



---

**Universidad de Valladolid**

TESIS DOCTORAL:

**PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO  
TRANSFORMANTE BETA (TGF- $\beta$ ) Y EFICACIA DE  
MOLÉCULAS INHIBIDORAS EN LA RESPUESTA  
INFLAMATORIA DE LA SUPERFICIE OCULAR**

Presentada por M<sup>a</sup> JESÚS BENITO ALMAZÁN para optar al  
grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

**Dra. AMALIA ENRÍQUEZ DE SALAMANCA ALADRO**





**Universidad de Valladolid**

Impreso 2T

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

(Art. 21 del R.D. 1393/2007 de 29 de octubre y Art. 4 c) de la Normativa para la defensa de la Tesis Doctoral)

Dña. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro, con D.N.I. nº05408578-J, Investigadora Principal del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) y Profesora del Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia, como Director de la Tesis Doctoral titulada "PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- $\beta$ ) Y EFICACIA DE MOLÉCULAS INHIBIDORAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA DE LA SUPERFICIE OCULAR" presentada por Dña. María Jesús Benito Almazán, alumno del programa de Doctorado en Ciencias de la Visión, impartido por el Instituto IOBA autoriza la presentación de la misma, considerando que es APTA para su defensa.

Valladolid, 12 de Mayo de 2012

El Director de la Tesis,

Fdo.: Amalia Enríquez de Salamanca Aladro.

ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO





**Universidad de Valladolid**



**COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN**

La Comisión de Investigación del IOBA, en su reunión del 20 de junio de 2012, ha analizado su proyecto de tesis doctoral titulado:

“PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- $\beta$ ) Y EFICACIA DE MOLÉCULAS INHIBIDORAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA DE LA SUPERFICIE OCULAR”, no encontrando ninguna objeción para poder ser remitido a la Comisión de Docencia y Doctorado del IOBA.

Y para que así conste se expide el presente certificado,

En Valladolid, a 20 de junio de 2012

Fdo.: M<sup>a</sup> Paz García García  
Secretaria de la Comisión de Investigación



*A mi familia y a Luis*





*"No hay inversión más rentable que la del conocimiento"*

*Benjamín Franklin*

*"Quien tiene un QUÉ, encontrará siempre un CÓMO"*

*Nietzsche*



## **AGRADECIMIENTOS**

Desde estas líneas pretendo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante estos años de trabajo han estado a mi lado, amigos, familia y compañeros, y que, directa o indirectamente, han hecho posible que este proyecto se llevara a cabo.

A mi directora de Tesis, la Dra. Amalia Enríquez de Salamanca, por haber confiado en mi y ofrecerme su apoyo y ayuda en todas las etapas de la elaboración de esta Tesis. Por sus consejos, tiempo dedicado y por tener siempre la puerta abierta para resolver dudas. Gracias por tu perseverancia y rigor a la hora de dirigir el trabajo.

A la Dra. Calonge, por permitirme formar parte de su grupo de investigación. Por preocuparse de buscar los medios que me han permitido finalizar este estudio. Por ser todo un ejemplo de trabajo y superación.

A Carmen, trabajadora incansable, por su paciencia para enseñarme y su ayuda en toda la parte técnica, por su profesionalidad, eficiencia y todas las horas compartidas para sacar adelante este trabajo.

A todos mis compañeros del Grupo de Superficie Ocular con quienes he compartido estos últimos cuatro años: Ana, Marina, Sara, Teresa, Antonio, Isabel, Laura C., Laura G., Laura S., M. Paz, Mario, Marisa, Toni, Vicente, Jose y Cecilio, por todo el tiempo compartido y disfrutado, por su gran compañerismo, por crear este fantástico ambiente de trabajo y por toda la ayuda prestada.

A Itziar por su ayuda con la estadística y a todo el equipo de administración por ayudarme cuando lo he necesitado.

A todo el personal del IOBA, por crear este buen ambiente de trabajo.

A mis amigos, los de siempre y los que he ido conociendo a lo largo de todos estos años, por todos los momentos vividos y experiencias compartidas. Porque a pesar de la distancia, sé que siempre puedo contar con ellos.

A mis familiares, en especial a Pilar, Marta y Laura, por su interés a lo largo de todo este tiempo, por su comprensión, aliento y respaldo.

Con especial cariño, a mis padres, a mi hermana Cristina y a Jaime, a quienes debo el camino recorrido hasta el momento, por darme todo sin esperar nada a cambio.

Finalmente a Luis, por su apoyo incondicional, por su paciencia, por estar a mi lado. Gracias por ser como eres, por ayudarme a no rendirme ante las dificultades.

A todos, GRACIAS



## FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la financiación privada y de los siguientes proyectos de investigación en convocatorias públicas competitivas:

- *Células epiteliales como nueva diana terapéutica en inflamación crónica y grave de la superficie ocular.*  
Ministerio de Educación y Ciencia CICYT-SAF-2007-61636 (I.P.: Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro). Duración: desde 2007 hasta 2010.
- *Estudio in vitro de una posible terapia con péptidos anti-TGF- $\beta$  en los procesos de inflamación crónica y grave de la superficie ocular.*  
Junta de Castilla y León SAN 126/VA02/09 (I.P.: Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro). Duración: desde 2009 hasta 2010.

## DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

El trabajo desarrollado ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- **MJ Benito**, VL Calder, RM Corrales, C García-Vázquez, Srihari Narayan, JM Herreras, M Stern, M Calonge, A Enríquez-de-Salamanca. *Effect of TGF- $\beta$  on ocular surface epithelial cells. Enviado a Molecular Vision.*
- **MJ Benito**, C García-Vázquez, M Stern, M Calonge, A Enríquez-de-Salamanca. *In vitro study of the involvement of IL-17 in chronic and severe ocular surface inflammatory processes. En preparación*
- **MJ Benito**, C García-Vázquez, M Stern, M Calonge, A Enríquez-de-Salamanca. *TLR-4 expression under inflammatory conditions in ocular surface epithelial cultured cells. En preparación.*

El trabajo realizado ha sido presentado en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

- A. Enríquez-de-Salamanca, E. Carreño, C. García-Vázquez, G. Galatowicz, V. Calder, M.E. Stern, M. Calonge. *In vitro TGF- $\beta$  receptor expression and TGF- $\beta$  secretion by conjunctival epithelial cells under basal and inflammatory conditions.*  
79<sup>th</sup> Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort-Lauderdale, Florida, EEUU. 2007. Tipo de participación: Póster

- A. Enríquez-de-Salamanca, C. García-Vázquez, V. Calder, M.E. Stern, M. Calonge. *In vitro TGF- $\beta$  effect on cytokine/chemokine and metalloproteinases (MMPs) secretion by human ocular surface epithelial cells.*  
79<sup>th</sup> Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort-Lauderdale, Florida, EEUU. 2008. Tipo de participación: Póster
- A. Enríquez-de-Salamanca, C. García-Vázquez, **M. Benito**, M.J. Maldonado, L. Cocho, J. Dotor, M.E. Stern, M. Calonge. *In vitro P144 and P17 anti TGF- $\beta$  peptides effect in TGF- $\beta$ -stimulated corneal epithelial cells.*  
81<sup>st</sup> Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort-Lauderdale, Florida, EEUU. 2009. Tipo de participación: Póster.
- C. García-Vázquez, A. Enríquez-de-Salamanca, M. Calonge. *Análisis mediante tecnología X-MAP del efecto in vitro del TGF- $\beta$  sobre la secreción de citoquinas/quimioquinas y metalloproteinases (MMPs) de células epiteliales humanas de la superficie ocular.*  
XXII Congreso Nacional de AETEL. 2009. Tipo de participación: Comunicación oral.
- **M.J Benito**, V. Calder, C. García-Vázquez, M.J. Maldonado, M. Calonge, A. Enríquez-De-Salamanca. *Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and ocular surface epithelial cells.*  
VI Edición del Día del IOBA. 2009. Tipo de participación: Comunicación oral.
- **M.J Benito**, C. García-Vázquez, M. Stern, M. Calonge, A. Enríquez-De-Salamanca. *In vitro study of the involvement of IL-17 in chronic and severe ocular surface inflammatory processes.*  
VII Edición del Día del IOBA. 2011. Tipo de participación: Comunicación oral.
- **M.J Benito**, C. García-Vázquez, M.E. Stern, M. Calonge. A. Enríquez-De-Salamanca. *In vitro study of the involvement of IL-17 in chronic and severe ocular surface inflammatory processes.*  
83<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort-Lauderdale, Florida, EEUU. 2012. Tipo de participación: Póster
- A. Enríquez-De-Salamanca, **M.J Benito**, C. García-Vázquez, M.E. Stern, M. Calonge. *TLR-4 expression under inflammatory conditions in ocular surface epithelial cultured cells.*  
83<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort-Lauderdale, Florida, EEUU. 2012. Tipo de participación: Póster

---

<b>I-INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. INFLAMACIÓN CRÓNICO-SEVERA DE LA SUPERFICIE OCULAR.....	3
2. CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS.....	5
2.1 Citoquinas y quimioquinas en procesos inflamatorios de la superficie ocular .....	9
3. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA, TGF- $\beta$ .....	11
3.1 Funciones, isoformas y activación de TGF- $\beta$ .....	11
3.2 Receptores de TGF- $\beta$ .....	14
3.3 Principales vías de señalización del TGF- $\beta$ .....	15
4. EFECTO DEL TGF- $\beta$ SOBRE LA FUNCIONALIDAD CELULAR: TGF- $\beta$ COMO MOLÉCULA “BIPOLAR” .....	19
5. TGF- $\beta$ Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS EN LA SUPERFICIE OCULAR .....	22
6. MOLÉCULAS ANTI-TGF- $\beta$ .....	25
<b>II.-JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>III.-HIPÓTESIS</b> .....	<b>31</b>
<b>IV.-OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
1. OBJETIVO GENERAL .....	37
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>V.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
1. CULTIVOS CELULARES .....	43
2. TRATAMIENTO CON CITOQUINAS .....	44
3. LISIS CELULAR Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	45
4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	46
5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOTTING.....	46
6. INMUNOFLUORESCENCIA .....	49
6.1 Cuantificación de la expresión observada por inmunofluorescencia .....	49
7. OBTENCIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES HUMANAS .....	51
8. AISLAMIENTO DE ARN, TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A TIEMPO REAL .....	51
9. MEDIDA DE LA SECRECIÓN CELULAR .....	52
9.1 Análisis multianálisis por tecnología X-MAP (Luminex <sup>TM</sup> ) .....	52
9.2 Análisis por ELISA .....	53

10. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR .....	54
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	55
<b>VI.-RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
1. CÉLULAS EPITELIALES CORNEALES Y CONJUNTIVALES COMO “FUENTE” DE TGF- $\beta$ .....	59
1.1 Estudio de la secreción de las 3 isoformas de TGF- $\beta$ (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) por las células HCE e IOBA-NHC.....	59
1.1.1 Condiciones basales .....	59
1.1.2 Estudio de la modificación de la secreción basal de TGF- $\beta$ bajo condiciones proinflamatorias.....	59
2. CÉLULAS EPITELIALES CORNEALES Y CONJUNTIVALES COMO “RECEPTORAS” DE TGF- $\beta$ ....	63
2.1 Expresión de los receptores RI, RII y RIII de TGF- $\beta$ .....	63
2.1.1 Expresión en condiciones basales .....	63
2.1.2 Estudio de la modificación de la expresión basal de receptores de TGF- $\beta$ bajo condiciones proinflamatorias.....	64
2.2 Activación de transducción de señales implicadas en las respuestas a TGF- $\beta$ . ....	70
2.2.1 Análisis de la viabilidad celular tras la exposición a TGF- $\beta$ .....	70
2.2. 2 Análisis de la fosforilación y translocación al núcleo del factor de transcripción SMAD-2 tras el tratamiento con TGF- $\beta$ .....	70
2.2.3 Análisis de la expresión de SMAD-7 .....	72
2.2.4 Análisis de la activación de otras vías de señalización implicadas en respuestas a otros estímulos inflamatorios: pSTAT-1/STAT-1, pSTAT-6/STAT6, pI $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ . ....	73
2.3 Modificación por TGF- $\beta$ de la expresión de receptores para diferentes moléculas implicadas en respuestas inflamatorias.....	73
2.3.1 Análisis del receptor tipo Toll TLR-4.....	73
2.3.2 Análisis del receptor IL-17 (IL-17R).....	75
2.4 Análisis de la secreción celular en condiciones basales y en respuesta a las distintas isoformas de TGF- $\beta$ . ....	77
2.4.1 Citoquinas/quimioquinas .....	77
2.4.2 Inhibidor de la proteasa de leucocitos secretores ( <i>Secretory leucocyte protease inhibitor</i> , SLPI) .....	79
2.4.3 Linfopoyetina estromal tímica ( <i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i> , TSLP).....	79
2.4.4 Metaloproteinasas (MMPs).....	79



---

2.5 Análisis del efecto del TGF- $\beta$ en la transición epitelial a mesenquimal: estudio de la expresión de e-cadherina .....	82
<b>3. ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS ANTI-TGF-<math>\beta</math> EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA DEL EPITELIO CORNEAL. ....</b>	<b>84</b>
3.1 Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$ en la viabilidad celular .....	84
3.2 Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$ en la activación de transducción de señales implicadas en las respuestas a TGF- $\beta$ .....	85
3.2.1 Efecto en pSMAD-2/SMAD-2 .....	85
3.2.2 Efecto en SMAD-7 .....	87
3.3 Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$ en la secreción celular .....	89
3.3.1 Efecto en la secreción de citoquinas/quimioquinas .....	89
3.3.2 Efecto en la secreción de SLPI .....	90
3.3.3 Efecto sobre la secreción de metaloproteinasas (MMPs).....	90
3.4 Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$ en la expresión del receptor TLR-4.....	91
3.5 Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$ en la transición epitelio-mesenquimal .....	94
<b>VII.-DISCUSIÓN .....</b>	<b>97</b>
<b>VIII.-RESUMEN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>113</b>
<b>IX.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>119</b>
<b>X.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>123</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

A lo largo de toda la presente memoria de Tesis Doctoral se ha utilizado principalmente terminología inglesa, en cuanto a abreviaturas se refiere, por correspondencia con los términos utilizados en la literatura científica.

**AKC:** Queratoconjuntivitis atópica (*atopic keratoconjunctivitis*).

**ALK:** Quinasa tipo receptor de activina (*activin receptor-like kinase*).

**BCA:** Ácido bicincónico (*bicinconic acid*).

**BSA:** Albúmina sérica bobina (*bovine serum albumin*).

**BMPs:** Proteínas morfogenéticas del hueso (*bone morphogenetic proteins*).

**CIC:** Citología de impresión conjuntival (*conjunctival impression cytology*).

**DAMPs:** Patrones moleculares asociados a daño (*danger-associated molecular patterns*).

**DMSO:** Dimetil sulfóxido (*dimethyl sulfoxide*).

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*).

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*).

**EMT:** Transición epitelial-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition*).

**FBS:** Suero bobino fetal (*fetal bovine serum*).

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*).

**FSP1:** Proteína específica de fibroblastos (*fibroblast specific protein 1*).

**GDFs:** Factores de diferenciación y crecimiento (*growth and differentiation factors*).

**GVHD:** Enfermedad de injerto contra huésped (*graft-versus-host disease, GVHD*).

**HCE:** Células epiteliales corneales humanas (*human corneal epithelial cells*).

**HRP:** Peroxidasa del rábano (*horseradish peroxidase*).

**HGF:** Factor de crecimiento de hepatocitos (*hepatocyte growth factor*).

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma.

**IL:** Interleuquina.

**IOBA-NHC:** Células epiteliales conjuntivales humanas (*normal human conjunctiva*).

**JAK:** Janus quinasas (*Janus Kinase*).

**LAP:** Péptido asociado de latencia (*latency associated peptide*).

**mA:** Miliamperios

**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*).

**MEC:** Matriz extracelular (*extracellular matrix*).

**MMPs:** Metaloproteinasas de la matriz extracelular (*matrix metalloproteinases*).

**MIF:** Factor inhibidor Müllleriano (*Müllerian inhibitory factor*).

**OSDI:** Índice de enfermedad de la superficie ocular (*ocular surface disease index*).

**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*).

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*).

**PBS:** Tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*).

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*).

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*phenylmethylsulfonyl fluoride*).

**kDa:** Kilodaltones.

**R:** Receptor.

**RIPA:** Tampón de radioinmunoprecipitación (*radioimmunoprecipitation assay buffer*).

**ROR $\gamma$ t:** retinoide relacionado con los receptores huérfanos  $\gamma$ t (*retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t*).

**RPM:** Revoluciones por minuto.

**SAC:** Conjuntivitis alérgica estacional (*seasonal allergic conjunctivitis*).

**SDS:** Dodecil sulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*).

**SLPI:** Inhibidor de la proteasa de leucocitos secretores (*secretory leucocyte proteinase inhibitor*).

**$\alpha$ -SMA:** Alfa actina del músculo liso ( *$\alpha$ - smooth muscle actin*).

**SMAD:** Homólogas de la proteína de *Drosophila* (*mothers against decapentaplegic*, MAD) y la proteína de *C. elegans*, SMA.

**SOS:** Síndrome de ojo seco.

**STAT:** Transductores de señal y activadores de transcripción (*signal transducers and activators of transcription*).

**TBS:** Tampón-tris salino (*tris- buffered saline*).

**TBS-T:** Tampón-tris salino suplementado con 0,05% de Tween-20.

**TBUT:** Tiempo de ruptura lagrimal (*tear break-up time*).

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*).

**TIMP:** Inhibidor tisular de metaloproteinasas (*metalloproteinases tissue inhibitor*).

**TLRs:** Receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*).

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*).

**TMB:** Tetrametil bencidina (*tetramethylbenzidine*).

**Treg:** Células T reguladoras.

**TSLP:** Linfopoyetina estromal tímica (*thymic Stromal Lymphopoietin*).

**PRRs:** Receptores de reconocimiento de patrón (*pattern-recognition receptors*).

**V:** Voltios

**VKC:** Queratoconjuntivitis vernal (*vernal keratoconjunctivitis*).

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*).



## **I-INTRODUCCIÓN**





## 1. INFLAMACIÓN CRÓNICO-SEVERA DE LA SUPERFICIE OCULAR

La superficie ocular representa el área de contacto entre el ojo y el entorno exterior; está constituida por el epitelio que recubre toda la superficie expuesta del globo ocular y se compone de película lagrimal, la conjuntiva (membrana delgada transparente que cubre la esclera o parte anterior del ojo), la córnea ("ventana" transparente y avascular situada en la parte frontal del globo a través del cual entra la luz a la retina), el limbo esclerocorneal (límite anatómico entre córnea y esclera), además del estroma subyacente. La superficie ocular junto con las glándulas lagrimales y las interconexiones nerviosas constituye la denominada unidad funcional lagrimal (Stern *et al.* 1998; Stern *et al.* 2004); la función principal de la unidad funcional lagrimal es proporcionar una película lagrimal estable necesaria para conservar una superficie óptica adecuada, confort, preservar las células epiteliales y proteger de las condiciones ambientales y agentes microbianos. La integridad de cada uno de los componentes de esta unidad es fundamental para matener la homeostasis y el correcto funcionamiento de todo el conjunto; la alteración de cualquiera de los elementos de esta unidad produce una pérdida en la integridad de la película lagrimal lo que podría afectar a la visión y con ello a la calidad de vida (Stern *et al.* 1998; Stern *et al.* 2004).

Existen diversos tipos de procesos inflamatorios que afectan a la superficie ocular. Estos procesos pueden ser bien de tipo agudo-moderado (como la conjuntivitis alérgica o la papilar gigante) o de tipo crónico-severo (como la queratoconjuntivitis atópica (AKC), la queratoconjuntivitis vernal (VKC) y el síndrome de ojo seco (SOS) así como otras enfermedades inflamatorias cuyo mecanismo exacto todavía no se conoce (Stern *et al.* 1998; Calonge 1999; Pflugfelder 2003) u otras cuyo mecanismo de producción es agudo, pero el daño es crónico (causticaciones). Estos últimos tipos de afecciones crónico-severas se caracterizan por la posibilidad de daño corneal, lo cual puede producir la pérdida total de visión. Mientras que existen numerosos medicamentos para el tratamiento de las formas agudas y moderadas, hay una falta de medicación adecuada para el tratamiento de los casos crónicos más severos.

