

ÍNDICE

	<i>Páginas</i>
• Agradecimientos	1
• Listado de abreviaturas	2
• Resumen	4
• Abstract	5
• Introducción	
○ La córnea	6
○ Citoquinas	9
○ Factores de crecimiento	
▪ TGFβ	11
▪ PDGF	12
▪ FGF	12
○ Proceso de cicatrización corneal	13
• Hipótesis	17
• Objetivos	18
• Material y métodos	
○ Cultivo celular	19
○ Inducción de quiescencia y realización de las heridas	19
○ Factores de crecimiento	19
○ Proliferación celular	20
○ Actividad metabólica	20
○ Cierre de la herida y proliferación en diferentes zonas del cultivo	20
○ Diferenciación celular	22
○ Expresión de α-SMA	22
○ Análisis estadístico	23
• Resultados	
○ Cierre de la herida	24
○ Proliferación general	25
○ Actividad metabólica	26
○ Proliferación celular en las diferentes zonas de la herida	28
○ Diferenciación celular	32
○ Presencia de miofibroblastos (expresión de α-SMA)	32
• Discusión	35
• Conclusiones	37
• Referencias	38

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. M^a del Carmen Martínez García su esfuerzo, ayuda, dedicación y apoyo a la hora de dirigir este trabajo.

Mi máximo agradecimiento al Dr. Manuel J. Gayoso Rodríguez por su codirección y seguimiento del trabajo.

Agradecer también la ayuda y el apoyo de Roberto Cantalapiedra Rodríguez a la hora de llevar a cabo las diferentes técnicas utilizadas en los experimentos presentados en este trabajo, a Rogelio Martínez por su ayuda durante la realización de los cultivos celulares y a Agustín Mayo Iscar por su ayuda con el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

En último lugar, y no por ello el menos importante, tengo que darle las gracias por su apoyo a la persona con la que comparto mi vida, David.

LISTADO DE ABREVIATURAS

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta/Transforming growth factor beta.

TGF β 1: Factor de crecimiento transformante beta-1/Transforming growth factor beta-1.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico/Fibroblast growth factor.

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico/ Basic fibroblast growth factor.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas/Platelet derived growth factor.

PDGF-BB: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma-BB/Platelet derived growth factor isoform-BB.

GFs: Factores de crecimiento/Growth factors.

BrdU: 5-bromo-2-deoxiuridina/ 5-bromo-2-deoxyuridine.

D: Dioptría/Diopter.

PGs: Proteoglucanos/Proteoglycans.

ECM: Matriz extracelular/Extracellular matrix.

CKs: Citoquinas/Cytokins.

kDa: kilo-Daltons.

CSF: Factores estimuladores de colonias de células sanguíneas/Colony-stimulating factors.

SCF: Factor de células totipotentes/Stem cell factor.

TNF: Factores de necrosis tumoral/Tumor necrosis factors.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa/Tumor necrosis factor alpha.

TNF- β : Factor de necrosis tumoral beta/Tumor necrosis factor beta.

INF-1: Interferón tipo 1/Interferon type 1.

INF- γ : Interferón gamma/Interferon gamma.

IL-8: Interleuquina 8/Interleukin 8.

IL-1: Interleuquina 1/Interleukin 1.

IL-7: Interleuquina 7/Interleukin 7.

TGF β RI: Receptor I del factor de crecimiento transformante beta/Transforming growth factor beta receptor type I.

TGF β RII: Receptor II del factor de crecimiento transformante beta/ Transforming growth factor beta receptor type II.

LAP: Péptido de latencia asociado/Latency associated peptide.

TGFβ3: Factor de crecimiento transformante beta 3/Transforming growth factor beta 3.

PDGF-AA: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma-AA/Platelet derived growth factor isoform-AA.

PDGF-AB: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma-AB/Platelet derived growth factor isoform-AB.

PDGFR-αβ: Receptor alfa beta del factor de crecimiento derivado de las plaquetas/Platelet derived growth factor receptor type alpha beta.

PDGFRβ: Receptor beta del factor de crecimiento derivado de las plaquetas/ Platelet derived growth factor receptor type beta.

PDGFRα: Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de las plaquetas/ Platelet derived growth factor receptor type alpha.

FGFR2: Receptor 2 del factor de crecimiento fibroblástico/Fibroblast growth factor receptor type 2.

RTKs: Receptores tirosina kinasa/ Tyrosine kinase receptors.

SPHK: Esfingosina kinasa/Sphingosine kinase.

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos/Keratinocyte growth factor.

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos/Hepatocyte growth factor.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico/Epidermal growth factor.

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina/Insulin like growth factor.

α-SMA: Actina alfa de músculo liso/Alpha Smooth muscle actin.

NGF: Factor de crecimiento nervioso/Nerve growth factor.

SFM: Medio libre de suero/Serum free médium.

FBS: Suero bovino fetal/Fetal bovine serum.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos/Phosphate buffered saline.

TBS: Solución amortiguadora tris/Tris-buffered saline.

W: Herida/wound.

WE: Márgenes de la herida/wound edges.

C: Resto del cultivo/culture.

B+: Células BrdU positivas.

siRNA: ARN pequeño de interferencia o silenciamiento/Small interfering RNA.

RESUMEN

MODELO "IN VITRO" DE CICATRIZACIÓN DEL ESTROMA CORNEAL HUMANO.

Introducción. Durante el proceso de cicatrización, se ponen en marcha muchos sistemas de señalización. El factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF β 1), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma-BB (PDGF-BB) pueden activar a los queratocitos in vitro para proliferar, diferenciarse y migrar de forma similar a la respuesta que se produce en los queratocitos in vivo en respuesta a un daño.

Objetivo. El objetivo de este trabajo fue determinar cómo los diferentes factores de crecimiento (GFs) estudiados actúan durante el proceso de reparación estromal in vitro.

Métodos. Se evaluó el efecto del TGF β 1, del bFGF y del PDGF-BB sobre la proliferación, migración y diferenciación celular en cultivos de queratocitos humanos. Se estudió el proceso de proliferación general y la actividad metabólica en respuesta a cada GF mediante dos ensayos colorimétricos (CY QUANT NF y WST-1 respectivamente) en los cultivos con y sin herida. En otros cultivos a los que se realizó el mismo tipo de herida, el medio fue suplementado además de con cada GF, con 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) como marcador de proliferación celular. Estos cultivos se fijaron después de diferentes tiempos y sobre las placas fijadas se estudiaron los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular en tres áreas diferentes del cultivo (la herida, los márgenes de la herida y el resto del cultivo) mediante diferentes técnicas inmunocitoquímicas.

Resultados. El PDGF-BB estimuló los niveles más altos de proliferación celular y actividad metabólica y la herida se cerró 10 días después de realizarla. Con este GF el número más alto de células BrdU positivas se observó a los 4 días en las tres zonas de la herida, desde este momento el número de células BrdU positivas comenzó a disminuir. Con TGF β 1 y bFGF se observó un efecto similar sobre la proliferación, sin embargo, el tiempo de cierre fue diferente. Con ambos GF, la proliferación fue lenta y gradual y el mayor número de células BrdU positivas se observó en los márgenes y en la herida. Con PDGF-BB y bFGF el cierre tuvo lugar a la vez (10 días), sin embargo, con el TGF β 1 no tuvo lugar. Tanto el PDGF-BB como el bFGF estimularon la diferenciación hacia fenotipo fibroblástico mientras que el TGF β 1 estimuló la diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico.

Conclusiones. Cada GF actuó de diferente manera sobre los procesos de proliferación, migración y diferenciación durante el proceso de cierre de la herida. Desequilibrios de los GFs durante el proceso de cicatrización pueden dar lugar a diferentes patologías oculares, por ello, aumentar el conocimiento sobre sus diferentes funciones y formas de actuación hace que puedan ser empleados como terapia oftalmológica a través de su aplicación exógena o inhibiendo de forma selectiva su producción y liberación. También pueden ser utilizados para provocar respuestas específicas a materiales oftálmicos.

ABSTRACT

"IN VITRO" MODEL OF HUMAN CORNEAL STROMAL WOUND HEALING.

Introduction. In wound healing many factors signaling systems take place. Transforming growth factor beta-1 (TGF β 1), basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) can activate keratocytes *in vitro* to proliferate, differentiate and migrate in the same way that keratocytes response to injury *in vivo*.

Purpose. The aim of this work was to determine how different growth factors (GFs) separately act during corneal stromal wound repair *in vitro*.

Methods. The effect of TGF β 1, bFGF and PDGF-BB on proliferation, migration and differentiation was evaluated in human corneal keratocyte cultures. We tested the general proliferation process and the metabolic activity in response to each GF by two different colorimetric assays (CY QUANT NF and WST-1 respectively) in the cultures with and without wound. After, the same type of wound was performed in other cultures supplemented with each GF and 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) as a cell proliferation marker. These cultures were fixed after different time points and then we studied the proliferation process, migration and differentiation in three different areas (wound, wound edges and the rest of the culture) with immunocytochemistry techniques.

Results. PDGF-BB stimulated the highest level of proliferation and metabolic activity, and the wound closure took place 10 days after making wound. With this factor the highest number of BrdU positive cells was observed in the 3 areas of the study 4 days after making wound, after that, the number decreased. TGF β 1 and bFGF had similar effects on proliferation but the closure time was very different. With both factors the proliferation process was slow and gradual. The highest number of BrdU positive cells was observed in the wound edges and in the wound. With PDGF-BB and bFGF the wound closure took place at the same time (10 days), on the contrary, with TGF β 1 the wound did not close. PDGF-BB and bFGF stimulated fibroblastic phenotype; in contrast, TGF β 1 stimulated myofibroblast phenotype.

Conclusions. Each GF acted in different way on proliferation, differentiation and migration processes during the wound closure. Imbalances may lead to deficient wound healing and various ocular pathologies. For this reason, increase the knowledge about their different functions makes that GFs may be targeted in therapeutic ophthalmic applications, through exogenous application or selective inhibition, and may be used to elicit specific cellular responses to ophthalmic materials.

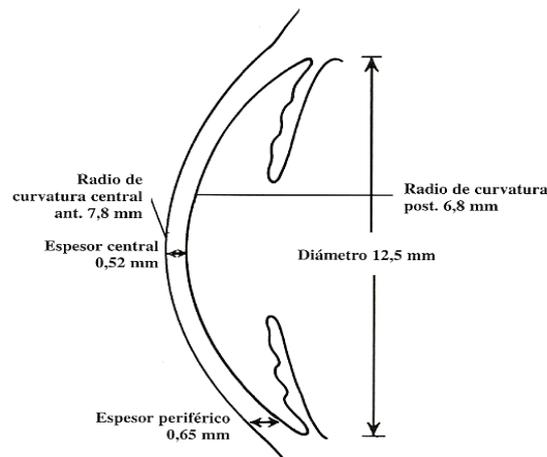
INTRODUCCIÓN

LA CÓRNEA

La córnea es la superficie transparente 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).

Es una estructura altamente especializada, y para el desarrollo de su función ha de mantenerse transparente. La cornea es uno de los pocos tejidos del cuerpo que carece de vasos sanguíneos, pero sí está inervado (nervios sin vainas de mielina). Todo esto junto con la configuración característica de las fibras de colágeno del estroma confieren a la cornea su característica principal, la transparencia.

Tiene forma de casquete esférico, algo elíptica anteriormente, con un diámetro medio de 11,5 mm. Su espesor central es de 0,5 mm y el periférico de 0,65 mm. El radio de curvatura anterior es de 7,84 mm y el posterior es de 6,8 mm. 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.

