadas en el proceso de migración celular durante el cierre de las heridas. Las proteínas estudiadas mediante western blot se muestran a continuación:

Proteína	PM (kDa)	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Colágeno I	115	234167 Policlonal de conejo	NA9340 ECL anti-IgG de conejo-HRP , producido en burro
Colágeno III	110-140	(S-17)-R sc-8780-R Policlonal de conejo	NA9340
FAK	125	A-17 sc-557 Policlonal de conejo	NA9340
Perlecano	466	E-6 sc-377219 Monoclonal de ratón	NA9310 ECL anti-IgG de ratón-HRP, producido en oveja
Sindecano 4	24	H-140 sc-15350 Policlonal de conejo	NA9340
actina β	43	AC-15 sc-69879 Monoclonal de ratón	NA9310

12.1. Extracción de proteínas totales a partir de los cultivos celulares.

Se utilizaron HCF en 7P sembrados en placas de 35 mm de diámetro. Todas las muestras se obtuvieron en el tiempo de 7 días, tiempo en el cual aún no se ha producido el cierre con ninguno de los tratamientos. En dicho tiempo se extrajeron las proteínas totales de 2 placas de cultivo por cada medio utilizado, obteniendo un *pool* de proteínas por cada tratamiento. La extracción proteica se realizó utilizando el *buffer* de lisis RIPA (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Alemania). El método de extracción de las proteínas totales se detalla en la **tabla 6**.

Una vez extraídas las proteínas, deben conservarse congeladas a -20°C , y evitando realizar un gran número de ciclos de congelación-descongelación. Asimismo, cuando se esté procediendo a su manipulación y las proteínas se encuentren en disolución, es recomendable mantenerlas en frío para reducir así su degradación.

Tabla 6: Método de extracción de las proteínas totales

1. Eliminar el medio de cultivo.
2. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS precalentado a 37°C.
3. Añadir 210 µL de *buffer* RIPA/placa manteniendo las placas a 4°C durante 20 minutos.
4. Levantar las células con una espátula (3010, Corning, NY, USA).
5. Recoger la suspensión celular obtenida de 2 placas del mismo tratamiento y transferirlas a un microtubo manteniéndolas a 4°C.
6. Centrifugar durante 12 minutos a 4°C y 13.000 g.
7. Recoger el sobrenadante en el cual se encuentra el contenido de proteínas totales.

12.2. Medida de la concentración de proteínas.

Debido a que la cantidad de células de la que se parte puede variar de una placa a otra y a las diferencias en el rendimiento de la extracción de las proteínas, es necesario medir la concentración de proteínas después de su extracción. Para ello, utilizamos el método de Bradford utilizando el reactivo de Bradford (B6916-500 MI, Sigma). Como proteína patrón se usó la albúmina procedente de suero bovino (BSA) disuelta en *buffer* RIPA. Las diferentes concentraciones empleadas para la realización de la recta patrón fueron 2000, 1500, 1250, 1000, 500, 250, 125 y 0 µg/mL. La medición de la concentración de proteínas se realizó en placas de 96 pocillos, añadiendo a cada pocillo 5 µL de muestra (ya sea de la proteína problema o de la recta) y 250 µL de reactivo de Bradford.

Una vez añadido el reactivo de Bradford a todas las muestras se agitó la placa y se incubó entre 5 y 45 min antes de hacer la lectura de la absorbancia.

La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de placas Sunrise RC básico (Tecan).

Por último, se realizó un análisis de regresión lineal con las muestras de la recta patrón y se calculó la concentración de proteína en las muestras problema. En nuestro caso obtuvimos una media de 450 µg/mL a partir de las células contenidas en 2 placas de 35 mm sometidas al mismo tratamiento.

12.3. Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida (SDS-PAGE).

El gel de acrilamida nos permite la separación de proteínas según su PM. Puesto que las proteínas tienen estructuras muy heterogéneas es necesario neutralizar las cargas para que todas tengan el mismo comportamiento iónico y se separen solamente en función de su PM. Según sea el tamaño de las proteínas que queremos analizar, se utilizará una concentración distinta de acrilamida, siendo más concentrada cuando se necesite separar macromoléculas de bajo peso molecular.

Nosotros realizamos dos tipos de geles, del 10% de acrilamida para la detección del sindecano 4 y del 6% para la detección del resto de proteínas de mayor PM.

El proceso se llevó a cabo empleando una cubeta de electroforesis MiniProtean tetra cell (Bio-Rad Laboratories, S.A, Madrid, España). Cada muestra debe contener una cantidad de entre 10 y 20 μL de proteína, aunque puede ser incluso superior si se utilizan geles de acrilamida con un mayor grosor o la muestra se carga de dos veces. Antes de realizar la electroforesis, es necesario añadir un tampón de carga y proceder a la desnaturalización de las proteínas mediante calentamiento a 100°C durante 5 minutos, nosotros utilizamos el *buffer* de carga Laemmli en proporción 1:3. Para la detección de FAK se utilizaron 20 μL de muestra en cada pocillo y 40 μL para la detección del resto de proteínas, ya que en pruebas previas observamos que 20 μL no eran suficientes para su correcta detección.

Además de las muestras problema, es necesario introducir una muestra patrón que contenga varias proteínas de PM conocido, para que al finalizar la detección podamos comprobar que efectivamente la proteína detectada tiene el PM correspondiente al de la proteína de interés. El marcador de peso utilizado fue *GangNam-STAIN* (24052, Intron Biotechnology, Inc).

En cada gel se cargaron las muestras problema y el marcador de PM (7 μL). La electroforesis se realizó con un voltaje de 25 mA durante 1 hora.

12.4. Electrotransferencia.

Una vez que las proteínas han sido separadas en el gel de acrilamida es necesario transferirlas a una membrana, mediante el montaje de un *sándwich* en el cual las proteínas se van a transferir desde el gel hasta la membrana. La transferencia puede llevarse a cabo por varios métodos (difusión, capilaridad, aplicación de vacío), pero para proteínas separadas en geles de poliacrilamida se suele emplear un campo eléctrico, que fue el método utilizado en este trabajo. Este, aplicado perpendicularmente a un *sandwich* formado por el gel y la membrana empapados entre papeles de filtro y esponjas empapados en el buffer de transferencia, provoca la transferencia de las proteínas hacia la membrana. La transferencia se realiza a amperaje constante (350 mA durante 1 hora) y es importante mantener el sistema refrigerado. Las membranas pueden ser de diferentes tipos; la primera que se utilizó fue de nitrocelulosa, que tiene una buena capacidad de unión de proteínas y se puede elegir de diferentes tamaños de poro dependiendo de la proteína que queramos transferir. Otro tipo también muy utilizado son las membranas *PVDF*. Estas deben ser activadas sumergiéndolas en metanol antes de su uso.

La transferencia no es un proceso cuantitativo y diversos factores afectan al proceso; las proteínas de alto PM se transfieren peor que las de menor peso. Por otro lado, las pequeñas se transfieren mejor pero pueden perderse en los lavados posteriores de la membrana. La presencia de alcohol en el *buffer* de transferencia incrementa la unión de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa, aunque provoca una peor transferencia de proteínas grandes. La adición del SDS al buffer incrementa la eficacia de la transferencia, aunque puede reducir la eficacia de la unión a las membranas de nitrocelulosa. El uso de membranas de PVDF ayuda a evitar gran parte de estos problemas y fueron las elegidas para nuestros experimentos.

Una vez terminado el proceso, se sumerge la membrana en colorante Ponceau (P-3504, Sigma) para confirmar que las proteínas se han transferido adecuadamente y se encuentran inmovilizadas en la membrana de PVDF.

12.5. Inmunoblotting.

Una vez que comprobamos que las proteínas se han transferido a la membrana, esta se lava con agua destilada y se procede a la detección basada en una reacción antígeno-anticuerpo. El proceso consiste en los siguientes pasos:

Bloqueo de las uniones inespecíficas:

- Se sumerge la membrana en TTBS (TBS y Tween 20 (P5927, Sigma)) con BSA o leche descremada al 2% (dependiendo del anticuerpo utilizado) a temperatura ambiente durante una hora en agitación.

Incubación con anticuerpo primario:

- Incubar cada membrana con su anticuerpo primario durante 24 horas a 4°C en agitación. La dilución de los anticuerpos primarios fue 1:250 excepto FAK y actinaβ que fue 1:1000. Todos se diluyeron en TTBS al 2% de BSA a excepción del colágeno I que se diluyó en TTBS al 5% en leche descremada.

(Todos fueron obtenidos de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology excepto el colágeno tipo 1 que es de Calbiochem, Merk-Millipore.)

Incubación con el anticuerpo secundario:

- Incubar cada membrana con su anticuerpo específico frente a las inmunoglobulinas de la especie del anticuerpo primario. En nuestro caso, hemos utilizado dos anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP, Horseradish peroxidase conjugated), uno frente a la IgG de ratón (NA9310, VWR International Ltd) y otro frente a la de conejo (NA9340, VWR International Ltd). La dilución utilizada fue 1:10.000 en TTBS y el tiempo de incubación fue de 1 hora a 4°C en agitación.

Detección:

- El último paso consiste en detectar aquellas zonas de la membrana en las que se ha unido el anticuerpo específico. En nuestro caso, para la detección de los productos específicos hemos utilizado el sustrato quimioluminiscente ECL para detección con HRP y la señal ha sido captada en placas de autorradiografía (16188323 películas FUJI SUPER-RX 18 x 24,100 u,Rosex.Medical SL).

12.6. Análisis densitométrico de las bandas proteicas.

Una vez finalizado el western-blot, se procedió a digitalizar las imágenes obtenidas en las placas de autorradiografía en un escaner convencional. Posteriormente, se realizó un análisis densitométrico de las bandas de cada imagen utilizando el software QuantityOne (BioRad). En cada membrana es necesario detectar la actina β como control endógeno para posteriormente normalizar los resultados con esta proteína. Su detección se pudo realizar directamente en todas las membranas excepto en las que se detectó el perlecano, ya que el anticuerpo primario es de ratón al igual que el de la actina β . Para poder detectar la actina β , hay que eliminar los anticuerpos previamente unidos a la membrana y a este proceso se denomina *stripping*. Su método de realización se detalla en la **tabla 7**. Para ello se necesita el siguiente buffer de *stripping*:

Preparación del buffer de <i>stripping</i> (100 mL)
• 1,5 g de glicina
• 0,1 g de SDS
• 1 mL de Tween 20
• Ajustar el pH a 2,2

Tabla 7: Método de realización del <i>stripping</i>
1. Activar nuevamente la membrana con metanol durante 30 segundos.
2. Lavar con TTBS.
3. Realizar 2 incubaciones de 15 minutos en el buffer de <i>stripping</i> .
4. Lavar con TTBS.
5. Bloquear y continuar con el inmunoblotting del mismo modo que se describió previamente.

Una vez realizado el análisis densitométrico de las bandas para cada proteína problema, se hizo la media de los resultados obtenidos por cada tratamiento y finalmente se dividieron entre los obtenidos en las muestras control (SFM) relativizando así todos los resultados con respecto al control, al cual se le dio un valor de 1. Los datos se representan como la abundancia relativa de cada proteína por cada tratamiento.

13. DETERMINACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE MIGRACIÓN.

Esta técnica permite la detección de proteínas en los cultivos celulares preservando, en mayor o menor medida, la morfología original de las células con el objetivo de visualizar las zonas del cultivo y en qué células se expresan las proteínas estudiadas. Para este estudio, las células fueron sembradas sobre cubres colocados en placas de 35 mm de diámetro. Los medios de cultivo fueron reemplazados cada dos días. Se emplearon 3 placas de cada tipo de medio de cultivo. Las proteínas objeto de estudio fueron la integrina $\alpha 5\beta 1$, FAK y el SDC4 ya que su visualización y localización nos permite distinguir zonas celulares en las cuales se localizan adhesiones focales. El tiempo de 4 días fue elegido en base a que en este tiempo las células de los márgenes de la herida o las que están ya ocupando la misma, son más fácilmente visualizables que en tiempos posteriores cuando la abundancia de células en dichas zonas es mayor. El método para la detección inmunocitoquímica de dichas proteínas se detalla en la **tabla 8**.

Tabla 8: Método para la detección inmunocitoquímica de integrina $\alpha 5\beta 1$, FAK y SDC4.

1. Fijar con paraformaldehído tamponado al 1% en tampón fosfato 0,1M durante 10 minutos.
2. Realizar 3 lavados de 5 minutos en PBS.
3. Permeabilizar introduciendo los cubres en:
TritonX-100 al 0,1% en PBS preenfriado a -20°C durante 10 minutos.
(para la detección del SDC4 y de la integrina $\alpha 5\beta 1$)
Acetona preenfriada a -20°C durante 10 minutos.
(para la detección de FAK)
4. Bloquear antígenos no específicos con suero de cabra diluido al 3% en PBSA (BSA al 1% en PBS) durante 30 minutos.
5. Incubar con los respectivos anticuerpos primarios toda la noche a 4°C en las diluciones que se describen a continuación:
 - FAK (A-17, sc-557) 1:250
 - SDC4 (H-140, sc-15350) 1:100
 - Integrina $\alpha 5\beta 1$ (MAB1969, Millipore) 1:250

(Todas las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios se realizaron con PBSA)

6. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS.
7. Incubar con los respectivos anticuerpos secundarios en dilución 1:200, durante 1 hora.
 - Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse (A-11029, Life Technologies), para la integrina.
 - Alexa Fluor 594 Goat anti-rabbit (A-11037, Life Technologies), para FAK.
 - Alexa Fluor 594 Goat anti-mouse (A-11032, Life Technologies), para el SDC4.
8. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS.
9. Montar los cubres sobre portaobjetos con Anti Fade.

La visualización y toma de imágenes se llevó a cabo con un microscopio confocal Leica y el *software Leica Application Suite Advanced*. Todas las imágenes de los cultivos celulares fueron tomadas con el objetivo de 40x bajo inmersión y realizadas con un láser de excitación para las longitudes de onda 488 y 543 nm manteniendo en todo momento las mismas condiciones de intensidad de láser, contraste, brillo y pinole para así poder comparar el marcaje.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar se resumieron las variables numéricas con medias y desviaciones estándar.

Para el análisis estadístico de las diferentes medidas se realizó un estudio de comparación múltiple de las diferentes medias de los parámetros evaluados a lo largo de los diferentes tiempos estudiados.

Para este fin, primero se calcularon los valores muestrales comunes: media, error estándar de la media, coeficiente de variación, mínimo, máximo, coeficiente de asimetría y coeficiente de kurtosis.

Estos estadísticos nos ayudan a resumir las muestras, localizando su valor central y la dispersión de las mismas. Los coeficientes de asimetría y de kurtosis nos ayudan a establecer la normalidad de la variable dependiente. Valores absolutos mayores que 2 nos advierten de que la variable se desvía de la normalidad.

En todos los resultados las variables cuantitativas se presentan con la media y la SD.

Material y métodos

Se realizó el test de Levene para contrastar si las varianzas son iguales para los diferentes valores del factor.

Se contrastó la igualdad de respuesta en cuanto a la proliferación y a la actividad metabólica con un análisis de la varianza. Para mantener controlado el error de tipo I global cuando se comparan diferentes tratamientos se empleó el procedimiento de comparaciones múltiples de Tukey.

Con los datos del tamaño de la herida obtenidos para diferentes momentos durante el cierre, se creó una puntuación para resumir la evolución temporal observada en cada tratamiento y se contrastó la igualdad de las evoluciones correspondientes a diferentes tratamientos. Para controlar globalmente el error de tipo I en las comparaciones entre parejas de tratamientos se aplicó la corrección debida a Bonferroni sobre los correspondientes p-valores.

Para establecer la correlación entre la densidad de las células BrdU positivas y las células α SMA positivas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

Con los datos obtenidos en el resto de experimentos se realizó un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA).

En el caso de que las varianzas sean iguales y se quiera comparar la media de tres o más grupos se realiza la tabla ANOVA para contrastar la igualdad de las medias.

En el caso de que las varianzas no sean iguales y se quiera comparar la media de tres o más grupos, se realiza el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Los datos han sido analizados con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc.; Warrenton, VA, USA). Se consideraron estadísticamente significativos aquellos p valores menores de 0,05.



Resultados

1. MODELO DE HERIDA

En primer lugar hemos establecido la respuesta celular producida en los fibroblastos humanos (HCF) tras la realización de una herida manual *in vitro*, sin la adicción de suero ni de factores de crecimiento, para establecer las diferencias con otros estudios previos realizados sin heridas o con otros tipos de heridas. Dicha respuesta será utilizada como control para todos los experimentos posteriores.

En respuesta a la herida, hemos observado que se libera bFGF al medio a las 24 horas, no detectándose posteriormente durante el cierre (ni a los 4 ni a los 7 días) (**Fig. 14**). En tiempos posteriores (7 días) se detectó liberación de TGF β 1. La liberación de bFGF inicial, junto con otros factores que probablemente también se estén liberando y no hemos estudiado, podría inducir la entrada en proliferación de las células que están en la zona cercana a la herida.

No detectamos PDGF-BB en ninguno de los tiempos estudiados como era de esperar, ya que es un factor de crecimiento cuya liberación está restringida a las células del epitelio corneal aunque sus receptores se localicen en las células del estroma.

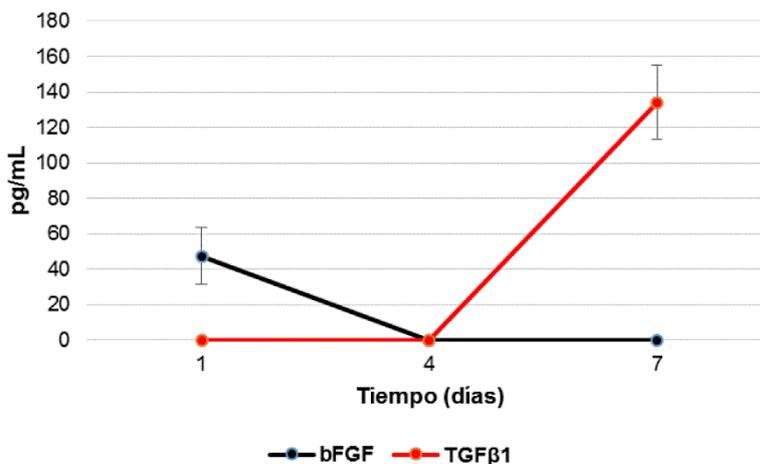


Figura 14. Detección de los factores de crecimiento estudiados en el medio de cultivo de las células control (SFM) en los diferentes tiempos de estudio.

Durante el proceso de cierre (**Fig. 15**) hay un incremento de la proliferación celular constante (**Fig. 15A**), no observando células que hayan proliferado en la zona de la herida a las 24 horas después de su realización pero si a los 4 días. A partir de ese momento, en los tiempos de 10 y 15 días, el incremento de la densidad de células BrdU positivas en esa zona es significativamente mayor que en las otras dos zonas

Resultados

analizadas. A las 24 horas ya se observan miofibroblastos en los márgenes de la herida y en el resto del cultivo (**Fig. 15B**). La densidad de este tipo celular aumenta de forma constante en el tiempo, presentando una baja densidad en la zona de la herida hasta los 15 días, momento que coincide con el cierre de la misma (**Fig. 15D**), por lo que su presencia en dicha zona es indicativo de la fase de contracción de la herida para que el cierre tenga lugar.

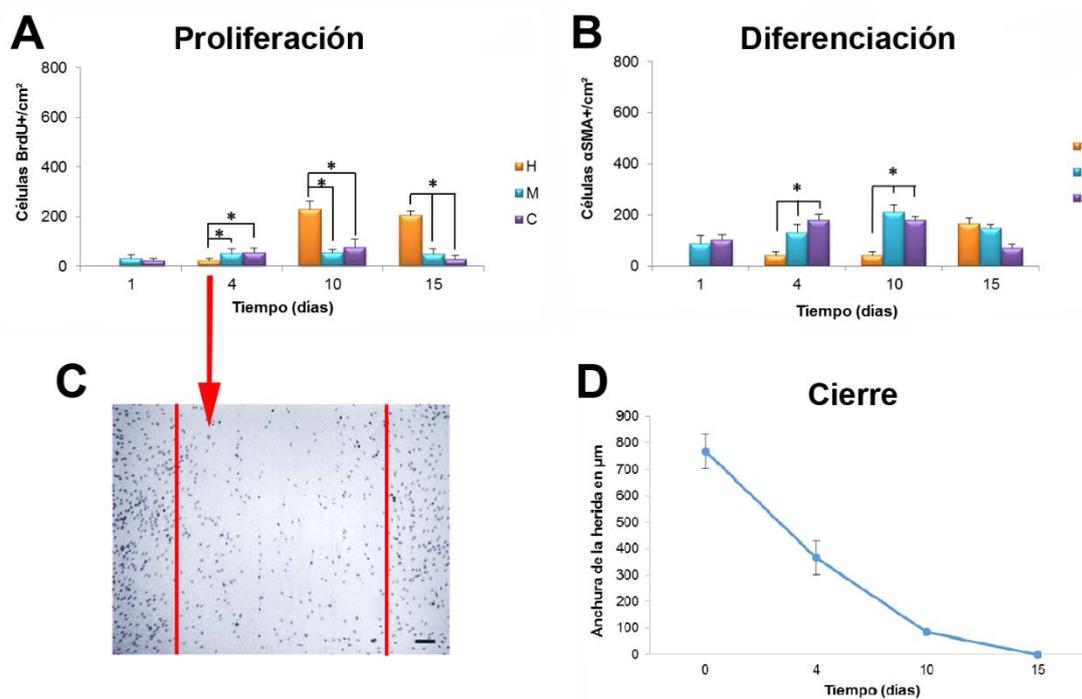


Figura 15. Proliferación celular y diferenciación miofibroblástica en las diferentes partes del cultivo asociadas con la herida. Los gráficos muestran el número y la localización de las células BrdU positivas (**A**) y α SMA positivas (**B**) obtenidas en los cultivos control (SFM). Ambos tipos de células fueron contadas en tres zonas diferentes del cultivo: herida (H), márgenes de la herida (M) y resto del cultivo (C). * Denota diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes áreas en cada tiempo de estudio ($p < 0,05$). (**C**) Microfotografía representativa que muestra en detalle las células BrdU positivas (núcleos teñidos de color negro) en el cultivo control a los 4 días. Las líneas rojas representan el tamaño inicial de la herida. Magnificación 50x; barra de escala 100 μm . (**D**) Proceso de cierre de la herida realizada en células control (SFM).

Resultados

La morfología celular observada durante el cierre fue principalmente fibroblástica (**Fig. 16A**), lo cual fue confirmado por la ausencia de expresión de queratocano. Estas células presentaron bajos niveles de actina-f (**Fig. 16B**).

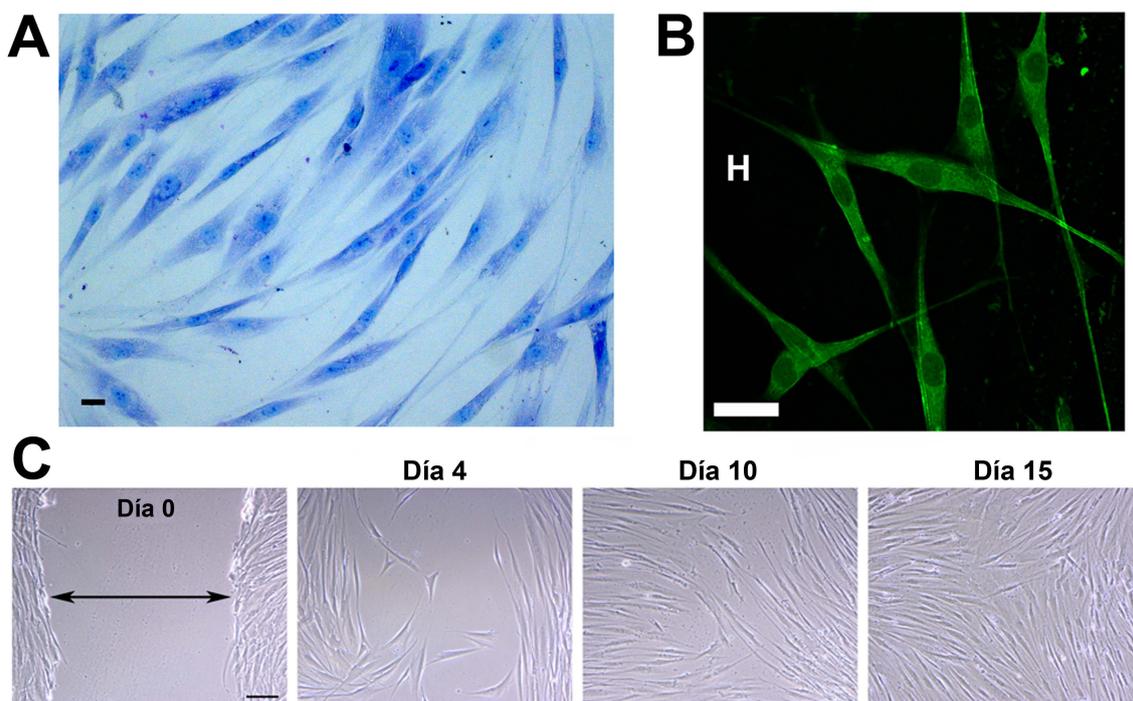


Figura 16. (A) Microfotografía representativa que muestra la morfología general de las células control (SFM) a los 4 días tras la realización de la herida. Magnificación 200x; barra de escala 20 μm . **(B)** Microfotografía representativa que muestra la organización en el citoesqueleto de los microfilamentos de actina-f en las células control (SFM) localizadas en los márgenes de la herida 4 días después de la realización de la misma. **H**, muestra el área en la que se localiza la herida; Magnificación 400x; barra de escala 25 μm . **(C)** Microfotografías representativas de los cambios observados en las células control (SFM) durante los diferentes tiempos de estudio, tras la realización de las heridas hasta que se completó su cierre. Magnificación 100x; barra de escala 100 μm .