El SOS se define como una enfermedad multifactorial de la Unidad Funcional Lagrimal que provoca síntomas de incomodidad o malestar, alteraciones visuales, e inestabilidad de la película lagrimal con daño potencial a la superficie ocular. Se acompaña de un incremento de la osmolaridad de la lágrima e inflamación de la superficie ocular (2007). El SOS puede producir una enfermedad crónica de la superficie ocular, una calidad de visión dañada y un amplio rango de complicaciones, causando una reducción en la calidad de vida (Miljanovic *et al.* 2007). Es una de las enfermedades oculares de mayor incidencia. Su prevalencia es del 10 % de

la población adulta (Viso *et al.* 2009), alcanzando un 14,6% en la población de más de 65 años (Schein *et al.* 1997) y un 40% en mujeres postmenopáusicas (Schaumberg *et al.* 2003). La alteración de la barrera epitelial corneal y pérdida acelerada de células epiteliales conlleva a una irregularidad de la superficie corneal que degrada la función visual, disminuyendo la sensibilidad al contraste y la agudeza visual funcional (Calonge *et al.* 2010). Se produce, además, una inestabilidad en la película lagrimal con un incremento en su osmolaridad, lo que conlleva una activación de las cascadas de vías inflamatorias y la liberación de mediadores inflamatorios que incrementan el potencial daño a la superficie ocular (Pflugfelder *et al.* 1999; Lam *et al.* 2009).

La VKC es una enfermedad alérgica crónica caracterizada por una inflamación severa, complicaciones corneales y remodelación tisular que produce la formación de papilas gigantes en la conjuntiva tarsal. La respuesta inflamatoria crónica de la VKC se caracteriza por un aumento en la cantidad de células inflamatorias en los tejidos de la superficie ocular como linfocitos Th2, eosinófilos y mastocitos activados; se producen alteraciones que involucran a las células estructurales y los tejidos, como engrosamiento conjuntival, fibrosis subepitelial, neovascularización y cicatrización. Existen muchos elementos que contribuyen a esta respuesta, incluyendo cambios en células epiteliales, depósito de tejido conectivo y la infiltración de células inflamatorias recién mencionada (Leonardi 2002). Además, se ha observado un incremento y sobreexpresión en los niveles de varios factores de crecimiento, citoquinas y enzimas en lágrimas y tejidos, sugiriendo que el proceso de remodelación y fibrosis es regulado por las interacciones de diferentes vías de señalización (Abu El-Asrar *et al.* 2006).

La AKC se define como una condición inflamatoria crónica de la superficie ocular; se produce en cualquier momento del curso de su enfermedad dermatológica acompañante, la dermatitis atópica, independientemente de su grado de severidad y con evidencia de implicación corneal en algún momento de la enfermedad (Foster & Calonge 1990). La enfermedad es bilateral y más simétrica que la VKC en la que la participación de uno de los ojos puede ser mínima mientras que el otro puede estar severamente afectado (Tuft *et al.* 1991). En la AKC hay una mayor susceptibilidad a la infección principalmente por *Staphylococcus aureus* y el virus herpes simplex, resultado de una inmunidad innata comprometida (Baker 2006). Esta inflamación de la superficie ocular causada por la inflamación conjuntival difusa puede producir también complicaciones corneales como alteración de la barrera epitelial, conducente a defectos epiteliales persistentes, una

vascularización corneal progresiva y opacidad estromal anterior. La patogénesis de AKC implica la producción de varias citoquinas por células efectoras que actualmente están bajo investigación ya que sus funciones inmunopatogénicas no están totalmente aclaradas.

- *Participación de las células epiteliales en los procesos de inflamación*

Aunque está claro que gran parte de los efectos observados durante los procesos inflamatorios son debidos a las moléculas secretadas por las células inflamatorias que participan en ellos, no se conoce todavía los mecanismos exactos que conducen al daño observado.

Cada vez es mayor el número de trabajos en los que se demuestra que los epitelios de los órganos afectados desempeñan un papel importante en el proceso inflamatorio y que no se limitan a un mero papel como barrera física (Kato & Schleimer 2007; Schleimer *et al.* 2007). Numerosos artículos señalan la existencia de daño epitelial en aquellos tejidos que se ven afectados por procesos inmune-inflamatorios, como en el asma o en las alergias intestinales (Ahdieh *et al.* 2001; Holgate 2007; Freishtat *et al.* 2011). Se ha demostrado que las células epiteliales de las diferentes mucosas (de las vías aéreas, intestinales, de la superficie ocular...) participan activamente durante los procesos inflamatorios, no solo expresando distintos tipos de moléculas de adhesión y co-estimuladoras sino, además, secretando ellas mismas diversas citoquinas y quimioquinas (Heiman *et al.* 2005; Rimoldi *et al.* 2005; Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2008; Cao *et al.* 2011; Freishtat *et al.* 2011). Dichas moléculas se implican directamente en la iniciación y propagación del fenómeno inflamatorio. Se ha demostrado una implicación directa de las respuestas de las células epiteliales de la mucosa a diferentes mediadores en las características clínicas de enfermedades alérgicas en varios órganos, incluyendo el ojo (Soumelis *et al.* 2002; Doganci *et al.* 2005; Prasad *et al.* 2005; Higuchi *et al.* 2011). La regulación de la participación activa del epitelio puede ser, por tanto, una buena alternativa terapéutica en los casos de inflamación crónica de la superficie ocular.

## **2. CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS**

Las citoquinas son moléculas de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 KDa. Dos importantes características funcionales de las citoquinas son su pleiotropismo, de tal manera que una misma citoquina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares, y su redundancia, es decir, que varias citoquinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular. Las citoquinas son mediadores esenciales de las interacciones entre las células inmunes activadas y las células no inmunes,

incluyendo las células epiteliales y mesenquimales; estos mediadores solubles controlan muchas funciones fisiológicas tales como la proliferación y diferenciación celular, reparación tisular, hematopoyesis y apoptosis (Dinarello 2007). Desempeñan, además, un papel importante en el mantenimiento, coordinación y persistencia de los procesos inflamatorios (Fantini *et al.* 2007), incluyendo aquellos que afectan a la superficie ocular, como por ejemplo el SOS o las conjuntivitis alérgicas (Stern *et al.* 2005a; Stern *et al.* 2005b; Leonardi *et al.* 2006; Leonardi *et al.* 2007). Estas moléculas pueden ser secretadas por diferentes tipos celulares; en concreto, a nivel ocular, no proceden sólo de células inflamatorias sino también de las células residentes en la superficie ocular como las células epiteliales corneales y conjuntivales, las células estromales y células de las glándulas lagrimales principales y accesorias (Zhan *et al.* 2003; Mitsias *et al.* 2006; Enriquez-de-Salamanca & Calonge 2008).

La quimioquinas son proteínas de 8 a 10kDa. Se subclasifican en 4 grupos: alpha (CXC), beta (CC), gamma (C) y delta (CX3C), basados en los espacios entre los residuos de cisteína y el N-terminal. Su acción biológica es mediada por receptores de transmembrana acoplados a proteínas G (Pease & Williams 2006). A pesar de sus bien conocidas propiedades quimioatrayentes y, por tanto, su habilidad de regular el tráfico de células inmunes, estas moléculas también participan en otras actividades, como la hematopoiesis, la angiogénesis, la degranulación, la fagocitosis y la regulación del crecimiento o del desarrollo (D'Ambrosio *et al.* 2003).

Clásicamente, las respuestas celulares de los linfocitos se han dividido en Th1 y Th2, en función del perfil de citoquinas involucradas en ellas (Mosmann & Coffman 1989). La respuesta Th1 se caracteriza por la presencia de las citoquinas interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleuquina (IL)-12 principalmente; activa macrófagos y es responsable de la inmunidad mediada por células, actuando en las respuestas para el control de virus, hongos e infecciones de bacterias intracelulares (Hsieh *et al.* 1993; Scharon & Scott 1993). Por otro lado, la respuesta Th2 se caracteriza por la producción de las citoquinas IL-4, IL-13 e IL-5; se encuentra con frecuencia asociada a enfermedades alérgicas, siendo especialmente importante en la respuesta del huésped a parásitos y helmintos (Min *et al.* 2004). En las respuestas Th2 hay una gran producción de anticuerpos y se promueve el cambio de clase de la IgG<sub>1</sub> a IgE y el reclutamiento de eosinófilos (Shinkai *et al.* 2002) (Fig. 1).

A pesar de que tradicionalmente se ha asumido que las citoquinas Th1 y Th2 son mutuamente inhibitorias, existe una evidencia cada vez mayor de que las interacciones entre estos elementos pueden regular la respuesta inmune. Así, aunque las citoquinas Th1 parecen

estar generalmente más relacionadas con procesos inflamatorios agudos en vez de crónicos, se ha comprobado que se hallan también implicadas en procesos crónicos y cada vez se acepta más la idea de que ambos tipos de citoquinas desempeñan simultáneamente un papel importante en los procesos inflamatorios crónicos (Stern *et al.* 2005b), como por ejemplo en el asma alérgica (Randolph *et al.* 1999; Dahl *et al.* 2004).

La unión de las citoquinas a sus receptores induce la homo o hetero dimerización de éstos y desencadena activación de cascadas de señalización intracelular. La mayoría de citoquinas e interferones median sus efectos a través de la vía de señalización de Janus quinasa (JAK)-STAT. Las proteínas STAT son factores de transcripción citoplasmáticos latentes (*signal transducers and activators of transcription*, STAT). Los STAT activados dimerizan y rápidamente translocan al núcleo, donde inducen la expresión de genes (Ihle 1996). Hasta el momento, siete miembros de la familia de proteínas de mamíferos STAT han sido identificadas (STAT 1- 4, STAT 5a/b y STAT-6) (Copeland *et al.* 1995). Cada miembro de la familia STAT juega un papel crítico en las funciones biológicas de citoquinas específicas. Entre ellos, STAT-1 participa en la señalización de interferones (Durbin *et al.* 1996) mientras que la activación de STAT-6 por IL-4 e IL-13 es esencial para la diferenciación a Th2 (Takeda *et al.* 1996; Kaplan *et al.* 1996).