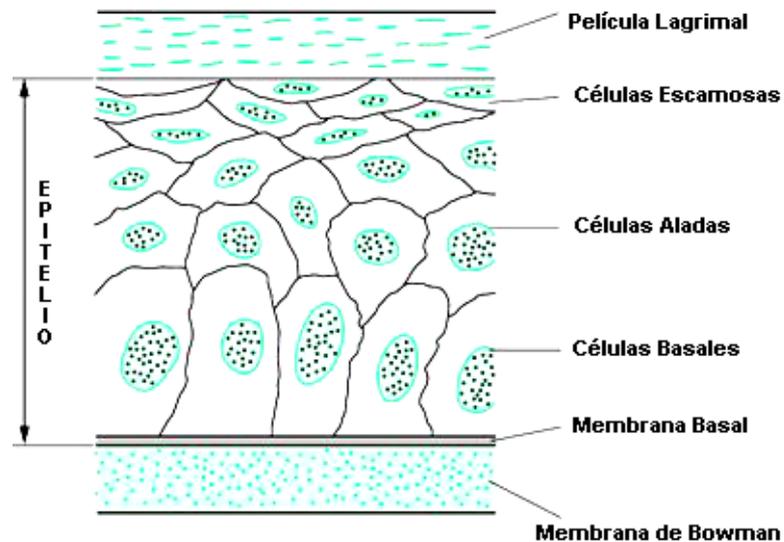


Está formada por tres capas celulares y dos membranas o capas acelulares:

Capas celulares:

El epitelio (capa externa): formado por células epiteliales en constante renovación, que se diferencian para formar un epitelio poliestratificado no queratinizado con gran potencial regenerativo. Sus células expresan mucinas que interaccionan con la película lagrimal estableciendo una superficie óptica lisa. En humanos presenta un grosor de 5-7 células y está formado por tres tipos celulares; sobre la membrana basal se sitúa una capa única de células basales cuboideas con capacidad de mitosis. A medida que tiene lugar la división celular las células hijas se desplazan hacia la superficie y comienzan a diferenciarse formando entre una y tres capas de células aladas. Las células superficiales son escamosas y forman una capa de tres a cuatro células de grosor. Al final estas células degeneran y se desprenden de la superficie corneal en un proceso que da lugar al recambio de todo el epitelio cada 7 días [1]. Las células basales se originan a partir de las células madre localizadas en la

capa basal del epitelio del limbo, situado en la periferia de la córnea. Las células basales descansan sobre una membrana basal que presenta un grosor de 40-60 nm. Está formada sobre todo por colágeno tipo IV y VII, laminina, fibronectina y perlecán.



El estroma (capa media): Constituye el 90% del espesor corneal [2] y está formado por un 78% de agua y un 22% de fibras de colágeno (80%), sustancia fundamental (15% proteoglucanos, PGs) y elementos celulares (5%).

Es predominantemente una matriz extracelular (ECM) constituida por fibrillas de colágeno con disposición laminar y dispuestas en paralelo a la superficie corneal, de manera que las fibrillas individuales de colágeno están separadas por una matriz de PGs [3]. La distribución uniforme de las fibrillas y el espaciado existente entre las mismas aportan transparencia corneal.

Embebidos en esta matriz se encuentran los queratocitos, células derivadas de la cresta neural que elaboran y mantienen las fibrillas de colágeno y la ECM. Estas células constituyen un porcentaje muy bajo del volumen del estroma. Se caracterizan por tener morfología dendrítica y establecer un entramado tridimensional contactando unas células con otras por sus amplios procesos. Estas células se caracterizan también por tener en su citoplasma altos niveles de cristalinas aldehído deshidrogenasas y transcetolasas (proteínas que aportan transparencia celular).

Durante el desarrollo de la córnea o cuando son estimulados tras un daño proliferan y son biosintéticamente activos pudiéndose diferenciar hacia miofibroblastos durante el proceso de curación [4], pero en córneas adultas se consideran quiescentes.

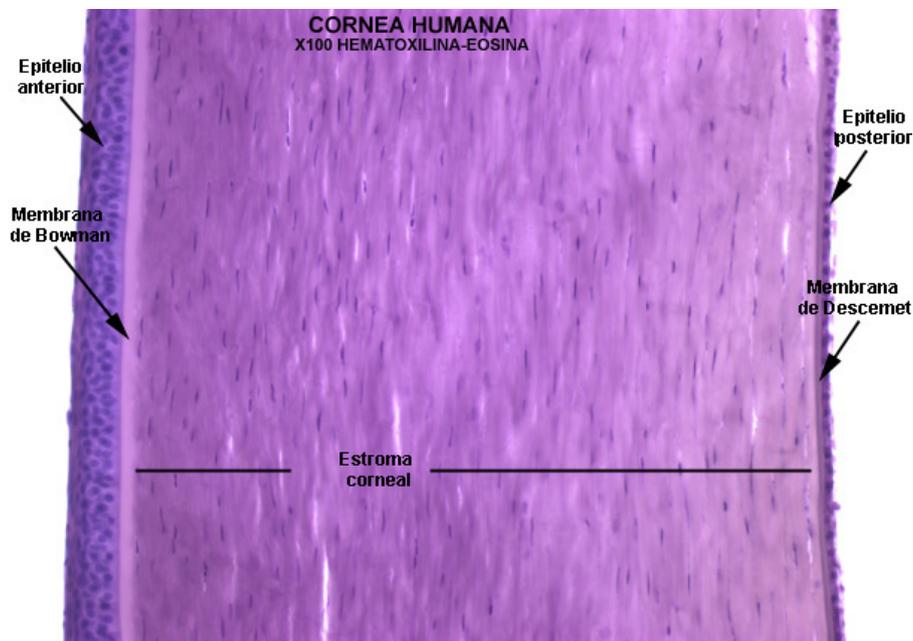
Las fibras de colágeno están constituidas sobre todo por colágeno tipo I y por colágeno de tipos V y VI, aunque en menor cantidad [5]. El material extrafibrilar o sustancia fundamental del estroma, está constituido principalmente por PGs ricos en leucina. Los PGs se han denominado según sus proteínas centrales, que en la córnea son decorina, lumicano, queratocano y miECMano. La sulfatación de las cadenas laterales de los PGs en la córnea incrementa las propiedades de retención de agua lo que influye en la hidratación del estroma y, por tanto, en la transparencia corneal.

El endotelio (capa interna o epitelio posterior): es una monocapa de células hexagonales cuboidales sin capacidad de regeneración. Estas células son esenciales para el mantenimiento de la transparencia corneal ya que constituyen un sistema activo y dinámico de hidratación del estroma desde el humor acuoso. En general, la densidad celular del endotelio disminuye con la edad. Cuando se pierde alguna célula endotelial las células próximas se hipertrofian.

Capas acelulares:

Membrana de Bowman: localizada entre el epitelio y el estroma. En los mamíferos sólo existe en los primates. En el ser humano tiene un espesor de 12µm aproximadamente. Está formada por fibrillas de colágeno, principalmente tipo I, dispuestas de manera aleatoria. 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 regeneradora.

Membrana de Descemet: es la membrana basal sobre la que descansa el endotelio. En el ojo adulto tiene un grosor de 10-15 µm. Es secretada por las propias células endoteliales y sus componentes son colágeno tipo IV, laminina y fibronectina. Se cree que esta capa actúa en la adhesión de las células endoteliales a la membrana [6, 7].



La capacidad de la córnea de ser transparente puede verse comprometida cuando sufre un trauma, una infección o una inflamación crónica. Cuando se produce un daño, los queratocitos dañados y los que flanquean la herida sufren apoptosis, y algunos de los que quedan van a ser

estimulados perdiendo la quiescencia y adquiriendo fenotipos "activos" (fibroblastos o miofibroblastos), esto les permite proliferar dando lugar a la aparición de zonas de hiper celularidad donde se va a producir nueva matriz necesaria para reparar la herida. Estos fenotipos divergentes pueden ayudar en la regeneración de una matriz estromal normal o dar lugar a cicatrices por permanencia de la hiper celularidad o por la producción de una matriz desorganizada. La alteración de la proporción de los tipos de colágeno y PGs en la ECM o la pérdida de las cristalinas de los queratocitos causa opacidad.

La integridad de la superficie ocular y el proceso de curación de heridas corneales dependen de un delicado balance entre procesos celulares de proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. Existe una gran variedad de citoquinas (CKs) que regulan estas funciones celulares y que son producidas por las células epiteliales, estromales y/o endoteliales. Estas CKs juegan un papel vital en el mantenimiento de la función corneal.

CITOQUINAS:

Las citoquinas o citocinas son un grupo de proteínas o glucoproteínas secretadas, de bajo peso molecular (por lo general menos de 30 kDa). Son producidas por diferentes tipos celulares tanto pertenecientes al sistema inmune (ej: macrófagos y linfocitos T) como no pertenecientes al mismo (ej: fibroblastos y células endoteliales).

Estas proteínas ejercen su acción de forma autocrina o paracrina produciendo efectos muy variables que comprenden: la modulación de la respuesta inmune, el crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas, la regeneración tisular y la angiogénesis, entre otras. Durante la activación celular que sigue como respuesta a un estímulo, se producen 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 CKs 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.

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:

1. **Factores de crecimiento (GFs).** Los GFs 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. La misión de estas moléculas no constituye solo la promoción del crecimiento celular sino que poseen otras acciones importantes como el mantenimiento de la supervivencia celular, el inicio de la multiplicación, la estimulación de la migración y producción de cambios fenotípicos que influyen en la invasión celular o en los procesos de apoptosis.

Los GFs actúan a muy baja concentración (pico gramo). Todos poseen receptores en las células que permiten que se transduzcan señales a su interior, estos receptores son tirosin-quinazas o serina/treonina-quinazas. Al ser estimulados se fosforilan y activan

una cascada de señales que finaliza con la activación de un conjunto de genes.

Ejemplos:

- El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).
 - El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).
 - El factor de crecimiento fibroblástico (FGF).
2. **Factores estimuladores de colonias de células sanguíneas (CSF).** Estimulan la proliferación y diferenciación de células progenitoras de la médula. Dependiendo del factor, estimulan distintos tipos de células desde la célula multipotencial que origina todos los tipos de células sanguíneas, hasta las que dan lugar a un solo tipo. Ejemplos:
- Factor de células totipotenciales (SCF)
 - Eritropoyetina
3. **Factores de necrosis tumoral (TNF).** Son mediadores de la inflamación local producidos principalmente por macrófagos activados que actúan reclutando neutrófilos y monocitos hacia los sitios de infección. Estimulan la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y también la secreción de quimioquinas por macrófagos y células endoteliales. Promueven la muerte celular por apoptosis de ciertas células. Inducen la fiebre, la síntesis de proteínas de la fase aguda por el hígado y la caquexia. Ejemplos:
- Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)
 - Factor de necrosis tumoral beta (TNF- β o linfotoxina)
4. **Interferones.** Refuerzan la capacidad del organismo para responder a los agentes infecciosos facilitando o inhibiendo la actividad de muchos componentes del sistema inmunitario. Promueven o impiden la diferenciación de ciertas células. Pueden inhibir la mitosis ejerciendo una función antitumoral. Ejemplos:
- Interferón tipo 1 (IFN-1)
 - Interferon gamma (INF- γ)
5. **Quimioquinas.** Estimulan la quimiotaxis, adhesión y activación de los leucocitos durante las reacciones inflamatorias. Ejemplos:
- Interleuquina 8 (IL-8)
 - Eotaxina
6. **Interleuquinas.** Es el nombre genérico que reciben las citoquinas producidas por los leucocitos. Las interleuquinas estimulan la proliferación celular y diversas acciones específicas de las células linfoides y de otras células relacionadas con la respuesta

inmunitaria. Esta acción también la ejercen sobre células hematopoyéticas y de otros muchos tejidos, como el conjuntivo. Ejemplos:

- Interleuquina 1 (IL-1)
- Interleuquina 7 (IL-7)

FACTORES DE CRECIMIENTO (GFs)

Entender la producción y función de determinadas CKs en tejidos oculares como la córnea, contribuye a mejorar el mantenimiento y la modulación del proceso de cicatrización, en el cual dichas citoquinas juegan un importante papel dirigiendo el comportamiento celular. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), entre otros, se han localizado tanto en la lágrima como en las diferentes capas de la córnea. Estos activan a los queratocitos para que inicien procesos de proliferación, migración y/o diferenciación durante el proceso de cicatrización en respuesta a un daño.