A su vez, a los 7 días estas células expresan y sintetizan colágeno tipo I y tipo III, SDC4 y perlecano, indicadores de la síntesis de una matriz reparadora. También expresan las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$ de la integrina, cuya localización a los 4 días fue observada formando complejos focales en muchas de las zonas donde también se localizó el SDC4 (**Fig.17**). Esto, junto con la escasa cantidad de microfilamentos de actina-f del citoesqueleto y la orientación de las células (paralelas a la zona de la herida) hace que el proceso migratorio sea lento y desorientado, lo cual ha sido observado durante el cierre que parece ser debidamente mayoritariamente al incremento de proliferación celular en la zona de la herida.

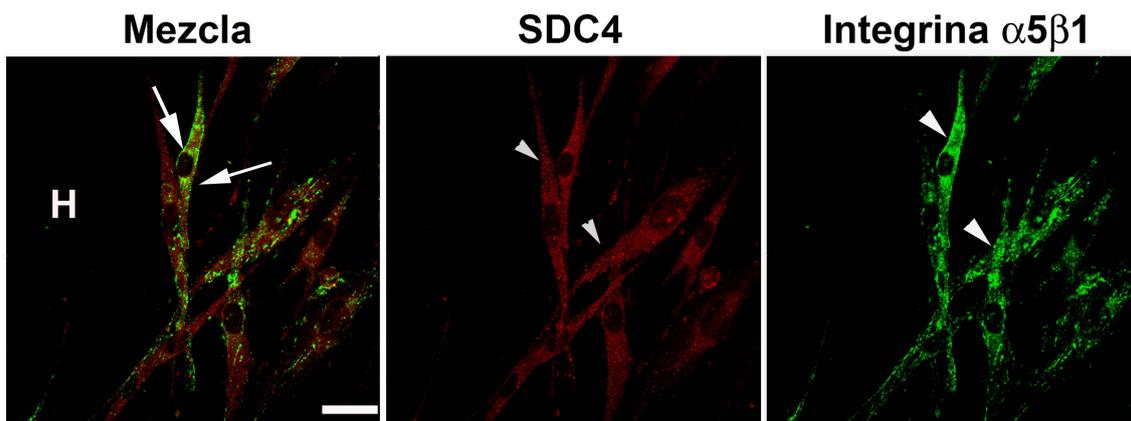


Figura 17. Co-localización del SDC4 y de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Las microfotografías muestran la localización mediante inmunocitoquímica del SDC4 y de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en las células control (SFM) 4 días después de la realización de la herida. **H**, indica la zona donde se localiza la herida; Las cabezas de flecha indican posibles complejos focales en el frente de avance celular. La primera columna muestra la mezcla de imágenes de ambas proteínas mostrando su co-localización (en amarillo indicado con flechas). Barra de escala 25 μm .

Una vez establecidas las respuestas que tienen lugar durante el cierre de la herida, sin la influencia de ningún factor de crecimiento aplicado de forma exógena, estudiamos la respuesta inducida por estas células a cada factor de crecimiento de forma individual relacionando cada respuesta con las diferentes fases del proceso de cicatrización.

2. EFECTO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO: TGF β 1, PDGF-BB y bFGF, SOBRE EL PROCESO DE CIERRE DE LA HERIDA

2.1. Concentración óptima de los factores de crecimiento utilizados.

Durante el estudio llevado a cabo para la elección de la concentración óptima de cada factor de crecimiento observamos, como se muestra en la **figura 18**, que sin realizar una herida (SH, sin herida) en los pocillos existía una mayor actividad metabólica en todos los casos excepto con las concentraciones de 20 y 50 ng/mL de PDGF-BB a los 4 días. El hecho de que con la herida (H) la actividad metabólica sea menor es debido a que al realizar las heridas el número de células es inferior por lo que obtenemos siempre valores más bajos. Para elegir la concentración óptima tuvimos en cuenta los resultados obtenidos en los pocillos con heridas ya que todo el estudio se iba a realizar en cultivos con heridas.

Resultados

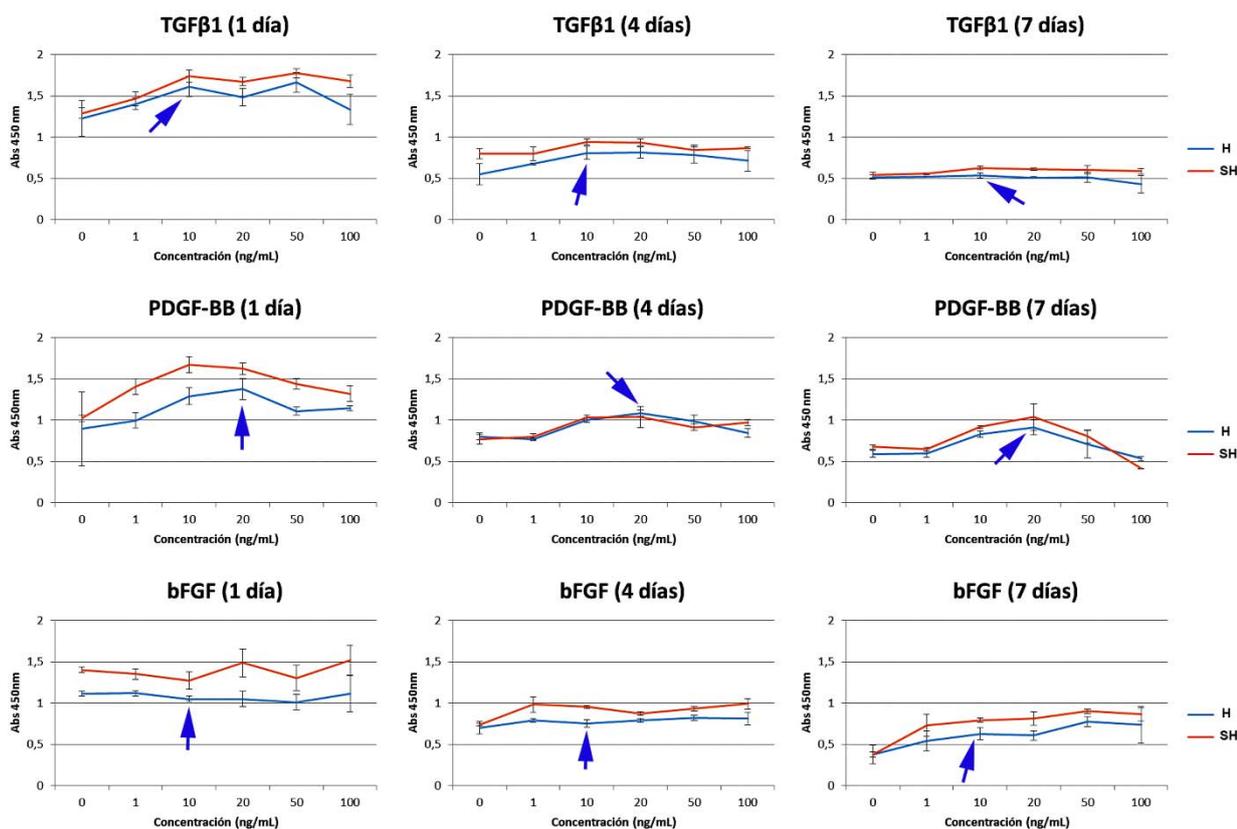


Figura 18. Los diferentes gráficos muestran los resultados obtenidos al testar diferentes concentraciones de cada factor de crecimiento en diferentes tiempos de estudio del cierre de las heridas. **H:** indica los resultados obtenidos en los pocillos con herida; **SH:** indica los resultados obtenidos en pocillos sin realizar herida. Las flechas indican la concentración finalmente elegida.

Las concentraciones utilizadas para todos los experimentos se eligieron a partir de nuestros resultados, eligiendo la concentración más baja que daba lugar a una respuesta máxima no tóxica y comparándola con las utilizadas frecuentemente en la bibliografía. Las tres concentraciones elegidas se muestran a continuación:

TGFβ1: 10 ng/mL

PDGF-BB: 20 ng/mL

bFGF: 10 ng/mL

En el caso del bFGF, en el que los resultados no estaban tan claros como con los otros dos factores de crecimiento, se tuvo en cuenta que dicha concentración era la más utilizada en estudios con cultivos celulares tratados con este factor de crecimiento²⁸⁹,²⁹² y, actualmente sigue siendo utilizada.³⁰⁴

2.2. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la secreción autocrina de los mismos.

La liberación temprana de bFGF observada en el medio control (SFM) disminuyó con la adición al medio de PDGF-BB y no fue detectado en el medio tras la adición de TGFβ1 existiendo, en este último caso, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a los otros dos grupos (**Fig. 19A**).

Por otro lado, a los 7 días, se detectó TGFβ1 en el medio como se observa en el control (SFM). Los cultivos con heridas tratadas con bFGF mostraron los mismos valores de TGFβ1 que los del grupo control mientras que el tratamiento con PDGF-BB indujo un incremento significativo de la concentración de TGFβ1 en el medio ($p < 0,001$; **Fig 19B**).

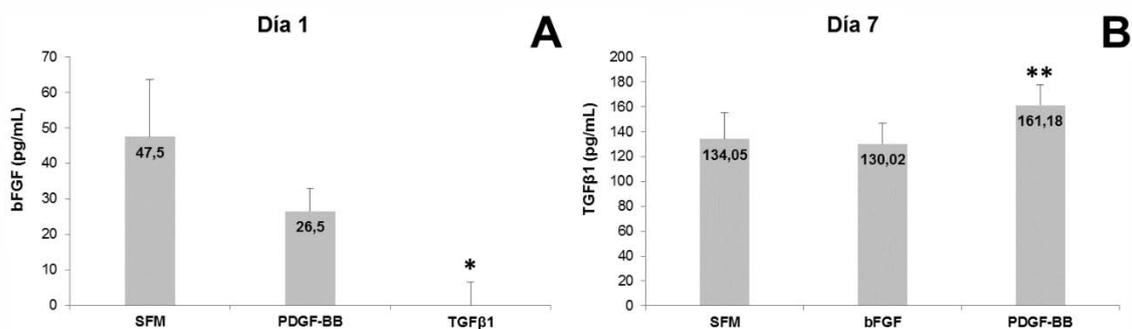


Figura 19. Detección de bFGF y de TGFβ1 en el medio de cultivo. Las concentraciones detectadas, de ambos factores de crecimiento, fueron comparadas entre tratamientos los días 1 y 7 tras la realización de las heridas y expresadas en pg/mL. **(A)** Concentraciones de bFGF detectadas en el día 1. **(B)** Concentraciones de TGFβ1 detectadas en el día 7. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

2.3. Efecto de los factores de crecimiento sobre el proceso de cierre de la herida.

Tras la observación diaria de los cultivos, a partir del cuarto día se empezaron a ver diferencias en la anchura de las heridas dependiendo del factor de crecimiento que se añadió al medio y comenzamos a tomar medidas de las mismas (**Tabla 9** y **Fig. 20**). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en dicho tiempo ($p < 0,001$) excepto entre las heridas tratadas con PDGF-BB y bFGF. El patrón de cierre seguido por las heridas tratadas con estos dos factores de crecimiento fue muy similar y en ambos casos el cierre total se completó el día 10 (**Fig. 20**). En ese tiempo, el cierre de la herida tratada con TGFβ1 fue más lento que el de las heridas sin tratar (SFM) ($p <$

Resultados

0,01). Aunque en los cultivos con heridas control el proceso de cierre fue más lento que con PDGF-BB o bFGF, este tuvo lugar a los 15 días, mientras que con la adición de TGFβ1 el cierre no se completó durante los tiempos de estudio elegidos como se observa en la **figura 20**.

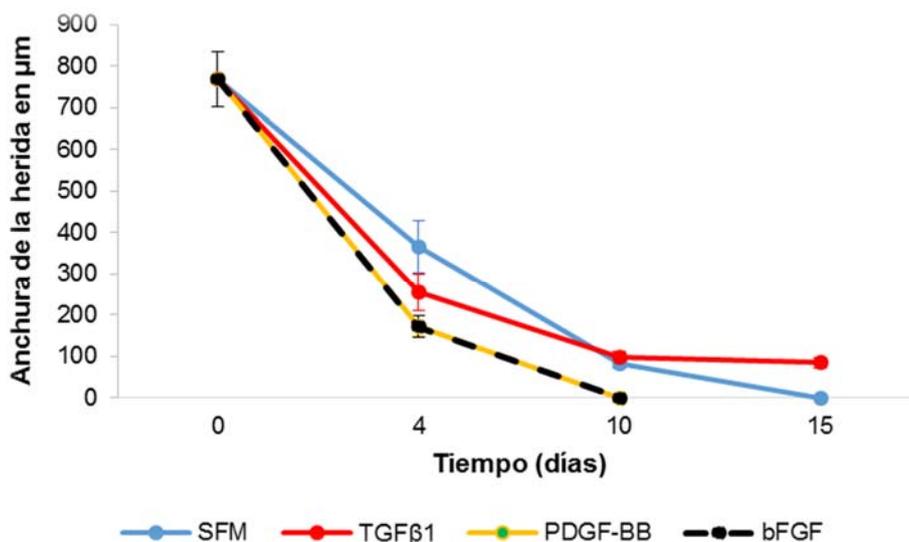


Figura 20. Proceso de cierre de la herida. El gráfico muestra el efecto de cada factor de crecimiento sobre el tiempo de cierre de las heridas.

Tabla 9. Efecto del tratamiento con los diferentes factores de crecimiento sobre el tiempo de cierre de las heridas.

Tratamiento	Anchura de la herida			
	Día 0	Día 4	Día 10	Día 15
SFM		365,45±63,08 μm [†]	83,51±10,49 μm [#]	0±0 μm
TGFβ1	768,50±65,87 μm	255,50±44,07 μm [‡]	98,80±12,52 μm	84,38±11,79 μm
PDGF-BB		172,85±25,43 μm [§]	0±0 μm	
bFGF		171,71±25,15 μm	0±0 μm	

SFM, medio sin suero; TGFβ1, factor de crecimiento transformante β1; PDGF-BB, factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma-BB; bFGF, factor de crecimiento fibroblástico básico. †, ‡, § y || indican diferencias estadísticamente significativas a los 4 días siendo $p < 0,001$. # indica diferencias estadísticamente significativas el día 10 siendo $p < 0,01$.

† SFM: vs TGFβ1; vs PDGF-BB; vs bFGF.

‡ TGFβ1: vs SFM; vs bFGF; vs PDGF-BB.

§ PDGF-BB: vs SFM; vs TGFβ1.

|| bFGF: vs SFM; vs TGFβ1.

#SFM vs TGFβ1.

2.4. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la morfología celular.

Para poder observar los cambios fenotípicos inducidos por la realización de la herida y por la adición de los diferentes factores de crecimiento, se tomaron microfotografías de los cultivos en los diferentes tiempos de estudio (**Fig. 21A**). Cuatro días después de hacer las heridas, ya se pudieron observar diferencias morfológicas en las células sometidas a los diferentes tratamientos (**Fig. 21A-B-C**) y estas diferencias se mantuvieron durante todo el estudio. Las células mantenidas en SFM presentaron una morfología fibroblástica característica con un citoplasma celular alargado. Por otro lado, las células tratadas con TGF β 1 desarrollaron una morfología similar a la de los miofibroblastos, con un citoplasma celular muy extenso y amplias prolongaciones con una elevada cantidad de microfilamentos de actina-f distribuidos por todo el citoplasma (y microfilamentos de actina α como veremos posteriormente). Finalmente, las células tratadas con bFGF o PDGF-BB presentaron una morfología fusiforme similar a la de las células control, pero en el caso de las tratadas con PDGF-BB estas presentaron una morfología mucho más fusiforme, casi filiforme, presentando un cuerpo celular muy alargado y estrecho. En ambos grupos también se observó una mayor cantidad de microfilamentos de actina-f en comparación con las células control y concretamente en el caso de las tratadas con PDGF-BB se localizaron principalmente en la zona del cortex celular.

Resultados

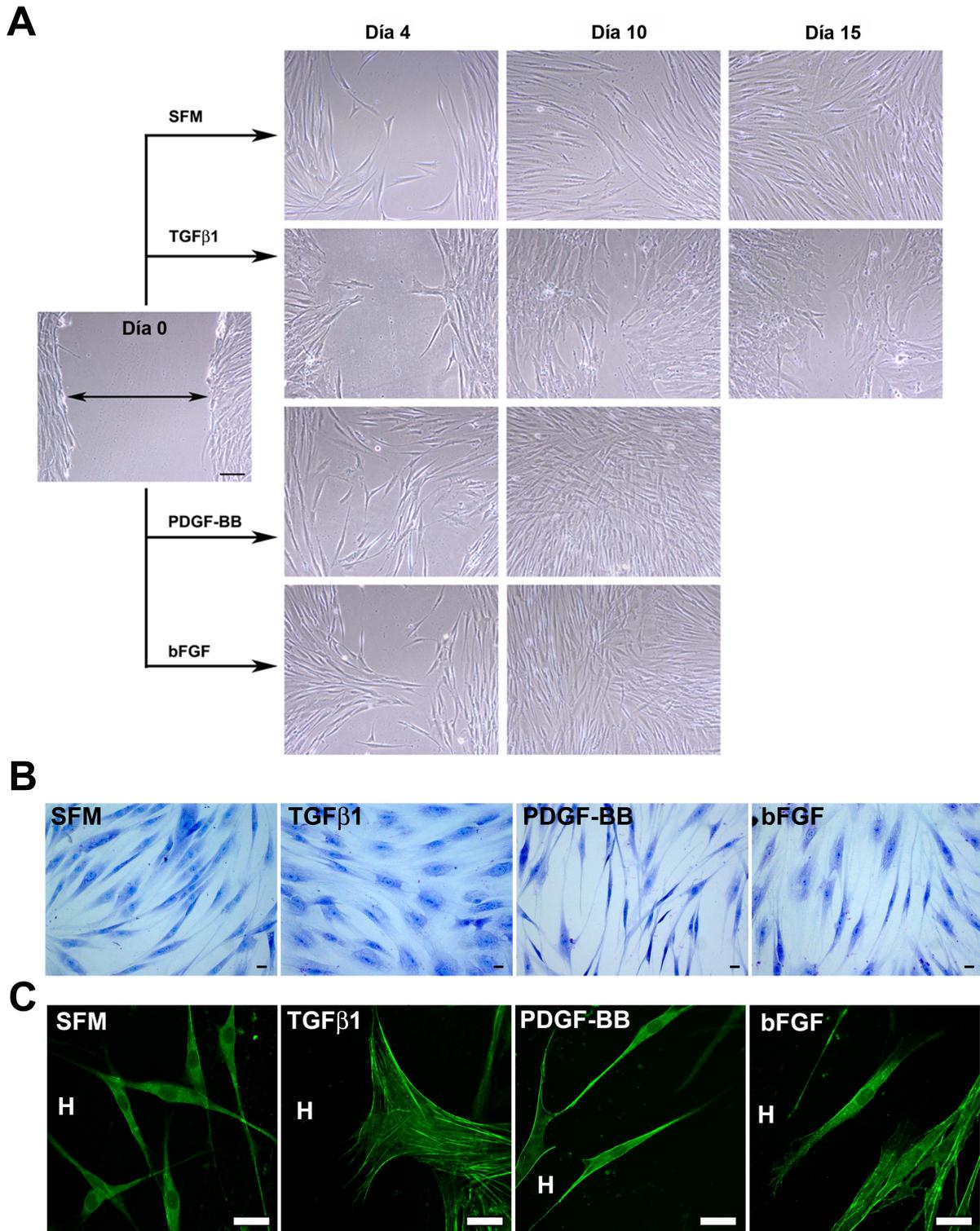


Figura 21. Cambios en la morfología celular. **(A)** Microfotografías representativas del cierre de la herida y de los cambios morfológicos observados en HCF cultivados en SFM (control), o SFM suplementado con TGF β 1, PDGF-BB, o bFGF en los diferentes tiempos de estudio (0, 4, 10, y 15 días) tras la realización de las heridas y hasta que el cierre de las mismas se completó. Magnificación 100x; barra de escala 100 μ m. **(B)** Microfotografías representativas de la morfología general de los HCF (no localizados en la zona de la herida) a los 4 días tras la realización de las heridas con los diferentes tratamientos aplicados. Magnificación 200x; barra de escala 20 μ m. **(C)** Microfotografías que muestran la organización en el citoesqueleto de los microfilamentos de actina-f en HCF cultivados en SFM o SFM suplementado con TGF β 1, PDGF-BB, o bFGF 4 días después de la realización de las heridas. **H**, muestra el área en la que se localiza la herida. Obsérvese la diferente distribución de los microfilamentos con respecto a la herida. En las células tratadas con TGF β 1, estos se distribuyen paralelamente a dicha zona mientras que los de los otros dos grupos de tratamientos se distribuyen perpendicularmente. Magnificación 400x; barras de escala de 25 μ m.

2.5. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la actividad metabólica celular.

Un día después de realizar las heridas, sólo la adición al medio de PDGF-BB dio lugar a un incremento significativo de la actividad metabólica celular ($p < 0,05$; **Fig. 22**). A los 4 días, la actividad metabólica siguió aumentando con el PDGF-BB mostrando nuevamente los valores más altos entre los grupos de estudio ($p < 0,05$). Este momento coincide con el tiempo de cierre de las heridas realizadas en células sembradas sobre placas de 96 pocillos y tratadas tanto con PDGF-BB como con bFGF. En los experimentos realizados en los pocillos el cierre fue más rápido debido a que el área de la herida es inferior. La adición al medio de TGF β 1 y bFGF indujo un ligero incremento en la actividad metabólica, sin mostrar diferencias entre ambos factores pero si entre estos y las heridas de las células control, que mostraron los niveles más bajos de actividad ($p < 0,05$). Finalmente, a los 7 días los niveles de actividad siguieron siendo más altos con TGF β 1 que los observados en las células control ($p < 0,05$), en las cuales se produjo el cierre en dicho tiempo.

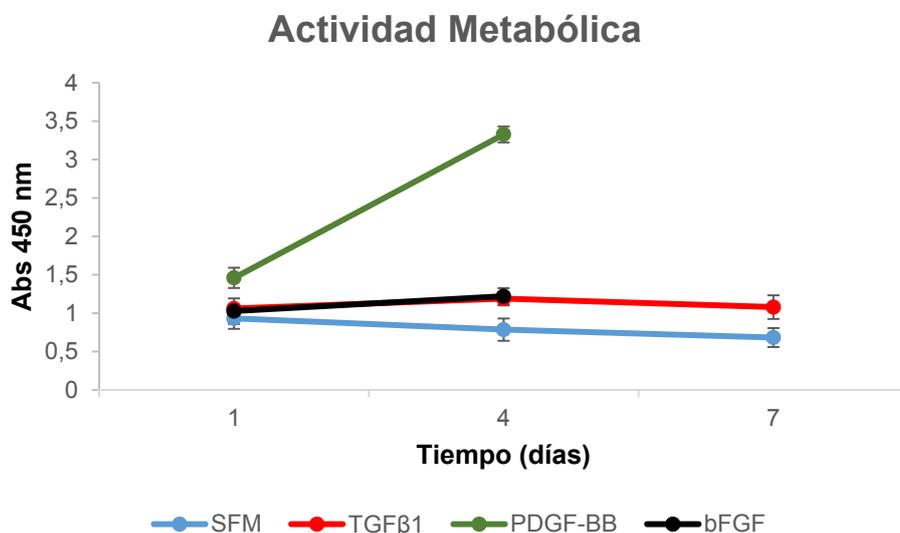


Figura 22. El gráfico muestra los resultados obtenidos de la actividad metabólica celular (medida como absorbancia a 450 nm) obtenida tras la aplicación de los diferentes tratamientos en los diferentes tiempos de estudio después de la realización de las heridas (1, 4 y 7 días).

2.6. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la proliferación celular.

Debido a que el cierre de la herida puede producirse tanto por proliferación como por migración celular, estudiamos la tasa proliferativa que presentan los cultivos sometidos a la herida y a los factores de crecimiento mediante la detección cuantitativa de DNA sintetizado de nuevo.

Todos los tratamientos estimularon niveles de proliferación celular más altos que los presentados por las heridas control en todos los tiempos estudiados (**Fig. 23**). Un día después de realizar las heridas la tasa de proliferación más alta se observó en las células tratadas con PDGF-BB ($p < 0,05$). Las diferencias observadas entre la proliferación inducida con el TGF β 1 y el bFGF no fueron significativas y tampoco lo fueron las diferencias observadas entre el TGF β 1 y la proliferación de las células control, pero sí entre la proliferación de estas últimas y la inducida por el bFGF ($p < 0,05$).

El día 4 observamos un descenso en la proliferación de las células tratadas con PDGF-BB que coincide con el tiempo de cierre (en este estudio, al igual que en el realizado con la actividad metabólica, el cierre es más rápido ya que se realizó en células sembradas sobre placas de 96 pocillos y por lo tanto el área de la herida es inferior), mientras que con los otros dos tratamientos y el control, la tasa proliferativa aumentó. En este tiempo de estudio no se observaron diferencias en cuanto a la proliferación estimulada por PDGF-BB, bFGF ni TGF β 1, pero con todos las proliferación fue más alta que en las heridas control ($p < 0,05$). Desde el día 4 hasta el 7 la proliferación en los cultivos control y en los tratados con TGF β 1 siguió aumentando y aunque se observaron diferencias, estas no fueron estadísticamente significativas. A pesar del aumento de proliferación observado con el TGF β 1, el cierre de la herida no tuvo lugar mientras que en el control sí. Estos resultados coincidieron con los obtenidos en el estudio del cierre realizados en placas de mayor superficie, lo cual indica que el proceso de migración se está viendo afectado por la suplementación con dicho factor de crecimiento.