Se ha descrito que las proteínas STAT no sólo son activadas por receptores de citoquinas, sino por varios receptores, entre los que se incluyen los receptores de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Leaman *et al.* 1996; Boccaccio *et al.* 1998). También se ha descrito la interacción entre miembros de la familia de STAT con SMADs esenciales para la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Nakashima *et al.* 1999). Estos datos sugieren la existencia de una señalización cruzada “*crosstalk*” entre los distintas cascadas de señalización para inducir respuestas biológicas más efectivas.

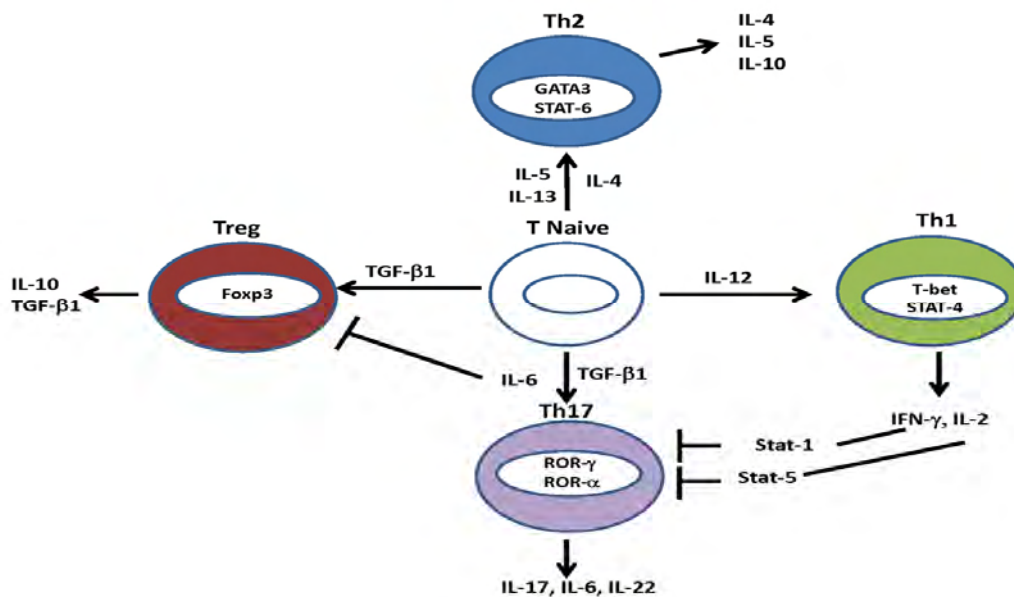
Además de las clásicas respuestas Th1 y Th2 se ha identificado, más recientemente, una nueva subpoblación de células T, llamadas Th17. Las células Th17 son importantes en la respuesta a patógenos bacterianos extracelulares y a hongos, reclutando neutrófilos y macrófagos a los tejidos infectados (Chung *et al.* 2003). Estas células son productoras de IL-17, una citoquina proinflamatoria que promueve a su vez la producción de citoquinas inflamatorias y el reclutamiento de leucocitos, especialmente neutrófilos, creando así una unión entre la inmunidad innata y la adaptativa (Harrington *et al.* 2005; Ouyang *et al.* 2008; Yu & Gaffen 2008). La familia de IL-17 está compuesta de IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E

(CD25) e IL-17F que tienen actividades biológicas solapantes pero no idénticas (Moseley *et al.* 2003;Kolls & Linden 2004). La IL-17A (también conocida como IL-17) y la IL-17F son los miembros de la familia más relacionados con procesos inflamatorios. La IL-17 se ha relacionado con diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, tanto humanas como en modelos animales (Hwang & Kim 2005;Komiyama *et al.* 2006;Chi *et al.* 2008;Luger *et al.* 2008). Se ha demostrado que promueve la producción de IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 y metaloproteinasas (MMP) de la matriz extracelular por diversos tipos de células epiteliales y fibroblastos (Jones & Chan 2002;Yagi *et al.* 2007;Cortez *et al.* 2007). La expresión de IL-17F también está relacionada con procesos inflamatorios, sin embargo, parece tener una actividad más débil que IL-17 (Chang & Dong 2007;Wright *et al.* 2007). Se ha observado que la IL-17 señala a través de un complejo receptor heteromérico formado por IL-17R (IL-17RA) e IL-17RC que son proteínas de transmembrana simples expresadas en una gran variedad de tipos celulares, principalmente células epiteliales, endoteliales y estromales. El receptor IL-17RA se puede unir tanto a IL-17A como a IL-17F pero con diez veces mayor afinidad a IL-17A. Existen además otros tres receptores adicionales denominados IL-17RB, IL-17RD e IL-17RE. En su vía de señalización, la IL-17 activa el factor de transcripción ROR $\gamma$ t (Ivanov *et al.* 2006).

Por otra parte, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citoquina pro-inflamatoria, producida principalmente por macrófagos en respuesta a daño tisular o a infección, pero también es producida por numerosos tipos celulares, células epiteliales entre ellos. Es un regulador clave de la inflamación y juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas (McInnes & Schett 2007). La activación de NF- $\kappa$ B y proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) determinan la respuesta de las células a la estimulación con TNF- $\alpha$ , que induce una señalización proinflamatoria. Los factores de transcripción NF- $\kappa$ B están presentes en el citosol en un estado inactivo formando un complejo con las proteínas inhibitoras I $\kappa$ B. La activación de I $\kappa$ B por fosforilación, produce la liberación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y activa la transcripción de genes que tienen funciones importantes en la regulación de la respuesta inflamatoria e inmune, incluyendo citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión y otras proteínas inmunoreguladoras (Bond *et al.* 2001).

Además de las subpoblaciones efectoras Th1, Th2 y Th17, existe una subpoblación de linfocitos reguladora (Treg) (Fig. 1), la cual suprime la respuesta de las células T adaptativa y previene la autoinmunidad promovida por TGF- $\beta$  (Sakaguchi 2000;Chen *et al.* 2003). Esta

subpoblación se caracteriza por la expresión del factor de transcripción Foxp3 y por la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$ .



**Figura 1: Diferenciación de células Th.** Dependiendo de la combinación y nivel de citoquinas, las células T naive se diferencian a diferentes líneas: Th1, Th2, Th17 y Treg. Así, IL-12 induce la respuesta Th1, e IL-4 junto con IL-13 favorece la diferenciación Th2. TGF- $\beta$  promueve el desarrollo de células Treg y diferencia células T naive a células Th17 junto con IL-6. Imagen adaptada de “Th17 cells in inflammation” Kimura *et al.* International Immunopharmacology 2011; 11: 319–322.

## 2.1 Citoquinas y quimioquinas en procesos inflamatorios de la superficie ocular

A nivel ocular, la respuesta de células epiteliales corneales y conjuntivales a estas citoquinas y quimioquinas parece ser también uno de los factores que participan en el reclutamiento de células inflamatorias específicas y en la perpetuación del proceso inflamatorio. Al igual que ocurre en otros tejidos mucosos, se ha observado que en los tejidos de la superficie ocular, estas moléculas producen a su vez una modificación de la secreción de citoquinas y quimioquinas por las células epiteliales (Stahl *et al.* 2003; Smit *et al.* 2003; Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2008), así como la regulación de la expresión de varias proteínas de adhesión intercelular (Calonge *et al.* “Specific patterns of conjunctival epithelial barrier alteration induced by Th1 versus Th2 cytokines.” ARVO meeting abstract Mayo 2006, Contreras-Ruiz *et al.* “Structural and Functional Alteration of Corneal Barrier under Inflammatory Conditions” Current Eye Research 2012. *En prensa*) y de moléculas coestimuladoras que participan en el reclutamiento y activación de células del sistema inmunitario (Siemasko *et al.* 2005).

Varios estudios han observado unos niveles de citoquinas y quimioquinas elevados tanto en lágrimas como en epitelio corneal y/o conjuntival de pacientes con inflamación de la superficie ocular (Uchio *et al.* 2000;Sack *et al.* 2007;Enriquez-de-Salamanca & Calonge 2008). Así, varias citoquinas, entre las que se encuentran IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , se han encontrado incrementadas tanto en el epitelio conjuntival como en el fluido lagrimal de pacientes con SOS (Barton *et al.* 1998;Pflugfelder *et al.* 1999;Yoon *et al.* 2007;Lam *et al.* 2009;Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2010). En esos trabajos, varios estudios de correlación revelaron asociaciones entre los niveles de algunas de estas citoquinas y quimioquinas con parámetros clínicos como el tiempo de ruptura lagrimal, el aclaramiento lagrimal, el daño en la superficie corneal, la densidad de células conjuntivales, la tinción corneal con fluoresceína y la severidad de los síntomas de irritación (Yoon *et al.* 2007;Lam *et al.* 2009;Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2010).

La conjuntivitis alérgica se considera como una clásica respuesta inflamatoria de la superficie ocular de tipo Th2. Diversos trabajos han señalado a las citoquinas tipo Th2 como moléculas especialmente críticas en el desarrollo de los procesos alérgicos. Entre ellas, tanto la IL-4 como la IL-13 parecen hallarse directamente implicadas en la alteración de la barrera epitelial (Fujishima *et al.* 1995;Uchio *et al.* 2000)y así, la mayor parte de la patología observada se podría atribuir a un efecto directo de estas citoquinas en el epitelio.

En la superficie ocular, también se han observado interacciones entre citoquinas Th1 y Th2 que podrían regular la respuesta inmune. Así, se ha relacionado citoquinas Th1 con procesos inflamatorios crónicos de la superficie ocular (Stern *et al.* 2005b). Se ha atribuido un papel importante para el IFN- $\gamma$  producido por las células Th1 en un modelo murino de conjuntivitis alérgica crónica y en la fase inflamatoria de las enfermedades alérgicas crónicas (Leonardi *et al.* 2006). Se ha observado además que, en la VKC, tanto los niveles de TNF- $\alpha$  en lágrima como las células positivas para TNF- $\alpha$  están incrementadas. La correlación de estos niveles de TNF- $\alpha$  con la severidad de la enfermedad sugiere, por tanto, un importante papel para esta citoquina en las formas severas de conjuntivitis alérgica (Leonardi *et al.* 2003).