- **TGF- β**

El TGF- β se ha establecido como uno de los GFs más importantes durante el proceso de cicatrización en la mayoría de las especies y tejidos, incluyendo la córnea [8, 9]. Está implicado en procesos de proliferación [10], diferenciación [11] y producción de ECM [12]. 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 [13, 14].

El TGF β es secretado generalmente asociado con un péptido de latencia (LAP) que hace que secrete como un complejo inactivo que se une con alta afinidad a la ECM creando reservorios de TGF β en forma latente [15]. La activación del GF ocurre a través de disociaciones proteolíticas del complejo mediante uniones enzimáticas extracelulares o a la membrana celular [16].

Dentro de la familia del TGF β hay 3 isoformas (TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3) que se expresan en los mamíferos tanto en la lágrima como en la córnea. Las tres isoformas se expresan durante el proceso de cicatrización, sin embargo, tienen diferentes funciones. Tanto el TGF β 1 como el TGF β 2 se localizan en el epitelio y en el estroma y ambos son constituyentes de la lágrima [17]. Contribuyen al reclutamiento 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 ECM) 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 importante [13]. 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 en la córnea, jugando un importante papel durante el proceso de cicatrización [17]. 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 [18]. El TGF β 3 no está implicado ni en la fase temprana de reclutamiento celular estromal ni en la fase tardía temporal de fibrosis subepitelial.

Como el TGF β 1 tiene un papel importante durante el proceso de cicatrización en respuesta a un daño, y es el principal causante de fibrosis, fue elegido como uno de los GF utilizados en este trabajo. Este GF inhibe el crecimiento de células epiteliales (retrasando el proceso de re-epitelización), endoteliales y leucocitos y estimula la proliferación de queratocitos [19]. También potencia la repoblación del área cercana a la herida y promueve la transformación de los queratocitos en miofibroblastos. Es 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 [8, 20]. Los receptores se localizan en el estroma y en el epitelio [21]. Este GF se ha detectado en bajas cantidades en los tres tipos principales de células corneales [16, 22]. Induce proliferación, migración de fibroblastos estromales [23] y alteración de la síntesis de ECM que modula la respuesta al factor después de un daño. Su actividad es mediada por proteínas smad.

- **PDGF**

El PDGF es un dímero formado por dos cadenas, A y B. Existen 3 isómeros: PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB [16]. Sus receptores se encuentran tanto en forma heterodimérica (PDGFR- $\alpha\beta$) como monomérica (PDGFR α y PDGFR β). Los receptores se localizan en fibroblastos corneales [21] y en células endoteliales [16]. El PDGF-BB es producido únicamente por el epitelio donde se acumula y se une en altos niveles a la membrana basal [24]. Este GF potencia la migración de los fibroblastos, y media la respuesta proliferativa de los fibroblastos al TGF- β [25]. A su vez, el TGF- β regula el crecimiento en tejidos a través del PDGF y de la expresión de su receptor, PDGFR β , en queratocitos mediante un mecanismo aún desconocido. En otros tejidos conectivos, bajos niveles de TGF- β promueven la producción de PDGF (y potencian la proliferación) mientras que altos niveles hacen que disminuya la expresión del receptor PDGFR β [25]. Debido a sus efectos sobre los queratocitos en respuesta a un daño y a la presencia de su receptor en los mismos, el PDGF-BB fue elegido para ser usado en nuestro estudio.

Su actividad es mediada por un mensajero lipídico, la esfingosina kinasa (SPHK).

- **FGF**

La familia del FGF 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 ECM y angiogénesis a través de varias vías de señalización [19, 26]. Su actividad está mediada por la unión a PGs de heparán sulfato con baja afinidad que los protegen de la degradación y favorecen la unión a receptores de la superficie celular RTKs (receptores tirosina kinasa) con alta afinidad [19].

El FGFb (también denominado FGF2) y su receptor (FGFR2 también denominado bek) se expresan en los tres principales tipos celulares corneales [22, 27] aunque la expresión del receptor es mayor en los fibroblastos estromales y la de la proteína es mayor en células epiteliales. Este GF tiene efecto mitogénico en células epiteliales, endoteliales y estromales. La adición de FGFb 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 FGF mediante interacciones con PGs [19]. Debido a la actividad que ejerce este GF sobre la proliferación celular, fue elegido también para ser usado en este estudio.

PROCESO DE CICATRIZACIÓN CORNEAL

La respuesta de cicatrización de una herida corneal es una cascada muy compleja que engloba interacciones mediadas por citoquinas entre células epiteliales, queratocitos del estroma, nervios corneales, glándulas lacrimales, 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...).

Un daño en la córnea va a dar lugar a una cascada de procesos cuyo fin es la curación del daño producido y la restauración de la visión. Esto requiere que tengan lugar procesos de apoptosis, proliferación, migración, diferenciación y comunicación intercelular. Las CKs presentes tanto en la córnea como en la lágrima, son importantes reguladoras de los procesos anteriormente citados. La actuación de estas CKs va a tener lugar de forma secuencial y ordenada durante el proceso de cicatrización.

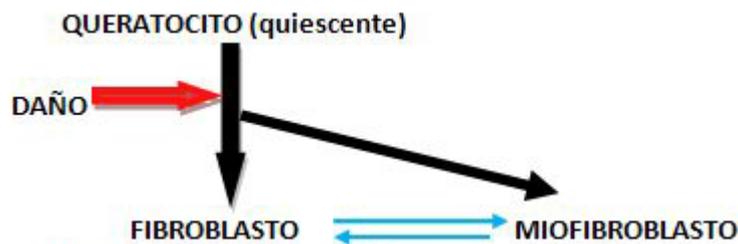
Los primeros minutos después de que se haya producido el daño se van a secretar CKs como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) por las células epiteliales dañadas y se cree que estas CKs van a dar lugar a la apoptosis de las células del estroma (primera respuesta detectable en el estroma durante proceso de cicatrización) [24, 28]. La IL-1 es un regulador del proceso de cicatrización que incrementa la expresión de GFs tanto en el epitelio como en el estroma [24]. 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 células epiteliales [29]. La liberación de PDGF-BB desde la membrana basal de las células epiteliales promueve la quimiotaxis de los fibroblastos [24] y potencia la expresión de KGF y HGF estimulando el crecimiento epitelial [21]. Las células epiteliales liberan 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 GFs sobre las células epiteliales y además, media la migración de los fibroblastos [30, 31]. 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 factores. La curación del epitelio mediada por estos factores comienza horas después del daño para restaurar su función de barrera. 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 [32], inducidas por HGF [21] y EGF [22, 32] sobre una matriz provisional de fibronectina que se acumula en la zona de la herida [33]. La fibronectina no está presente en la membrana basal de células epiteliales normales, pero se detecta durante las primeras 8 horas después de producirse la lesión [34]. Se cree que existe una producción endógena de fibronectina que es

sintetizada por células epiteliales para promover la adhesión [35]. Una vez que es alcanzada la confluencia, las células proliferan y finalmente se diferencian para formar un epitelio normal estratificado [22, 32]; la matriz de fibronectina desaparece y la composición de la membrana basal normal formada por colágeno y laminina es restaurada [32].

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 de las células epiteliales [21, 36].

Tras la apoptosis causada por la herida, comienza la proliferación de los queratocitos entre las 48 y 72 primeras horas [37] y continua durante varios días después del daño [24]. La liberación de PDGF-BB y TGF- β 1 desde el epitelio hacia el estroma incrementa la proliferación y la migración [11, 24]. Los GFs PDGF-BB, EGF e IGF parecen jugar un papel importante inhibiendo la apoptosis de los fibroblastos que ha sido iniciada previamente como respuesta al daño [38, 39]. En respuesta a la IL-1, los queratocitos se vuelven competentes para la producción de IL-1 y entran en circuitos de auto-renovación modulando la producción de GFs, la cicatrización epitelial y la remodelación de la matriz [11, 28]. Los queratocitos quiescentes son activados como respuesta al daño y se diferencian en fibroblastos con capacidad migratoria y miofibroblastos, los cuales se caracterizan por la expresión de actina- α de músculo liso (α -SMA) y por la producción elevada de HGF, KGF, heparan y keratan sulfato, colágeno y metaloproteinasas de matriz para la remodelación del estroma [24, 40].

La diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico es inducida a baja densidad por presencia de TGF- β [40] y también se ha demostrado la necesidad de PDGF que actúe de forma sinérgica [25]. Con el tiempo los fibroblastos se vuelven quiescentes y algunos miofibroblastos permanecen después del proceso de cicatrización [40, 41]; Actualmente no se conoce si los miofibroblastos entran en apoptosis o reversion al fenotipo propio de los queratocitos [40].



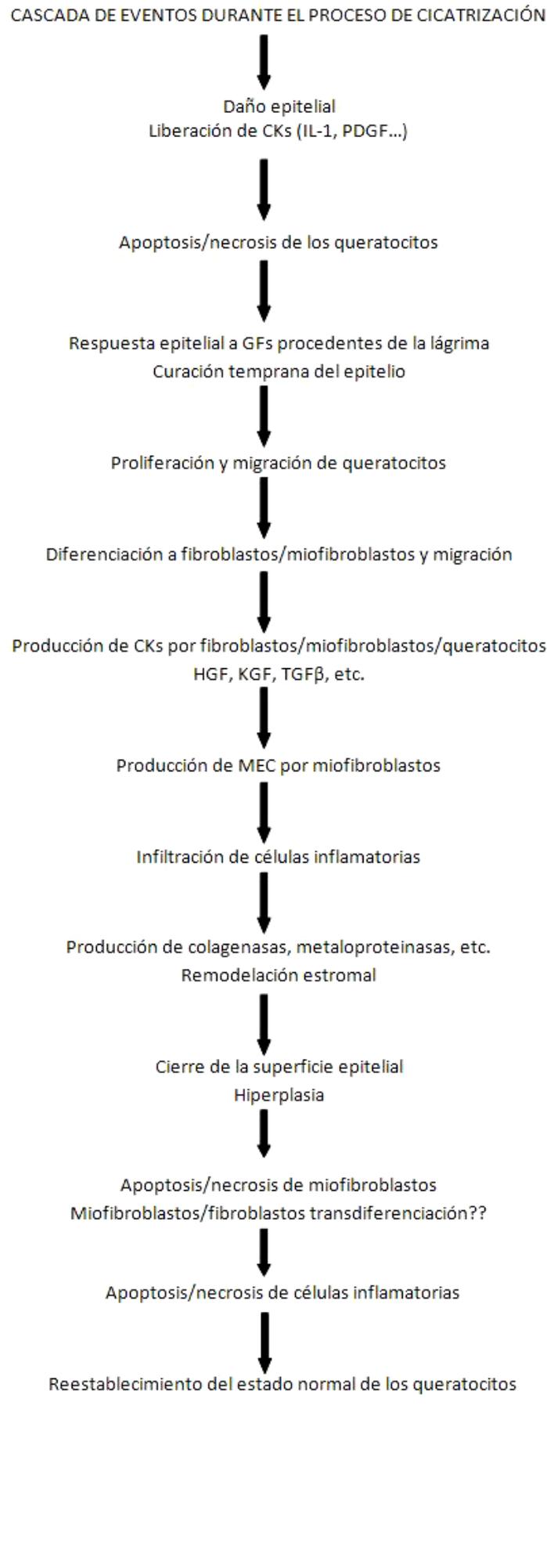
Diferentes estudios han mostrado que el bFGF puede inducir a los miofibroblastos a convertirse en fibroblastos en cultivo pero la respuesta no está probada in vivo [40]. Además, mientras que inicialmente es observado un incremento significativo de uniones de TGF- β en el margen de la herida, se ha observado que el bFGF modula respuestas más tardías durante el cierre de la herida, y la presencia de bFGF inhibe la expresión de TGF- β 1 [19], esto está indicando que existe una regulación temporal de ambos factores que controlan la diferenciación de las células estromales durante la cicatrización corneal.