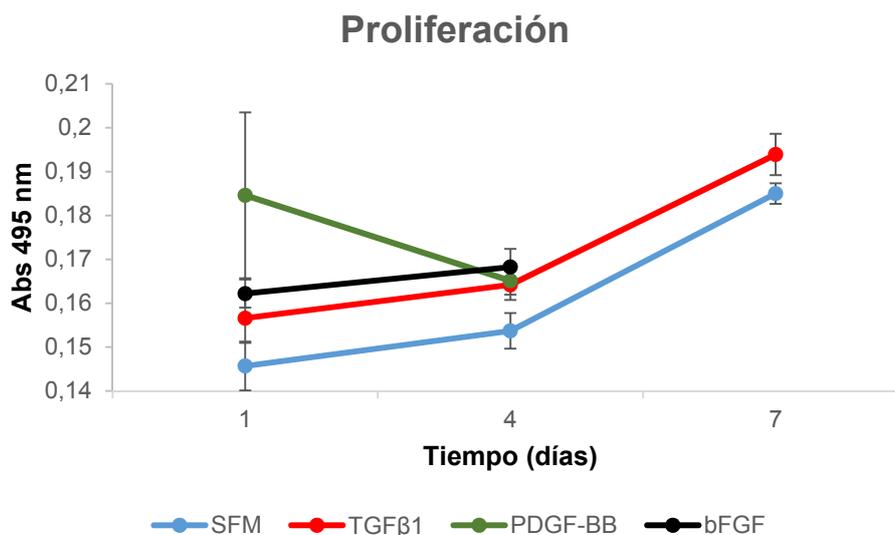


Figura 23. Proliferación celular. Gráfico en el que se muestran los resultados obtenidos de la medición del contenido de DNA (medida como absorbancia a 495 nm) tras la aplicación de los diferentes tratamientos en los diferentes tiempos de estudio después de la realización de las heridas (1, 4 y 7 días).

2.7. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre el proceso de diferenciación miofibroblástica.

Uno de los eventos más importantes que tienen lugar durante el proceso de cicatrización es la generación de miofibroblastos, ya que puede dar lugar a la aparición de opacidad permanente del estroma corneal o fibrosis. La detección de la proteína α SMA es un marcador de miofibroblastos y por lo tanto estudiamos su expresión a nivel del mRNA y de la proteína ya formada en el citoplasma celular.

2.7.1. Expresión de α SMA a nivel de su mRNA.

A los 7 días se observó expresión del mRNA para la proteína α SMA en todos los grupos estudiados (**Fig. 24**). Los niveles más altos los presentaron las células con heridas tratadas con PDGF-BB, y los más bajos las tratadas con TGFβ1, que fueron similares a los de las controles. Finalmente con bFGF los niveles de expresión observados fueron intermedios. A pesar de las diferencias observadas estas no fueron estadísticamente significativas.

Resultados

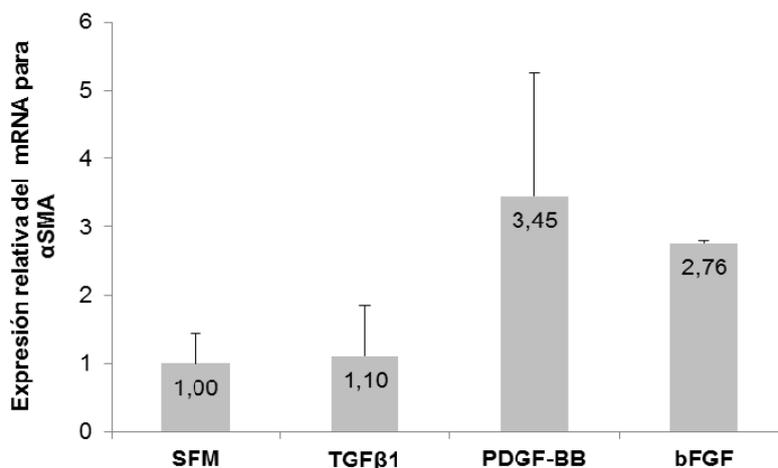


Figura 24. El gráfico muestra los cambios obtenidos en la transcripción del gen para la proteína α SMA. Los resultados fueron comparados entre los diferentes tratamientos el día 7 después de la realización de las heridas y se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM con la que fueron normalizados dándole un valor de 1.

2.7.2. Detección de la proteína α SMA.

Como la presencia del mRNA que codifica para una proteína en una muestra determinada, no implica que esta esté presente, ni que si lo está que esté en su forma activa, se procedió a su detección mediante inmunocitoquímica y se evaluó la densidad de células α SMA positivas (α SMA+) en los cultivos. Esta densidad fue significativamente mayor en las heridas tratadas con TGF β 1 que en el resto de los grupos en todos los tiempos de estudio ($p < 0,001$; **Fig. 25**). Por el contrario, el día 1 los cultivos tratados con PDGF-BB presentaron la menor densidad de células α SMA+ ($p < 0,01$). Diez días después de la realización de las heridas, cuando estas con los medios suplementados con PDGF-BB y bFGF se habían cerrado, la densidad de células α SMA+ fue similar a la observada el día 4 en las heridas control. En el tiempo de 10 días, la densidad de estas células en los cultivos tratados con PDGF-BB aumentó y por el contrario en los tratados con bFGF disminuyó. En ese tiempo, la densidad de células α SMA+ fue significativamente diferente entre todos los tratamientos ($p < 0,001$).

Finalmente, 15 días después, la densidad de las células α SMA+ en los cultivos control disminuyó, mientras que en los cultivos tratados con TGF β 1 siguió aumentando ($p < 0,001$).

Resultados

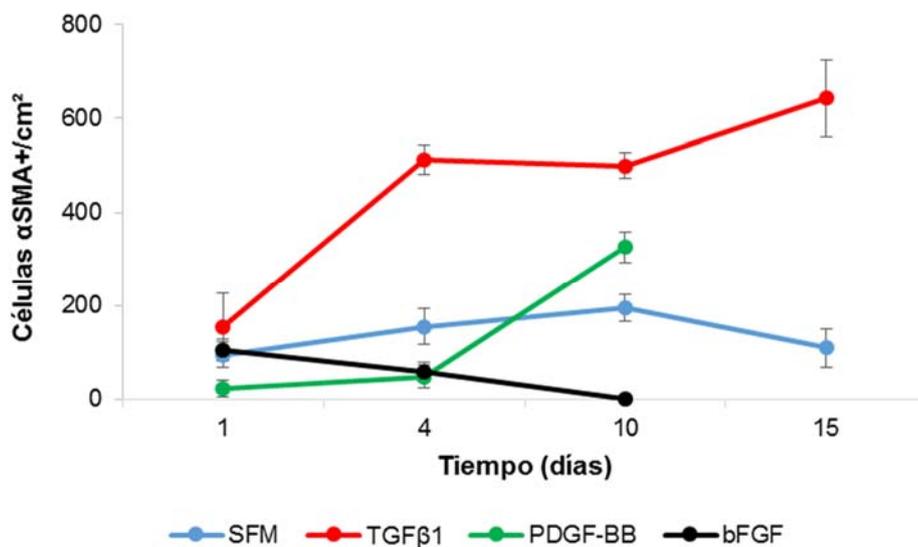


Figura 25. Densidad de células α SMA positivas. En el gráfico se representa la densidad de células α SMA positivas obtenidas con los diferentes tratamientos en los diferentes tiempo de estudio (1, 4, 10 y 15 días) tras la realización de las heridas.

2.8. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la proliferación celular y la diferenciación miofibroblástica analizando diferentes zonas del cultivo asociadas a la herida.

Para comprender mejor cómo tienen lugar los procesos de proliferación celular y de diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico, después de la suplementación del medio de cultivo con los factores de crecimiento durante el cierre de la herida, estudiamos dónde y cuándo tienen lugar ambos procesos. Para ello estudiamos tres zonas diferentes del cultivo: herida (H), márgenes de la herida (M) y el resto del cultivo (C).

En las heridas control se produjo un incremento gradual de la densidad de células BrdU positivas (BrdU+) en la zona de la herida en el tiempo (**Fig. 26A**). Durante los días 1, 4 y 10, la diferenciación miofibroblástica, medida como densidad de células α -SMA+, fue más remarcable en los márgenes y en el resto del cultivo comparado con la propia zona de la herida (**Fig. 26B**). A los 15 días, momento en el que se produce el cierre en las heridas control, se produjo un incremento de miofibroblastos en la zona de la herida, mientras que su densidad disminuyó en las otras dos partes estudiadas.

En las heridas control se pudo observar una correlación positiva entre la densidad de células BrdU+ y la de α SMA+ durante el cierre ($r = 0,4180$; $p = 0,0005$) la cual nos indica que a medida que aumenta la proliferación aumenta también la diferenciación.

Resultados

En las células tratadas con TGF β 1, al día siguiente de la realización de la herida, la proliferación celular se localizó principalmente en los márgenes (**Fig. 26C**) y, posteriormente, la densidad de células BrdU+ se incrementó en las tres zonas estudiadas observándose un pico de proliferación a los 10 días. Esta proliferación disminuye posteriormente de forma llamativa. Este factor estimuló la diferenciación hacia miofibroblastos observándose a las 24 horas tanto en los márgenes como en el resto del cultivo (**Fig. 26D**). Un gran número de estas células también fueron localizadas a los 4 días en las mismas zonas y durante los días 10 y 15 su densidad fue muy elevada tanto en los márgenes como en el resto del cultivo y las células localizadas en la herida también fueron α SMA positivas.

Con este factor de crecimiento observamos, al igual que en las heridas control, una correlación positiva ($r = 0,4540$; $p = 0,0001$) entre los procesos de proliferación y diferenciación miofibroblástica.

La respuesta de las células presentes en las heridas tratadas con PDGF-BB fue completamente diferente a la observada en las células control y en las tratadas con TGF β 1 (**Fig. 26E-F**). Desde el día 1 y hasta el día 4, la proliferación se incrementó en las tres zonas estudiadas, siendo la zona del resto del cultivo donde mayor densidad de células BrdU+ se observó (**Fig. 26E**). Después del día 4 la proliferación disminuyó en las tres zonas. Por otro lado, la adición de este factor dio lugar a un número bajo de miofibroblastos hasta el día 10, momento en el cual se produjo el cierre de estas heridas (**Fig. 26F**). En ese momento, se localizaron células α SMA+ en las tres zonas estudiadas.

Con este factor de crecimiento, la correlación entre proliferación y diferenciación hacia miofibroblastos no fue significativa ($r = 0,0187$; $p = 0,8918$).

En último lugar, la proliferación de las células presentes en las heridas tratadas con bFGF siguió un patrón similar al observado en las heridas control (**Fig. 26G**), sin embargo, el cierre fue más rápido. Por otro lado, este factor indujo un nivel muy bajo de diferenciación hacia miofibroblastos durante los tiempos estudiados, no observándose células α SMA+ en el tiempo de 10 días (**Fig. 26H**). La adición de bFGF al medio de cultivo dio lugar a una correlación negativa entre la proliferación y la diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico ($r = -0,0231$; $p = 0,0428$), que nos indica que a medida que aumenta la proliferación celular, disminuye la diferenciación hacia miofibroblastos.

En la **figura 27** se muestran microfotografías tomadas a los 4 días de la realización de las heridas, en las que se pueden observar las diferentes localizaciones de las células BrdU positivas y su densidad con los diferentes tratamientos aplicados.

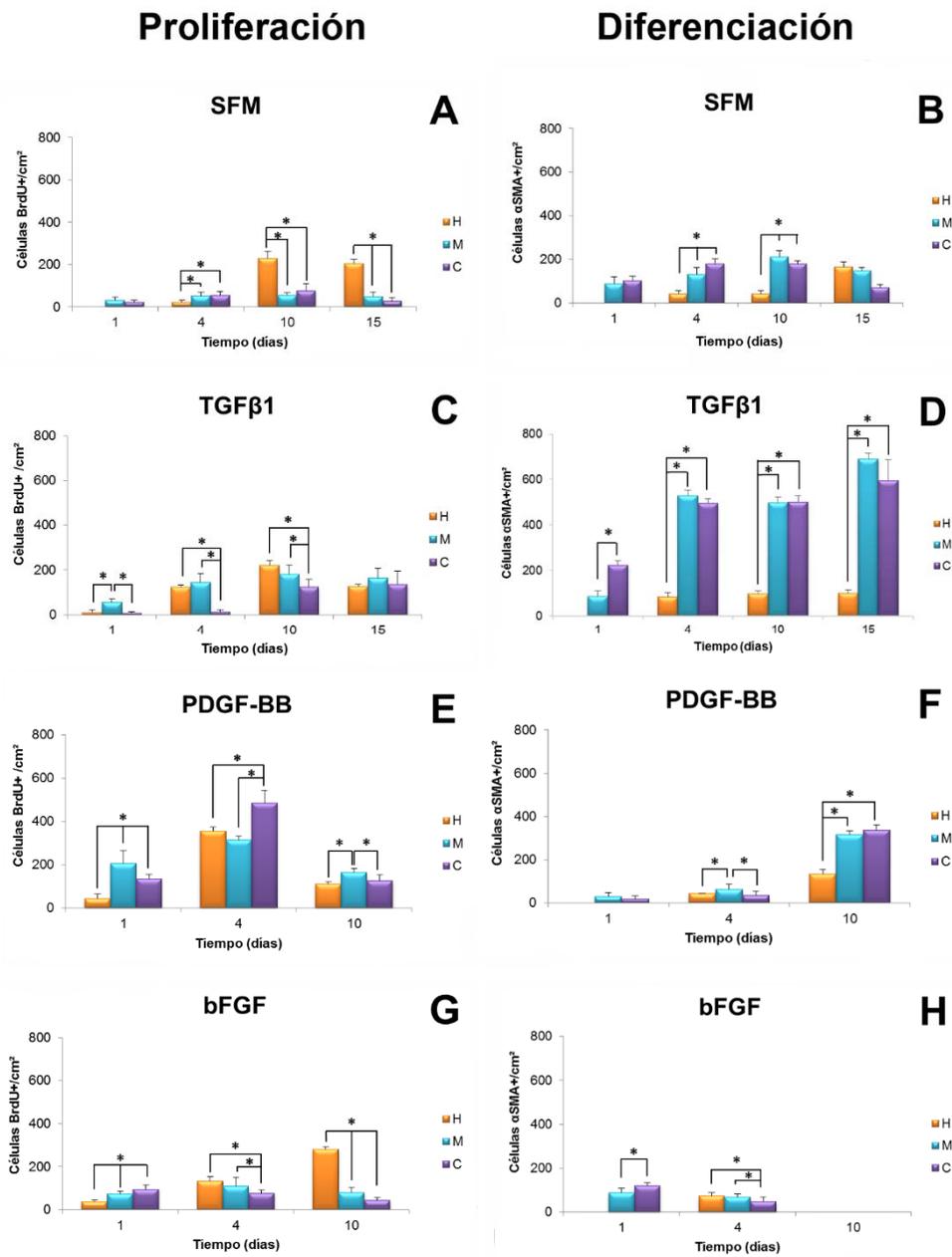


Figura 26. Proliferación celular y diferenciación miofibroblástica en diferentes zonas del cultivo asociadas con la herida. Los gráficos muestran el número y la localización de las células BrdU positivas (A, C, E, G) y α SMA positivas (B, D, F, H), obtenidas con los diferentes tratamientos durante el cierre de las heridas (1, 4, 10 y 15 días). Las células BrdU y α -SMA positivas fueron contadas en tres zonas diferentes del cultivo: herida (H), márgenes de la herida (M) y resto del cultivo (C). * Denota diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes áreas por cada tiempo de estudio ($p < 0,05$).

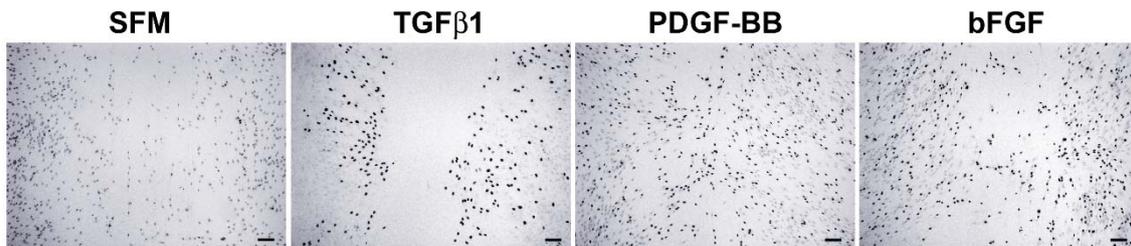


Figura 27. Microfotografías tomadas 4 días después de la realización de las heridas en las que se muestra la diferente localización de las células BrdU positivas (núcleos teñidos de color negro). Magnificación 50x; barras de escala 100 μ m.

2.9. Efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la expresión del mRNA y sobre la producción de proteínas implicadas en la síntesis de MEC y migración celular.

2.9.1. Queratocano como marcador de fenotipo nativo de queratocitos.

No se detectó expresión del mRNA para queratocano en ninguna de las muestras analizadas.

2.9.2. Colágeno tipo I como marcador del proceso de recuperación normal del estroma.

Las células tratadas con TGF β 1 mostraron un incremento significativo de la abundancia relativa de colágeno tipo I con respecto al resto de grupos (**Fig. 28**). Las células tratadas con PDGF-BB mostraron niveles más bajos que los observados con la adición de TGF β 1, pero estos fueron tres veces superiores a los observados con la adición de bFGF y cinco veces más que los obtenidos en las células control. Por otro lado, aunque los niveles obtenidos con la adición de bFGF fueron bajos, fueron casi el doble de los mostrados en las células control. Estos resultados nos indican que con los tres factores de crecimiento hay síntesis del principal tipo de colágeno que forma el estroma corneal.

En el caso de las células tratadas con TGF β 1, los niveles de colágeno tipo I parecen estar relacionadas con la cantidad de miofibroblastos, que son las células que principalmente sintetizan MEC y, en el caso de las células tratadas con PDGF-BB, este tipo celular comienza a aparecer notablemente entre los 4 y los 10 días.

Resultados

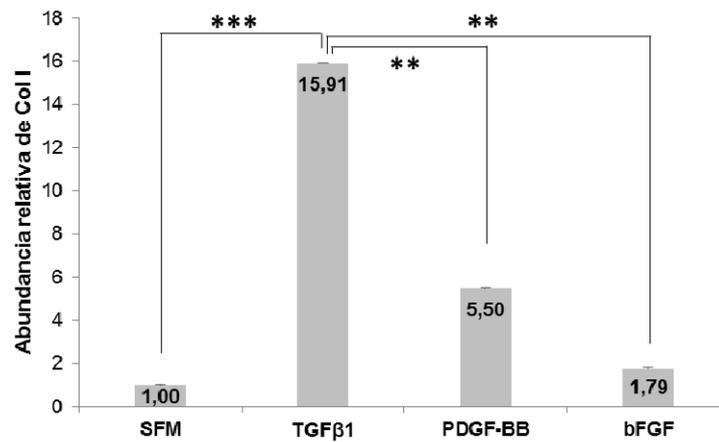


Figura 28. El gráfico muestra la abundancia relativa de colágeno tipo I obtenida en los diferentes tratamientos. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM que fueron normalizados dándole un valor de 1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos a diferentes niveles: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.9.3. Colágeno tipo III como componente de una MEC reparadora.

La expresión del mRNA para el colágeno tipo III mostró un aumento significativo en las células tratadas con TGFβ1 ($p < 0,001$; **Fig. 29A**) con respecto al resto de grupos. Este resultado se relaciona directamente con la alta densidad de miofibroblastos presentes en las tres zonas de las heridas tratadas con dicho factor, ya que es un marcador de fenotipo miofibroblástico cuya excesiva producción se relaciona con la presencia de una matriz fibrótica.

Asimismo, los mayores niveles de la proteína también los presentaron las células tratadas con TGFβ1 (**Fig. 29B**). En el caso de la proteína, las células tratadas con PDGF-BB mostraron también niveles altos no existiendo diferencias significativas entre los niveles de colágeno tipo III producido por estas células y el producido en las células tratadas con TGFβ1. La adición de bFGF no estimuló la síntesis de dicha proteína, mostrando niveles similares a los observados en las células control. Sin embargo, si fueron significativas las diferencias encontradas entre los tratamientos PDGF-BB y SFM ($p < 0,05$), PDGF-BB y bFGF ($p < 0,05$), TGFβ1 y SFM ($p < 0,01$) y TGFβ1 y bFGF ($p < 0,01$). El incremento de la síntesis de este tipo de colágeno está directamente relacionado con el aumento miofibroblastos en los cultivos durante el proceso de cierre de la herida.

Resultados

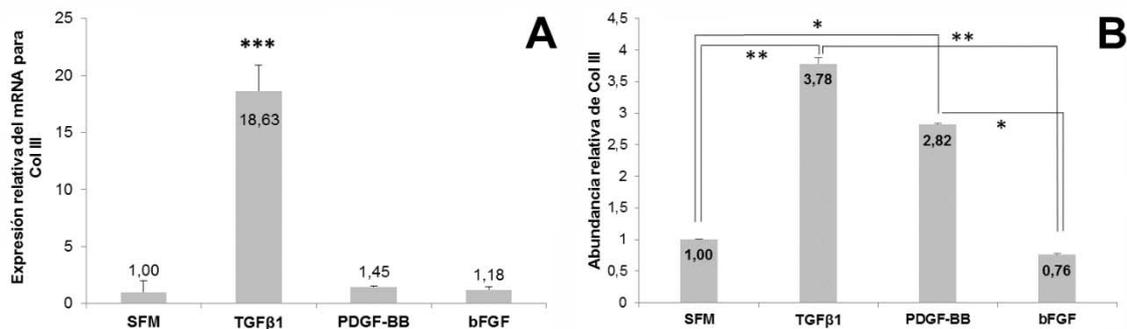


Figura 29. (A) Resultados de la expresión relativa del mRNA para el colágeno tipo III. Los cambios obtenidos en la transcripción del gen para el colágeno tipo III fueron comparados entre los diferentes tratamientos el día 7 después de la realización de las heridas. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM que fueron normalizados dándole un valor de 1. **(B)** Resultados de la abundancia relativa de colágeno tipo III. Los cambios obtenidos en la abundancia del colágeno tipo III fueron comparados entre los diferentes tratamientos el día 7 después de la realización de las heridas. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM que fueron normalizados dándole un valor de 1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos a diferentes niveles: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.9.4. FAK como proteína implicada en el proceso de migración celular.

La expresión del mRNA de FAK aumentó significativamente en las células tratadas con PDGF-BB ($p < 0,01$; **Fig. 30A**). La adición al medio de bFGF indujo un ligero incremento de la expresión de su mensajero pero las diferencias observadas entre la expresión obtenida con este tratamiento y el TGFβ1 o las células de heridas control no fueron significativas.

Con respecto a los niveles de la proteína, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio (**Fig. 30B**). La ausencia de diferencias entre los tratamientos fue observada ya a los 4 días mediante su detección inmunocitoquímica (**Fig. 30C**), en la que se puede observar como FAK se localizó en todo el citoplasma celular, no observándose grandes diferencias entre los diferentes tratamientos, a excepción de las células tratadas con TGFβ1, en las que parece acumularse en la zona citoplasmática que rodea al núcleo de las células que se localizan en el margen de la herida.

Resultados

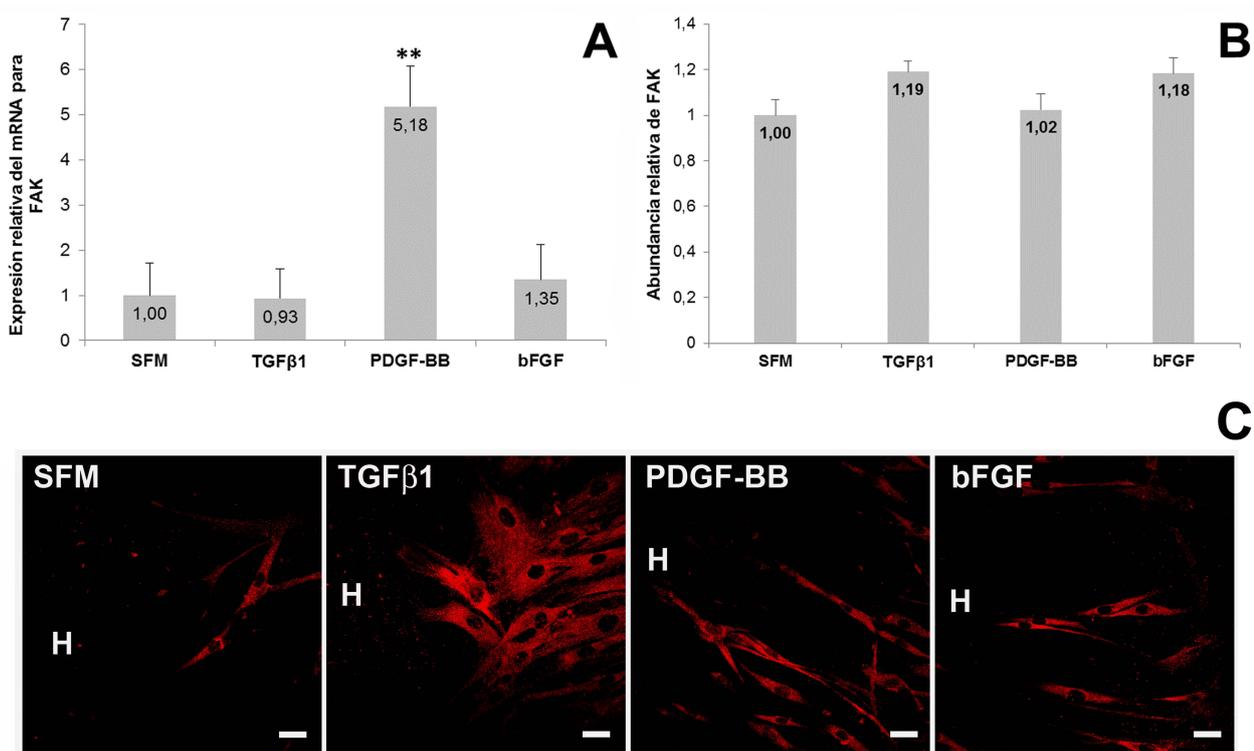


Figura 30. (A) Resultados de la expresión relativa del mRNA para FAK. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM que fueron normalizados dándole un valor de 1. (B) Resultados de la abundancia relativa de FAK. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM que fueron normalizados dándole un valor de 1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos nivel de $**p < 0,01$. (C) Las microfotografías muestran la localización mediante inmunocitoquímica de FAK en HCF tratados con los diferentes factores de crecimiento 4 días después de realizar las heridas. H: indica la zona donde se localiza la herida; Barras de escala 25 μm .