Finalmente, se ha observado que la IL-17 desempeña un papel importante en las enfermedades de la superficie ocular (Kang *et al.* 2011). Así, se ha descrito una asociación entre los linfocitos Th17 o la IL-17 con enfermedades inflamatorias oculares tales como uveítis (Yoshimura *et al.* 2009), escleritis (Amadi-Obi *et al.* 2007), SOS (Chauhan *et al.* 2009;Kang *et al.* 2011), así como con un modelo murino experimental de SOS (Zheng *et al.* 2010a). En concreto, se ha puesto de manifiesto su implicación en la alteración de la barrera epitelial en la patología del SOS humano y animal, a través de la secreción de MMPs (de Paiva *et al.* 2009). Además,



parece que las células Th17 juegan un papel importante en la inflamación corneal inicial inducida por herpes virus como se ha visto a nivel experimental (Molesworth-Kenyon *et al.* 2008).

### 3. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA, TGF- $\beta$

#### 3.1 Funciones, isoformas y activación de TGF- $\beta$

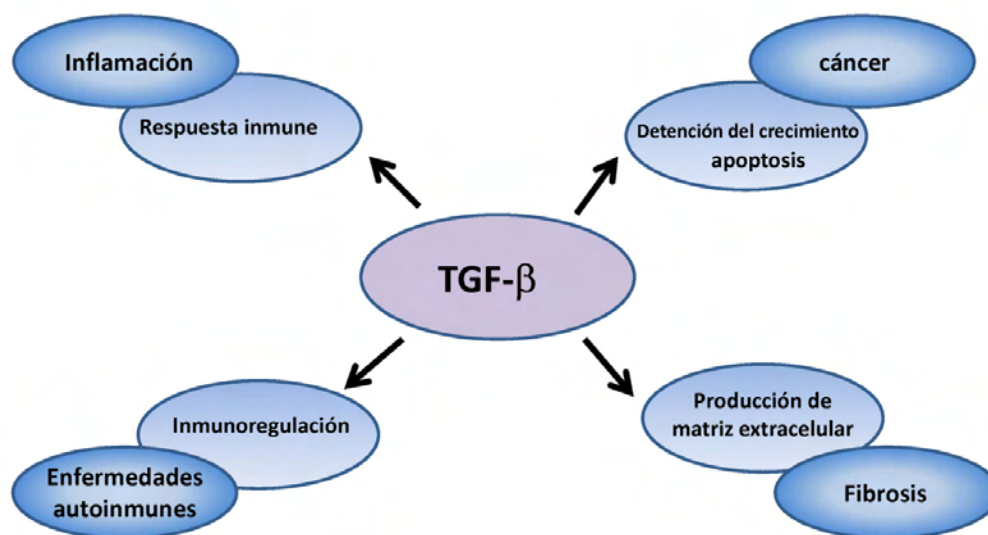
- *Funciones de TGF- $\beta$*

Entre las numerosas moléculas implicadas en los procesos de inflamación, destaca el factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ), que es secretado por diversos tipos celulares, células epiteliales entre ellos (Peralta-Zaragoza *et al.* 2001).

La familia del TGF- $\beta$  incluye un gran número de factores, estructural y funcionalmente relacionados, que actúan como reguladores multifuncionales de un amplio rango de procesos biológicos. Los miembros de la familia del TGF- $\beta$  están implicados, entre otras cosas, en la morfogénesis, el desarrollo embrionario, la proliferación celular, la regulación inmune, la reparación de tejidos, la inflamación y el cáncer (Massague 1990) (Fig. 2). El primer miembro de la familia, TGF- $\beta$ , fue descubierto en 1983 por su capacidad para “transformar” el crecimiento de fibroblastos en cultivo (Assoian *et al.* 1983; Sporn 2006). Hasta el momento, se conocen más de 40 miembros de esta familia entre los que se encuentran las proteínas morfogenéticas del hueso (*bone morphogenetic proteins*, BMPs), los factores de diferenciación y crecimiento (*growth and differentiation factors*, GDFs), el factor inhibidor Mülleriano (*Müllerian inhibitory factor*, MIF), activinas o inhibinas (Wharton & Derynck 2009).

El TGF- $\beta$  es una proteína de 25Kda y es considerado como una citoquina multifuncional debido a los efectos que tiene sobre los diferentes tipos celulares. Es el inhibidor más potente de proliferación en células mieloides, mesenquimales, epiteliales, linfoides, endoteliales y en varios tipos de células malignas. Alternativamente, puede estimular la proliferación de fibroblastos normales a células no epiteliales y cierto tipo de células mesenquimales (Sporn & Roberts 1992). Es también un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular (MEC) por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales; además, induce la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de matriz extracelular (Barnard *et al.* 1990). El TGF- $\beta$  también induce otros eventos intracelulares, tales como la regulación de factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular. En resumen, el TGF- $\beta$  tiene un espectro muy amplio de funciones, las

cuales dependen del estado de activación celular, de su concentración, del equilibrio de expresión de otras citoquinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa. Por este motivo, la distribución celular de su expresión *in situ* e *in vivo* está directamente asociada con el estado de diferenciación celular.



**Figura 2. TGF-β como un regulador multifuncional.** El TGF-β inhibe el crecimiento celular y promueve la apoptosis, estimula la producción de matriz extracelular, regula la proliferación y la diferenciación de células endoteliales y regula la proliferación, la diferenciación y la activación de células inmunes. La alteración de la señalización del TGF-β se ha relacionado con varias enfermedades humanas, como cáncer, fibrosis, inflamación y enfermedades autoinmunes.

- *Isoformas de TGF-β*

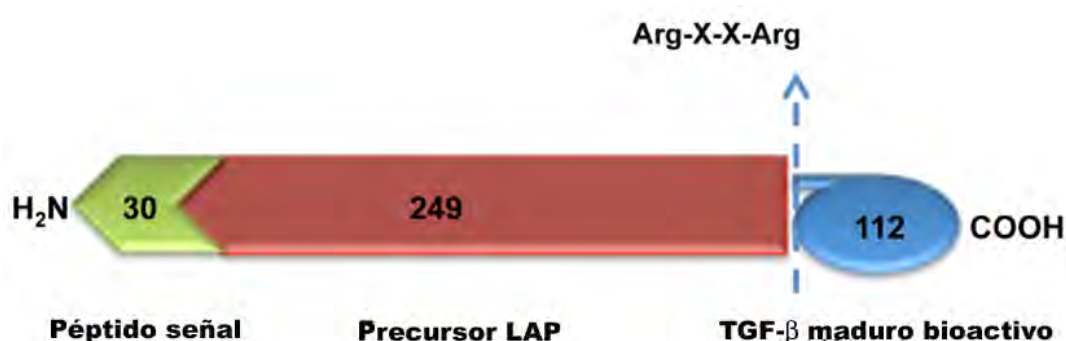
Existen cinco isoformas del TGF-β, designadas como TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 y TGF-β5. En mamíferos, se han descrito las isoformas 1, 2 y 3, codificadas en cromosomas diferentes (19q13, 1q41 y 14q24 en humanos, respectivamente). Las isoformas 4 y 5 se han identificado en aves y algunos mamíferos, respectivamente (Cheifetz *et al.* 1990).

Existe una homología del 70% de aminoácidos entre las isoformas TGF-β1 y TGF-β2, y del 79% entre las isoformas TGF-β2 y TGF-β3 (Massague *et al.* 1987). La comparación de las estructuras del TGF-β1 y del TGF-β2 muestran mucha similitud conformacional; sin embargo, hay diferencias notables en la estructura local y en la flexibilidad, lo cual puede estar relacionado con diferencias en la unión al receptor y en las señales de transducción inducidas (Wozney *et al.* 1988; Massague 1990).

- *Estructura y activación de TGF- $\beta$*

Las tres isoformas del TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3) son sintetizadas como proteínas precursoras inactivas y contienen nueve residuos de cisteínas en el extremo C-terminal (Massague *et al.* 1987). A partir de estos precursores se originan las formas maduras activas del factor. El precursor del TGF- $\beta$  (Pro- TGF- $\beta$ ) es de 391 aminoácidos y son los 112 residuos localizados en el extremo carboxilo-terminal los que constituyen la forma madura. Los residuos restantes, localizados en la porción amino-terminal, constituyen el llamado péptido asociado de latencia o simplemente LAP (*latency associated peptide*) (Fig. 3) (Barnard *et al.* 1990). Como parte de su proceso de secreción, el pro-TGF- $\beta$  sufre proteólisis, mediada por una endopeptidasa, la cual rompe el enlace peptídico entre el factor maduro y el LAP. El LAP tiene un papel importante para mediar el plegamiento correcto y la dimerización de las regiones maduras, y es necesario para un procesamiento postraduccional eficiente.

El TGF- $\beta$  procesado es secretado como un complejo latente formado por la asociación no covalente entre el LAP y la región madura de la molécula. En el complejo latente el TGF- $\beta$  carece de actividad, presumiblemente porque su asociación con el LAP le impide unirse a su receptor. Para que el TGF- $\beta$  se active es indispensable que se disocie del LAP; este proceso puede producirse por varios factores, como cambios de temperatura o de pH (Caestecker M. 2004). Una vez liberado, el TGF- $\beta$  tiene una vida media corta. El TGF- $\beta$  activo puede ser degradado por proteasas y elastasas en el sitio de la inflamación.



**Figura 3. Representación esquemática de la estructura del pro-TGF- $\beta$ .** Una región N-terminal hidrofóbica que actúa como péptido señal (30 aminoácidos), la región del péptido asociado de latencia (LAP) (249 aminoácidos) y el C-terminal (112 aminoácidos), que corresponde con la región madura bioactiva del TGF- $\beta$ . El punto de escisión entre el factor maduro y el LAP corresponde a una secuencia que incluye dos argininas separadas por dos aminoácidos. Imagen adaptada de "Role of transforming growth factor beta in corneal function, biology and pathology" Tandon *et al.* *Curr Mol Med.* 2010; 10: 565–578.

### 3.2 Receptores de TGF- $\beta$

Se han identificado tres tipos diferentes de receptores (R) para el TGF- $\beta$  en humanos. Estos receptores pueden ser funcionales o no funcionales.