Durante las primeras 12-24h, existe una entrada de células inflamatorias dentro de la córnea desde los vasos del limbo y de la lágrima. Las CKs 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 TGF- β 1 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. La función de las células inflamatorias elimina los restos de apoptosis y libera PDGF-BB que media en el proceso de cicatrización.

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 se restaura la quiescencia de las células estromales. La expresión de GFs y de sus receptores vuelve a su estado basal. La remodelación de la matriz de colágeno del estroma también tiene lugar, se elimina el tejido cicatricial y el epitelio recupera su espesor normal.

Durante el proceso de cierre de la herida, la aplicación de cada factor de crecimiento de forma individual va a favorecer bien procesos de proliferación, de migración o de diferenciación celular en momentos determinados del proceso de cierre. Conocer cómo la aplicación en un determinado momento, de cada factor de crecimiento afecta al proceso de cicatrización es una importante herramienta a la hora de tratar diferentes tipos de heridas corneales.



HIPÓTESIS

La aplicación de factores de crecimiento de forma individual, sobre los queratocitos después de realizar una herida que mimetice un daño estromal, va a favorecer de forma diferente cada uno de los procesos de cicatrización: proliferación, migración y diferenciación celular.

OBJETIVOS

1. Determinar cómo afecta cada factor de crecimiento al proceso de cierre de la herida.
2. Estudiar la influencia de cada factor de crecimiento sobre la actividad metabólica y sobre la proliferación celular y su localización en el cultivo durante el proceso de cierre de la herida.
3. Estudiar los cambios fenotípicos inducidos en las células con cada factor de crecimiento durante el cierre de la herida.
4. Estudiar la secuencia cronológica de actuación de dichos factores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

Para la obtención de queratocitos se emplearon anillos corneales humanos obtenidos del Banco de Ojos del Principado de Asturias (Oviedo, España). Después de eliminar el endotelio y el epitelio bajo el microscopio de disección con una legra, los queratocitos fueron liberados del estroma usando colagenasa tipo II (GIBCO, Carlsband, CA) durante 3 horas a 37°C. El medio de cultivo utilizado para la extracción celular fue Eagle modificado por Dubelcco y una mezcla de nutrientes Ham más F12 (DMEM-F12, GIBCO, Carlsband, CA) suplementado con suero bovino fetal (FBS, Sigma, St. Louis, MO) al 10% y solución de antibióticos-antimicóticos (Sigma, St. Louis, MO) al 1%. Las células obtenidas fueron sembradas a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células por placa en placas de 35 mm. Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. El medio de cultivo fue cambiado cada 2 días hasta que se alcanzó la confluencia del cultivo. Los fibroblastos corneales se mantuvieron en cultivo hasta el pase 7 (P7) en el cual se obtuvo el número necesario de células para comenzar con los experimentos. Los pases se realizaron mediante tripsinización (Trypsin from bovine pancreas, Sigma, St. Louis, MO).

Inducción de quiescencia y realización de las heridas

El estado de quiescencia fue inducido en los fibroblastos en P7 reemplazando el medio DMEM-F12 suplementado con FBS por DMEM-F12 sin FBS (SFM), tres días después de la realización del P7. Dependiendo del experimento que se fuera a realizar, los fibroblastos en P7 se sembraron a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células por placa (en placas de 35 mm) o a $3 \cdot 10^3$ células por pocillo (en placas de 96 pocillos). Los fibroblastos entraron en quiescencia tres días después de la retirada del FBS del medio transformándose en queratocitos. Tras la entrada en quiescencia, se procedió a la realización de la herida con una punta de 10 µl en el centro de la placa o del pocillo para poder seguir el tiempo de cierre tras añadir diferentes factores de crecimiento al medio y observar sus efectos durante el proceso de cierre.

Factores de crecimiento

Después de la realización de las heridas, para observar la respuesta a los factores de crecimiento, el medio de cultivo DMEM-F12 fue suplementado con diferentes factores de crecimiento obteniendo diferentes medios como se describe a continuación:

- DMEM-F12= **SFM** (control)
- DMEM-F12+ FBS al 10%= **FBS**
- DMEM-F12+ 10 ng/ml del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ = **TGF β 1**
- DMEM-F12+ 10 ng/ml del factor de crecimiento fibroblástico básico= **bFGF**
- DMEM-F12+ 20 ng/ml del factor de crecimiento derivado de las plaquetas= **PDGF-BB**

Todos los factores de crecimiento fueron obtenidos de GIBCO, Carlsband, CA. Las concentraciones de los factores de crecimiento fueron determinadas previamente mediante experimentos de dosis-respuesta utilizando el Kit Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, España) y siguiendo las instrucciones aportadas con el kit. Este ensayo está basado en la bioreducción de las sales de tetrazolio 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 en un lector de absorbancia Sunrise RC Básico para microplacas (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).

Las concentraciones utilizadas para los experimentos fueron las más bajas que daban lugar a una respuesta máxima no tóxica.

Proliferación celular

Para determinar el efecto de los diferentes factores de crecimiento sobre la proliferación de los queratocitos durante el cierre de la herida se empleó el kit de proliferación celular CY QUANT NF (Invitrogen). Este kit se basa en la medición del contenido de DNA celular mediante la unión de un colorante fluorescente. El contenido en DNA se mide mediante la lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector de absorbancia Sunrise RC Básico para microplacas (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) siguiendo las instrucciones aportadas con el kit. El contenido en DNA se midió en 50 pocillos (10 pocillos por cada factor de crecimiento, 5 con herida y 5 sin herida) 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.

Actividad metabólica

Los cambios en la actividad metabólica inducidos por cada factor de crecimiento fueron seguidos durante los diferentes tiempos del cierre de la herida (1, 4, y 7 días) estudiados. Para la obtención de datos de la actividad metabólica se empleó el Kit WST-1 (Roche, España) utilizado previamente para la obtención de la concentración óptima de cada factor de crecimiento.

Cada medio de cultivo diferente fue añadido a 40 pocillos, 20 con herida y 20 sin herida. Los diferentes medios fueron reemplazados cada 2 días hasta el momento de la lectura de la absorbancia.

Cierre de la herida y proliferación celular en diferentes zonas del cultivo

Para el seguimiento del cierre de la herida y de la proliferación en diferentes zonas del cultivo se usaron queratocitos sembrados en placas de 35 mm. En estos experimentos los diferentes medios de cultivo fueron suplementados además con $2 \cdot 10^{-7}$ M de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU, Sigma, St. Louis, MO) 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 medio de cultivo y tiempo en paraformaldehído tamponado al 4% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M (PBS) durante 30 minutos.

Posteriormente las placas fueron lavadas en tampón tris (TBS). Para bloquear antígenos no específicos se usó suero de cabra (Sigma, St. Louis, MO) en TBS. Después de lavar con TBS, las placas fueron incubadas con IgG anti-BrdU monoclonal de ratón (dilución 1:20 en TBS, Dako, Barcelona, España) durante 24 horas a 4°C. El anticuerpo primario fue detectado con el kit Mouse Extravidin® Peroxidase producido en cabra (Extra2-1KT, Sigma, St. Louis, MO) siguiendo las instrucciones del kit. Se usó 3,3'-Diaminobencidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO) para la localización de la actividad peroxidasa. Las células fueron posteriormente contrateñidas con solución de Giemsa (Giemsa's azur eosin methylene blue solution, Merck Kga, Darmstadt, Alemania). 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 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) para poder medir las dimensiones de la herida durante el cierre y poder contar el número de células BrdU positivas en los diferentes cultivos.

Las dimensiones de la herida fueron obtenidas mediante el programa de ordenador Soft Cell^A Imaging Software for Life Science Microscopy. Las medidas obtenidas en cada placa se usaron para calcular la media de los datos presentados en μm como se muestra en la figura 1.

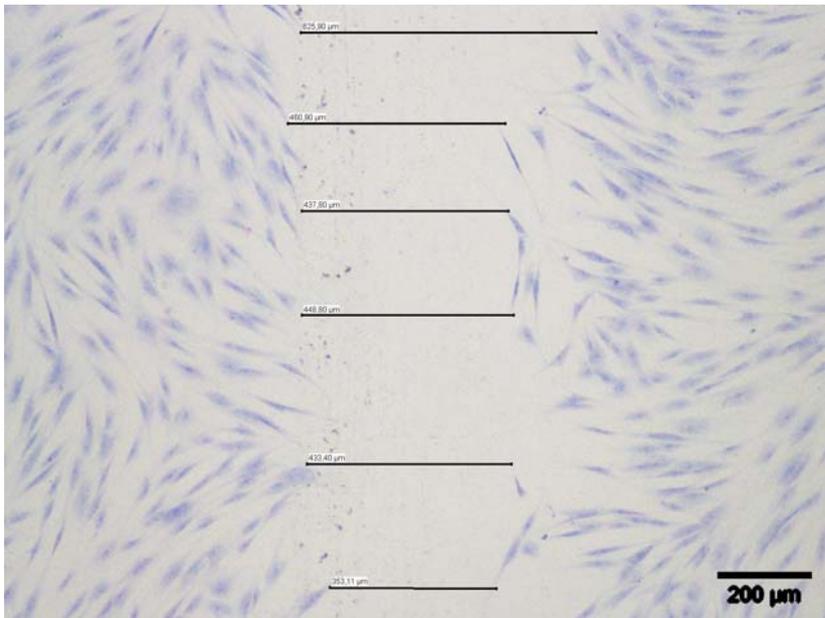


Figura 1.

Las células BrdU positivas fueron contadas a una magnificación de 20x en tres áreas diferentes del cultivo por cada placa como muestra la figura 2: zona de la herida (W), zona de los márgenes de la herida (WE) y resto del cultivo (C). Las medidas obtenidas en cada área fueron empleadas para calcular la media de los datos presentados como células BrdU positivas por cm^2 (Figura 3).

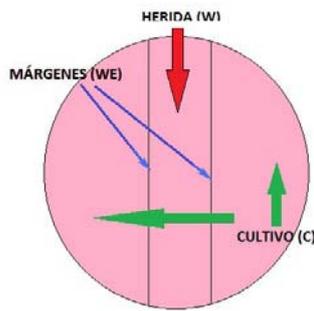


Figura 2.

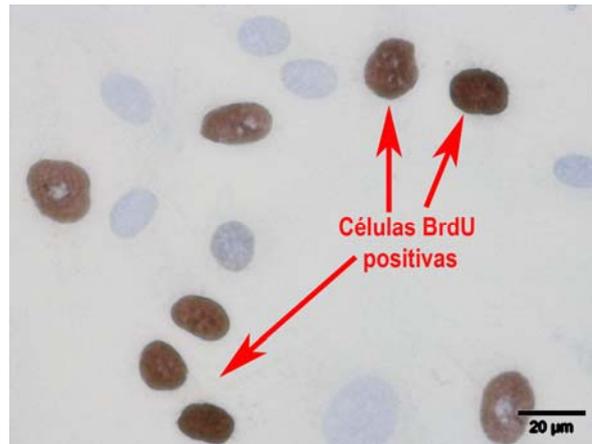


Figura 3.

Diferenciación celular

Para observar los cambios morfológicos inducidos por cada medio de cultivo durante el cierre de la herida, se tomaron fotografías durante los diferentes tiempos de cierre en las placas de 35 mm *in vivo* mediante un microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 con una cámara digital incorporada Nikon DXM1200 (Nikon Instruments, Inc. New York, USA).

Expresión de α -SMA

Para determinar el efecto de los diferentes medios de cultivo sobre la diferenciación de los queratocitos a miofibroblastos se llevó a cabo una técnica inmunocitoquímica para la detección de la expresión de actina- α de músculo liso (α -SMA) característica del fenotipo miofibroblástico. Se emplearon 3 placas de cada tipo de medio que fueron fijadas como previamente se ha descrito para la detección de células BrdU positivas. Las placas fijadas fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti- α actina de músculo liso de humano preparado para su uso directo (Dako, Carpintería, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario Texas red goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Barcelona, España) en dilución 1:200 en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Molecular Probes, Barcelona, España). Las placas fueron examinadas bajo el microscopio de fluorescencia Axiophot (426510-9901-000, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) y las células α -SMA positivas (figura 4) fueron contadas a una magnificación de 40x en tres áreas diferentes del cultivo por cada placa: zona de la herida (W), zona de los márgenes de la herida (WE) y resto del cultivo (C). Las medidas obtenidas en cada área fueron empleadas para calcular la media de los datos presentados como células α -SMA positivas por cm².