2.9.5. Integrina $\alpha 5\beta 1$ como marcador fenotípico miofibroblástico y de migración celular.

La expresión de las subunidades que forman la integrina $\alpha 5\beta 1$ (principal receptor de fibronectina) caracterizada como otro signo de diferenciación miofibroblástica junto con el colágeno tipo III, aumentó en las células tratadas con PDGF-BB y TGF β 1, mientras que con bFGF disminuyó (**Fig. 31**). Las células tratadas con PDGF-BB mostraron un mayor aumento de expresión del mRNA de ambas subunidades que el observado con la adición de TGF β 1, aunque dicho aumento no fue significativo, puede ser debido al aumento de miofibroblastos observado entre los 4 y los 10 días con el PDGF-BB.

Resultados

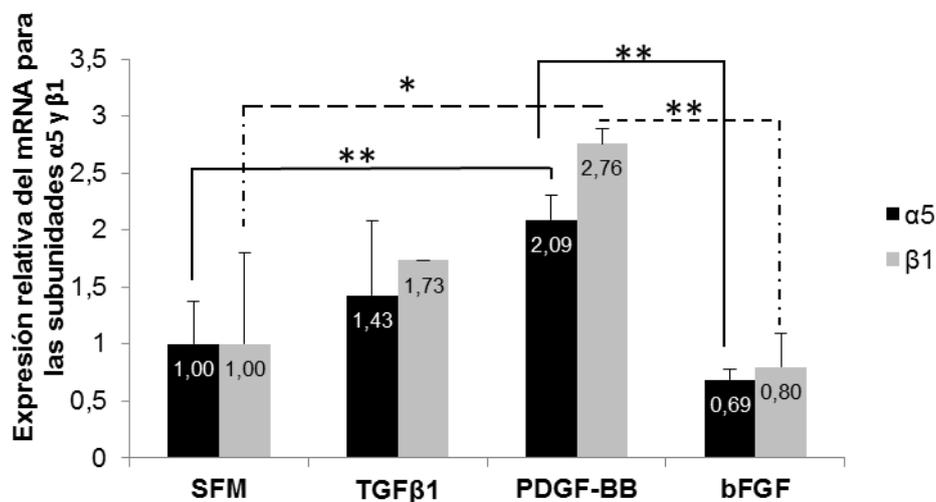


Figura 31. El gráfico muestra la expresión relativa del mRNA para las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$ de la integrina. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM que fueron normalizados dándole un valor de 1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos a diferentes niveles: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Más importante que la abundancia relativa de las subunidades que forman esta integrina, es su localización celular. Para comprobar cuál es su localización, la integrina $\alpha 5\beta 1$ fue visualizada mediante inmunocitoquímica. Como se puede observar en la **figura 33**, la integrina fue localizada en prolongaciones celulares (cabezas de flechas).

En las células tratadas con TGF $\beta 1$ se pudo observar cómo además de localizarse en las prolongaciones celulares, se acumuló alrededor del núcleo (zona celular que presenta menor movilidad) y en la parte posterior de las células (flechas).

Por otro lado, en las células tratadas con PDGF-BB la integrina se localizó principalmente en el frente de avance celular (**Fig. 33**, cabezas de flechas), sin acumularse en la zona que rodea al núcleo.

En las células control, los niveles observados fueron inferiores a los observados con TGF $\beta 1$ y mayores que en las tratadas con PDGF-BB, pero sin mostrar una localización concreta.

Finalmente, en las células tratadas con bFGF encontramos los niveles más bajos de esta proteína.

2.9.6. SDC4 como proteína implicada en el proceso de migración celular.

El SDC4 es un proteoglicano de heparán sulfato importante para el mantenimiento de la integridad corneal y característico de fenotipos reparadores relacionados con un proceso de reparación normal, sin desarrollo de fibrosis.

La expresión relativa de este proteoglicano aumentó en las células tratadas con PDGF-BB y bFGF (**Fig. 32A**), mostrando valores significativamente más altos en células tratadas con PDGF-BB ($p < 0,05$), mientras que disminuyó en las tratadas con TGF β 1.

Por otro lado, los niveles de la proteína fueron mayores en las células tratadas con TGF β 1 (**Fig. 32B**) que en el resto de grupos, aunque las diferencias observadas fueron únicamente significativas con respecto al bFGF ($p < 0,01$). La adición de bFGF indujo los niveles más bajos de dicho proteoglicano y, en este caso, las diferencias encontradas entre los valores presentados por este grupo y los otros dos tratamientos sí fueron significativas.

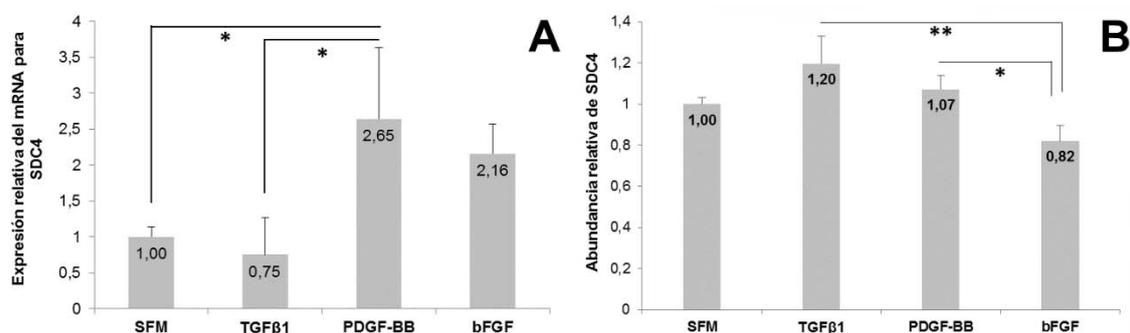


Figura 32. (A) Resultados de la expresión relativa del mRNA para el SDC4. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM que fueron normalizados dándole un valor de 1. (B) Resultados de la abundancia relativa del SDC4. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM que fueron normalizados dándole un valor de 1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas a diferentes niveles: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Aunque la expresión de su mensajero es muy baja en las células tratadas con TGF β 1, los niveles de la proteína son los más altos y, como se puede observar mediante su detección por inmunocitoquímica (**Fig. 33**), a los 4 días se localizó principalmente en las mismas regiones celulares que la integrina $\alpha 5\beta 1$, observándose su acúmulo en regiones más cercanas al núcleo. También se detectó en forma de puntos en lamelipodios del frente de avance celular en este grupo (cabezas de flecha).

Resultados

En el caso de las células tratadas con bFGF los niveles de expresión de su mensajero fueron altos, pero no tanto como los inducidos por el PDGF-BB y, sin embargo los niveles proteicos detectados tanto por western blot como por inmunocitoquímica fueron los más bajos.

La localización de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y del SDC4 nos muestra, en los cultivos tratados con TGF β 1, que ambas proteínas se disponen de manera muy llamativa en la parte central del citoplasma (entorno al núcleo) y en las partes de la célula opuestas al movimiento (*trailing edge*, zonas señaladas mediante flechas en **Fig. 33**); mientras que en los cultivos tratados con PDGF-BB ambas proteínas co-localizan en las zonas de avance celular, para cerrar la herida (flechas, **Fig. 33**). En los cultivos control, se observan algunas co-localizaciones en disposición paralela a la herida. Finalmente, con el bFGF las co-localizaciones fueron muy escasas.

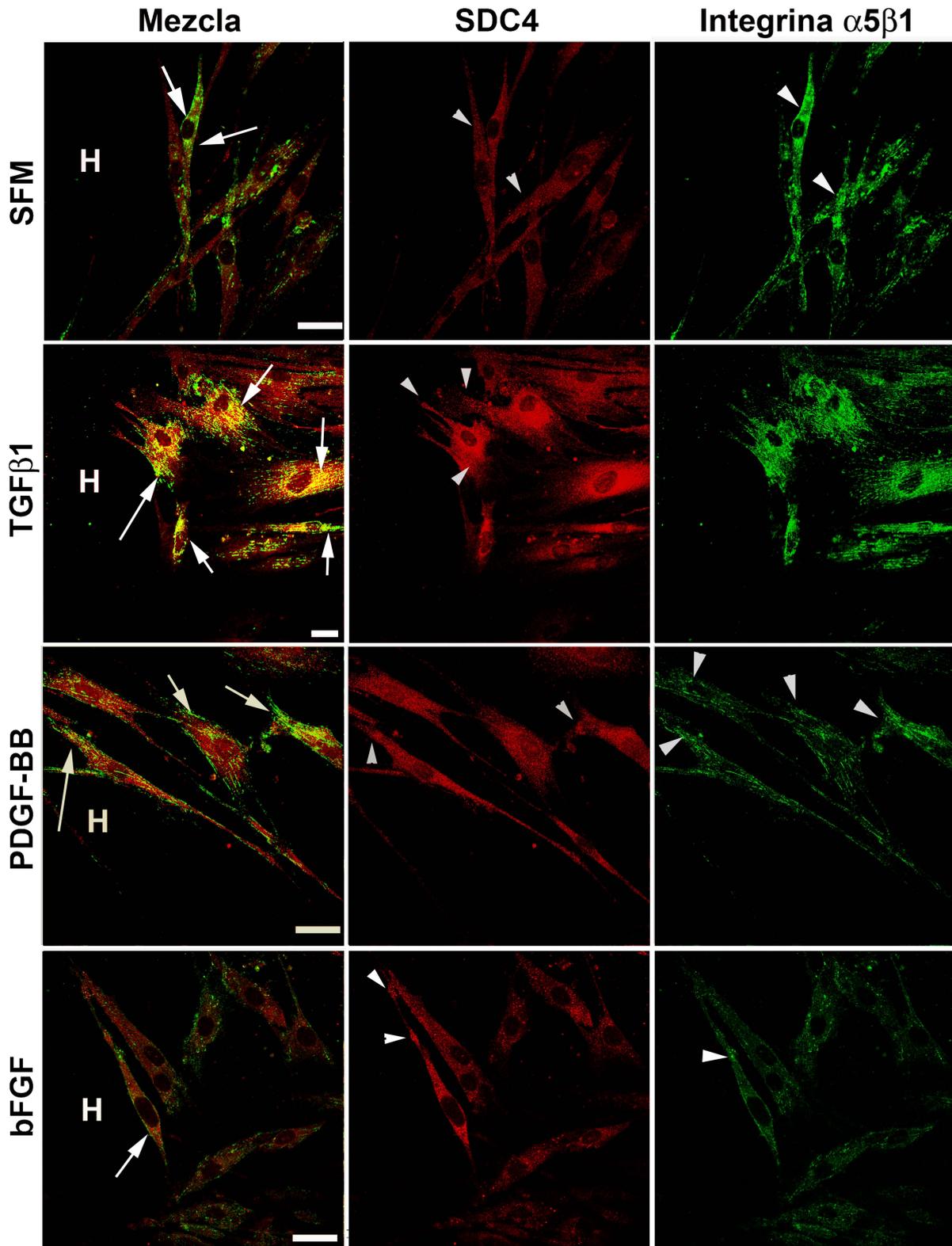


Figura 33. Las microfotografías muestran la localización mediante inmunocitoquímica del SDC4 (en rojo) y de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (en verde) en HCF tratados con los diferentes factores de crecimiento, 4 días después de realizar las heridas. **H** indica la zona donde se localiza la herida; Las cabezas de flecha indican lamelipodios en el frente de avance celular en el caso del SDC4; en el caso de la integrina, las cabezas de flecha indican posibles complejos focales en el frente de avance celular. La primera columna muestra la mezcla de imágenes del SDC4 y de la integrina $\alpha 5\beta 1$, pudiéndose ver las zonas en las que ambas proteínas co-localizan (zonas en amarillo y señaladas mediante flechas). Barras de escala de 25 μm .

2.9.7. Perlecano como marcador de síntesis de una matriz reparadora del daño.

El perlecano es, junto con el SDC4, otro proteoglicano de heparán sulfato importante para el mantenimiento de la integridad corneal y característico de fenotipos reparadores relacionados con el proceso de reparación normal no fibrótico.

Los resultados obtenidos de la expresión de su mRNA fueron similares a los obtenidos para el SDC4 aunque en este caso las diferencias observadas entre los grupos no fueron significativas (**Fig. 34A**). Los valores más altos los presentaron las células tratadas con PDGF-BB y los más bajos las tratadas con TGFβ1.

Con respecto a los niveles proteicos del proteoglicano observamos, al igual que en los resultados de su mRNA, que fueron más altos con el PDGF-BB (**Fig. 34B**) existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de grupos ($p < 0,01$). Tanto con el bFGF como con el TGFβ1 los niveles fueron similares, pero más altos que los observados en células control. En este caso, la diferencia entre las medias fue significativa al 90%, pero no al 95%, por lo que las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas para un nivel de $p < 0,05$. Los resultados obtenidos con el PDGF-BB y con el bFGF se relacionan bien con la expresión a nivel de su mensajero, sin embargo, con el TGFβ1 aunque se observaron niveles de expresión inferiores que con el resto de tratamientos, incluido el control, los niveles de la proteína fueron más altos de lo esperado.

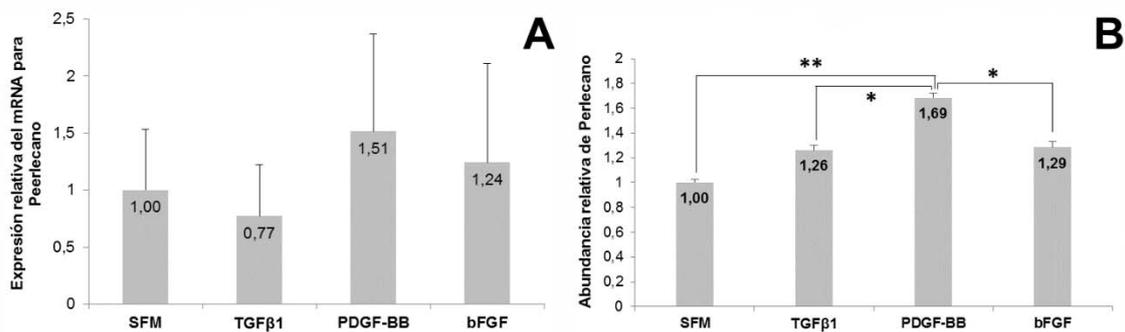


Figura 34. (A) Resultados de la expresión relativa del mRNA para el perlecano. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM que fueron normalizados dándole un valor de 1. **(B)** Resultados de la abundancia relativa del perlecano. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en la muestra SFM que fueron normalizados dándole un valor de 1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos a diferentes niveles: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



Discusión

Discusión

La cicatrización corneal es un proceso complejo que, en condiciones normales, finaliza con la restauración del tejido sin que se produzca la pérdida de su principal cualidad, la transparencia, y con ello el paso de la luz sin interferencia ni dispersión para obtener una visión perfecta.

Los daños infringidos sobre la córnea pueden ser numerosos y causados por agentes muy diferentes (biológicos, físicos y químicos) como infecciones, traumatismos, quemaduras, e incluso, iatrogénicos entre ellos diferentes tipos de cirugías (cataratas, refractiva, cross-linking, etc).

En este proceso de cicatrización intervienen múltiples agentes, de forma muy regulada, entre ellos el epitelio, el estroma, las células procedentes de la médula ósea, la lágrima y las terminaciones nerviosas. Todos ellos liberan numerosas citoquinas, entre las que se encuentran los factores de crecimiento.

La modulación de la respuesta de cicatrización corneal y el desarrollo de tratamientos que eviten el desarrollo y permanencia de opacidad corneal (haze) durante la regeneración del tejido dañado, son importantes dianas objeto de numerosos estudios cuyo fin es mejorar el proceso de cicatrización.

Las lesiones que se restringen al epitelio, especialmente cuando la membrana basal no es afectada, curan normalmente rápido mediante procesos de migración, mitosis y diferenciación a partir de las células epiteliales basales y de las células madre residentes en el limbo, sin que se vea reducida la transparencia corneal. Sin embargo, si el daño alcanza la membrana basal y el estroma, la transparencia corneal puede verse comprometida, dependiendo de la profundidad y extensión del daño.

Los queratocitos son las células principales del estroma corneal y son los encargados del mantenimiento del ambiente extracelular en el que se encuentran. En condiciones normales, estas células son quiescentes y presentan una baja actividad metabólica. Entre sus funciones primarias están mantener el colágeno y otros componentes de la matriz extracelular como los proteoglicanos y las metaloproteasas, todos ellos componentes esenciales para el mantenimiento de la homeostasis estromal.^{2, 215, 305}

La respuesta más temprana que se detecta en el estroma dañado es la apoptosis de los queratocitos como se ha podido observar con diferentes modelos animales^{189, 260, 306, 307} y en humanos mediante microscopía confocal *in vivo*.³⁰⁸⁻³¹¹ Dicho proceso puede extenderse hasta una semana o más después del daño inicial e implica también a las células derivadas de la médula ósea que son atraídas hacia el estroma.^{127, 312, 313}

Discusión

En este trabajo, dicha respuesta no se ha podido analizar debidamente, ya que al tratarse de un estudio *in vitro* las células que sufren apoptosis se desprenden del cultivo haciendo difícil y poco fiable su cuantificación.

Sin embargo, los siguientes acontecimientos: proliferación, diferenciación, migración y secreción de nueva matriz, han sido estudiados en un nuevo modelo experimental realizado con fibroblastos corneales humanos en cultivo sobre los que se realiza una herida de dimensiones adecuadas. Con este modelo además probamos que solo la realización de la herida produce estímulos sobre las células.

El mismo puede ser utilizado para el testado de nuevos tratamientos y nos servirá para ver la actuación de tres de los factores de crecimiento más importantes que regulan el proceso de cicatrización: TGF β 1, bFGF y PDGF-BB.^{140, 289}

Hasta el momento, se han desarrollado numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* diseñados para incrementar los conocimientos de la respuesta corneal a los factores de crecimiento.^{140, 143, 151, 217, 218, 285, 289, 292, 304, 314-318} Sin embargo, la mayoría se han realizado con células de procedencia no humana y los que se han realizado con células humanas carecen de un estímulo como en nuestro caso.

Los queratocitos aislados, pueden conservar su fenotipo quiescente y morfología dendrítica en cultivo siempre que sean mantenidos en condiciones libres de suero^{144, 287}, expresando queratocano como marcador fenotípico nativo^{33, 79, 80}, pero este hecho nos impide obtener una elevada cantidad de células, por ello se utilizan corneas de animales. Los queratocitos, procedentes de conejos, han sido utilizados recientemente por Lakshman y Petroll^{80, 304}, para estudiar cómo las modificaciones biofísicas de la MEC influyen sobre el fenotipo de los queratocitos en respuesta a estos factores de crecimiento.

En el estudio de Petroll y Lakshman del 2015³⁰⁴ utilizaron también células humanas pero en este caso, inicialmente el medio contiene suero al 10% y antes de comenzar los experimentos es retirado. Las células así tratadas están activadas aunque presentan una actividad metabólica reducida, por tanto son fibroblastos.

Algunas publicaciones recientes sobre el papel del TGF β en el desarrollo de fibrosis corneal, utilizan fibroblastos corneales humanos, pero sembrados en suero y mantenidos en suero incluso cuando se añade el factor de crecimiento del que se evalúa la respuesta.^{148, 149, 220}

Discusión

En nuestro trabajo los queratocitos son extraídos de anillos corneo-esclerales humanos, sobrantes tras la realización de trasplantes de córnea, y por tanto las córneas utilizadas son en general jóvenes y sanas. El número de queratocitos que obtenemos de cada anillo es muy bajo y, por esta razón, los queratocitos fueron sometidos a suero y diferentes pasajes que nos permitieron obtener un número alto de células con las que trabajar, por tanto, partimos también de fibroblastos.

Previamente al inicio de los diferentes experimentos retiramos el suero, haciendo disminuir la tasa metabólica celular para que las condiciones sean lo más próximas a su estado de quiescencia y eliminar así la posible interacción con los factores que contiene el suero como se ha realizado en otros trabajos.^{304, 314, 319, 320}

En primer lugar, es importante conocer la respuesta celular a la propia herida para saber, si, en respuesta a la misma, las células **liberan de forma autocrina** los factores de crecimiento objeto de estudio. Como pudimos observar en los cultivos control, hay una liberación de bFGF que se produce de forma temprana (1 día) y una más tardía de TGFβ1 a los 7 días. La suplementación del medio con PDGF-BB hace que la cantidad de bFGF detectada en el medio disminuya y que no se detecte si se añade TGFβ1.

Por otro lado, observamos como la secreción de TGFβ1 a los 7 días no se ve afectada por la adición al medio de bFGF, mientras que si se añade PDGF-BB se observa un aumento significativo de TGFβ1 en el medio.

Como era de esperar, en ningún caso se detectó liberación de PDGF-BB ya que su producción se restringe a las células del epitelio.^{121, 165} Estudios previos han mostrado, al igual que en nuestros experimentos, que los fibroblastos del estroma corneal producen bFGF y TGFβ1 en respuesta a un daño^{130, 299}; Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Song y cols., en 2002¹⁴³ observaron un patrón de secreción de ambos factores diferente al nuestro. Sus resultados indican que la liberación de TGFβ1 tiene lugar en fases tempranas tras la realización de la herida mientras que el bFGF modula respuestas posteriores. La explicación a esta discrepancia es la procedencia de los fibroblastos (de conejo) y la realización de pequeñas y múltiples heridas en el cultivo, las cuales cerraron a las 48 horas.

Por otro lado, en el estudio de Wang y cols., en 2011²⁹⁹, en el cual sí utilizaron fibroblastos humanos, observaron que estos producen de forma endógena TGFβ, pero no midieron su concentración tras la realización de la herida y tampoco distinguen entre las diferentes isoformas de este factor de crecimiento.

Discusión

Nuestros resultados nos indican que al añadir TGF β 1 no se detecta bFGF en el medio, lo cual se podría traducir en que el TGF β 1 podría estar estimulando la producción de receptores de baja afinidad para la unión del bFGF y, por ello, el bFGF liberado al realizar la herida se une al receptor, quedando secuestrado en la matriz y no lo detectamos en el medio. Nugent y cols., ya en 1992³²¹, describieron el TGF β 1 como potente regulador tanto de la producción como de la composición de los proteoglicanos de la matriz, ya que observaron cómo estimulaba de forma selectiva la producción de proteoglicanos de alto peso molecular (190-300 kDa). También observaron cómo la matriz aislada de células tratadas con este factor de crecimiento, incorporaba más bFGF mitogénicamente activo que la matriz obtenida de células sin la adicción exógena de TGF β 1, y concluyeron que existe un aumento de los lugares de unión al bFGF tras un tratamiento prolongado con TGF β 1.

Por otro lado, al añadir PDGF-BB, la síntesis de matriz no es tan elevada como con el TGF β 1 (como veremos posteriormente), por lo que observamos bFGF en el medio aunque a un nivel inferior al que muestran las heridas control.

Como anteriormente dijimos, después de la apoptosis inicial, muchos de los queratocitos que permanecen en el estroma entorno a la herida se activan y comienzan a entrar en mitosis (12 o 24 horas posteriores al daño) para repoblar la zona dañada, como se ha descrito utilizando modelos animales.^{165, 260, 322}

Nuestros resultados muestran que una vez que las células han sido activadas, al igual que tiene lugar *in vivo*, a las 24 horas de la realización de la herida las células comienzan a proliferar en los márgenes y en el resto del cultivo de las heridas control. Sin embargo, con los diferentes tratamientos, a las 24 horas ya hay células BrdU positivas también en la zona de la herida, existiendo una mayor densidad de estas tras la adición de PDGF-BB, lo cual nos indica que todos aceleran el proceso de proliferación, aunque de manera diferente como se detalla más adelante.