1) Los receptores funcionales: incluyen el tipo I, TGF- $\beta$  RI con un peso molecular de 53 a 65 kDa, y el tipo II, TGF- $\beta$  RII con un peso molecular de 83 a 110 kDa. Los receptores tipo I reciben otros nombres, uno de los cuales es quinasa tipo de receptor de activina (*activin receptor-like kinase*, ALK). Existen algunas diferencias entre los receptores tipo I y II que se basan en la conservación de los dominios con actividad de quinasa y la presencia de un dominio serina/treonina (dominio GS) que se encuentra anclado a la membrana en el receptor tipo I y el cual es crítico para su activación (Massague 1996).

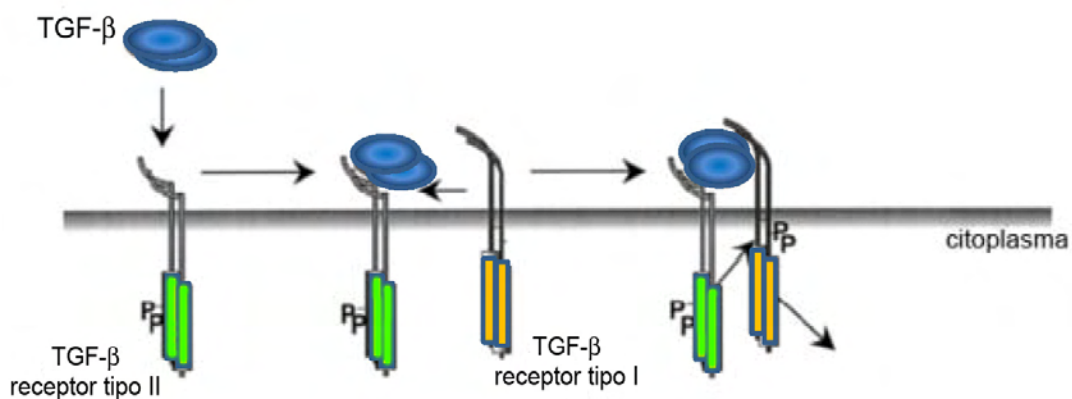
Respecto a la cooperación entre TGF- $\beta$  RI y TGF- $\beta$  RII, existe una dependencia funcional entre ambos; el receptor TGF- $\beta$  RI requiere de TGF- $\beta$  RII para unirse al ligando, mientras que TGF- $\beta$  RII requiere de TGF- $\beta$  RI para la señalización funcional. En presencia del TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$  RI y TGF- $\beta$  RII tienen la habilidad para interactuar uno con otro y formar un complejo tetramérico a través del cual se transducen las señales. Este complejo molecular es la unidad receptora de señales que media las respuestas biológicas del TGF- $\beta$  (Feng & Derynck 1996; Massague 1996). En este complejo, la región citoplásmica de TGF- $\beta$  RII está constitutivamente fosforilada, y fosforila el dominio GS de TGF- $\beta$  RI, lo cual induce su actividad quinasa (Fig. 4). Las regiones intracelulares de ambos receptores tienen funciones distintas y ambas son necesarias para la transducción de señales (Massague 1996). Las regiones transmembranal y extracelular son requeridas por TGF- $\beta$  RI y TGF- $\beta$  RII para la activación dependiente del ligando. La unión del TGF- $\beta$  estabiliza el complejo y genera respuestas fisiológicas adecuadas en una forma dependiente del ligando. La expresión anormal de TGF- $\beta$  RI y TGF- $\beta$  RII puede contribuir a la formación de complejos activos, produciendo una señalización independiente del ligando y, en consecuencia, respuestas celulares inapropiadas (Feng & Derynck 1996).

2) Los receptores no funcionales: incluyen el tipo III, TGF- $\beta$  RIII de peso molecular 250 a 310 kDa, también llamado betaglicano, y la endogлина. Se consideran “co-receptores” del TGF- $\beta$ , ya que aunque no son requeridos para la generación de su señal, son capaces de modularla al controlar la interacción del TGF- $\beta$  con los receptores funcionales (Massague 1992). El betaglicano tiene un gran dominio extracelular y un dominio de señalización intracelular corto y puede estar anclado a la membrana o ser secretado en forma soluble (Caestecker M. 2004); se puede unir a todas las isoformas del TGF- $\beta$ , y juega un papel selectivo al facilitar la

interacción del TGF- $\beta$ 2 con el TGF- $\beta$  RII (Derynck & Zhang 2003), ya que TGF- $\beta$ 2 tiene menos afinidad por el TGF- $\beta$  RII que TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 3 (Cheifetz *et al* 1990; Sankar *et al* 1995). La endogлина es similar a los betaglicanos y se une a los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 (Cheifetz *et al.* 1990).

Los efectos de las isoformas del TGF- $\beta$  están asociados a su disponibilidad, a la combinación de los tipos de receptores y a la vía de señalización intracelular que inducen (Wrana *et al.* 1992).

En ausencia de ligando, los receptores tipo I y II existen como homodímeros en la superficie celular. Los complejos del receptor son heterotetraméricos y consisten en dos receptores tipo II a los cuales se une el ligando, y dos receptores tipo I, que transmiten la señal de transducción. El ensamblaje del complejo heteromérico es iniciado por la unión del ligando y estabilizado por las interacciones entre los dominios citoplásmicos de los receptores tipo I y II.



**Figura 4. Activación de los receptores de TGF- $\beta$ .** El ligando se une inicialmente al RII de TGF- $\beta$ . Esto puede ser reconocido por el RI, que es reclutado al complejo. Posteriormente, el RII-quinasa activo fosforila y activa el RI de TGF- $\beta$ , que propagará la señal. Imagen adaptada de “Transforming growth factor  $\beta$  signal transduction” Dennler *et al.* Journal of Leukocyte Biology 2002; 71: 731-740.

### 3.3 Principales vías de señalización del TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  funciona como una proteína reguladora transmitiendo su función de la superficie celular al núcleo a través de la transducción de señales moleculares. Tras la unión a los receptores de la superficie celular, el TGF- $\beta$  inicia la transducción de la señal a través de la fosforilación de proteínas citoplasmáticas. Esta señal es transportada al núcleo donde activa o reprime la transcripción de genes diana que conducen a diferentes respuestas celulares. La respuesta de señalización del TGF- $\beta$  incluye tanto vías canónicas, a través de proteínas SMAD, como no canónicas (Derynck & Zhang 2003). La integración de estas vías de señalización determina las respuestas celulares al TGF- $\beta$ .

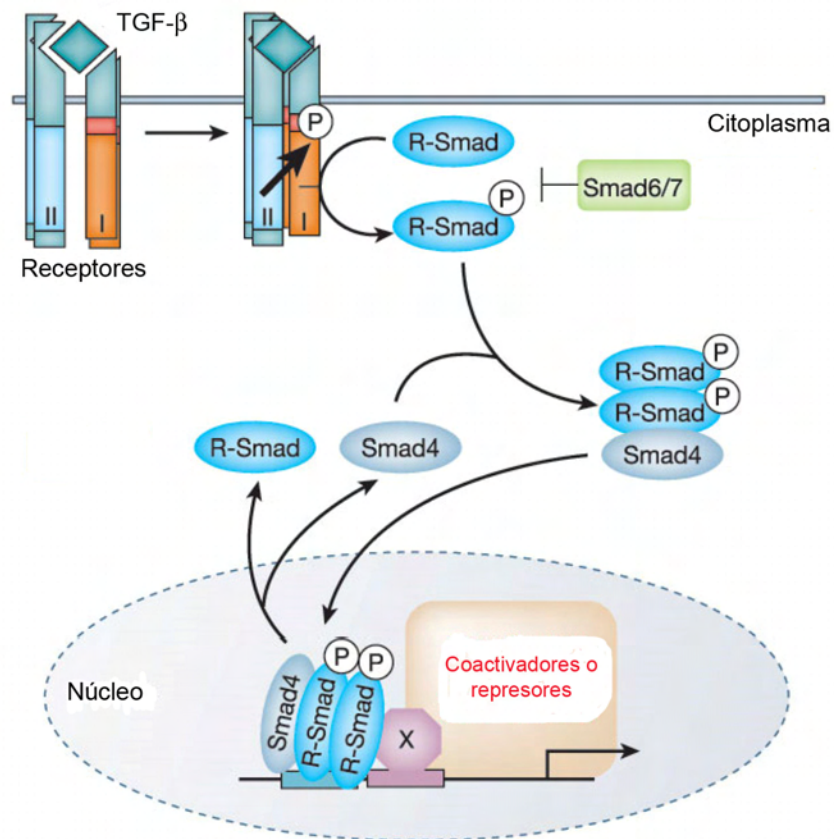
- *Vía de señalización canónica: señalización dependiente de proteínas SMAD*

Las proteínas SMAD (homólogas de la proteína de *Drosophila*, *mothers against decapentaplegic* (MAD) y la proteína de *C. elegans*, SMA) han sido identificadas como las principales transductoras de la señalización del TGF- $\beta$ , mediando la señalización del receptor desde la superficie celular hasta los genes diana en el núcleo (Heldin *et al.* 1997; Whitman 1997; Derynck *et al.* 1998).

Se han descrito ocho proteínas SMAD en vertebrados con tres funcionalidades distintas: 1) SMAD activadas por el receptor, o R-SMADs (SMAD-1, -2, -3, -5 y -8), 2) SMAD mediadora común o C-SMAD (SMAD-4) y, 3) las SMAD inhibitorias o I-SMADs (SMAD-6 y 7) (Whitman 1997; Roberts 1999; Derynck & Zhang 2003).

En esta vía, la fosforilación en el receptor tipo I activa a las quinasas que fosforilan a los factores de transcripción SMAD-2 y SMAD-3 en su segmento C-terminal; una vez fosforilados, se liberan del complejo del receptor y forman un complejo con SMAD-4 para trasladarse del citoplasma hacia el núcleo, donde interactúan de una manera específica con otros factores de transcripción como AP-1, regulando la transcripción de genes de respuesta al TGF- $\beta$  para llevar a cabo sus funciones biológicas (Fig. 5) (Caestecker M. 2004).