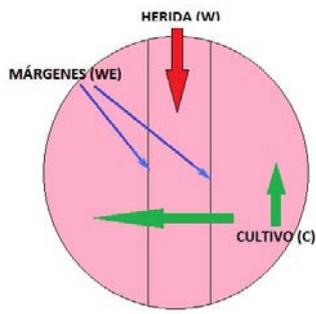


Figura 3.

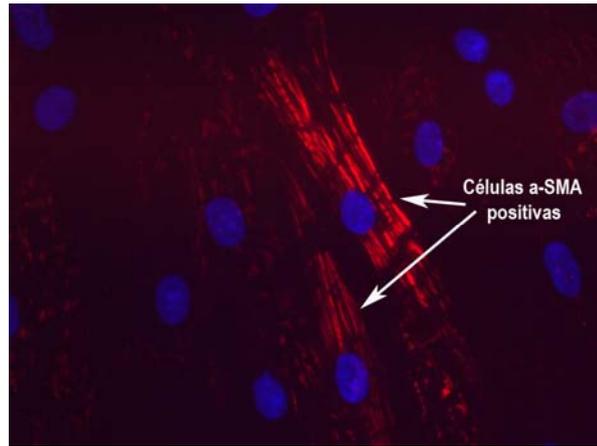


Figura 4.

Análisis estadístico

Se resumieron las variables numéricas con medias y desviaciones típicas.

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.

Se consideraron estadísticamente significativos aquellos p valores menores que 0,05 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Cierre de la herida

Como se puede observar en el gráfico 1, con el medio de cultivo SFM el cierre es lento teniendo lugar 15 días después de realizar la herida. La adición al medio de FBS hace que el cierre se produzca en sólo 4 días. Tanto la adición al medio de bFGF como la de PDGF-BB hacen que el cierre se produzca a los 10 días. La adición de TGFβ1 al medio de cultivo hace que el proceso de cierre sea muy lento y a los 15 días no ha tenido lugar. Si centramos los resultados en el tiempo de estudio correspondiente a 4 días podemos observar como existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en cuanto al tiempo de cierre producido por cada factor de crecimiento, a excepción del bFGF y PDGF-BB, donde no se observaron diferencias ($p = 0.094$), con ambos factores de crecimiento el patrón de cierre fue similar.

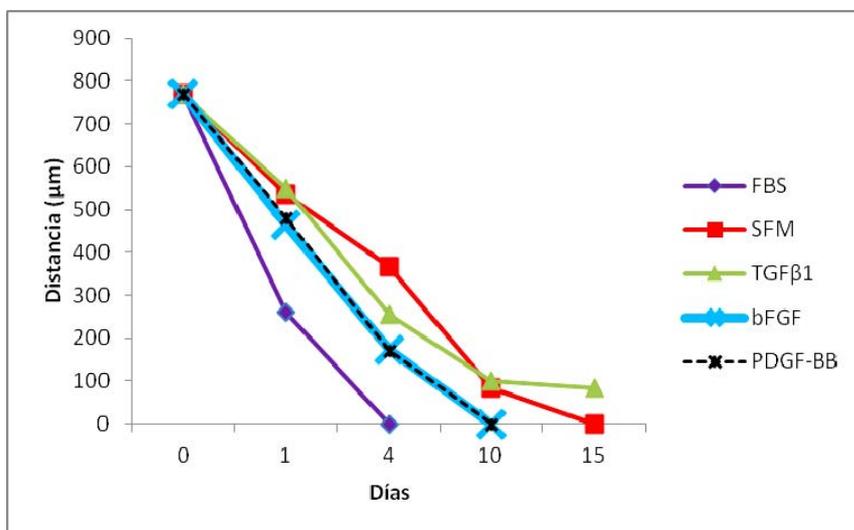


Gráfico 1.

La correspondencia en cuanto a los tiempos de cierre en los pocillos de las placas multipocillos fueron las que se indican en la siguiente tabla:

Medio de cultivo usado	Tiempo de cierre en placa de 35 mm (días)	Tiempo de cierre en pocillo de placa de 96 pocillos (días)
SFM	15	7
FBS	4	1-2
bFGF	10	4
PDGF-BB	10	4
TGFβ1	No cierra	No cierra

Proliferación general

El hecho de realizar herida sólo fue relevante durante las primeras 24 horas donde se observó que la proliferación fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los pocillos en los que no se realizó herida, independientemente del medio de cultivo utilizado. Al trabajar con placas multipocillos de 96 pocillos, el poder de discriminación después de 24 horas es mínimo o nulo, por lo que no se observaron diferencias en cuanto a la proliferación debido a la realización o no de la herida durante los tiempos de 4 y 7 días.

Al tomar los resultados en su conjunto, a las 24 horas el factor que más proliferación indujo fue el PDGF-BB, existiendo diferencias significativas con el resto de factores de crecimiento analizados ($p < 0.05$), como se puede observar en el gráfico 2.

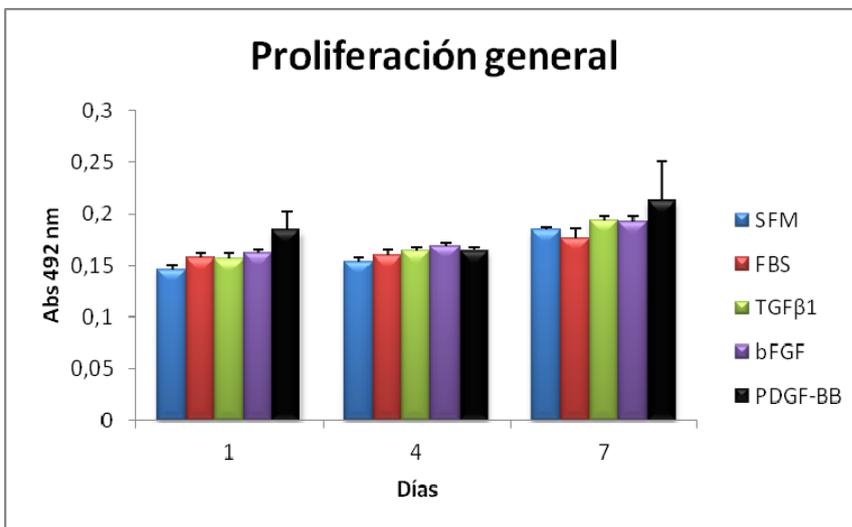


Gráfico 2.

El segundo factor que más proliferación indujo fue el bFGF, siendo menor que la proliferación inducida por el PDGF-BB, pero mayor que la inducida por el SFM (< 0.05) y obteniendo un valor similar que el obtenido por la adición de TGFβ1 y FBS.

A los 4 días, se observó más proliferación en los pocillos tratados con bFGF, pero las diferencias encontradas con la proliferación inducida por PDGF-BB y por TGFβ1 no fueron estadísticamente significativas. Si fueron significativas las diferencias encontradas en cuanto a la proliferación inducida tanto por el SFM como por el FBS, que fue más baja. Este es un resultado esperable en cuanto al comportamiento de las células en presencia de FBS una vez que se ha producido el cierre entre los días 1 y 2.

Siete días después de realizar las heridas, la tasa de proliferación más elevada se observa de nuevo con el PDGF-BB existiendo diferencias significativas con la proliferación inducida por el resto de factores de crecimiento. En el caso de las diferencias encontradas con respecto a la proliferación inducida por TGFβ1, éstas se encontraron en el límite de la significación estadística ($p = 0.05$).

El factor más importante a la hora de inducir la proliferación es el PDGF-BB. El bFGF hace que el aumento de la proliferación sea más lento y gradual, lo mismo ocurre al añadir TGF β 1. Las células en presencia de SFM no experimentan un aumento de la proliferación hasta los 7 días. Un día después de realizar la herida las diferencias encontradas fueron significativas con respecto al resto de medios de cultivo empleados, excepto con el TGF β 1 ($p=0.073$). Cuatro días después, la presencia de SFM sigue dando lugar a la proliferación más baja observada existiendo de nuevo diferencias significativas con el resto de medios a excepción del FBS (en presencia de este medio la herida ya ha cerrado y las células dejan de proliferar). Una semana después de realizar las heridas, únicamente se observan diferencias significativas en cuanto a la proliferación inducida por PDGF-BB.

Las células en presencia de SFM carecen de factores de crecimiento necesarios para que la división celular tenga lugar, por lo que comienzan a dividirse más tarde que el resto.

Si el medio es suplementado con FBS (mezcla de factores de crecimiento), la proliferación celular aumenta 24 horas después de realizar la herida con respecto a la proliferación observada en las células tratadas con SFM ($p<0.05$) pero no aumenta tanto como con PDGF-BB ($p<0.05$) y se obtienen valores similares a los obtenidos con TGF β 1 y bFGF. Cuatro días después sólo se observan diferencias con respecto al bFGF ($p<0.05$) y una semana después sólo con respecto a la proliferación inducida por PDGF-BB.

Actividad metabólica

En general se observa como la actividad metabólica es más baja cuando se realiza la herida que cuando no se realiza en los tres diferentes tiempos estudiados, lo cual es lógico ya que existe un número menor de células que en los pocillos donde no se ha realizado herida. Al igual que con los datos de la proliferación, el poder de discriminación es mínimo y se tomaron los datos en su conjunto.

Como se muestra en el gráfico 3, un día después de realizar las heridas el factor de crecimiento con el que se observó una mayor actividad metabólica fue el PDGF-BB, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) con la actividad metabólica inducida por el resto de factores estudiados. Entre estos factores no se observaron diferencias en cuanto a la actividad metabólica.

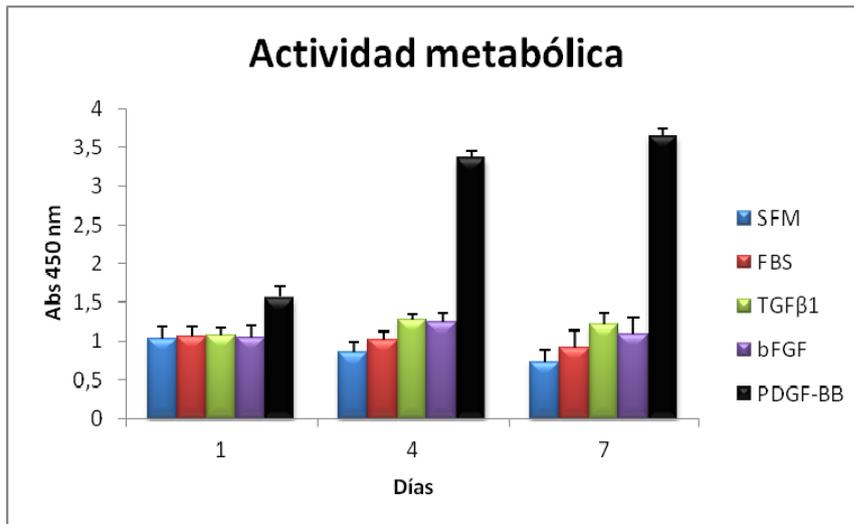


Gráfico 3.

A los cuatro días, la actividad metabólica inducida por el SFM ha disminuido encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) con el resto de medios. La actividad metabólica más alta la presenta el PDGF-BB, encontrándose, al igual que a las 24 horas, diferencias significativas con el resto de medios estudiados. Con FBS se observó cómo disminuye ligeramente la actividad metabólica existiendo diferencias con los demás (la herida ya ha cerrado y al igual que ocurrió con la proliferación celular, la actividad metabólica se ralentiza). Tanto con bFGF como con TGFβ1 aumenta ligeramente la actividad metabólica, no observándose diferencias entre ambos pero sí entre estos y el resto de medios estudiados.