La elevada proliferación inicial inducida por el PDGF-BB, posteriormente disminuye durante el cierre de la herida, mientras que en el resto de grupos existe un aumento más pequeño pero constante y mantenido de dicho proceso. En 2009, LaTia Etheredge y cols.,²⁸⁹, estudiando los efectos de los factores de crecimiento sobre cultivos de queratocitos de vaca, mostraron cómo la aplicación de los mismos factores de crecimiento objeto de nuestro estudio aumentaban la tasa proliferativa con respecto a los cultivos control; sin embargo, la mayor tasa proliferativa la observaron tras la aplicación de bFGF. Sus resultados no pueden ser comparados con los nuestros debido

Discusión

al uso de células de diferente especie y, sobre todo, a la carencia de un estímulo como la herida.

Si unimos los resultados obtenidos de la detección en el medio de los factores de crecimiento secretados con los de la proliferación, podemos deducir que al realizar la herida, el bFGF liberado en tiempos tempranos no se estaría uniendo en altos niveles a sus receptores por la escasez de la matriz sintetizada en las células control, lo cual se traduce en una baja tasa proliferativa inducida por dicho factor. El efecto del bFGF sobre su propia liberación en el medio no pudo ser medido ya que estaríamos midiendo tanto el producido como el añadido, pero sus efectos sobre la proliferación celular de los fibroblastos han sido ampliamente descritos desde los años 80 ³²³⁻³²⁶, por lo que el aumento de proliferación, observado tras su adicción, con respecto a las células control, estaría justificado por la concentración a la cual lo ponemos en el medio. Por otro lado, al añadir PDGF-BB al medio se detecta una concentración más baja de bFGF que en células control, sugiriendo que el PDGF-BB hace que se secrete más matriz y, por lo tanto, el bFGF se una a sus receptores induciendo una mayor respuesta proliferativa. Si tenemos en cuenta que, además los receptores del PDGF-BB se localizan en los fibroblastos, este factor podría estar potenciando el efecto proliferativo por la unión de efectos del bFGF y del PDGF-BB sobre la proliferación. La respuesta proliferativa temprana inducida por la adición del TGF β 1 es inferior a la observada con el PDGF-BB, lo cual se podría explicar debido a que la síntesis de matriz estimulada por el TGF β 1 es mayor, el bFGF estaría unido a sus receptores estimulando la respuesta proliferativa pero le faltaría el sumatorio de la respuesta proliferativa inducida por la unión de un mitógeno potente como es el PDGF-BB.^{166, 168}

Para profundizar en el proceso de proliferación, se realizó un estudio de la **localización de las células que están proliferando** y a su vez se estudiaron **fenómenos de diferenciación miofibroblástica** para comprobar si, como estudios previos sugieren, la proliferación de los queratocitos tras el daño, genera precursores de miofibroblastos que tras su desarrollo en heridas severas persisten, dando lugar a la pérdida de transparencia debido a la propia opacidad que presentan dichas células y a la secreción de matriz extracelular desorganizada que ellas mismas producen.^{31, 327, 328} Aunque estudios recientes han demostrado que los miofibroblastos pueden desarrollarse tanto a partir de fibroblastos como de células derivadas de la médula ósea, que son atraídas hacia el lugar del daño ^{215, 317}, nosotros sólo podemos valorar la diferenciación que tiene lugar en los fibroblastos.

Discusión

En las heridas control, el incremento de las células BrdU positivas observado se produce en principio en los márgenes de la herida, para hacerse más llamativo posteriormente en la zona de la herida, mientras que los miofibroblastos se detectaron principalmente en la zona de los márgenes y en la del resto del cultivo hasta el momento del cierre, existiendo una correlación positiva entre ambos procesos, es decir, el incremento de la proliferación hace que aumente la diferenciación o viceversa ya que, con nuestros resultados podemos ver si la correlación es positiva o negativa pero no qué proceso estimula al otro. Hay que tener en cuenta que ambos procesos tienen lugar en zonas diferentes lo que nos permite aseverar que las células recién formadas no son las que se diferencian.

Cuando se añade TGF β 1 en el medio, las células que comienzan a proliferar son las de los márgenes y posteriormente las células que ocupan la herida mediante división, existiendo un pico a los 10 días que posteriormente disminuye. A su vez la presencia de miofibroblastos fue observada a las 24 horas tanto en los márgenes como en el resto del cultivo, existiendo un número elevado en esta última zona. Posteriormente, su número fue muy elevado en ambas zonas durante el cierre, donde podemos observar cómo la gran mayoría de las células del cultivo son α SMA positivas. En este caso, también se observó una correlación positiva entre ambos procesos.

Cuando se añade PDGF-BB la respuesta celular es totalmente diferente, 24 horas después de realizar la herida, se observó una mayor proliferación que en el resto de grupos, siendo significativamente más alta en los márgenes. La proliferación experimenta un pico a los 4 días en las tres zonas y posteriormente disminuye. En este caso no observamos correlación entre ambos procesos. El desarrollo de miofibroblastos es lento y su número es bajo hasta el final del cierre, donde su número aumenta, lo cual nos habla de una proliferación eminentemente fibroblástica y de un estímulo de la secreción de TGF β 1 tardía, como hemos observado al detectar los factores secretados en el medio de cultivo, lo cual estaría favoreciendo el proceso de diferenciación miofibroblástica en etapas finales del cierre.

Finalmente, la adición al medio de bFGF dio lugar a una respuesta proliferativa similar a la observada en las células control, pero más rápida en el tiempo y, a diferencia de estas, inhibe el proceso de diferenciación miofibroblástica, no observándose miofibroblastos en el momento del cierre y, por lo tanto, existiendo una correlación negativa entre ambos procesos.

Discusión

Otro proceso biológico que tiene lugar durante la cicatrización es **la diferenciación**, que se produce simultáneamente con la proliferación con algunos factores como muestran nuestros resultados (**Fig. 26**). Los queratocitos, una vez activados tras el daño, van a diferenciarse en fibroblastos o en miofibroblastos (fenotipos activos).^{37, 129} Estos fenotipos divergentes pueden ayudar en la reparación de una matriz estromal normal o dar lugar a tejido fibrótico.^{217, 307, 322} La alteración de la proporción de los tipos de colágeno y proteoglicanos en la MEC, o la pérdida de las cristalinas de los queratocitos ocasionada por los cambios fenotípicos que acontecen durante la reparación estromal, dan lugar a la pérdida de la transparencia corneal que en ocasiones es irreversible y permanente.

Estas diferenciaciones se traducen en cambios en la morfología de los queratocitos que han sido ampliamente descritas en diferentes modelos animales desde los años 60, utilizando ratas ³²⁹, conejos ^{178, 330} y gatos.³³ Estos cambios en los queratocitos adyacentes a la zona de la herida se producen aproximadamente a las 6 horas después del daño, y sobre las 24 horas, van a comenzar a migrar hacia la zona en la que se ha producido la apoptosis inicial, localizándose ya a las 48 horas en la zona de los márgenes de la herida.

Durante el tiempo que tardan en alcanzar los márgenes de la herida, presentan un incremento en tamaño y adquieren morfología fibroblástica, con forma fusiforme, múltiples nucléolos y carecen de gránulos citoplasmáticos. Así mismo, producen poca MEC, dando como resultado regiones de hiper celularidad donde, posteriormente se va a formar nueva matriz necesaria para reparar la herida.^{84, 322, 331-334} Análisis realizados en este tipo celular mediante microscopía electrónica, revelaron la presencia de organelas típicas de células con este fenotipo como un amplio retículo endoplasmático rugoso, numerosas mitocondrias, ribosomas libres, aparato de Golgi y numerosas vesículas, todos ellos indicativos de un incremento en su actividad metabólica.^{135, 335}

Posteriormente se han realizado estudios *in vitro* con diferentes factores de crecimiento para ver su actuación sobre los procesos de proliferación, migración y diferenciación, con queratocitos procedentes de diferentes especies animales para tratar de explicar el papel que juegan los factores de crecimiento en la respuesta que se observa *in vivo* a un daño.^{289, 292, 294} Una vez que estas células son expuestas a suero o a factores de crecimiento como el bFGF o el PDGF-BB, se activan, adquiriendo fenotipo fibroblástico.^{144, 151, 169, 287, 293, 336}

Discusión

De forma semejante a los estudios previos, en nuestro modelo se observaron diferencias morfológicas que, a partir de los 4 días, se mantuvieron durante todo el tiempo del estudio. Las células control, mantenidas únicamente en SFM, presentaron una morfología fibroblástica típica caracterizada por un cuerpo celular alargado, con un bajo nivel de actina-f. Estos resultados junto con el bajo nivel de actividad metabólica explicarían, en parte, el lento proceso de cierre de este grupo de estudio (15 días). La morfología fusiforme observada en las células control, la presentaron también las células tratadas con bFGF y PDGF-BB pero a diferencia de las células control, estas presentaron un incremento de microfilamentos de actina-f y las tratadas con PDGF-BB, además, adoptaron una morfología mucho más alargada y estrecha como previamente ha sido descrito en células de conejo al ser sometidas a dicho factor.²⁹² A pesar de las diferencias observadas en cuanto a la morfología y en cuanto a la actividad metabólica, con ambos factores de crecimiento el cierre fue más rápido que en las células control y coincidió en el tiempo (10 días), presentando un patrón de cierre similar.

En determinados tipos de heridas, los queratocitos y fibroblastos se van a diferenciar en miofibroblastos, los cuales generan fuerzas de contracción mayores y sintetizan grandes cantidades de componentes de la matriz, entre los que se incluyen algunos tipos de colágenos que no están presentes en la córnea en estado normal.^{217, 293, 337} Estas respuestas pueden causar una reducción permanente de la transparencia corneal.^{217, 338, 339}

La exposición al TGF β 1 da lugar a la diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico con expresión de actina- α de músculo liso ^{144, 169}, siendo un factor de crecimiento clave para su desarrollo, como previamente han determinado estudios realizados tanto en modelos *in vitro* ^{293, 317, 327} como en modelos animales tras cirugía de PRK.^{37, 150, 153, 312, 317, 327} La excesiva producción de miofibroblastos y su permanencia en el lugar de la lesión es un efecto adverso del proceso de cicatrización ya que da lugar a la formación de tejido fibrótico.³⁴⁰ En nuestro estudio, la suplementación del medio con TGF β 1 hizo que las células adquiriesen morfología de miofibroblastos, caracterizada por la presencia de un cuerpo celular muy extendido, con amplios procesos y abundancia de microfilamentos de actina-f formando cuerdas por el citoplasma. Los **miofibroblastos** depositan grandes cantidades de matriz extracelular desorganizada e inducen la pérdida de cristalinas, siendo los principales responsables de la pérdida de transparencia corneal.^{31, 305, 312}

Además presentan características ultraestructurales y fisiológicas de células musculares, como la respuesta contráctil a agonistas del músculo liso.^{217, 293} La detección inmunocitoquímica de α SMA es el principal marcador utilizado para su

Discusión

detección *in vivo* e *in vitro*, aunque durante fases tempranas de su desarrollo expresan vimentina, pero no α SMA, y cuando maduran completamente expresan vimentina, α SMA y desmina.³⁴¹ En nuestros experimentos, en las heridas tratadas con TGF β 1 el cierre fue muy lento, no teniendo lugar durante los diferentes tiempos de estudio analizados, lo cual sugiere, que si bien pueden tener efecto contráctil *in vivo*, el proceso de migración parece estar inhibido.

En el desarrollo de los miofibroblastos se ha descrito también el importante papel que juega el PDGF-BB. En diferentes trabajos se muestran cómo cuando existen defectos estructurales y funcionales en la membrana basal epitelial regenerada, el TGF β 1 y el PDGF-BB siguen entrando hacia el estroma desde el epitelio^{152, 162, 318, 342}, lo que da lugar al desarrollo de miofibroblastos en el estroma anterior con la consiguiente aparición de opacidad corneal que persiste hasta que la membrana basal es regenerada, lo cual, a menudo, puede durar años.^{150, 213, 215, 342} En este momento, los niveles de ambos factores disminuyen en el estroma y los miofibroblastos, cuya supervivencia depende de los mismos, entran en apoptosis.³⁰⁷

Nuestras observaciones demuestran que en etapas posteriores del proceso de cicatrización (7-10 días), se empiezan a detectar miofibroblastos en las heridas tratadas con PDGF-BB (Fig. 26F) coincidiendo con un incremento de la producción de TGF β 1, como demuestra la liberación al medio de forma autocrina (**Fig. 19B**) que, junto con el PDGF-BB, estaría favoreciendo la transición hacia miofibroblastos maduros (vimentina+ α SMA+).

Las diferencias morfológicas y biosintéticas van a definir los diferentes fenotipos que los queratocitos adquieren al ser activados. La ausencia de expresión del mRNA para el queratocano en todos los grupos, nos confirmó la activación de los queratocitos hacia diferentes fenotipos, como previamente se ha observado en estudios llevados a cabo con queratocitos expuestos a factores de crecimiento^{79, 80, 287, 343, 344}, en los que se muestra la inhibición de la expresión de dicho proteoglicano de forma similar a lo que ocurre cuando los queratocitos son activados durante el proceso de cicatrización.^{84, 345-}

347

Según el estudio llevado a cabo por Jester y cols., en 2003 en células de conejo²⁹², las diferencias biosintéticas debidas a cambios en el ambiente celular (exposición a factores de crecimiento), van a definir los papeles que cada fenotipo juega durante el mantenimiento del estado normal y durante el proceso de cicatrización de la córnea. A diferencia de nuestros experimentos, ellos no someten a las células a ningún otro

Discusión

estímulo más que a factores de crecimiento y sugieren que los fibroblastos se encargan de repoblar y remodelar el tejido dañado, y los miofibroblastos de contraer la herida, pero no lo muestran realizándola, sino porque observan como los diferentes fenotipos se diferencian en la síntesis de proteoglicanos, en la organización estructural, incluyendo el ensamblaje de actina-f y la formación de adhesiones focales, como también hemos podido observar con nuestros experimentos en células humanas y con una herida.

La diferenciación miofibroblástica fue confirmada mediante el estudio de la expresión del mRNA para la actina α de músculo liso (α SMA) y de su detección en el citoplasma de las células.

Debido a que los datos obtenidos mediante inmunocitoquímica en los cultivos mostraron resultados diferentes a los obtenidos mediante RT-PCR, nos induce a pensar que aparte de la regulación transcripcional que da lugar a la producción del mRNA, existe una compleja regulación post-transcripcional de la proteína α SMA. De los resultados obtenidos con ambas técnicas podemos pensar que, en el caso de las células que han sido tratadas con TGF β 1, la expresión del mRNA para α SMA es baja a los 7 días debido a que los niveles de la proteína son muy elevados desde tiempos muy tempranos tras la producción de la herida y que esta proteína es muy estable, por lo tanto no es necesaria una gran expresión del mRNA que la codifique. En el caso de las células de heridas control, las células α SMA positivas fueron más o menos constantes durante el cierre, lo cual se traduce en una expresión basal de su mensajero.

Con la adición de PDGF-BB se observó un incremento de células α SMA positivas desde los 4 días hasta el cierre (10 días), este incremento se ve reflejado en los niveles de expresión del mensajero que, a los 7 días, son los más altos comparado con el resto de tratamientos, indicando que la diferenciación miofibroblástica inducida por este factor es más tardía y que la mayor formación de miofibroblastos se produce entre el día 7 y 10, de ahí que aumente la expresión del mensajero para α SMA.

Finalmente, el tratamiento con bFGF hace que disminuya la cantidad de células que expresan α SMA desde los 4 hasta los 7 días, sin embargo, los niveles de expresión del mensajero son altos. Esto nos está indicando que el bFGF participa en algún tipo de regulación bien transcripcional, o post-transcripcional, que inhibe la formación de la proteína, inhibiendo, por lo tanto, la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos como previamente ha sido descrito en células de origen bovino tratadas con dicho factor.¹⁵¹

Discusión

En el desarrollo del fenotipo miofibroblástico inducido por el TGF β 1 juega un papel importante la **quinasa de adhesión focal (FAK)**. Proteína que se localiza en adhesiones focales y está implicada en diferentes procesos celulares^{200, 205, 348-350}, como expusimos en la introducción.

Trabajos previos han descrito como el TGF β 1 induce la síntesis, secreción e incorporación de fibronectina a la MEC y además induce la expresión de integrinas específicas para la unión de las células a la fibronectina.^{145, 193, 351-357} En la mayoría de los tejidos, entre ellos el estroma corneal, son necesarias señales procedentes del TGF β 1 y de la fibronectina para que se lleve a cabo la diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico^{160, 293, 327, 358}, y las señales mediadas vía integrinas son transmitidas por FAK, que se localiza en adhesiones focales donde es fosforilada una vez que se produce la unión de la célula a la matriz.^{349, 359-361} Por lo tanto, se ha sugerido que FAK podría transducir las señales mediadas por integrinas desde la fibronectina y, a su vez, inducir la expresión de α SMA y su organización en fibras de estrés, lo cual conlleva a la diferenciación miofibroblástica.

Experimentos llevados a cabo en fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en FAK indican que dicha quinasa también es necesaria para que la vía de señalización del bFGF funcione correctamente y se induzca un descenso de la expresión de α SMA.³⁴⁸ Por lo tanto, el TGF β 1 hace que se incremente la síntesis de fibronectina y la expresión de integrinas^{145, 193, 351-357}, lo cual conlleva a la activación de FAK, por lo que mientras que este factor de crecimiento induce la expresión de α SMA, la activación de FAK da lugar a un incremento de la expresión de los receptores de alta afinidad para el bFGF (FGFR2) lo que permite la transmisión de las señales desde el bFGF hacia el interior celular y hace que se regulen de forma negativa los niveles de α SMA.³⁴⁸

Nuestros resultados apoyan esta teoría ya que, como se puede ver, la expresión de FAK es mayor en las células tratadas con bFGF que con TGF β 1, lo cual estaría activando la señalización mediada por el bFGF y, a su vez, inhibiendo la formación de la proteína α SMA, por lo que aunque observamos que con la adición de bFGF la expresión del mRNA para α SMA es alta, la proteína no llega a formarse, manteniendo el fenotipo fibroblástico. Por otro lado, la expresión del mensajero de FAK en las células tratadas con TGF β 1 fue la más baja observada de entre todos los grupos debido a la elevada densidad de miofibroblastos que, al igual que en los experimentos de Greenberg y cols.,³⁴⁸ estaría demostrando que la diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico se ve favorecida por un descenso de la expresión de FAK.

Discusión

En las células tratadas con PDGF-BB observamos la mayor expresión del mensajero de FAK, en este caso FAK facilita también la activación de la vía de señalización del PDGF-BB ³⁶² y, además de estar favoreciendo la migración, su elevada expresión podría ser responsable de las diferencias morfológicas observadas entre estas células y las tratadas tanto con bFGF como en las control.

En los experimentos de Greenberg y cols., ³⁴⁸ describen cómo en ausencia de FAK, la proteína α SMA se expresa aunque se añada bFGF de forma exógena debido a que la expresión de su principal receptor, el FGFR disminuye y el principal defecto observado en estos fibroblastos es un descenso de la migración debido al descenso en la tasa de recambio de las adhesiones focales como previamente se había descrito en otros trabajos.³⁶³⁻³⁶⁵ Lo cual confirma, al igual que en el estudio llevado a cabo por Ronnov-Jessen L., ²¹² que los miofibroblastos presentan una tasa migratoria inferior a la de los fibroblastos, como muestran nuestros resultados (el cierre de la herida no tiene lugar en los tiempos estudiados) ya que la inhibición de la actividad contráctil o de la expresión de α SMA da lugar a un incremento de adhesiones fibrilares y por lo tanto de la migración celular.^{212, 352, 366} En suma, la actividad de FAK en el proceso de cicatrización promueve la motilidad de los fibroblastos mediada por bFGF manteniendo su fenotipo y retrasando la diferenciación hacia miofibroblastos ³⁴⁸, datos que concuerdan con nuestros resultados.

Aunque la presencia de α SMA sea el principal marcador de diferenciación miofibroblástica, los miofibroblastos también tienen muy elevada la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$.^{79, 192, 293, 367}

La presencia de la **integrina $\alpha 5\beta 1$** , a su vez, está directamente implicada en el proceso de migración celular. A diferencia de los queratocitos, los fibroblastos y los miofibroblastos tienen activada la síntesis de la subunidad $\alpha 5$ de la integrina, cuya formación es clave para que se produzca la reorganización del citoesqueleto de actina y con ello la formación de adhesiones necesarias para la migración de estos por la matriz provisional.¹⁹¹ Esta integrina puede tener una alta tasa de recambio participando en la auto-renovación constante de complejos focales necesarios para el proceso de migración de los fibroblastos ³⁶⁸, o bien puede pasar a formar parte de adhesiones fibrilares formadas a partir de adhesiones focales permanentes, estructuras más estables que anclan la célula a la MEC y por lo tanto ralentizan el proceso migratorio.³⁶⁹ Las integrinas regulan la capacidad de los queratocitos, fibroblastos y miofibroblastos para ensamblar y mantener la matriz rica en colágeno y proteoglicanos, limitando así la

Discusión

formación de tejido fibrótico.⁹⁷ Concretamente, la integrina $\alpha 5\beta 1$ es el receptor de alta afinidad para la fibronectina y su expresión no se produce en estromas normales ³⁶⁷, sin embargo, está presente en regiones de formación de cicatrices en córneas humanas.^{192, 222, 370}

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los niveles de expresión del mensajero para ambas subunidades a los 7 días, podemos apuntar que la elevada expresión de ambos mensajeros en las células tratadas con PDGF-BB se relaciona por una parte con la posterior diferenciación miofibroblástica inducida por dicho factor al final del cierre de la herida. Por otra parte su localización a los 4 días en el frente de avance de las células en migración, nos induce a pensar en la intervención de esta en procesos de migración, formando parte de complejos focales que dan lugar a un incremento de la migración celular observado durante el cierre, en el cual además, está implicada la proteína FAK, como hemos visto anteriormente. En el caso de las células tratadas con TGF β 1, podemos decir que la expresión de ambas subunidades está dirigida a la formación de estructuras estables y permanentes (adhesiones fibrilares), que no tienen una constante auto-renovación y, por lo tanto, no necesitan una expresión tan alta del mRNA de dichas subunidades. Estos datos, junto con el descenso observado en la expresión del mensajero de FAK y su acumulación entorno al núcleo, indican la presencia de fuertes uniones entre las células y la matriz que ralentizan la migración celular.

En las células tratadas con bFGF vemos como dicho factor induce una expresión muy baja del mensajero para ambas subunidades y, además, los niveles observados de la integrina mediante inmunocitoquímica también fueron los más bajos. Estos datos, junto con los bajos niveles observados en la expresión del mensajero de FAK, nos confirman que el bFGF está inhibiendo la diferenciación celular hacia fenotipo miofibroblástico como previamente observamos y, a su vez, nos indican que este factor de crecimiento no estimula el proceso migratorio.

Otro marcador característico del fenotipo miofibroblástico es el **colágeno tipo III** ^{79, 149, 220}, uno de los componentes de la matriz que es sintetizado durante el proceso de cicatrización y, por lo tanto, indicativo de la presencia de una matriz reparadora, que si es segregado en exceso es indicativo de fibrosis.^{60, 221, 371}

Mientras que la adición de TGF β 1 dio lugar a un incremento significativo de los niveles del mensajero para la síntesis de colágeno tipo III, que se vieron traducidos en altos niveles de dicha proteína, la adición del PDGF-BB dio lugar a niveles más bien bajos de su mRNA y a niveles intermedios de la proteína, esto nos está indicando que la síntesis de colágeno tipo III inducida por este factor de crecimiento está más controlada que la

Discusión

inducida por el TGF β 1, produciendo niveles inferiores pero necesarios para el correcto proceso de cicatrización. Los resultados obtenidos para esta proteína se correlacionan bien con el lento proceso de diferenciación hacia miofibroblastos que tiene lugar tras la adición del PDGF-BB al medio de cultivo, y con la síntesis de una matriz reparadora en la que el colágeno tipo III está presente, pero no es tan abundante como en el caso de las células tratadas con TGF β 1.

El tratamiento con bFGF no dio lugar a un incremento en la síntesis de este tipo de colágeno, lo cual también apoya los resultados obtenidos anteriormente en cuanto a la presencia de miofibroblastos.

Una vez que conocemos cómo cada factor afecta a los procesos iniciales que acontecen en respuesta a la herida (activación, proliferación y diferenciación), es importante estudiar si existen **cambios en la matriz segregada** durante el cierre y su implicación en el proceso de migración, ya que la nueva matriz va a actuar como el sustrato necesario para que las células puedan migrar.

Junto con el colágeno tipo III estudiamos también la síntesis del **colágeno tipo I**, el más abundante de la córnea.^{51, 56, 60} La abundancia relativa de este colágeno fue muy similar a la obtenida para el colágeno tipo III aunque presentando niveles más altos y, a excepción de los niveles inducidos por el bFGF, que fueron más altos que en las células control. Estos resultados nos indican que los tres factores estudiados inducen la síntesis del principal componente del estroma corneal, siendo muy llamativa la síntesis de ambos tipos en los cultivos tratados con TGF β 1.