Las I-SMADs, o SMAD inhibitorias, tienen también un papel importante en la regulación de la respuesta inducida por TGF- $\beta$ . La síntesis de las SMADs inhibitorias (SMAD 6 y 7) es inducida por el TGF- $\beta$ , lo cual sugiere que hay un mecanismo de autorregulación negativa intracelular que regula la señal del TGF- $\beta$  (Hayashi *et al.* 1997; Nakao *et al.* 1997). Las SMAD 6 y 7 interactúan con TGF- $\beta$  RI en una manera más estable que las SMAD 2 y 3, compitiendo por la unión con el receptor. La sobreexpresión de las SMAD 6 o 7 inhibe la fosforilación de las SMAD 2 y 3 estimulada por el ligando, lo cual sugiere que las SMAD 6 y 7 tienen propiedades inhibitorias, ya que pueden bloquear la señalización en puntos tempranos de la vía de transducción de señal inducida por el TGF- $\beta$ . En general, SMAD-7 puede ser considerada como inhibidor de la señalización de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Whitman 1997) (Fig. 5).

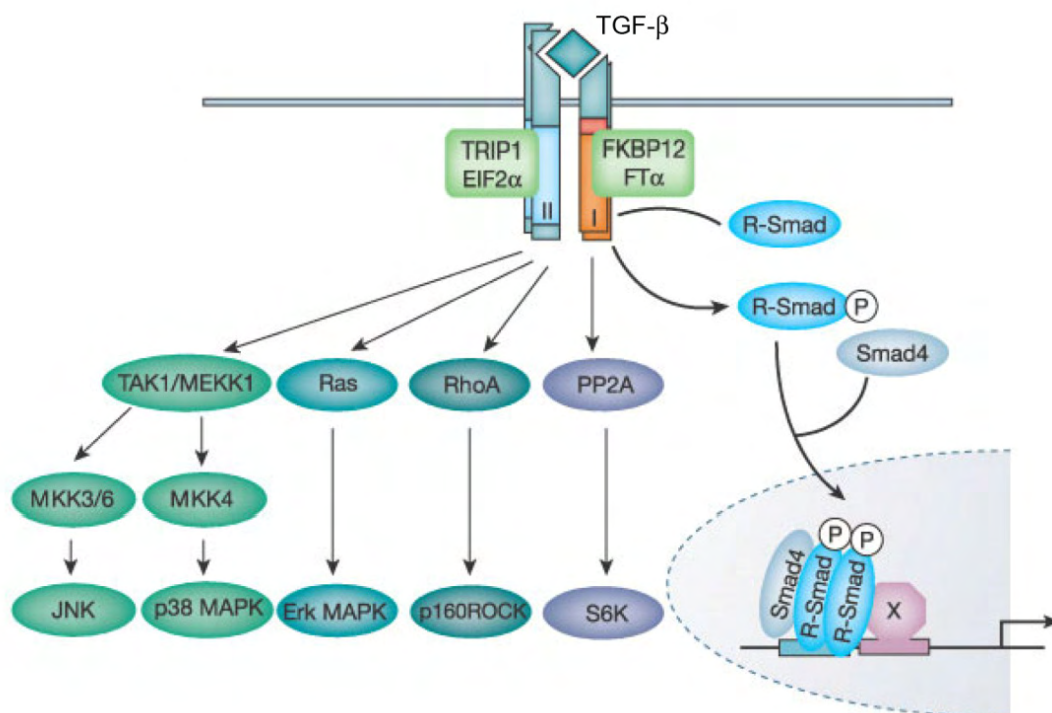


**Figura 5. Modelo de la vía de transducción de señal canónica por SMAD inducida por el TGF- $\beta$ .** El TGF- $\beta$  se une al TGF- $\beta$  RII para formar un complejo activo con el receptor I. Este complejo tetramérico fosforila a las SMAD 2 y 3 (R-SMADs), las cuales se asocian con la SMAD 4. El complejo de las SMAD 2-3-4 activo es traslocado al núcleo donde funciona como un coactivador transcripcional de genes de respuesta al TGF- $\beta$ . Las SMAD 6 y 7 pueden interactuar con TGF- $\beta$  RI y RII e impedir que se fosforilen SMAD2 y 3. Imagen adaptada de “Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling” Derinck *et al.* Nature 2003; 425: 577-58.

- *Vías de señalización no canónicas: señalización independiente de proteínas SMAD*

Uno de los mecanismos subyacentes a la multifuncionalidad y la complejidad de la acción del TGF- $\beta$  es que puede señalizar a través de otras vías no SMAD, tales como a través de la activación de las GTPasas pequeñas (Rho-like GTPasas), MAP quinasa (*mitogen-activated protein kinase*) (MAPK): p38, Jun N terminal quinasa (JNK) y la vía de señalización Ras-Erk-MAPK; la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K/Akt) así como la vía de la protein-fosfatasa PP2A (Fig. 6)(Derynck & Zhang 2003;Zhang 2009). Algunas de estas vías regulan la activación de SMAD pero otras podrían inducir respuestas no relacionadas con la transcripción. La activación inducida por TGF- $\beta$  de las vías Erk y JNK puede producir la fosforilación de SMAD y regular su

activación (Funaba *et al.* 2002). Además, la activación inducida por TGF- $\beta$  de la vía de señalización MAPK Ras/Erk puede inducir expresión de TGF- $\beta$ , por tanto amplificando su respuesta e induciendo respuestas secundarias (Yue & Mulder 2000). La activación de MAPK por TGF- $\beta$  puede afectar también respuestas de transcripción a través de efectos directos en factores de transcripción que interactúan con SMAD (Moustakas & Heldin 2005). Además, también se ha visto que la capacidad dual de TGF- $\beta$  de activar SMADs y la señalización de MAPK también tiene un papel importante en la transdiferenciación epitelio-mesenquimal inducida por TGF- $\beta$  (Bakin *et al.* 2002). Aunque esta convergencia a menudo produce cooperatividad, estas vías también pueden contrarrestarse una con otra (Pessah *et al.* 2002). Así, el equilibrio entre la activación directa de SMADs y las vías de señalización MAPK a menudo define las respuestas celulares al TGF- $\beta$ .



**Figura 6. Vías de señalización no canónicas del TGF- $\beta$ .** Además de las proteínas que interactúan con los receptores y SMAD, otras proteínas como TRIP1 y FKBP12 pueden asociarse con los receptores tipo I y II y regular la señalización del TGF- $\beta$ . Además, el complejo receptor activado activa vías de señalización no-SMAD como MAPK, RhoA, TAK y PP2A. Imagen adaptada de “Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling” Derinck *et al.* Nature 2003; 425: 577-58.



#### 4. EFECTO DEL TGF- $\beta$ SOBRE LA FUNCIONALIDAD CELULAR: TGF- $\beta$ COMO MOLÉCULA “BIPOLAR”

En principio se tiende a considerar como beneficiosa la presencia del TGF- $\beta$  en el desarrollo de los procesos inflamatorios, dadas sus propiedades inmunosupresoras sobre células inflamatorias y por implicarse en la generación de linfocitos T reguladores (Treg), además de ser una de las principales moléculas secretadas por ellos (Chen *et al.* 2003). El TGF- $\beta$  actúa inhibiendo la presentación y procesamiento de antígenos y suprimiendo la activación de linfocitos T, en particular de los linfocitos T autoreactivos, para restablecer la homeostasis del sistema inmunitario y prevenir la autoinmunidad (Gorelik & Flavell 2002).

Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto que su presencia puede ser perjudicial, ya que este factor posee además propiedades proinflamatorias (Wahl 2007). Así, al margen de sus propiedades pro-fibrinogénicas, se ha descrito, una potente actividad quimiotáctica del TGF- $\beta$  para mastocitos (Wahl 2007), así como para linfocitos y monocitos (Adams *et al.* 1991). Se ha demostrado además, que la presencia del TGF- $\beta$ , conjuntamente con otras citoquinas como son IL-6, IL-23 y/o IL-1 $\beta$  se implica en la transformación de linfocitos nativos a linfocitos Th17, un tipo celular altamente pro-inflamatorio tanto en ratón (Bettelli *et al.* 2006; Mangan *et al.* 2006) como en humano (Volpe *et al.* 2008; Manel *et al.* 2008). La combinación de TGF- $\beta$  e IL-4 parece también tener un papel fundamental en la activación de la secreción por linfocitos de IL-9 (Beriou *et al.* 2010), una citoquina involucrada en el desarrollo de la inflamación y la mediación de la destrucción tisular y relacionada con la fisiopatología de enfermedades alérgicas (Soussi-Gounni *et al.* 2001; Nowak *et al.* 2009).

- *TGF- $\beta$  y secreción de citoquinas*

Además de los efectos sobre células inflamatorias, el TGF- $\beta$  también actúa sobre células epiteliales. Así, se ha descrito que la exposición a TGF- $\beta$  modifica las respuestas de quimioquinas por las células epiteliales de las vías respiratorias humanas incrementando la secreción de GM-CSF y de RANTES por éstas, favoreciendo por tanto la eosinofilia y el reclutamiento de linfocitos y monocitos, característicos de la inflamación alérgica y crónica (Jagels & Hugli 2000). También se ha relacionado el TGF- $\beta$  con la estimulación de la secreción por células epiteliales de la córnea humana de algunas metaloproteinasas, colagenasas y estromelinas, capaces de hidrolizar prácticamente todos los componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal (Kim *et al.* 2004). Estas enzimas están directamente

involucrados en la patogénesis de enfermedades de la superficie ocular (Pflugfelder *et al.* 2005;Chotikavanich *et al.* 2009).

El TGF- $\beta$  se ha relacionado con el daño en el tejido bronquial en la bronquitis obliterante y en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, mediando la disminución en la secreción de la molécula inhibidora de proteasas SLPI (*secretory leucocyte proteinase inhibitor*) por células epiteliales bronquiales (Jaumann *et al.* 2000;Luo *et al.* 2008). Una disminución en la expresión de esta molécula se ha relacionado con un incremento en el daño causado por dichas proteasas.