A los siete días, la actividad metabólica inducida por el SFM sigue disminuyendo, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con el resto de medios, a excepción del FBS, con el que también se observa un descenso. Al igual que en el resto de tiempos estudiados, el PDGF-BB es el factor que más actividad metabólica induce, existiendo diferencias con el resto ($p < 0.05$). Tanto con el TGFβ1 como con el bFGF, la actividad metabólica fue similar a la observada a los 4 días, se observó un ligero descenso con bFGF pero este no fue significativo ($p = 1$).

Sin la adición al medio de factores de crecimiento (SFM), observamos cómo el cierre es más lento, tiene lugar a los 15 días en las placas de 35 mm o a los 7 días en los pocillos. Siempre la proliferación es menor, aumenta de forma muy lenta y la actividad metabólica disminuye con el tiempo.

A la vista de los resultados observamos que el medio con el cual se produce un cierre más rápido es el FBS, pero con este medio no se observa un aumento de la proliferación como el observado por la adición de PDGF-BB. Sí que se observa un aumento con respecto al SFM ($p < 0.05$). A las 24 horas, no se ve tampoco un cambio significativo en cuanto a la actividad metabólica, de hecho, ésta va disminuyendo con el tiempo, lo que se puede explicar porque el cierre tiene lugar muy pronto (entre 1 y 2 días en los pocillos y a los 4 días en las placas) y a partir del momento del cierre comienzan a disminuir la actividad metabólica y la proliferación celular.

El PDGF-BB da lugar a un aumento tanto de la proliferación como de la actividad metabólica durante el proceso de cierre. Con el bFGF vemos que existe también un aumento, pero no tan elevado como el observado con PDGF-BB, pero sin embargo, el cierre se produce a la vez con ambos factores sin que existan diferencias entre ambos.

Con TGF β 1 también se observa un aumento similar al que tiene lugar con el bFGF en cuanto a la actividad metabólica y a la proliferación celular pero con este factor el cierre de la herida no se llega a producir en los tiempos estudiados y además, ya a los 4 días durante el cierre se observan diferencias ($p < 0.05$) con respecto al bFGF.

Proliferación celular en las diferentes zonas de la herida

Con SFM se observan células BrdU positivas (B+) 24 horas después de realizar la herida en los márgenes de la misma y en el resto del cultivo pero hasta los 4 días no se comienzan a observar en la herida (gráfico 4). A los 10 días, existe un ligero aumento de células B+ en los márgenes y en el cultivo, pero el mayor número se localiza en la herida. A los 15 días, el cierre ya ha tenido lugar y el número de células B+ disminuye en las tres zonas. Con este medio de cultivo el cierre tiene lugar por un aumento de divisiones celulares en los márgenes de la herida. Estas células comienzan a ocupar la herida y continúan dividiéndose hasta conseguir cerrarla. Es un proceso lento en el cual la proliferación se centra en la herida, principalmente por esto, cuando analizamos la proliferación en general vemos que es más baja al igual que la actividad metabólica.

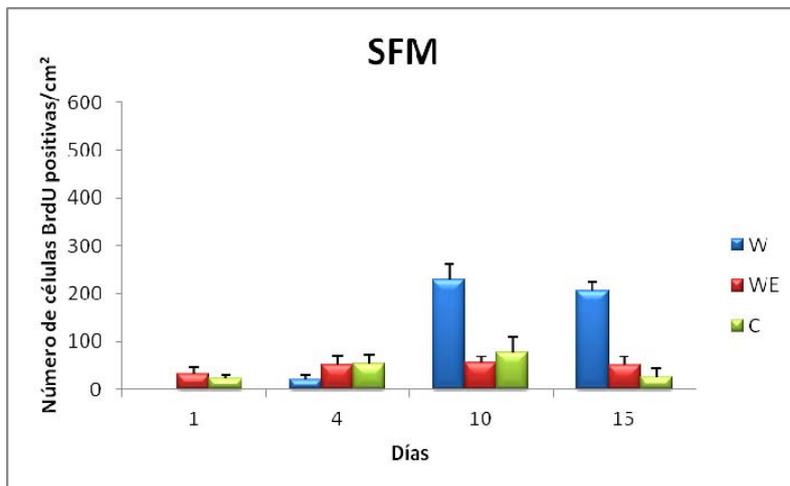


Gráfico 4.

Al añadir FBS (gráfico 5), 24 horas después de realizar la herida se observan células B+ en las 3 zonas estudiadas, presentando un número similar de células B+. A los 4 días, cuando tiene lugar el cierre, se observa cómo el número ha aumentado en las 3 zonas de forma similar. Con FBS aumenta la proliferación en las 3 zonas por igual. Al analizar los datos obtenidos de la proliferación en general, vemos cómo esta aumenta con respecto al SFM y que es similar a la proliferación inducida por el resto de factores de crecimiento (a excepción del PDGF-BB). El proceso de cierre es tan rápido que no detectamos los cambios en la actividad metabólica al trabajar con placas de 96 pocillos, sólo observamos un descenso pero cuando ya se ha producido el cierre, lo cual es lógico porque la tendencia es a adquirir nuevamente un estado quiescente.

El proceso de cierre tiene lugar por un aumento de la proliferación general (en las 3 zonas) y probablemente por un aumento de la migración celular.

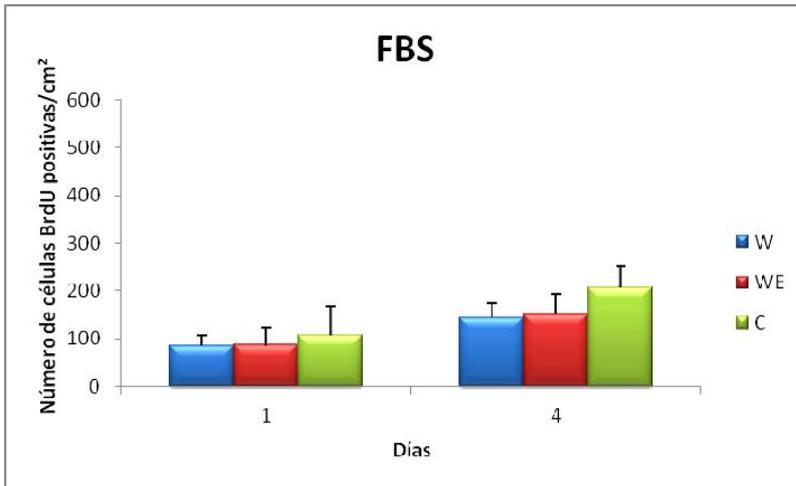


Gráfico 5.

Cuando añadimos bFGF al medio (gráfico 6), observamos que 24 horas después de realizar la herida ya hay células B+ en las 3 zonas de estudio aunque no tantas como con FBS. Sin embargo, a los 4 días la zona que más células B+ presenta es la herida, también hay un aumento en los márgenes pero disminuye en el resto del cultivo. Diez días después de realizar la herida, la zona que más células B+ presenta es la herida donde se observa un aumento constante en el tiempo, en las otras dos zonas el número de células B+ sigue disminuyendo. En el resto del cultivo se observa un descenso gradual de células B+ en el tiempo, en la herida un aumento de las mismas, mientras que en los márgenes de la herida aumenta el número hasta los 4 días y luego disminuye.

Si se tienen en cuenta los datos de la proliferación en general, vemos como ésta aumenta lentamente en el tiempo, siempre siendo menor que la inducida por PDGF-BB. La actividad metabólica también aumenta gradualmente hasta que tiene lugar el cierre de la herida, momento en el cual disminuye.

El cierre que se produce en respuesta al bFGF tiene lugar por un aumento de la proliferación, sobre todo en las células localizadas en los márgenes de la herida y en la herida.

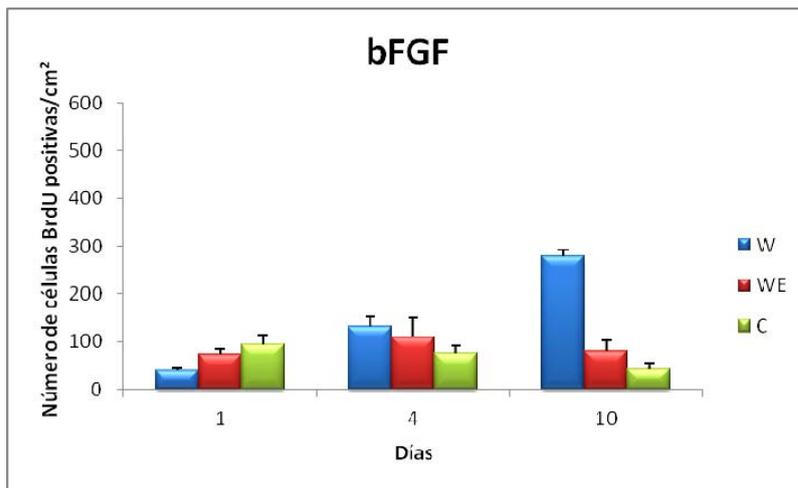


Gráfico 6.

Con TGFβ1 (gráfico 7) se observan algunas células B+ 24 horas después de la realización de la herida, sobre todo en los márgenes de la misma. A los 4 días aumenta el número de células B+ tanto en la zona de los márgenes como en la de la herida, pero no en el resto del cultivo. Diez días después de realizar la herida el número de células B+ sigue aumentando en las 3 zonas estudiadas, siendo la de la herida donde se localiza un número mayor. Quince días después de la realización de la herida, el número observado de células B+ es más bajo en las 3 zonas estudiadas.

Con este factor de crecimiento se observan una proliferación celular general y una actividad metabólica similares a las observadas con el bFGF, sin embargo, el cierre después de 15 días no tiene lugar y ya a los 4 días se observa cómo es más lento que con el bFGF.

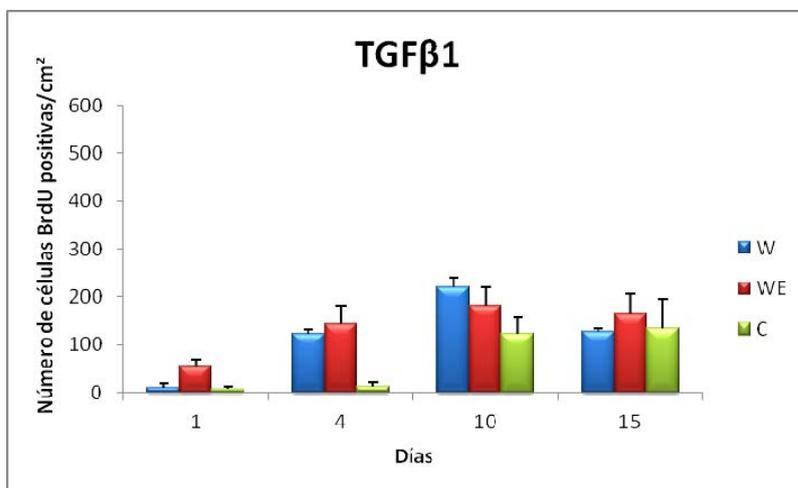


Gráfico 7.

Con PDGF-BB (gráfico 8) se observan células B+ en las 3 zonas de estudio a las 24 horas, existiendo mayor número en los márgenes. Cuatro días después de realizar las heridas el número de células B+ es mucho mayor en las 3 zonas y a los 10 días disminuye en las mismas. El cierre tiene lugar a los 10 días, al igual que con el bFGF, pero el proceso mediante el cual éste tiene lugar es diferente, puesto que el mayor número de células B+ se observa a los 4 días.

Con este factor de crecimiento se observan siempre una proliferación celular general y una actividad metabólica mayores que con el resto de factores de crecimiento (a excepción de a los 4 días, donde la proliferación general es similar a la producida por el bFGF).