Además de los colágenos tipo I y tipo III, la nueva matriz sintetizada contiene **proteoglicanos de heparán sulfato** como el perlecano y el sindecano 4 (SDC4). Estos van a regular el ordenamiento y espaciado de las fibras de colágeno nuevamente sintetizadas y los niveles de hidratación, ambas características indispensables para conseguir la transparencia corneal³⁷², ya que ambos son necesarios para el mantenimiento estructural de la córnea y característicos de fenotipos reparadores no asociados al desarrollo de fibrosis.^{90, 373} Los dos están presentes de forma fisiológica en el estroma, pero a niveles bajos, y se incrementan durante la reparación de un daño como hemos podido observar en nuestros resultados y como estudios previos han mostrado.^{76, 83, 84}

El **SDC4** junto con la integrina α 5 β 1 son los dos principales receptores que unen y median la migración de los fibroblastos a través de la fibronectina.³⁷⁴ La integrina aporta conexión mecánica entre fibroblastos y fibronectina y es necesaria para la migración

Discusión

sobre dicha matriz.³⁷⁵ Por otro lado, el SDC4 es necesario para que se produzca la adhesión completa dependiente de señal y actúa como sensor inicial de fibronectina.³⁷⁵⁻³⁷⁷ Este se localiza en adhesiones focales de células adherentes como son los fibroblastos⁹², teniendo alta capacidad para la unión de ligandos extracelulares y, por lo tanto, un importante papel tanto en procesos de adhesión como de migración y/o de proliferación celular.³⁷³ Su expresión hace que las células localizadas en la zona dañada aumenten su adhesión para cerrar la herida. La expresión de su mRNA fue mayor en las células tratadas con PDGF-BB y en las tratadas con bFGF, pero la abundancia relativa de la proteína fue mayor en las células tratadas con TGF β 1, y la menor cantidad fue observada en células tratadas con bFGF. Su localización inmunocitoquímica a los 4 días nos mostró que en las células tratadas con TGF β 1 se acumula en regiones menos móviles de la célula, donde también se encuentra la integrina α 5 β 1, y en lamelipodios. Este hecho nos está indicando que no es necesaria una elevada expresión de su mRNA debido a que la proteína sintetizada pasa a formar parte de adhesiones focales permanentes y estables, que están ralentizando el proceso de migración, como previamente habíamos expuesto.

Por otro lado, la elevada expresión de su mRNA en las células tratadas con PDGF-BB dio lugar a unos niveles de proteína que son inferiores a lo esperado, lo cual nos indica una renovación constante de la proteína que no pasa a formar parte de adhesiones focales permanentes, sino auto-renovables y necesarias para el proceso migratorio.

Los resultados obtenidos tras la suplementación con el bFGF nos indican que este proteoglicano se produce, pero a niveles bajos, al igual que los dos tipos de colágeno estudiados, lo que demuestra que el bFGF no estimula en gran medida la síntesis de matriz.

La ausencia de SDC4 da lugar a defectos durante el proceso de cicatrización centrados en un retraso de la migración y en la falta de contracción de la matriz, como se ha observado en heridas cutáneas.⁹⁴ Además, estudios recientes muestran cómo los fibroblastos que carecen de expresión para dicho proteoglicano no se diferencian hacia miofibroblastos debido al bloqueo de expresión de α SMA, al reducido tamaño de las adhesiones focales y a la reducida fosforilación de FAK.³⁷⁸ Por lo tanto, los niveles bajos de SDC4 en nuestras células, tras la adición de bFGF, podrían explicar la inhibición ejercida por este factor sobre la diferenciación miofibroblástica, además de la baja tasa migratoria.

Discusión

En los queratocitos quiescentes, el SDC4 no se detecta en todas las adhesiones focales, y se ha visto que su aparición en las mismas es estimulada por el tratamiento de las células con suero.³⁷⁹ Su expresión es inducida durante el proceso de cicatrización en la piel cuando presenta incisiones.^{380, 381} Así mismo, su expresión también puede ser inducida en cultivos celulares tratados con factores de crecimiento aunque la respuesta específica parece ser única del tipo celular.³⁸² En estudios previos se ha observado cómo su expresión se incrementa en fibroblastos tratados con PDGF-BB, tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional ³⁷⁵, al igual que hemos podido observar con nuestros experimentos.

Como podemos ver principalmente en las células tratadas con PDGF-BB, cuando las células están migrando, se produce el ensamblaje de los microfilamentos de actina en el frente de avance celular, lo cual induce el desarrollo de lamelipodios y filopodios, estructuras altamente dinámicas, en las que se van a formar complejos focales que conectan los microfilamentos de actina del citoesqueleto con la MEC y anclan los lamelipodios, ejerciendo fuerzas de tracción en el cuerpo celular. Posteriormente, las células deben retraer su parte posterior desensamblando las adhesiones allí presentes.¹⁹⁶ Si los complejos focales no se desensamblan entonces maduran, dando lugar a adhesiones fibrilares que son más estables y de mayor longitud que los complejos focales con una tasa de recambio lenta, localizadas principalmente en la periferia y en zonas centrales del cuerpo celular, presentando altos niveles de integrina $\alpha 5\beta 1$ ^{197, 369}, como hemos observado en las células tratadas con TGF β 1.

El tratamiento con TGF β 1 indujo altos niveles de esta integrina que se localizó principalmente en parte posterior de las células (zona opuesta al frente de avance), junto con el SDC4 formando fuertes adhesiones focales y adhesiones fibrilares y, por lo tanto, retrasando el proceso migratorio (**Fig. 34**). Además, se sabe que este proteoglicano, induce el incremento de adhesión de las células de los márgenes de la zona dañada para contraer la herida ³⁸³, como también hemos podido observar con nuestros resultados, por lo que la alta abundancia relativa del SDC4 en este grupo y los bajos niveles de su mensajero, apoyan nuestra teoría, que indica su lenta tasa de recambio, lo cual se ve traducido en un retraso de la migración.

A diferencia de los resultados obtenidos del grupo tratado con TGF β 1, la suplementación con PDGF-BB hace que los niveles de integrina no sean tan altos, localizándose principalmente en el frente de avance celular, lo cual contrasta con el alto nivel de expresión de su mensajero a los 7 días. Esto sugiere una elevada tasa de recambio ya que, a su vez, estas células mostraron la expresión más alta del mensajero para SDC4

Discusión

y la mayor abundancia relativa de dicho proteoglicano. Por lo tanto, estos resultados nos indican que las adhesiones focales formadas presentan una elevada tasa de recambio que estaría favoreciendo la alta tasa de migración observada en este grupo, lo cual, a su vez, explica el rápido cierre resultado del sumatorio de ambos procesos, migración y proliferación. Estos dos procesos requieren un gran aporte energético, como lo demuestra el aumento llamativo de la actividad metabólica que se muestra en nuestros resultados.

El tratamiento con bFGF indujo los niveles más bajos de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y de SDC4. Este hecho confirma que el bFGF tiene efectos positivos en cuanto a la proliferación celular, pero no estimula el proceso migratorio y, por lo tanto, el cierre que tiene lugar en el mismo tiempo que el de las heridas tratadas con PDGF-BB tiene que ser debido a proliferación, que, además, se localiza principalmente en la herida y en sus márgenes. Con este factor, al igual que con el TGF β 1, hay un ligero incremento de la actividad metabólica con respecto al control.

Finalmente, el **perlecano** se encarga de mantener la adhesión celular y la integridad de la matriz corneal⁸⁷, estando implicado también en el mantenimiento de la función barrera que tiene la membrana basal epitelial.^{83, 89}

Hasta el momento, se conocía relativamente poco sobre la biosíntesis no epitelial del perlecano, ya que la mayoría de estudios indicaban que exclusivamente era producido por las células epiteliales. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que las células del estroma corneal humano lo producen en respuesta a un daño, contribuyendo así a la regeneración de la membrana basal epitelial.^{17, 384} En concordancia con estos estudios, nosotros hemos observado su expresión y producción en fibroblastos estromales y también hemos podido observar cómo la aplicación de los diferentes factores de crecimiento afecta a su síntesis de diferente manera.

Todos los factores de crecimiento indujeron un incremento en la síntesis de este proteoglicano con respecto a las células control, lo cual se traduce en la síntesis de una matriz reparadora principalmente segregada por células tratadas con PDGF-BB. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los del SDC4, a excepción de los obtenidos para su abundancia relativa en las células tratadas con TGF β 1, que fueron inferiores.

Un incremento en la síntesis de este proteoglicano se traduce en una mayor aportación del mismo desde las células estromales, que es necesaria para la regeneración de la membrana basal epitelial, lo cual conlleva a una restauración más rápida de la misma y al menor desarrollo de miofibroblastos, como se indica en el trabajo de Torricelli y cols.¹⁷

Discusión

Nuestros resultados muestran que la adición del PDGF-BB da lugar a un incremento de este proteoglicano, y esto podría favorecer la rápida restauración de la membrana basal, con lo cual se evitaría la permanencia y/o la excesiva producción de miofibroblastos durante el proceso de reparación normal.

Los resultados de todos los experimentos llevados a cabo en esta tesis ayudan a comprender mejor el proceso de cicatrización corneal en humanos. Si sumamos nuestros resultados con los obtenidos por Dawson y cols.,³⁷⁰ que realizaron un estudio histopatológico con córneas humanas sometidas a diferentes procesos quirúrgicos refractivos, y los previamente obtenidos en nuestro laboratorio utilizando la gallina como modelo experimental de cicatrización^{260, 385-387}, podemos concluir que la adición de PDGF-BB da lugar a una respuesta cicatricial similar a la observada en heridas que no implican un excesivo daño epitelial, tales como las producidas después de cirugía refractiva LASIK o implantación de anillos intraestromales. En estas heridas, la respuesta cicatricial se caracteriza por una hiper celularidad inicial que, posteriormente, da lugar a una cicatriz hipocelular con predominancia de proteoglicanos y ausencia de tejido fibrótico.

Por otro lado, la suplementación con TGF β 1 da lugar a un proceso de reparación similar al observado cuando hay un daño epitelial extenso con ruptura de la membrana basal, como ocurre tras la cirugía refractiva de PRK o quemaduras con álcali. Ambos tipos de daños están caracterizados por una respuesta cicatricial con desarrollo de un gran número de miofibroblastos, aparición de tejido fibrótico y pérdida de transparencia.^{260, 370, 388}

Finalmente, el bFGF podría estar implicado en ambos tipos de respuestas promoviendo la proliferación e inhibiendo, o retrasando, la aparición de miofibroblastos.

Por lo tanto, la modulación de la respuesta cicatricial inducida por estos factores de crecimiento puede tener gran relevancia clínica con respecto a determinar el mecanismo, o mecanismos, por los cuales en ocasiones hay defectos en el proceso de cicatrización y, a su vez, poder estimular o inhibir determinados procesos para mejorar la cicatrización.



Conclusiones

Conclusiones

1. *El modelo de herida, desarrollado "in vitro" con células estromales humanas, mimetiza en gran parte los procesos biológicos que tienen lugar durante el proceso de cicatrización de una herida estromal "in vivo": proliferación, diferenciación, migración y síntesis de matriz extracelular.*
2. *Se ha establecido la relación dosis-efecto, sobre cultivos de fibroblastos humanos en presencia de una herida, de tres de los factores de crecimiento más importantes que intervienen en el proceso de cicatrización.*
3. *Se ha determinado cómo, los factores de crecimiento estudiados, intervienen a lo largo del tiempo en la proliferación, diferenciación y secreción autocrina de los mismos.*
4. *El bFGF es secretado de forma autocrina en tiempos tempranos tras la producción del daño. Este factor acelera el cierre de la herida debido, principalmente, al incremento de la proliferación celular en dicha zona, inhibe la diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico y promueve la síntesis de una matriz no fibrótica a bajos niveles, no estimulando en gran medida la migración celular.*
5. *El TGFβ1 también se secreta de forma autocrina pero más tarde (7 días) durante el proceso de cierre de la herida, y su adición al medio hace que el bFGF, secretado en tiempos tempranos, no se detecte. Su adición induce un lento, pero constante, proceso de proliferación y una significativa diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico, estimulando a las células para que produzcan una matriz rica en colágeno tipo III y disminuyan su tasa migratoria.*
6. *La suplementación del medio con PDGF-BB induce un rápido cierre de la herida debido al sumatorio de un pico temprano de proliferación celular y a la elevada estimulación del proceso migratorio donde, además, se observa cómo induce la síntesis de componentes de una matriz reparadora no fibrótica Este factor de crecimiento hace que aumenten las cantidades de TGFβ1 en el medio de cultivo en etapas cercanas al cierre, lo que promueve un bajo nivel de diferenciación miofibroblástica observado hasta dicho momento.*
7. *Este modelo es viable para el estudio de la afectación de los diferentes eventos que tienen lugar durante el proceso de reparación de una herida estromal y puede ser de gran utilidad para el testado de nuevos tratamientos dirigidos a mejorar el proceso de cicatrización corneal.*



Limitaciones

Limitaciones

La primera limitación encontrada es que al tratarse de un cultivo celular, no se puede observar la interacción de todas las células que intervienen “in vivo” en el proceso de cicatrización ni tampoco se pueden tener en cuenta los factores que “in vivo” son aportados por la lágrima o por la sangre.

Una de las principales limitaciones que hemos encontrado a la hora de llevar a cabo este trabajo ha sido la disponibilidad de muestras, por lo que hemos tenido que realizar todos los experimentos con fibroblastos y no con queratocitos.

Aunque la retirada del suero tras su amplificación en una serie de pases disminuya la tasa metabólica de los fibroblastos, habría sido conveniente llevar a cabo los experimentos con queratocitos partiendo de su estado de quiescencia.

Finalmente hay que tener en cuenta limitaciones de tiempo y dinero, ya que nos hubiese gustado poder analizar, dentro de la secreción de nueva matriz, más tiempos y otras moléculas que complementarían el trabajo como por ejemplo el colágeno tipo V, otros proteoglicanos y otras proteínas implicadas en la migración celular y en la formación de uniones intercelulares.



Difusión de resultados

Participaciones en congresos internacionales y nacionales:

- *Gallego P*, Ibares-Frías L, Garrote JA, Valsero-Blanco MC, Cantalapiedra-Rodríguez R, Merayo-Llodes J, Martínez-García C. **Can the PDGF-BB accelerate the corneal wound healing process without fibrosis?**. 2015 Association for Research in Vision and Ophthalmology. Denver, Estados Unidos de América 03-07 mayo 2015.
- Martínez-García C, *Gallego-Muñoz P*, Ibares-Frías L, Garrote JA, Valsero-Blanco MC, Cantalapiedra-Rodríguez R, Merayo-Llodes J. **Human Corneal Stroma Wound Repair in vitro after bFGF treatment**. International Society for Eye Research XXI Biennial Meeting. San Francisco, Estados Unidos de América 20-24 julio 2014.
- *Gallego-Muñoz P*, Ibares-Frías L, Garrote JA, Valsero-Blanco MC, Cantalapiedra-Rodríguez R, Merayo-Llodes J, Martínez-García C. **PDGF-BB effects during Human Corneal Stroma Wound Repair in vitro**. International Society for Eye Research XXI Biennial Meeting. San Francisco, Estados Unidos de América 20-20 julio 2014.
- *Gallego P*, Ibares-Frías L, Cantalapiedra R, Merayo-Llodes J, Martínez-García C. **Stromal Wound Repair: the effect of several growth factors**. 2011 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. Fort Lauderdale, Florida, Estados Unidos de América, 01-05 mayo 2011.
- *Gallego P*, Ibares-Frías L, Cantalapiedra R, Merayo-Llodes J, Martínez-García C. **The effect of several Growth Factors on Keratocytes in the Stromal Wound Repair In Vitro**. European Association for Vision and Eye Research-EVER 2010 Congress. Creta, Grecia, 06-09 octubre 2010.
- *Gallego P*, Martínez-García C, Blanco T, Ibares L, Cantalapiedra R, Merayo-Llodes J. **Stromal Cell proliferation and differentiation during corneal wound healing**. XIII Congreso de la SEBC. Murcia, España, diciembre 2009.
- *Gallego P*, Martínez-García C, Blanco T, Ibares L, Cantalapiedra R, Merayo-Llodes J. **Stromal Cell proliferation and differentiation during corneal wound healing**. 2009 ARVO /ISOCB (International Society for Ocular Cell Biology). Ericeira, Portugal, 09-12 septiembre 2009.

Publicaciones científicas:

Otros trabajos realizados durante el periodo de realización de mi tesis doctoral han dado lugar a diversas colaboraciones que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- P. Pérez-Merino, F. Parra, L. Ibares-Frías, *P. Gallego*, B. Vázquez-Lasa, L. Benito, J. San Román, C. Martínez-García, J. Merayo-Llves. **"Clinical and pathological effects of different acrylic intracorneal ring segments in corneal additive surgery."** *Acta Biomaterialia*. Volume 6, Issue 7, July 2010. Pages 2572-2579.
- *P. Gallego*, C. Martínez-García, P. Pérez-Merino, L. Ibares-Frías, A. Mayo-Íscar, J. Merayo-Llves. **"Scleral changes induced by atropine in chicks as an experimental model of Myopia."** *Ophthalmic Physiol Opt* 2012 Nov; 32(6):478-84. Epub 2012 Sep 17. 2012, 32, 478-484.
- Martínez-García C, Martínez T, Peñeda C, *Gallego P*, Jimenez AI, Merayo J. **"Differential expression and localization of transient receptor potential vanilloid 1 in rabbit and human eyes"**. Martínez-García C, Martínez T, Peñeda C, **Gallego P**, Jimenez AI, Merayo J. *Histol Histopathol*, 2013 May; 28:1507-1516.
- Ibares-Frías L, *Gallego P*, Cantalapedra-Rodríguez R., et al. **Validation of an experimental animal model for corneal additive surgery**. *Journal of clinical and experimental ophthalmology*, 2014; 5:5; 1000360.
- Córdova C, Gutierrez B, Martínez-García C, Martin R, *Gallego-Muñoz P*, Hernández M, Nieto M. **Oleanolic acid controls allergic and inflammatory responses in experimental allergic conjunctivitis**. *PlosOne*. 9 - 4, pp. e91282. 03/04/2014.
- Ibares-Frías L, *Gallego P*, Cantalapedra-Rodríguez R, Merayo-Llves J, Martínez-García C. **Tissue reaction after intrastromal corneal ring implantation in an experimental animal model**. *Graefe's Archive For Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2015 Jul; 253(7):1071-83.
- Ibares-Frías L, *Gallego P*, Cantalapedra-Rodríguez R, Merayo-Llves J, Martínez-García C. **Clinical and histological reversibility of corneal additive surgery in Deep stroma in an animal model**. In minor revision.



Financiación

- Ayuda de la Consejería de Educación-Junta de Castilla y León, cofinanciada por el Fondo Social Europeo destinada a financiar la **contratación predoctoral de personal investigador de reciente titulación universitaria (PIRTU)** en el marco de la Estrategia Regional de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2007-2013. Desde el 01/06/2009 hasta el 31/05/2013.

- Proyecto **VA109A08 de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León**. Estudio de la proliferación celular en la cicatrización corneal con escaso o nulo daño epitelial y su regulación: Células madre del estroma corneal. Investigador Principal: Dra. Carmen Martínez García. Desde octubre del 2008 hasta diciembre del 2010.

- **Proyecto CENIT-CeyecC** (Customized Eye Care Technology).
 - **Subproyecto: Farmacología del antihistamínico Bilastina en alergia ocular.**
 - ENTIDAD FINANCIADORA: Faes Farma S.A.
 - ORGANISMO: Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina. Departamento de Biología celular, Histología y Farmacología.
 - DURACIÓN: Desde enero del 2010 hasta diciembre del 2012.
 - INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. M^a del Carmen Martínez García.

 - **Subproyecto: Evaluación histológica de muestras de animales tratados con siRNA.**
 - ENTIDAD FINANCIADORA: Sylentis.
 - ORGANISMO: Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina. Departamento de Biología celular, Histología y Farmacología.
 - DURACIÓN: Desde mayo del 2010 hasta abril del 2011.
 - INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. M^a del Carmen Martínez García.



Colaboraciones desinteresadas

Colaboraciones desinteresadas

- **Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología.** Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid: Uso de los laboratorios y material inventariable.
- **Fundación de Investigación Oftalmológica Fernandez-Vega** (Dr. Jesús Merayo Lloves y Dr. Álvaro Meana) de Oviedo: Aporte de muestras.
- **Departamento de Estadística e Investigación Operativa.** Universidad de Valladolid (Dr. Agustín Mayo y Dra. Maria Cruz Valsero): Estudio estadístico de los datos analizados.
- **Departamento de Pediatría e Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología.** Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid (Dr. Jose A. Garrote y Dr. Eduardo Arranz): Uso de los laboratorios y material inventariable.
- **Unidad de Investigación Clínica en Infección e Inmunidad del Hospital Clínico de Valladolid** (Dr. Jesús Bermejo): Uso del laboratorio y material inventariable.
- **Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM).** Universidad de Valladolid (Laboratorio de la Dra. Maria Luisa Nieto): Uso del laboratorio, material inventariable y fungible.
- **Departamento de Anatomía.** Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid (Dra. Sagrario Callejo): Uso del microscopio confocal.



Bibliografía

Bibliografia

1. Cameron JD, Corneal reaction to injury. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea*, 2 nd ed. Philadelphia, PA, Elsevier Mosby, 2005:115-133.
2. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37:588-598.
3. Rufer F, Schroder A, Erb C. White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea*. 2005; 24:259-261.
4. Nichols B, Dawson CR, Togni B. Surface features of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983; 24:570-576.
5. Yanoff M DJ. *Ophthalmology*. 3 rd ed. Mosby; 2009:203-208.
6. Wiley L, SundarRaj N, Sun TT, Thoft RA. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991; 32:594-602.
7. Buck RC. Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985; 26:1296-1299.
8. Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol*. 1961; 65:695-698.
9. Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res*. 2007; 17:26-36.
10. Gipson IK. The epithelial basement membrane zone of the limbus. *Eye (Lond)*. 1989; 3 (Pt 2):132-140.
11. Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Michael AF, Sun TT, Kenney MC. Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab Invest*. 1995; 72:461-473.
12. Lawrenson JG, Ruskell GL. The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *J Anat*. 1991; 177:75-84.

Bibliografia

13. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1982; 80:155-171.
14. Pinnamaneni N, Funderburgh JL. Concise review: Stem cells in the corneal stroma. *Stem Cells.* 2012; 30:1059-1063.
15. Brightbill F, McDonnell P, McGhee NJ, Farjo A, Serdarevic O. *Corneal Surgery. Theory, technique and tissue.* 4 th ed. Mosby; 2008.
16. Thoft RA. Role of the ocular surface in destructive corneal disease. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1978; 98:339-342.
17. Torricelli AA, Marino GK, Santhanam A, Wu J, Singh A, Wilson SE. Epithelial basement membrane proteins perlecan and nidogen-2 are up-regulated in stromal cells after epithelial injury in human corneas. *Exp Eye Res.* 2015; 134:33-38.
18. Wilson SE, Hong JW. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea.* 2000; 19:417-420.
19. Kaye GI. Stereologic measurement of cell volume fraction of rabbit corneal stroma. *Arch Ophthalmol.* 1969; 82:792-794.
20. Moller-Pedersen T. Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Exp Eye Res.* 2004; 78:553-560.
21. Abedi H, Dawes KE, Zachary I. Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125 focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* 1995; 270:11367-11376.
22. Moller-Pedersen T, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39:487-501.
23. Moller-Pedersen T, Vogel M, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Quantification of stromal thinning, epithelial thickness, and corneal haze after

Bibliografia

- photorefractive keratectomy using in vivo confocal microscopy. *Ophthalmology*. 1997; 104:360-368.
24. Chen S, Mienaltowski MJ, Birk DE. Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. *Exp Eye Res*. 2015; 133:69-80.
 25. Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, Guthoff RF. The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea*. 2000; 19:185-193.
 26. Poole CA, Brookes NH, Clover GM. Keratocyte networks visualised in the living cornea using vital dyes. *J Cell Sci*. 1993; 106 (Pt 2):685-691.
 27. Estey T, Chen Y, Carpenter JF, Vasiliou V. Structural and functional modifications of corneal crystallin ALDH3A1 by UVB light. *PLoS One*. 2010; 5:e15218.
 28. Estey T, Piatigorsky J, Lassen N, Vasiliou V. ALDH3A1: a corneal crystallin with diverse functions. *Exp Eye Res*. 2007; 84:3-12.
 29. Lassen N, Black WJ, Estey T, Vasiliou V. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol*. 2008; 19:100-112.
 30. Jester JV. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Semin Cell Dev Biol*. 2008; 19:82-93.
 31. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, et al. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci*. 1999; 112 (Pt 5):613-622.
 32. Piatigorsky J. Enigma of the abundant water-soluble cytoplasmic proteins of the cornea: the "refracton" hypothesis. *Cornea*. 2001; 20:853-858.
 33. Jester JV, Barry PA, Lind GJ, Petroll WM, Garana R, Cavanagh HD. Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35:730-743.

Bibliografia

34. Joseph A, Hossain P, Jham S, et al. Expression of CD34 and L-selectin on human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:4689-4692.
35. Sosnova M, Bradl M, Forrester JV. CD34+ corneal stromal cells are bone marrow-derived and express hemopoietic stem cell markers. *Stem Cells.* 2005; 23:507-515.
36. Toti P, Tosi GM, Traversi C, Schurfeld K, Cardone C, Caporossi A. CD-34 stromal expression pattern in normal and altered human corneas. *Ophthalmology.* 2002; 109:1167-1171.
37. Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res.* 1999; 18:311-356.
38. Poole CA, Brookes NH, Clover GM. Confocal imaging of the human keratocyte network using the vital dye 5-chloromethylfluorescein diacetate. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2003; 31:147-154.
39. Polisetty N, Fatima A, Madhira SL, Sangwan VS, Vemuganti GK. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol Vis.* 2008; 14:431-442.
40. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells.* 2005; 23:1266-1275.
41. Golebiewska A, Brons NH, Bjerkvig R, Niclou SP. Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell.* 2011; 8:136-147.
42. Du Y, Carlson EC, Funderburgh ML, et al. Stem cell therapy restores transparency to defective murine corneas. *Stem Cells.* 2009; 27:1635-1642.
43. Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:581-589.

Bibliografia

44. Knickelbein JE, Buela KA, Hendricks RL. Antigen-presenting cells are stratified within normal human corneas and are rapidly mobilized during ex vivo viral infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55:1118-1123.
45. Knickelbein JE, Watkins SC, McMenamin PG, Hendricks RL. Stratification of Antigen-presenting Cells within the Normal Cornea. *Ophthalmol Eye Dis.* 2009; 1:45-54.
46. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity.* 2000; 12:71-81.
47. Lutz M, Romani N, Steinkasserer A. *Handbook of Dendritic cells. Biology, Diseases, and Therapies.* 1 st ed. Weinheim, Germany; 2006.
48. Engel J. Domain organizations of modular extracellular matrix proteins and their evolution. *Matrix Biol.* 1996; 15:295-299.
49. Heino J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol.* 2000; 19:319-323.
50. Davison PF, Galbavy EJ. Connective tissue remodeling in corneal and scleral wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986; 27:1478-1484.
51. Newsome DA, Gross J, Hassell JR. Human corneal stroma contains three distinct collagens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982; 22:376-381.
52. Maurice DM. The transparency of the corneal stroma. *Vision Res.* 1970; 10:107-108.
53. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res.* 2004; 78:503-512.
54. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010; 339:247-257.
55. Ihanamaki T, Pelliniemi LJ, Vuorio E. Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye. *Prog Retin Eye Res.* 2004; 23:403-434.

Bibliografia

56. Marshall GE, Konstas AG, Lee WR. Collagens in ocular tissues. *Br J Ophthalmol*. 1993; 77:515-524.
57. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci*. 1990; 95 (Pt 4):649-657.
58. Fitch JM, Birk DE, Mentzer A, Hasty KA, Mainardi C, Linsenmayer TF. Corneal collagen fibrils: dissection with specific collagenases and monoclonal antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988; 29:1125-1136.
59. Woost PG, Brightwell J, Eiferman RA, Schultz GS. Effect of growth factors with dexamethasone on healing of rabbit corneal stromal incisions. *Exp Eye Res*. 1985; 40:47-60.
60. Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36:1037-1046.
61. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med*. 2001; 33:7-21.
62. Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea*. 2005; 24:S2-S11.
63. Sun M, Chen S, Adams SM, et al. Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: dysfunctional regulation of structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model. *J Cell Sci*. 2011; 124:4096-4105.
64. Cogan DG. Applied anatomy and physiology of the cornea. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1951; 55:329-359.
65. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67:609-652.
66. Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44:2941-2948.

Bibliografia

67. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res.* 2010; 91:326-335.
68. Li W, Vergnes JP, Cornuet PK, Hassell JR. cDNA clone to chick corneal chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan reveals identity to decorin. *Arch Biochem Biophys.* 1992; 296:190-197.
69. Blochberger TC, Vergnes JP, Hempel J, Hassell JR. cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. *J Biol Chem.* 1992; 267:347-352.
70. Kao WW, Funderburgh JL, Xia Y, Liu CY, Conrad GW. Focus on molecules: lumican. *Exp Eye Res.* 2006; 82:3-4.
71. Chakravarti S. Focus on molecules: keratocan (KERA). *Exp Eye Res.* 2006; 82:183-184.
72. Corpuz LM, Funderburgh JL, Funderburgh ML, Bottomley GS, Prakash S, Conrad GW. Molecular cloning and tissue distribution of keratocan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan 37A. *J Biol Chem.* 1996; 271:9759-9763.
73. Funderburgh JL, Corpuz LM, Roth MR, Funderburgh ML, Tasheva ES, Conrad GW. Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J Biol Chem.* 1997; 272:28089-28095.
74. Beecher N, Carlson C, Allen BR, et al. An x-ray diffraction study of corneal structure in mimecan-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46:4046-4049.
75. Cintron C, Hassinger LC, Kublin CL, Cannon DJ. Biochemical and ultrastructural changes in collagen during corneal wound healing. *J Ultrastruct Res.* 1978; 65:13-22.

Bibliografia

76. Hassell JR, Cintron C, Kublin C, Newsome DA. Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars. *Arch Biochem Biophys.* 1983; 222:362-369.
77. Liu CY, Birk DE, Hassell JR, Kane B, Kao WW. Keratocan-deficient mice display alterations in corneal structure. *J Biol Chem.* 2003; 278:21672-21677.
78. Funderburgh JL. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology.* 2000; 10:951-958.
79. Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Corpuz L, Roth MR. Proteoglycan expression during transforming growth factor beta -induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation. *J Biol Chem.* 2001; 276:44173-44178.
80. Lakshman N, Petroll WM. Growth factor regulation of corneal keratocyte mechanical phenotypes in 3-D collagen matrices. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53:1077-1086.
81. Chen J, Wong-Chong J, SundarRaj N. FGF-2- and TGF-beta1-induced downregulation of lumican and keratocan in activated corneal keratocytes by JNK signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52:8957-8964.
82. Iozzo RV. Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol.* 1994; 14:203-208.
83. Smith S, Hassell JR. Focus on molecules: perlecan (HSPG2). *Exp Eye Res.* 2006; 83:471-472.
84. Sundarraj N, Fite D, Belak R, et al. Proteoglycan distribution during healing of corneal stromal wounds in chick. *Exp Eye Res.* 1998; 67:433-442.
85. Cintron C, Gregory JD, Damle SP, Kublin CL. Biochemical analyses of proteoglycans in rabbit corneal scars. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990; 31:1975-1981.
86. Cintron C, Hong BS, Covington HI, Macarak EJ. Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988; 29:767-775.

Bibliografia

87. Vittitow J, Borrás T. Genes expressed in the human trabecular meshwork during pressure-induced homeostatic response. *J Cell Physiol.* 2004; 201:126-137.
88. Sta Iglesia DD, Stepp MA. Disruption of the basement membrane after corneal debridement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41:1045-1053.
89. Rossi M, Morita H, Sormunen R, et al. Heparan sulfate chains of perlecan are indispensable in the lens capsule but not in the kidney. *Embo J.* 2003; 22:236-245.
90. Mongiat M, Taylor K, Otto J, et al. The protein core of the proteoglycan perlecan binds specifically to fibroblast growth factor-7. *J Biol Chem.* 2000; 275:7095-7100.
91. Whitelock JM, Melrose J, Iozzo RV. Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry.* 2008; 47:11174-11183.
92. Woods A, Couchman JR. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell.* 1994; 5:183-192.
93. Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol.* 1988; 4:487-525.
94. Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, et al. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest.* 2001; 107:R9-R14.
95. Masur SK, Cheung JK, Antohi S. Identification of integrins in cultured corneal fibroblasts and in isolated keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34:2690-2698.
96. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 2010; 341:126-140.
97. Stepp MA. Corneal integrins and their functions. *Exp Eye Res.* 2006; 83:3-15.

Bibliografia

98. Gipson IK, Inatomi T. Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol*. 1995; 6:3-10.
99. Wang Y, Chen M, Wolosin JM. ZO-1 in corneal epithelium; stratal distribution and synthesis induction by outer cell removal. *Exp Eye Res*. 1993; 57:283-292.
100. Watsky MA, McDermott ML, Edelhauser HF. In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: the effects of age, cataract surgery and diabetes. *Exp Eye Res*. 1989; 49:751-767.
101. Stiemke MM, Edelhauser HF, Geroski DH. The developing corneal endothelium: correlation of morphology, hydration and Na/K ATPase pump site density. *Curr Eye Res*. 1991; 10:145-156.
102. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997; 38:779-782.
103. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea*. 2001; 20:374-384.
104. Cruzat A, Pavan-Langston D, Hamrah P. In vivo confocal microscopy of corneal nerves: analysis and clinical correlation. *Semin Ophthalmol*. 2010; 25:171-177.
105. Beuerman RW, Schimmelpfennig B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol*. 1980; 69:196-201.
106. Guthoff RF, Wiens H, Hahnel C, Wree A. Epithelial innervation of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea*. 2005; 24:608-613.
107. Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea*. 1998; 17:584-589.
108. Thut CJ, Rountree RB, Hwa M, Kingsley DM. A large-scale in situ screen provides molecular evidence for the induction of eye anterior segment structures by the developing lens. *Dev Biol*. 2001; 231:63-76.

Bibliografia

109. Beebe DC, Coats JM. The lens organizes the anterior segment: specification of neural crest cell differentiation in the avian eye. *Dev Biol.* 2000; 220:424-431.
110. Cintron C, Covington H, Kublin CL. Morphogenesis of rabbit corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983; 24:543-556.
111. Coulombre AJ, Coulombre JL. Corneal development. I. Corneal transparency. *J Cell Physiol.* 1958; 51:1-11.
112. Toole BP, Trelstad RL. Hyaluronate production and removal during corneal development in the chick. *Dev Biol.* 1971; 26:28-35.
113. Cornuet PK, Blochberger TC, Hassell JR. Molecular polymorphism of lumican during corneal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35:870-877.
114. Funderburgh JL, Caterson B, Conrad GW. Keratan sulfate proteoglycan during embryonic development of the chicken cornea. *Dev Biol.* 1986; 116:267-277.
115. Young RD, Gealy EC, Liles M, Caterson B, Ralphs JR, Quantock AJ. Keratan sulfate glycosaminoglycan and the association with collagen fibrils in rudimentary lamellae in the developing avian cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48:3083-3088.
116. Dunlevy JR, Beales MP, Berryhill BL, Cornuet PK, Hassell JR. Expression of the keratan sulfate proteoglycans lumican, keratocan and osteoglycin/mimecan during chick corneal development. *Exp Eye Res.* 2000; 70:349-362.
117. Zhang G, Chen S, Goldoni S, et al. Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan. *J Biol Chem.* 2009; 284:8888-8897.
118. Hay ED. Development of the vertebrate cornea. *Int Rev Cytol.* 1980; 63:263-322.
119. Davison PF, Galbavy EJ. Fluorescent dyes demonstrate the uniform expansion of the growing rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985; 26:1202-1209.
120. Rada JA, Fini ME, Hassell JR. Regionalized growth patterns of young chicken corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37:2060-2067.

Bibliografia

121. Li DQ, Tseng SC. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol.* 1995; 163:61-79.
122. Lim M, Goldstein MH, Tuli S, Schultz GS. Growth factor, cytokine and protease interactions during corneal wound healing. *Ocul Surf.* 2003; 1:53-65.
123. Tuominen IS, Tervo TM, Teppo AM, Valle TU, Gronhagen-Riska C, Vesaluoma MH. Human tear fluid PDGF-BB, TNF-alpha and TGF-beta1 vs corneal haze and regeneration of corneal epithelium and subbasal nerve plexus after PRK. *Exp Eye Res.* 2001; 72:631-641.
124. Zhou L, Beuerman RW, Huang L, et al. Proteomic analysis of rabbit tear fluid: Defensin levels after an experimental corneal wound are correlated to wound closure. *Proteomics.* 2007; 7:3194-3206.
125. Brissette-Storkus CS, Reynolds SM, Lepisto AJ, Hendricks RL. Identification of a novel macrophage population in the normal mouse corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:2264-2271.
126. Chinnery HR, Humphries T, Clare A, et al. Turnover of bone marrow-derived cells in the irradiated mouse cornea. *Immunology.* 2008; 125:541-548.
127. Hong JW, Liu JJ, Lee JS, et al. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:2795-2803.
128. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Expression of basic fibroblast growth factor in rabbit corneal alkali wounds in the presence and absence of granulocytes. *Acta Ophthalmol Scand.* 2005; 83:374-378.
129. Stramer BM, Zieske JD, Jung JC, Austin JS, Fini ME. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:4237-4246.

Bibliografia

130. Kay EP, Lee MS, Seong GJ, Lee YG. TGF-beta s stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts. *Curr Eye Res.* 1998; 17:286-293.
131. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1983; 258:7155-7160.
132. Jester JV, Barry-Lane PA, Petroll WM, Olsen DR, Cavanagh HD. Inhibition of corneal fibrosis by topical application of blocking antibodies to TGF beta in the rabbit. *Cornea.* 1997; 16:177-187.
133. O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29:63-78.
134. Carrington LM, Albon J, Anderson I, Kamma C, Boulton M. Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by TGF-beta isoforms and their inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:1886-1894.
135. Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res.* 1999; 18:529-551.
136. Chen C, Michelini-Norris B, Stevens S, et al. Measurement of mRNAs for TGFs and extracellular matrix proteins in corneas of rats after PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41:4108-4116.
137. Mita T, Yamashita H, Kaji Y, et al. Functional difference of TGF-beta isoforms regulating corneal wound healing after excimer laser keratectomy. *Exp Eye Res.* 1999; 68:513-519.
138. Zieske JD, Hutcheon AE, Guo X, Chung EH, Joyce NC. TGF-beta receptor types I and II are differentially expressed during corneal epithelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:1465-1471.

Bibliografia

139. Dinbergs ID, Brown L, Edelman ER. Cellular response to transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions. *J Biol Chem.* 1996; 271:29822-29829.
140. 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.
141. Vesaluoma M, Teppo AM, Gronhagen-Riska C, Tervo T. Release of TGF-beta 1 and VEGF in tears following photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res.* 1997; 16:19-25.
142. Pasquale LR, Dorman-Pease ME, Luttj DA, Quigley HA, Jampel HD. Immunolocalization of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in the anterior segment of the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34:23-30.
143. Song QH, Klepeis VE, Nugent MA, Trinkaus-Randall V. TGF-beta1 regulates TGF-beta1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. *Mol Pathol.* 2002; 55:164-176.
144. Jester JV, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Petroll WM. Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. *Cornea.* 1996; 15:505-516.
145. Garana RM, Petroll WM, Chen WT, et al. Radial keratotomy. II. Role of the myofibroblast in corneal wound contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33:3271-3282.
146. Jester JV, Petroll WM, Barry PA, Cavanagh HD. Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36:809-819.
147. Huh MI, Kim YH, Park JH, et al. Distribution of TGF-beta isoforms and signaling intermediates in corneal fibrotic wound repair. *J Cell Biochem.* 2009; 108:476-488.

Bibliografia

148. Karamichos D, Guo XQ, Hutcheon AE, Zieske JD. Human corneal fibrosis: an in vitro model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:1382-1388.
149. Karamichos D, Hutcheon AE, Zieske JD. Transforming growth factor-beta3 regulates assembly of a non-fibrotic matrix in a 3D corneal model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011; 5:e228-238.
150. Singh V, Santhiago MR, Barbosa FL, et al. Effect of TGFbeta and PDGF-B blockade on corneal myofibroblast development in mice. *Exp Eye Res.* 2011; 93:810-817.
151. Maltseva O, Folger P, Zekaria D, Petridou S, Masur SK. Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:2490-2495.
152. 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.
153. Mohan RR, Stapleton WM, Sinha S, Netto MV, Wilson SE. A novel method for generating corneal haze in anterior stroma of the mouse eye with the excimer laser. *Exp Eye Res.* 2008; 86:235-240.
154. Sakimoto T, Rosenblatt MI, Azar DT. Laser eye surgery for refractive errors. *Lancet.* 2006; 367:1432-1447.
155. Mietz H, Arnold G, Kirchhof B, Diestelhorst M, Krieglstein GK. Histopathology of episcleral fibrosis after trabeculectomy with and without mitomycin C. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1996; 234:364-368.
156. Skuta GL, Parrish RK, 2nd. Wound healing in glaucoma filtering surgery. *Surv Ophthalmol.* 1987; 32:149-170.
157. Li DQ, Tseng SC. Differential regulation of cytokine and receptor transcript expression in human corneal and limbal fibroblasts by epidermal growth factor,

Bibliografia

- transforming growth factor-alpha, platelet-derived growth factor B, and interleukin-1 beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37:2068-2080.
158. Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He YG. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res.* 1994; 59:63-71.
159. Grant MB, Khaw PT, Schultz GS, Adams JL, Shimizu RW. Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33:3292-3301.
160. Petridou S, Maltseva O, Spanakis S, Masur SK. TGF-beta receptor expression and smad2 localization are cell density dependent in fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41:89-95.
161. Tandon A, Tovey JC, Sharma A, Gupta R, Mohan RR. Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology. *Curr Mol Med.* 2010; 10:565-578.
162. Kaur H, Chaurasia SS, Agrawal V, Suto C, Wilson SE. Corneal myofibroblast viability: opposing effects of IL-1 and TGF beta1. *Exp Eye Res.* 2009; 89:152-158.
163. Barbosa FL, Chaurasia SS, Kaur H, de Medeiros FW, Agrawal V, Wilson SE. Stromal interleukin-1 expression in the cornea after haze-associated injury. *Exp Eye Res.* 2010; 91:456-461.
164. Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci.* 2002; 7:d1720-1726.
165. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrosio R, Jr., Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res.* 2001; 20:625-637.

Bibliografia

166. Denk PO, Knorr M. The in vitro effect of platelet-derived growth factor isoforms on the proliferation of bovine corneal stromal fibroblasts depends on cell density. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1997; 235:530-534.
167. Andresen JL, Ehlers N. Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta. *Curr Eye Res*. 1998; 17:79-87.
168. Kim WJ, Mohan RR, Mohan RR, Wilson SE. Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40:1364-1372.
169. Jester JV, Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res*. 2002; 75:645-657.
170. Ciuculan L, Ehnert S, Ilkavets I, et al. TGF-beta enhances alcohol dependent hepatocyte damage via down-regulation of alcohol dehydrogenase I. *J Hepatol*. 2010; 52:407-416.
171. LaGier AJ, Gordon GM, Katzman LR, Vasiliou V, Fini ME. Mechanisms for PDGF, a serum cytokine, stimulating loss of corneal keratocyte crystallins. *Cornea*. 2013; 32:1269-1275.
172. Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, Le Bourhis X. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000; 11:295-302.
173. Lopes CC, Dietrich CP, Nader HB. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39:157-167.

Bibliografia

174. Kretzschmar M, Doody J, Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature*. 1997; 389:618-622.
175. Lawler S, Feng XH, Chen RH, et al. The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J Biol Chem*. 1997; 272:14850-14859.
176. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997; 390:465-471.
177. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res*. 1999; 18:293-309.
178. Kitano S, Goldman JN. Cytologic and histochemical changes in corneal wound repair. *Arch Ophthalmol*. 1966; 76:345-354.
179. Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF. A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985; 26:897-900.
180. Wilson SE, Chen L, Mohan RR, Liang Q, Liu J. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp Eye Res*. 1999; 68:377-397.
181. Honma Y, Nishida K, Sotozono C, Kinoshita S. Effect of transforming growth factor-beta1 and -beta2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res*. 1997; 65:391-396.
182. Kokawa N, Sotozono C, Nishida K, Kinoshita S. High total TGF-beta 2 levels in normal human tears. *Curr Eye Res*. 1996; 15:341-343.
183. Suzuki K, Saito J, Yanai R, et al. Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing. *Prog Retin Eye Res*. 2003; 22:113-133.
184. Maldonado BA, Furcht LT. Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and

Bibliografia

- arginine-glycine-aspartic acid peptide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36:2120-2126.
185. Fujikawa LS, Foster CS, Gipson IK, Colvin RB. Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: immunofluorescence and ultrastructural studies. *J Cell Biol.* 1984; 98:128-138.
186. Ohji M, Mandarino L, SundarRaj N, Thoft RA. Corneal epithelial cell attachment with endogenous laminin and fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34:2487-2492.
187. Grierson I, Heathcote L, Hiscott P, Hogg P, Briggs M, Hagan S. Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye. *Prog Retin Eye Res.* 2000; 19:779-802.
188. Netto MV, Mohan RR, Ambrosio R, Jr., 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.
189. Wilson SE, He YG, Weng J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res.* 1996; 62:325-327.
190. Chaurasia SS, Lim RR, Lakshminarayanan R, Mohan RR. Nanomedicine approaches for corneal diseases. *J Funct Biomater.* 2015; 6:277-298.
191. Welch MP, Odland GF, Clark RA. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol.* 1990; 110:133-145.
192. Lauweryns B, van den Oord JJ, Volpes R, Foets B, Missotten L. Distribution of very late activation integrins in the human cornea. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991; 32:2079-2085.
193. Masur SK, Conors RJ, Jr., Cheung JK, Antohi S. Matrix adhesion characteristics of corneal myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40:904-910.

Bibliografia

194. Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *J Biol Chem.* 2002; 277:37377-37381.
195. Bach CT, Creed S, Zhong J, et al. Tropomyosin isoform expression regulates the transition of adhesions to determine cell speed and direction. *Mol Cell Biol.* 2009; 29:1506-1514.
196. Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 2003; 116:4605-4613.
197. Le Clainche C, Carlier MF. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev.* 2008; 88:489-513.
198. Carragher NO, Frame MC. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol.* 2004; 14:241-249.
199. Hervy M, Hoffman L, Beckerle MC. From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2006; 18:524-532.
200. Braren R, Hu H, Kim YH, Beggs HE, Reichardt LF, Wang R. Endothelial FAK is essential for vascular network stability, cell survival, and lamellipodial formation. *J Cell Biol.* 2006; 172:151-162.
201. Hamadi A, Bouali M, Dontenwill M, Stoeckel H, Takeda K, Ronde P. Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *J Cell Sci.* 2005; 118:4415-4425.
202. Huang Z, Yan DP, Ge BX. JNK regulates cell migration through promotion of tyrosine phosphorylation of paxillin. *Cell Signal.* 2008; 20:2002-2012.
203. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, et al. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 2004; 6:154-161.

Bibliografia

204. Zaidel-Bar R, Milo R, Kam Z, Geiger B. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 2007; 120:137-148.
205. Zouq NK, Keeble JA, Lindsay J, et al. FAK engages multiple pathways to maintain survival of fibroblasts and epithelia: differential roles for paxillin and p130Cas. *J Cell Sci.* 2009; 122:357-367.
206. Steele C. Corneal wound healing: a review. *Optometry Today.* 1999; 24:28-32.
207. Cintron C, Hong BS, Kublin CL. Quantitative analysis of collagen from normal developing corneas and corneal scars. *Curr Eye Res.* 1981; 1:1-8.
208. Cintron C, Kublin CL. Regeneration of corneal tissue. *Dev Biol.* 1977; 61:346-357.
209. Wilson SE. Stimulus-specific and cell type-specific cascades: emerging principles relating to control of apoptosis in the eye. *Exp Eye Res.* 1999; 69:255-266.
210. Yanai R, Yamada N, Kugimiya N, Inui M, Nishida T. Mitogenic and antiapoptotic effects of various growth factors on human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:2122-2126.
211. Jester JV, Rodrigues MM, Herman IM. Characterization of avascular corneal wound healing fibroblasts. New insights into the myofibroblast. *Am J Pathol.* 1987; 127:140-148.
212. Ronnov-Jessen L, Petersen OW. A function for filamentous alpha-smooth muscle actin: retardation of motility in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1996; 134:67-80.
213. Barbosa FL, Chaurasia SS, Cutler A, et al. Corneal myofibroblast generation from bone marrow-derived cells. *Exp Eye Res.* 2010; 91:92-96.
214. Santhiago MR, Singh V, Barbosa FL, Agrawal V, Wilson SE. Monocyte development inhibitor PRM-151 decreases corneal myofibroblast generation in rabbits. *Exp Eye Res.* 2011; 93:786-789.

Bibliografia

215. Singh V, Agrawal V, Santhiago MR, Wilson SE. Stromal fibroblast-bone marrow-derived cell interactions: Implications for myofibroblast development in the cornea. *Exp Eye Res.* 2012; 98:1-8.
216. Wilson SE, Mohan RR, Netto M, et al. RANK, RANKL, OPG, and M-CSF expression in stromal cells during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45:2201-2211.
217. Wilson SE. Corneal myofibroblast biology and pathobiology: Generation, persistence, and transparency. *Exp Eye Res.* 2012; 99:78-88.
218. Tuli SS, Liu R, Chen C, Blalock TD, Goldstein M, Schultz GS. Immunohistochemical localization of EGF, TGF-alpha, TGF-beta, and their receptors in rat corneas during healing of excimer laser ablation. *Curr Eye Res.* 2006; 31:709-719.
219. Garcia-Olivas R, Hoebeke J, Castel S, et al. Differential binding of platelet-derived growth factor isoforms to glycosaminoglycans. *Histochem Cell Biol.* 2003; 120:371-382.
220. Karamichos D, Rich CB, Zareian R, et al. TGF-beta3 stimulates stromal matrix assembly by human corneal keratocyte-like cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54:6612-6619.
221. Galiacy SD, Fournie P, Massoudi D, et al. Matrix metalloproteinase 14 overexpression reduces corneal scarring. *Gene Ther.* 2011; 18:462-468.
222. Dawson DG, Kramer TR, Grossniklaus HE, Waring GO, 3rd, Edelhauser HF. Histologic, ultrastructural, and immunofluorescent evaluation of human laser-assisted in situ keratomileusis corneal wounds. *Arch Ophthalmol.* 2005; 123:741-756.
223. Funderburgh JL, Hevelone ND, Roth MR, et al. Decorin and biglycan of normal and pathologic human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39:1957-1964.