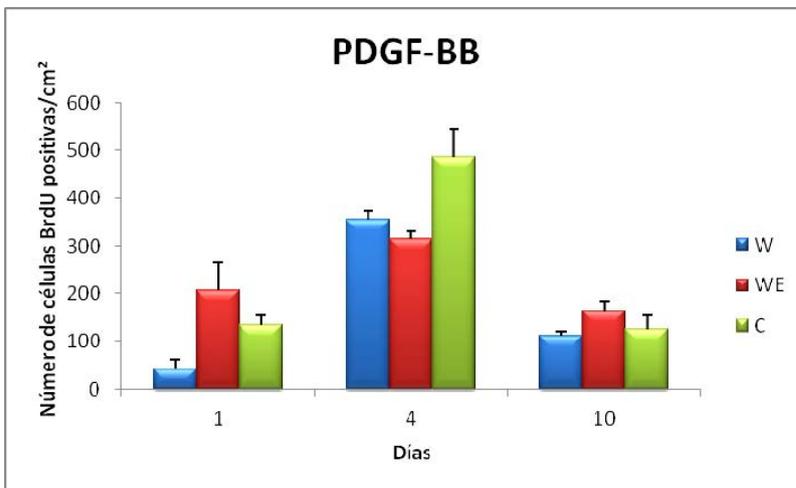


Gráfico 8.

Diferenciación celular

Existen cambios morfológicos evidentes durante el proceso de cierre de la herida con los diferentes factores de crecimiento, como puede observarse en la figura 5, la cual muestra microfotografías tomadas 4 días después de la realización de las heridas con los diferentes factores de crecimiento (barra de escala= 100 μ m).

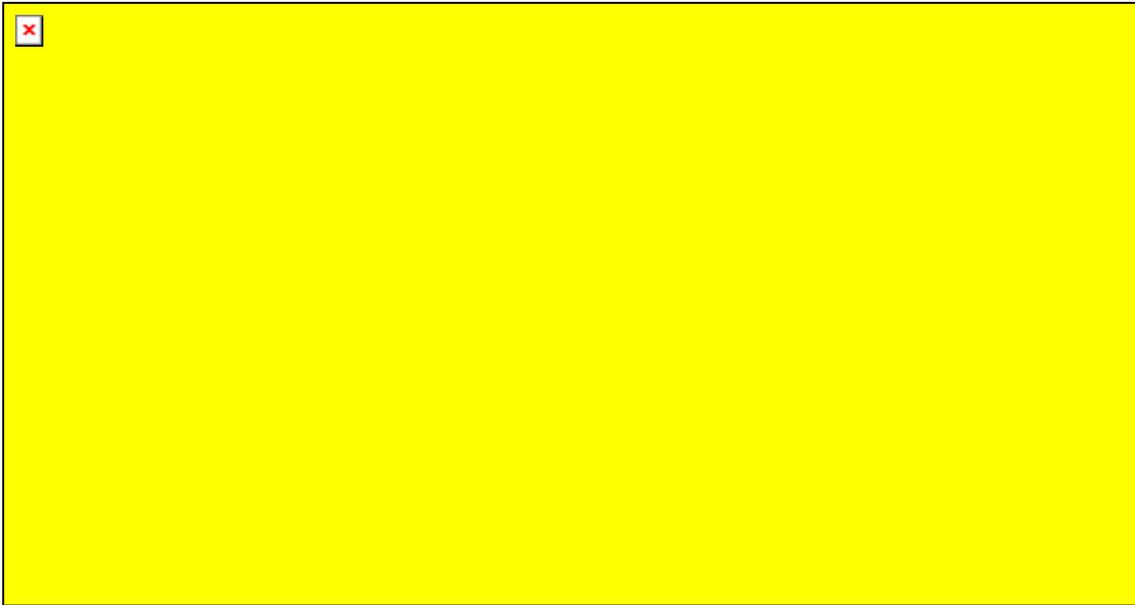


Figura 5.

Las células tratadas con SFM conservan un fenotipo de queratocito típico, con gran organización celular del cultivo, y que presentan un metabolismo ralentizado cuya tendencia es el establecimiento de la quiescencia.

Las células tratadas con FBS, bFGF y PDGF-BB se activan y adquieren fenotipos fibroblásticos diferentes. Las células tratadas con PDGF-BB presentan un fenotipo más alargado y fusiforme que las tratadas tanto con bFGF como con FBS, y presentan también una mayor desorganización careciendo de uniones intercelulares, y por lo tanto presentando mayores espacios entre células. Con TGF β 1 las células adquieren un fenotipo miofibroblástico caracterizado por presentar morfología no fusiforme, con grandes prolongaciones citoplasmáticas y que, en su gran mayoría, expresan α -SMA.

Presencia de miofibroblastos (expresión de α -SMA)

En contacto con SFM la presencia de miofibroblastos (queratocitos diferenciados detectables por la expresión de α -SMA) fue baja en las 3 zonas estudiadas durante los diferentes tiempos (gráfico 9). La diferenciación hacia este fenotipo tiene lugar para cerrar espacios, desarrollando contactos intercelulares. Las células tratadas con SFM presentan una actividad metabólica lenta y una proliferación reducida, por lo que, cuando existen huecos intercelulares las células se diferencian a miofibroblastos para poder eliminar espacios.

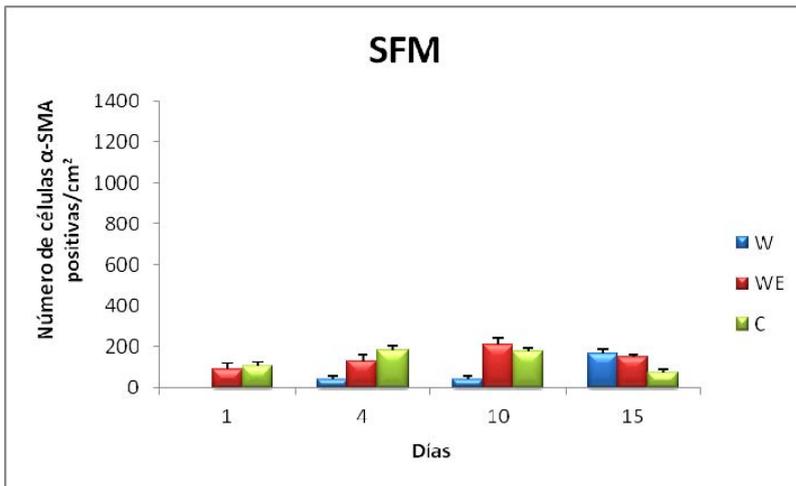


Gráfico 9.

Con FBS no se observó expresión en ninguno de los tiempos estudiados.

Con bFGF (gráfico 10) se observaron algunos miofibroblastos 24 horas después de realizar las heridas en las zonas de los márgenes y del resto del cultivo. Posteriormente, estos se localizan en la zona de la herida a los 4 días y disminuyen en las otras dos zonas estudiadas. Diez días después no se observan miofibroblastos en los cultivos tratados con este factor de crecimiento.

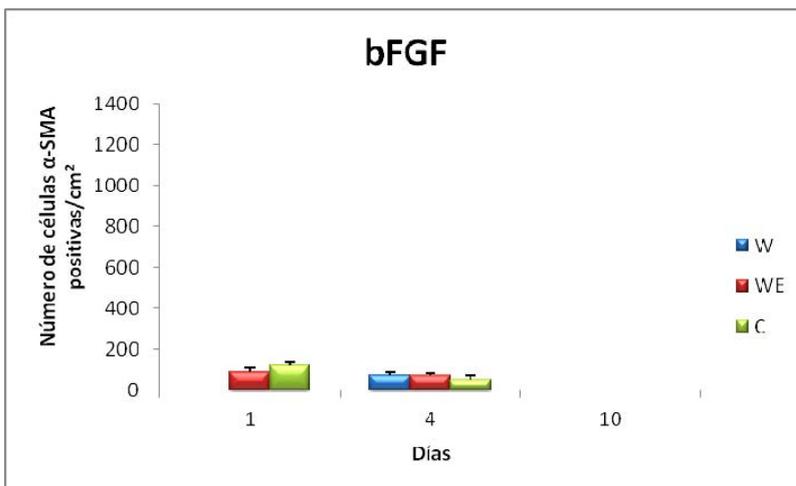


Gráfico 10.

Con TGFβ1 se observa un gran número de miofibroblastos (gráfico 11). Aunque sea un fenotipo que favorece la migración celular, en este caso algo detiene este proceso y el cierre no tiene lugar.

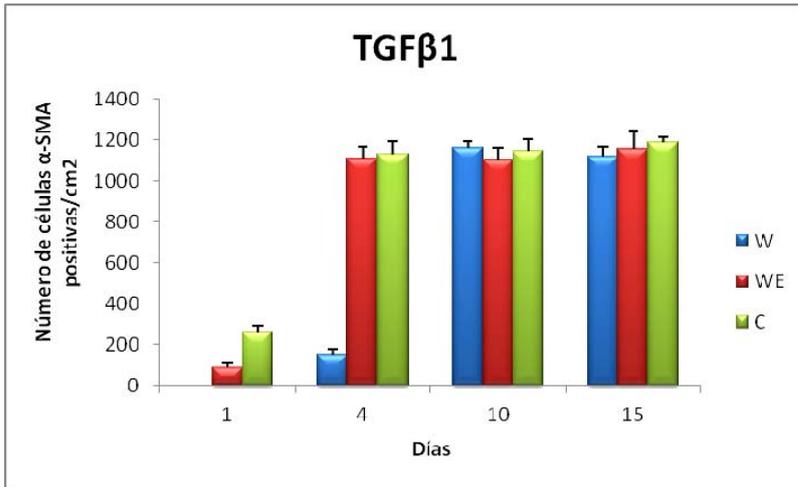


Gráfico 11.

La presencia de PDGF-BB (gráfico 12) en el medio hace que la expresión de α-SMA sea baja, excepto 10 días después, donde aumenta el número de miofibroblastos. Esto puede deberse a que las células, una vez que el cierre se ha producido, comienzan a diferenciarse hacia miofibroblastos para aumentar los contactos intercelulares y la secreción de matriz extracelular, aumentando así la organización del cultivo y posteriormente restaurar el fenotipo de queratocito y entrar en quiescencia.

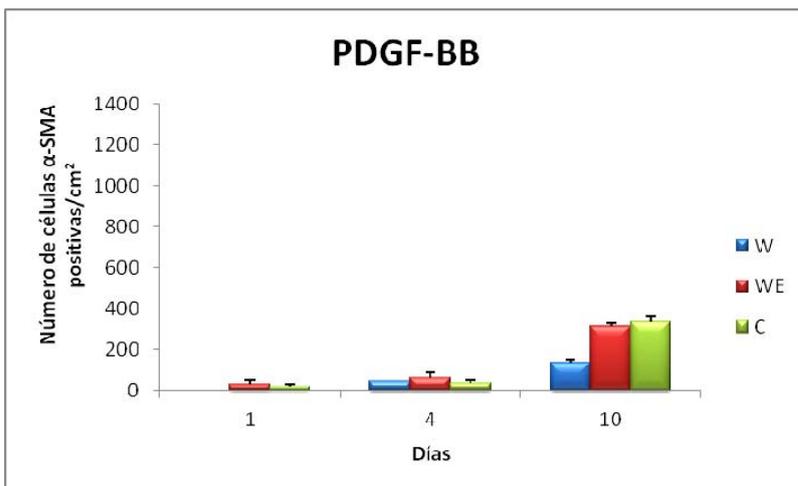


Gráfico 12.