Bibliografia

224. Cionni RJ, Katakami C, Lavrich JB, Kao WW. Collagen metabolism following corneal laceration in rabbits. *Curr Eye Res.* 1986; 5:549-558.
225. Fini ME, Girard MT. The pattern of metalloproteinase expression by corneal fibroblasts is altered by passage in cell culture. *J Cell Sci.* 1990; 97 (Pt 2):373-383.
226. Fini ME, Girard MT. Non-coordinate regulation of metalloproteinase gene expression in cornea. *Matrix Suppl.* 1992; 1:203-204.
227. Fini ME, Yue BY, Sugar J. Collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases in normal and keratoconus corneas. *Curr Eye Res.* 1992; 11:849-862.
228. Matsubara M, Zieske JD, Fini ME. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991; 32:3221-3237.
229. Gabison EE, Mourah S, Steinfeld E, et al. Differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in normal and ulcerated corneas: role in epithelio-stromal interactions and matrix metalloproteinase induction. *Am J Pathol.* 2005; 166:209-219.
230. Maguen E, Zorapapel NC, Zieske JD, et al. Extracellular matrix and matrix metalloproteinase changes in human corneas after complicated laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK). *Cornea.* 2002; 21:95-100.
231. Gabison EE, Huet E, Baudouin C, Menashi S. Direct epithelial-stromal interaction in corneal wound healing: Role of EMMPRIN/CD147 in MMPs induction and beyond. *Prog Retin Eye Res.* 2009; 28:19-33.
232. Brown D, Chwa M, Escobar M, Kenney MC. Characterization of the major matrix degrading metalloproteinase of human corneal stroma. Evidence for an enzyme/inhibitor complex. *Exp Eye Res.* 1991; 52:5-16.
233. Ando H, Twining SS, Yue BY, et al. MMPs and proteinase inhibitors in the human aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34:3541-3548.

Bibliografia

234. Johnson-Muller B, Gross J. Regulation of corneal collagenase production: epithelial-stromal cell interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75:4417-4421.
235. Alexander CM, Werb Z. Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr Opin Cell Biol*. 1989; 1:974-982.
236. Girard MT, Matsubara M, Fini ME. Transforming growth factor-beta and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991; 32:2441-2454.
237. Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol*. 1998; 8:437-441.
238. Wu WC, Stark WJ, Green WR. Corneal wound healing after 193-nm excimer laser keratectomy. *Arch Ophthalmol*. 1991; 109:1426-1432.
239. Albert DM JF. *Principles and Practice of Ophthalmology*. 3 rd ed. Philadelphia; 2008:420-423.
240. Lee JB, Seong GJ, Lee JH, Seo KY, Lee YG, Kim EK. Comparison of laser epithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy for low to moderate myopia. *J Cataract Refract Surg*. 2001; 27:565-570.
241. Meek KM, Hayes S. Corneal cross-linking--a review. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2013; 33:78-93.
242. Samaras KE, Lake DB. Corneal collagen cross linking (CXL): a review. *Int Ophthalmol Clin*. 2010; 50:89-100.
243. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T, Denaro R, Balestrazzi A. Riboflavin-UVA-induced corneal collagen cross-linking in pediatric patients. *Cornea*. 2012; 31:227-231.
244. Tomkins O, Garzosi HJ. Collagen cross-linking: Strengthening the unstable cornea. *Clin Ophthalmol*. 2008; 2:863-867.

Bibliografia

245. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006; 17:356-360.
246. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye (Lond)*. 2004; 18:718-722.
247. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea*. 2004; 23:43-49.
248. Baiocchi S, Mazzotta C, Cerretani D, Caporossi T, Caporossi A. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. *J Cataract Refract Surg*. 2009; 35:893-899.
249. Malhotra C, Shetty R, Kumar RS, Veluri H, Nagaraj H, Shetty KB. In vivo imaging of riboflavin penetration during collagen cross-linking with hand-held spectral domain optical coherence tomography. *J Refract Surg*. 2012; 28:776-780.
250. Cherfan D, Verter EE, Melki S, et al. Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54:3426-3433.
251. Gipson IK, Kiorpes TC. Epithelial sheet movement: protein and glycoprotein synthesis. *Dev Biol*. 1982; 92:259-262.
252. Pal-Ghosh S, Blanco T, Tadvalkar G, et al. MMP9 cleavage of the beta4 integrin ectodomain leads to recurrent epithelial erosions in mice. *J Cell Sci*. 2011; 124:2666-2675.
253. Chinnery HR, McLenachan S, Binz N, et al. TLR9 ligand CpG-ODN applied to the injured mouse cornea elicits retinal inflammation. *Am J Pathol*. 2012; 180:209-220.
254. Ferrington DA, Roehrich H, Chang AA, et al. Corneal wound healing is compromised by immunoproteasome deficiency. *PLoS One*. 2013; 8:e54347.
255. Terai K, Call MK, Liu H, et al. Crosstalk between TGF-beta and MAPK signaling during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52:8208-8215.

Bibliografia

256. Yang Y, Yang H, Wang Z, et al. Cannabinoid receptor 1 suppresses transient receptor potential vanilloid 1-induced inflammatory responses to corneal injury. *Cell Signal*. 2013; 25:501-511.
257. Hutcheon AE, Guo XQ, Stepp MA, et al. Effect of wound type on Smad 2 and 4 translocation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46:2362-2368.
258. Azar DT, Pluznik D, Jain S, Khoury JM. Gelatinase B and A expression after laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol*. 1998; 116:1206-1208.
259. Kato T, Chang JH, Azar DT. Expression of type XVIII collagen during healing of corneal incisions and keratectomy wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44:78-85.
260. Martinez-Garcia MC, Merayo-Llodes J, Blanco-Mezquita T, Mar-Sardana S. Wound healing following refractive surgery in hens. *Exp Eye Res*. 2006; 83:728-735.
261. Blanco-Mezquita JT, Hutcheon AE, Stepp MA, Zieske JD. alphaVbeta6 integrin promotes corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52:8505-8513.
262. Ruberti JW, Zieske JD. Prelude to corneal tissue engineering - gaining control of collagen organization. *Prog Retin Eye Res*. 2008; 27:549-577.
263. Blanco-Mezquita JT, Hutcheon AE, Zieske JD. Role of thrombospondin-1 in repair of penetrating corneal wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54:6262-6268.
264. Fish R, Davidson RS. Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010; 21:317-321.
265. Javadi MA, Yazdani S, Sajjadi H, et al. Chronic and delayed-onset mustard gas keratitis: report of 48 patients and review of literature. *Ophthalmology*. 2005; 112:617-625.

Bibliografia

266. Khaw PT, Shah P, Elkington AR. Injury to the eye. *Bmj*. 2004; 328:36-38.
267. Saika S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha. *Cornea*. 2007; 26:S70-74.
268. Sosne G, Szliter EA, Barrett R, Kernacki KA, Kleinman H, Hazlett LD. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation in vivo following alkali injury. *Exp Eye Res*. 2002; 74:293-299.
269. Argueso P, Guzman-Aranguez A, Mantelli F, Cao Z, Ricciuto J, Panjwani N. Association of cell surface mucins with galectin-3 contributes to the ocular surface epithelial barrier. *J Biol Chem*. 2009; 284:23037-23045.
270. Reichl S, Bednarz J, Muller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol*. 2004; 88:560-565.
271. Sasaki H, Yamamura K, Mukai T, et al. Enhancement of ocular drug penetration. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1999; 16:85-146.
272. Trinkaus-Randall V, Gipson IK. Role of calcium and calmodulin in hemidesmosome formation in vitro. *J Cell Biol*. 1984; 98:1565-1571.
273. Zieske JD, Gipson IK. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986; 27:1-7.
274. Ma A, Zhao B, Boulton M, Albon J. A role for Notch signaling in corneal wound healing. *Wound Repair Regen*. 2011; 19:98-106.
275. Janin-Manificat H, Rovere MR, Galiacy SD, et al. Development of ex vivo organ culture models to mimic human corneal scarring. *Mol Vis*. 2012; 18:2896-2908.
276. He Z, Pipparelli A, Manissolle C, et al. Ex vivo gene electrotransfer to the endothelium of organ cultured human corneas. *Ophthalmic Res*. 2010; 43:43-55.
277. Pipparelli A, Arsenijevic Y, Thuret G, Gain P, Nicolas M, Majo F. ROCK inhibitor enhances adhesion and wound healing of human corneal endothelial cells. *PLoS One*. 2013; 8:e62095.

Bibliografia

278. Saghizadeh M, Kramerov AA, Yu FS, Castro MG, Ljubimov AV. Normalization of wound healing and diabetic markers in organ cultured human diabetic corneas by adenoviral delivery of c-Met gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:1970-1980.
279. Zheng R, Po I, Mishin V, et al. The generation of 4-hydroxynonenal, an electrophilic lipid peroxidation end product, in rabbit cornea organ cultures treated with UVB light and nitrogen mustard. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 272:345-355.
280. Kryczka T, Ehlers N, Nielsen K, Midelfart A. Impact of organ culturing on metabolic profile of human corneas: preliminary results. *Acta Ophthalmol.* 2012; 90:761-767.
281. Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res.* 2003; 76:521-542.
282. Stepp MA, Spurr-Michaud S, Gipson IK. Integrins in the wounded and unwounded stratified squamous epithelium of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34:1829-1844.
283. Proulx S, d'Arc Uwamaliya J, Carrier P, et al. Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types. *Mol Vis.* 2010; 16:2192-2201.
284. Dreier B, Thomasy SM, Mendonsa R, Raghunathan VK, Russell P, Murphy CJ. Substratum compliance modulates corneal fibroblast to myofibroblast transformation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54:5901-5907.
285. Kim A, Lakshman N, Karamichos D, Petroll WM. Growth factor regulation of corneal keratocyte differentiation and migration in compressed collagen matrices. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:864-875.

Bibliografia

286. Micera A, Lambiase A, Puxeddu I, et al. Nerve growth factor effect on human primary fibroblastic-keratocytes: possible mechanism during corneal healing. *Exp Eye Res.* 2006; 83:747-757.
287. Beales MP, Funderburgh JL, Jester JV, Hassell JR. Proteoglycan synthesis by bovine keratocytes and corneal fibroblasts: maintenance of the keratocyte phenotype in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40:1658-1663.
288. Stepp MA, Zieske JD, Trinkaus-Randall V, et al. Wounding the cornea to learn how it heals. *Exp Eye Res.* 2014; 121:178-193.
289. Etheredge L, Kane BP, Hassell JR. The effect of growth factor signaling on keratocytes in vitro and its relationship to the phases of stromal wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50:3128-3136.
290. Funderburgh ML, Mann MM, Funderburgh JL. Keratocyte phenotype is enhanced in the absence of attachment to the substratum. *Mol Vis.* 2008; 14:308-317.
291. Haber M, Cao Z, Panjwani N, Bedenice D, Li WW, Provost PJ. Effects of growth factors (EGF, PDGF-BB and TGF-beta 1) on cultured equine epithelial cells and keratocytes: implications for wound healing. *Vet Ophthalmol.* 2003; 6:211-217.
292. Jester JV, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res.* 2003; 77:581-592.
293. Jester JV, Huang J, Barry-Lane PA, Kao WW, Petroll WM, Cavanagh HD. Transforming growth factor(beta)-mediated corneal myofibroblast differentiation requires actin and fibronectin assembly. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40:1959-1967.
294. Long CJ, Roth MR, Tasheva ES, et al. Fibroblast growth factor-2 promotes keratan sulfate proteoglycan expression by keratocytes in vitro. *J Biol Chem.* 2000; 275:13918-13923.

Bibliografía

295. Wilson SE, He YG, Lloyd SA. EGF, EGF receptor, basic FGF, TGF beta-1, and IL-1 alpha mRNA in human corneal epithelial cells and stromal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33:1756-1765.
296. Blanco-Mezquita T, Martinez-Garcia C, Proenca R, et al. Nerve growth factor promotes corneal epithelial migration by enhancing expression of matrix metalloprotease-9. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54:3880-3890.
297. Anitua E, Sanchez M, Merayo-Llodes J, De la Fuente M, Muruzabal F, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival fibroblasts and inhibits and reverts TGF-beta1-Induced myodifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52:6066-6073.
298. Chen TC, Lai CH, Chang JL, Chang SW. Mitomycin C retardation of corneal fibroblast migration via sustained dephosphorylation of paxillin at tyrosine 118. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53:1539-1547.
299. Wang L, Ko CY, Meyers EE, Pedroja BS, Pelaez N, Bernstein AM. Concentration-dependent effects of transforming growth factor beta1 on corneal wound healing. *Mol Vis.* 2011; 17:2835-2846.
300. Asamblea Mundial de la Salud, 66. Proyecto de plan de acción para la prevención de la ceguera y la discapacidad visual evitables 2014-2019: Salud ocular universal: un plan de acción mundial para 2014-2019. 2013; <http://apps.who.int/iris/handle/10665/150916#sthash.APsIP4Bw.dpuf>.
301. Reidy JJ, Paulus MP, Gona S. Recurrent erosions of the cornea: epidemiology and treatment. *Cornea.* 2000; 19:767-771.
302. Wu J, Du Y, Mann MM, Funderburgh JL, Wagner WR. Corneal stromal stem cells versus corneal fibroblasts in generating structurally appropriate corneal stromal tissue. *Exp Eye Res.* 2014; 120:71-81.

Bibliografia

303. Bick MD, Davidson RL. Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine-dependent cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974; 71:2082-2086.
304. Petroll WM, Lakshman N. Fibroblastic Transformation of Corneal Keratocytes by Rac Inhibition is Modulated by Extracellular Matrix Structure and Stiffness. *J Funct Biomater*. 2015; 6:222-240.
305. West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38:1625-1631.
306. Wilson SE. Everett Kinsey Lecture. Keratocyte apoptosis in refractive surgery. *Clae J*. 1998; 24:181-185.
307. Wilson SE, Chaurasia SS, Medeiros FW. Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response. *Exp Eye Res*. 2007; 85:305-311.
308. Amoozadeh J, Aliakbari S, Behesht-Nejad AH, Seyedian MA, Rezvan B, Hashemi H. Confocal microscopy of corneal stroma and endothelium after LASIK and PRK. *J Refract Surg*. 2009; 25:S963-967.
309. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Corneal keratocyte deficits after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol*. 2006; 141:799-809.
310. McLaren JW, Bourne WM, Maguire LJ, Patel SV. Changes in Keratocyte Density and Visual Function Five Years After Laser In Situ Keratomileusis: Femtosecond Laser Versus Mechanical Microkeratome. *Am J Ophthalmol*. 2015; 160:163-170.
311. Vesaluoma M, Perez-Santonja J, Petroll WM, Linna T, Alio J, Tervo T. Corneal stromal changes induced by myopic LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41:369-376.

Bibliografia

312. Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res.* 2003; 76:71-87.
313. Wilson SE. Clinical practice. Use of lasers for vision correction of nearsightedness and farsightedness. *N Engl J Med.* 2004; 351:470-475.
314. Jester JV, Huang J, Fisher S, et al. Myofibroblast differentiation of normal human keratocytes and hTERT, extended-life human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:1850-1858.
315. Petroll WM, Lakshman N, Ma L. Experimental Models for Investigating Intra-Stromal Migration of Corneal Keratocytes, Fibroblasts and Myofibroblasts. *J Funct Biomater.* 2012; 3:183-198.
316. Song QH, Singh RP, Richardson TP, Nugent MA, Trinkaus-Randall V. Transforming growth factor-beta1 expression in cultured corneal fibroblasts in response to injury. *J Cell Biochem.* 2000; 77:186-199.
317. Singh V, Barbosa FL, Torricelli AA, Santhiago MR, Wilson SE. Transforming growth factor beta and platelet-derived growth factor modulation of myofibroblast development from corneal fibroblasts in vitro. *Exp Eye Res.* 2014; 120:152-160.
318. Singh V, Jaini R, Torricelli AA, et al. TGFbeta and PDGF-B signaling blockade inhibits myofibroblast development from both bone marrow-derived and keratocyte-derived precursor cells in vivo. *Exp Eye Res.* 2014; 121:35-40.
319. Mohan RR, Gupta R, Mehan MK, Cowden JW, Sinha S. Decorin transfection suppresses profibrogenic genes and myofibroblast formation in human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res.* 2010; 91:238-245.
320. Petroll WM, Ma L, Kim A, Ly L, Vishwanath M. Dynamic assessment of fibroblast mechanical activity during Rac-induced cell spreading in 3-D culture. *J Cell Physiol.* 2008; 217:162-171.

Bibliografia

321. Nugent MA, Edelman ER. Transforming growth factor beta 1 stimulates the production of basic fibroblast growth factor binding proteoglycans in Balb/c3T3 cells. *J Biol Chem.* 1992; 267:21256-21264.
322. Zieske JD, Guimaraes SR, Hutcheon AE. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res.* 2001; 72:33-39.
323. Baird A, Durkin T. Inhibition of endothelial cell proliferation by type beta-transforming growth factor: interactions with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; 138:476-482.
324. Gonzalez AM, Buscaglia M, Ong M, Baird A. Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *J Cell Biol.* 1990; 110:753-765.
325. Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res.* 1989; 1:207-235.
326. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol.* 1989; 109:1-6.
327. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:4219-4223.
328. Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal. *Cornea.* 1998; 17:627-639.
329. Weimar V. *Healing processes in the cornea.* 1 st Edition ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1960.
330. Matsuda H, Smelser GK. Electron microscopy of corneal wound healing. *Exp Eye Res.* 1973; 16:427-442.
331. Del Pero RA, Gigstad JE, Roberts AD, et al. A refractive and histopathologic study of excimer laser keratectomy in primates. *Am J Ophthalmol.* 1990; 109:419-429.

Bibliografia

332. Hanna KD, Pouliquen Y, Waring GO, 3rd, et al. Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol*. 1989; 107:895-901.
333. Lance SE, Capone A, Jr., SundarRaj N, Roat MI, Thoft RA. Diamond burring and surgical keratectomy. Morphologic comparison in the rabbit. *Arch Ophthalmol*. 1988; 106:830-834.
334. Lee RE, Davison PF, Cintron C. The healing of linear nonperforating wounds in rabbit corneas of different ages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1982; 23:660-665.
335. Smelser GK. Role of the epithelium in incorporation of sulfate in the corneal connective tissue. In: Duke-Elder S, Perkins ES. *The transparency of the cornea*. Oxford: 125 Blackwell Scientific Publications; 1960.
336. Dahl IM. Biosynthesis of proteoglycans and hyaluronate in rabbit corneal fibroblast cultures. Variation with age of the cell line and effect of foetal calf serum. *Exp Eye Res*. 1981; 32:419-433.
337. Blalock TD, Duncan MR, Varela JC, et al. Connective tissue growth factor expression and action in human corneal fibroblast cultures and rat corneas after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44:1879-1887.
338. Dupps WJ, Jr., Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Exp Eye Res*. 2006; 83:709-720.
339. Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Stromal wound healing explains refractive instability and haze development after photorefractive keratectomy: a 1-year confocal microscopic study. *Ophthalmology*. 2000; 107:1235-1245.
340. Finnsen KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2:195-214.

Bibliografia

341. Chaurasia SS, Kaur H, de Medeiros FW, Smith SD, Wilson SE. Dynamics of the expression of intermediate filaments vimentin and desmin during myofibroblast differentiation after corneal injury. *Exp Eye Res.* 2009; 89:133-139.
342. Torricelli AA, Singh V, Agrawal V, Santhiago MR, Wilson SE. Transmission electron microscopy analysis of epithelial basement membrane repair in rabbit corneas with haze. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54:4026-4033.
343. Chen J, Guerriero E, Sado Y, SundarRaj N. Rho-mediated regulation of TGF-beta1- and FGF-2-induced activation of corneal stromal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50:3662-3670.
344. Funderburgh JL, Mann MM, Funderburgh ML. Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure: a role for fibroblasts in corneal fibrosis. *J Biol Chem.* 2003; 278:45629-45637.
345. Brown CT, Applebaum E, Banwatt R, Trinkaus-Randall V. Synthesis of stromal glycosaminoglycans in response to injury. *J Cell Biochem.* 1995; 59:57-68.
346. Carlson EC, Wang IJ, Liu CY, Brannan P, Kao CW, Kao WW. Altered KSPG expression by keratocytes following corneal injury. *Mol Vis.* 2003; 9:615-623.
347. Funderburgh JL, Cintron C, Covington HI, Conrad GW. Immunoanalysis of keratan sulfate proteoglycan from corneal scars. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988; 29:1116-1124.
348. Greenberg RS, Bernstein AM, Benezra M, Gelman IH, Taliana L, Masur SK. FAK-dependent regulation of myofibroblast differentiation. *Faseb J.* 2006; 20:1006-1008.
349. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:5192-5196.
350. Zachary I. Focal adhesion kinase. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29:929-934.

Bibliografia

351. Borsi L, Castellani P, Risso AM, Leprini A, Zardi L. Transforming growth factor-beta regulates the splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS Lett.* 1990; 261:175-178.
352. Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci.* 2001; 114:3285-3296.
353. Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost.* 2003; 90:993-1002.
354. Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J.* 1999; 18:1345-1356.
355. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol.* 1998; 142:873-881.
356. Thannickal VJ, Lee DY, White ES, et al. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 2003; 278:12384-12389.
357. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3:349-363.
358. Petroll WM, Jester JV, Bean JJ, Cavanagh HD. Myofibroblast transformation of cat corneal endothelium by transforming growth factor-beta1, -beta2, and -beta3. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39:2018-2032.
359. Burridge K, Turner CE, Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol.* 1992; 119:893-903.
360. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999; 285:1028-1032.

Bibliografia

361. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6:56-68.
362. Hauck CR, Hsia DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase facilitates platelet-derived growth factor-BB-stimulated ERK2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000; 275:41092-41099.
363. Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, et al. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature.* 1995; 377:539-544.
364. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, et al. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2000; 2:249-256.
365. Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 16):2677-2691.
366. Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell.* 2003; 14:2508-2519.
367. Carter RT. The role of integrins in corneal wound healing. *Vet Ophthalmol.* 2009; 12 Suppl 1:2-9.
368. Pinco KA, He W, Yang JT. alpha4beta1 integrin regulates lamellipodia protrusion via a focal complex/focal adhesion-independent mechanism. *Mol Biol Cell.* 2002; 13:3203-3217.
369. Edelhauser HF, Ubels JL. The cornea and sclera. In: Kaufman PL, Alm A. *Adler's Physiology of the eye.* 10 th ed. Mosby, St. Louis; 2003:47-114.
370. Dawson DG, Edelhauser HF, Grossniklaus HE. Long-term histopathologic findings in human corneal wounds after refractive surgical procedures. *Am J Ophthalmol.* 2005; 139:168-178.

Bibliografia

371. Chen L, Kato T, Toshida H, Nakamura S, Murakami A. Immunohistochemical characterization of epithelial cells implanted in the flap-stroma interface of the cornea. *Jpn J Ophthalmol.* 2005; 49:79-83.
372. Rawe IM, Meek KM, Leonard DW, Takahashi T, Cintron C. Structure of corneal scar tissue: an X-ray diffraction study. *Biophys J.* 1994; 67:1743-1748.
373. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J.* 1997; 327 (Pt 1):1-16.
374. Brooks R, Williamson R, Bass M. Syndecan-4 independently regulates multiple small GTPases to promote fibroblast migration during wound healing. *Small GTPases.* 2012; 3:73-79.
375. Lin F, Ren XD, Doris G, Clark RA. Three-dimensional migration of human adult dermal fibroblasts from collagen lattices into fibrin/fibronectin gels requires syndecan-4 proteoglycan. *J Invest Dermatol.* 2005; 124:906-913.
376. Bass MD, Roach KA, Morgan MR, et al. Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 2007; 177:527-538.
377. Woods A, Couchman JR, Johansson S, Hook M. Adhesion and cytoskeletal organisation of fibroblasts in response to fibronectin fragments. *Embo J.* 1986; 5:665-670.
378. Gopal S, Bober A, Whiteford JR, Multhaupt HA, Yoneda A, Couchman JR. Heparan sulfate chain valency controls syndecan-4 function in cell adhesion. *J Biol Chem.* 2010; 285:14247-14258.
379. Baciuc PC, Goetinck PF. Protein kinase C regulates the recruitment of syndecan-4 into focal contacts. *Mol Biol Cell.* 1995; 6:1503-1513.
380. Elenius K, Vainio S, Laato M, Salmivirta M, Thesleff I, Jalkanen M. Induced expression of syndecan in healing wounds. *J Cell Biol.* 1991; 114:585-595.

Bibliografía

381. Gallo R, Kim C, Kokenyesi R, Adzick NS, Bernfield M. Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *J Invest Dermatol.* 1996; 107:676-683.
382. Cizmeci-Smith G, Langan E, Youkey J, Showalter LJ, Carey DJ. Syndecan-4 is a primary-response gene induced by basic fibroblast growth factor and arterial injury in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:172-180.
383. Couchman JR, Woods A. Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. *J Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 20):3415-3420.
384. Maguen E, Rabinowitz YS, Regev L, Saghizadeh M, Sasaki T, Ljubimov AV. Alterations of extracellular matrix components and proteinases in human corneal buttons with INTACS for post-laser in situ keratomileusis keratectasia and keratoconus. *Cornea.* 2008; 27:565-573.
385. Ibares-Frias L, Gallego P, Cantalapiedra-Rodriguez R, et al. Tissue reaction after intrastromal corneal ring implantation in an experimental animal model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015.
386. Merayo-Llodes J, Blanco-Mezquita T, Ibares-Frias L, Fabiani L, Alvarez-Barcia A, Martinez-Garcia C. Induction of controlled wound healing with PMMA segments in the deep stroma in corneas of hens. *Eur J Ophthalmol.* 2010; 20:62-70.
387. Torres RM, Merayo-Llodes J, Blanco-Mezquita JT, et al. Experimental model of laser in situ keratomileusis in hens. *J Refract Surg.* 2005; 21:392-398.
388. Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, et al. Expression of Smad7 in mouse eyes accelerates healing of corneal tissue after exposure to alkali. *Am J Pathol.* 2005; 166:1405-1418.