DISCUSIÓN

Cuando el estroma corneal es dañado, los queratocitos afectados y los que se localizan en la zona cercana a la herida entran en apoptosis [24, 42]. La proliferación de las células que quedan es esencial para reemplazar la pérdida debida a la apoptosis. El resultado de este estudio muestra cómo la suplementación del medio con diferentes GFs de forma individual, estimula de diferente manera los procesos de proliferación, diferenciación, migración y de cierre de la herida. El GF que estimuló en mayor medida el proceso de proliferación celular fue el PDGF-BB. Con este factor se observó también una mayor actividad metabólica, sin embargo, el cierre tuvo lugar de forma similar al observado con bFGF. Aunque ambos GFs produzcan un cierre similar, se diferencian en que el bFGF da lugar a un aumento más lento y gradual de la proliferación celular, que se observa principalmente en las células de los márgenes de la herida y en la propia herida. Como ya fue descrito por Song y cols., [19] en cultivos de córneas de conejo, el bFGF modula respuestas más tardías durante el cierre de la herida. Con el PDGF-BB, la proliferación se produce en las células de las tres zonas estudiadas y, en vez de ser lenta y gradual, es más rápida observándose un número mayor cuatro días después de realizar la herida. Con este GF comienza a aumentar el número de miofibroblastos en el cultivo 10 días después de realizar la herida, mientras que con el bFGF a los 10 días no se observan miofibroblastos. Este efecto del bFGF sobre la diferenciación de miofibroblastos ya ha sido descrito previamente por Song y cols., [19] quienes indican que este GF disminuye la expresión de TGF β 1 y, por lo tanto, se inhibe la diferenciación de los queratocitos en miofibroblastos. Este GF activa procesos tanto de proliferación como de migración, por lo que el cierre observado es debido a la suma de ambos procesos. Por otro lado, la aparición a los 4 y 10 días de miofibroblastos en los cultivos a los que se les ha añadido PDGF-BB, puede explicarse porque la adición de este factor hace que se eleve de forma significativa la tasa proliferativa y, una vez que se ha producido el cierre, los fibroblastos tienden a volverse quiescentes; pero la falta de organización y de uniones observada en estos cultivos hace que se diferencien los fibroblastos en miofibroblastos, para conseguir una mayor organización celular y mayor comunicación intercelular. Como describieron Jester y cols., [25] para que se produzca la diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico, es necesario que el TGF β 1 y el PDGF-BB actúen de manera sinérgica. En nuestro estudio, al aplicar al cultivo únicamente PDGF-BB, la diferenciación tiene lugar más tarde que con TGF- β 1, y pensamos que se produce como respuesta a la existencia de espacios intercelulares en el cultivo una vez que se ha producido el cierre. Los fenotipos producidos por PDGF-BB y bFGF son fibroblásticos, pero difieren en morfología y organización.

Con el bFGF existe una mayor organización del cultivo, mientras que con el PDGF-BB la morfología es muy fusiforme y no hay organización en el cultivo ni contactos intercelulares. Con bFGF no es necesaria la presencia de miofibroblastos para el re-establecimiento del cultivo. Después del cierre, la recuperación de la quiescencia, y por lo tanto del fenotipo de queratocito, podría tener lugar por diferenciación directa de fibroblasto a queratocito, como describieron previamente Baldwin y cols., [41].

Por otro lado, la adición al medio de TGF β 1 hace que los procesos proliferativos tengan lugar de forma similar a los que ocurren en presencia de bFGF, pero el cierre es más lento (no cierra en los tiempos estudiados) y aunque la proliferación se centre en las mismas zonas, existe una diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico. Aunque los miofibroblastos son células con alta capacidad migratoria, la presencia de éstas en el cultivo no hace que el cierre tenga lugar, por lo tanto, aunque se dan procesos de proliferación, existe algo que frena la migración celular para que tenga lugar el cierre, probablemente la ausencia de PDGF-BB.

Como hemos comprobado con los resultados de este trabajo, el proceso de cicatrización corneal depende de una combinación de factores que coordinan la regeneración tanto del epitelio como del estroma. Las interacciones entre GFs son extremadamente complejas, dependiendo en gran medida del ambiente extracelular, del efecto de otros GFs y de ECManismos de regulación de las células afectadas. Cuando no existe un balance entre estos ECManismos, se pueden desarrollar como resultado diferentes estados patológicos. La posibilidad de conocer y controlar la actividad de los GFs, para el diagnóstico de la etiopatogenia de alteraciones de la cicatrización, mediante su inhibición (tecnología del siRNA) o estimulación por la aplicación exógena de GFs específicos, da lugar al desarrollo de nuevas aplicaciones para potenciar procesos de cicatrización, inhibir alteraciones de los mismos como la fibrosis y dirigir la respuesta celular a los diferentes tipos de prótesis. El uso de células en ingeniería de tejidos y estrategias de terapia génica en las que están implicados GFs son también estrategias prometedoras en este campo. Sin embargo, los efectos de la alteración del balance entre GFs en procesos celulares también han de ser considerados, y han de realizarse test in vivo para poder aumentar el conocimiento de los ECManismos en los que los GFs están implicados y sus posibles aplicaciones en diferentes patologías corneales.

CONCLUSIONES

- La ausencia de GFs en el medio (SFM) hace que el cierre de la herida sea muy lento. Tanto la proliferación como la actividad metabólica son bajas. Las células comienzan a proliferar en los márgenes para ocupar la zona de la herida pero muy lentamente manteniendo el fenotipo característico de queratocitos con una baja presencia de miofibroblastos.
- Una combinación de GFs (FBS) añadidos al medio hace que la proliferación aumente en general, produciendo el cierre de la herida en tan sólo 4 días debido a la suma de procesos de proliferación y, probablemente, de migración. No hay diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico, pero si hacia fenotipo fibroblástico.
- Cuando al medio se añade bFGF, se produce un aumento lento y gradual de la proliferación y de la actividad metabólica hasta que se produce el cierre a los 10 días. Éste tiene lugar por un aumento de la proliferación en las células localizadas en los márgenes de la herida, sobre todo, y en la herida. El patrón de proliferación celular es similar al seguido en ausencia de bFGF, pero más rápido. Hay diferenciación hacia fenotipo fibroblástico y una baja presencia de miofibroblastos hasta los 4 días (a los 10 días no hay miofibroblastos).
- La adición al medio de TGFβ1 hace que la proliferación y la actividad metabólica sean similares a las observadas por la adición de bFGF, sin embargo, el cierre no tiene lugar y se observa cómo este, ya a los 4 días, es más lento que con bFGF. Existe diferenciación hacia fenotipo miofibroblástico.
- Cuando al medio se le añade PDGF-BB se observa la mayor proliferación y actividad metabólica del estudio. El cierre tiene lugar a los 10 días de forma similar al bFGF, pero mediante un proceso diferente ya que el número más alto de células BrdU positivas se observa en las tres zonas de estudio a los 4 días. Existe diferenciación hacia fenotipo fibroblástico, presentando una morfología más fusiforme y con menor organización que la observada con bFGF. La presencia de miofibroblastos fue baja hasta los 10 días donde fue mayor en las tres zonas.

REFERENCIAS

1. Hanna, C., D.S. Bicknell, and J.E. O'Brien, *Cell turnover in the adult human eye*. Arch Ophthalmol, 1961. **65**: p. 695-8.
2. Kaye, G.I., *Stereologic measurement of cell volume fraction of rabbit corneal stroma*. Arch Ophthalmol, 1969. **82**(6): p. 792-4.
3. Cogan, D.G., *Applied anatomy and physiology of the cornea*. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol, 1951. **55**: p. 329-59.
4. Jester, J.V., W.M. Petroll, and H.D. Cavanagh, *Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts*. Prog Retin Eye Res, 1999. **18**(3): p. 311-56.
5. Newsome, D.A., J. Gross, and J.R. Hassell, *Human corneal stroma contains three distinct collagens*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1982. **22**(3): p. 376-81.
6. Gipson, I.K. and T. Inatomi, *Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing*. Curr Opin Ophthalmol, 1995. **6**(4): p. 3-10.
7. Wang, Y., M. Chen, and J.M. Wolosin, *ZO-1 in corneal epithelium; stratal distribution and synthesis induction by outer cell removal*. Exp Eye Res, 1993. **57**(3): p. 283-92.
8. Jester, J.V., et al., *Inhibition of corneal fibrosis by topical application of blocking antibodies to TGF beta in the rabbit*. Cornea, 1997. **16**(2): p. 177-87.
9. O'Kane, S. and M.W. Ferguson, *Transforming growth factor beta s and wound healing*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(1): p. 63-78.
10. Carrington, L.M., et al., *Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by TGF-beta isoforms and their inhibitors*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(5): p. 1886-94.
11. Fini, M.E., *Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea*. Prog Retin Eye Res, 1999. **18**(4): p. 529-51.
12. Chen, C., et al., *Measurement of mRNAs for TGFs and extracellular matrix proteins in corneas of rats after PRK*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(13): p. 4108-16.
13. Mita, T., et al., *Functional difference of TGF-beta isoforms regulating corneal wound healing after excimer laser keratectomy*. Exp Eye Res, 1999. **68**(4): p. 513-9.
14. Zieske, J.D., et al., *TGF-beta receptor types I and II are differentially expressed during corneal epithelial wound repair*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(7): p. 1465-71.
15. Dinbergs, I.D., L. Brown, and E.R. Edelman, *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**(47): p. 29822-9.
16. Imanishi, J., et al., *Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea*. Prog Retin Eye Res, 2000. **19**(1): p. 113-29.
17. Vesaluoma, M., et al., *Release of TGF-beta 1 and VEGF in tears following photorefractive keratectomy*. Curr Eye Res, 1997. **16**(1): p. 19-25.
18. Pasquale, L.R., et al., *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**(1): p. 23-30.
19. Song, Q.H., et al., *TGF-beta1 regulates TGF-beta1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing*. Mol Pathol, 2002. **55**(3): p. 164-76.
20. Jester, J.V., et al., *Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes*. Cornea, 1996. **15**(5): p. 505-16.
21. Li, D.Q. and S.C. Tseng, *Differential regulation of cytokine and receptor transcript expression in human corneal and limbal fibroblasts by epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, platelet-derived growth factor B, and interleukin-1 beta*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. **37**(10): p. 2068-80.
22. Wilson, S.E., et al., *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**(1): p. 63-71.
23. Grant, M.B., et al., *Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992. **33**(12): p. 3292-301.
24. Wilson, S.E., et al., *The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells*. Prog Retin Eye Res, 2001. **20**(5): p. 625-37.

25. Jester, J.V., et al., *TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling*. *Exp Eye Res*, 2002. **75**(6): p. 645-57.
26. Boilly, B., et al., *FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000. **11**(4): p. 295-302.
27. Li, D.Q. and S.C. Tseng, *Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface*. *J Cell Physiol*, 1995. **163**(1): p. 61-79.
28. Wilson, S.E., J.J. Liu, and R.R. Mohan, *Stromal-epithelial interactions in the cornea*. *Prog Retin Eye Res*, 1999. **18**(3): p. 293-309.
29. Wilson, S.E., et al., *Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding*. *Exp Eye Res*, 1999. **68**(4): p. 377-97.
30. Honma, Y., et al., *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**(3): p. 391-6.
31. Kokawa, N., et al., *High total TGF-beta 2 levels in normal human tears*. *Curr Eye Res*, 1996. **15**(3): p. 341-3.
32. Suzuki, K., et al., *Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing*. *Prog Retin Eye Res*, 2003. **22**(2): p. 113-33.
33. Maldonado, B.A. and L.T. Furcht, *Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995. **36**(10): p. 2120-6.
34. Fujikawa, L.S., et al., *Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: immunofluorescence and ultrastructural studies*. *J Cell Biol*, 1984. **98**(1): p. 128-38.
35. Ohji, M., et al., *Corneal epithelial cell attachment with endogenous laminin and fibronectin*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993. **34**(8): p. 2487-92.
36. Grierson, I., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye*. *Prog Retin Eye Res*, 2000. **19**(6): p. 779-802.
37. Steele, C., *Corneal wound healing: a review*. *Optometry Today*, 1999. **24**: p. 28-32.
38. Wilson, S.E., *Stimulus-specific and cell type-specific cascades: emerging principles relating to control of apoptosis in the eye*. *Exp Eye Res*, 1999. **69**(3): p. 255-66.
39. Yanai, R., et al., *Mitogenic and antiapoptotic effects of various growth factors on human corneal fibroblasts*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002. **43**(7): p. 2122-6.
40. Maltseva, O., et al., *Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. **42**(11): p. 2490-5.
41. Baldwin, H.C. and J. Marshall, *Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: A review*. *Acta Ophthalmol Scand*, 2002. **80**(3): p. 238-47.
42. Zieske, J.D., S.R. Guimaraes, and A.E. Hutcheon, *Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement*. *Exp Eye Res*, 2001. **72**(1): p. 33-9.