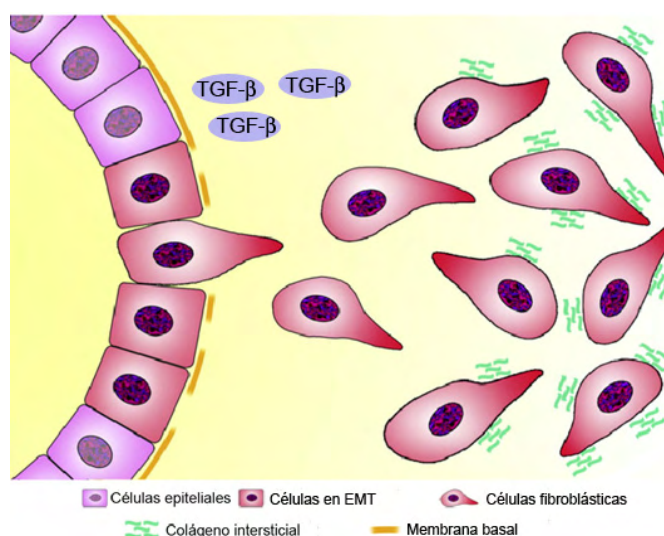
- *TGF- $\beta$  y receptores tipo Toll*

Varios estudios han demostrado que el TGF- $\beta$  provoca cambios en la expresión de receptores tipo Toll (Toll like receptors, TLR) en modelos murinos (Cartney-Francis *et al.* 2004;Mou *et al.* 2004). Estos receptores son esenciales en la activación de la inmunidad innata y se ha demostrado que los TLRs contribuyen a los procesos inflamatorios, tanto a través del reconocimiento de ligandos exógenos de microorganismos, como a través del reconocimiento de ligandos endógenos, llamados alarmitas o patrones moleculares asociados a daño (danger-associated molecular patterns, DAMPs), liberados de tejidos dañados o necróticos (Marshak-Rothstein 2006). Niveles aumentados de estos DAMPs han sido asociados con varias enfermedades inflamatorias, tanto a nivel extraocular (sepsis, artritis, aterosclerosis, lupus, enfermedades inflamatorias intestinales y cáncer) (Foell *et al.* 2008;Ehrchen *et al.* 2009) como a nivel ocular. En concreto, dos miembros de la familia de proteínas S100 (S100A8 y S100A9), identificados recientemente como importantes DAMPs endógenos, se han visto aumentados en enfermedades inflamatorias de la superficie ocular, como el SOS (Zhou *et al.* 2009b), la uveítis anterior aguda y recurrente (Wakefield *et al.* 2009) y el pterigium (Zhou *et al.* 2009a). Estas moléculas han sido identificadas como activadores endógenos del TLR-4, y no sólo participarían en la respuesta inflamatoria en infección, sino que actuarían como potentes amplificadores de inflamación (Ehrchen *et al.* 2009). Se ha sugerido también la participación de TLRs en enfermedades inflamatorias de la superficie ocular, ya que se ha visto modificada su expresión en la conjuntiva de pacientes afectados con VKC activa (Bonini *et al.* 2005), estando incrementada la expresión del receptor TLR-4 y disminuía la expresión de TLR-9 en la conjuntiva de dichos sujetos, respecto al epitelio conjuntival de sujetos sanos.

- *Efecto del TGF- $\beta$  sobre la transición epitelio-mesenquimal*

El proceso conocido como transición epitelio-mesenquimal (EMT) parece ser inducido por la acción integrada de los muchos estímulos entre los que se encuentra el TGF- $\beta$  (Miettinen *et al.* 1994; Piek *et al.* 1999; Bhowmick *et al.* 2001).

Varios indicios sugieren que a través de este proceso, las células epiteliales pueden cambiar su fenotipo y adquirir propiedades mesenquimales. Las células epiteliales perderían la cohesión intercelular y translocarían desde el compartimiento epitelial al intersticio donde adquiriendo un fenotipo mesenquimal completo, podrían participar en la síntesis de la matriz fibrosa (Fig. 7) (Guarino 1995; Kalluri & Neilson 2003). Los marcadores de epitelio en fase de transición epitelio-mesenquimal incluyen la menor expresión de e-cadherina, responsable de la pérdida de adhesión célula-célula y el posterior desprendimiento del epitelio (Thiery & Sleeman 2006; Lee *et al.* 2006b), así como la expresión de novo de proteínas mesenquimales como la proteína específica de fibroblastos (*fibroblast specific protein 1*, FSP1), vimentina y la actina del músculo liso alfa ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA) (Yang *et al.* 2003; Zavadil *et al.* 2008).



**Figura 7. Transición epitelio mesenquimal (EMT).** A la izquierda, en reposo las células epiteliales están fuertemente cohesionadas y separadas del intersticio por la membrana basal. Determinados estímulos, como el TGF- $\beta$ , producen que algunas células epiteliales se preparen para la EMT, lo que conlleva la degradación de la membrana basal, la pérdida de la cohesión célula-célula, aumento de la motilidad, cambio de la forma celular y, por último, la migración hacia el intersticio (centro). Aquí, una vez alcanzado un fenotipo completamente mesenquimal, las células derivadas de la EMT podrían participar en la producción de la matriz fibrosa. Imagen adaptada de “Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition” Guarino *et al.* Human Pathology 2009; 40: 1365–1376.

Las consecuencias de la transición epitelio-mesenquimal en enfermedades crónicas podría ser doble: por un lado, mediante la generación de nuevas células mesenquimales, que podrían incrementar el número cada vez mayor de fibroblastos intersticiales / miofibroblastos responsables de la acumulación de matriz, por otro lado, podría causar la pérdida de las células epiteliales, por lo tanto, contribuir a la destrucción del parénquima. Por lo tanto, en un microambiente inflamatorio, el TGF- $\beta$  podría actuar como potente inductor de la EMT y pueden tener un papel importante en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias de la superficie ocular.

- *TGF- $\beta$  y proteínas de unión estrecha*

El TGF- $\beta$  también parece estar relacionado con la regulación de las proteínas de unión estrecha (*Tight Junctions*, TJ). Estas proteínas son esenciales para la función de barrera epitelial y la adhesión epitelial, y constituyen una barrera física anatómica al movimiento de agua, solutos, moléculas grandes y células (Lee *et al.* 2006a). Se ha demostrado que una expresión alterada de las TJ está asociada con una pérdida de la función de barrera (Capaldo & Nusrat 2009). Se ha sugerido que la exposición a TGF- $\beta$ 1 afecta la barrera de TJ y modifica su patrón de distribución (Woo *et al.* 1996;Lui *et al.* 2001;Pierucci-Alves *et al.* 2011). A nivel ocular, el TGF- $\beta$  también se ha relacionado con la regulación de proteínas TJ en el epitelio corneal, y por extensión en la pérdida de la integridad funcional, ya que se ha visto que bajo tratamiento *in vitro* con TGF- $\beta$ , las células epiteliales corneales modifican la expresión y distribución de sus proteínas de unión estrecha (Contreras-Ruiz *et al.* "Structural and Functional Alteration of Corneal Barrier under Inflammatory Conditions" Current Eye Research 2012. *En prensa*).

## **5. TGF- $\beta$ Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS EN LA SUPERFICIE OCULAR**

Tanto un aumento como una disminución en la producción de TGF- $\beta$  se ha relacionado con diferentes condiciones patológicas. En particular, se ha observado que la expresión de TGF- $\beta$  está incrementada en diversas enfermedades inflamatorias crónicas y fibróticas como fibrosis pulmonar, asma, artritis reumatoide y enfermedad de Crohn (Vignola *et al.* 1997;Gordon & Blobe 2008;Pohlers *et al.* 2009). Múltiples indicios muestran la participación del TGF- $\beta$  como regulador crítico tanto de los procesos de fibrogénesis fisiológicos como en la fibrosis patológica. La reacción fibrótica se caracteriza por un incremento en la producción de componentes de la MEC, como fibronectina, colágeno, laminina y vitronectina, así como la proliferación, migración y acumulación de células mesenquimales. Estos procesos producen la

activación de fibroblastos locales que se diferencian a miofibroblastos que son tipos celulares especializados en la producción de MEC (Pohlers *et al.* 2009).

Por otro lado, como se ha descrito, el TGF- $\beta$  tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular. En células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas, actúa inhibiendo la progresión de la fase G1 del ciclo mitótico, inhibiendo la expresión de genes que regulan el ciclo celular como los *c-myc* y *c-myb*. En las células cancerosas, las mutaciones en la vía de señalización del TGF- $\beta$  confieren resistencia a la inhibición del crecimiento, y consecuentemente, disparan un crecimiento celular descontrolado (Filmus & Kerbel 1993). Además, también juega un papel importante en la metástasis induciendo la expresión de matriz extracelular y de proteínas de adhesión celular. En general, el efecto directo del TGF- $\beta$  en las células cancerosas es la inhibición del crecimiento del cáncer en los estados iniciales del desarrollo del tumor. Sin embargo, las células cancerosas son capaces de adquirir la habilidad de evadir el efecto inhibitorio del TGF- $\beta$  por diferentes mecanismos, y paradójicamente, el TGF- $\beta$  se convierte en un factor pro-oncogénico que estimula el crecimiento celular del tumor en los estados finales de la tumorigénesis. Las células malignas son capaces de producir grandes cantidades de TGF- $\beta$  y esta cantidad excesiva promueve la angiogénesis tumoral y la supresión inmune (Huang & Lee 2003).

A nivel ocular, también se ha relacionado con varias patologías inflamatorias oculares, proliferativas y degenerativas (Connor, Jr. *et al.* 1989; Kon *et al.* 1999; Hirase *et al.* 2005; Min *et al.* 2006; Saika 2006). Se cree que TGF- $\beta$  es el principal responsable en la patogénesis de enfermedades fibróticas en el ojo, incluyendo las cicatrices corneales y conjuntivales, la fibrosis en el endotelio corneal, la fibrosis post-cirugía de cataratas de la cápsula del cristalino, el exceso de cicatrización del tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo y la vitreorretinopatía proliferante (Saika *et al.* 2008; Saika *et al.* 2009; Karamichos *et al.* 2010) y parece implicado en el desarrollo del queratocono (Engler *et al.* 2011). Se ha encontrado incrementados niveles de TGF- $\beta$ 1 en las membranas mucosas oculares de pacientes con penfigoide ocular cicatricial (OCP), enfermedad caracterizada por cicatrización conjuntival con fibrosis subepitelial (Razzaque *et al.* 2003), lo que sugiere que podría regular el aumento de la producción de colágeno y por lo tanto podría contribuir significativamente al proceso de cicatrización conjuntival en pacientes con OCP. En pacientes con tracoma inactivo también se ha visto incrementada la concentración de TGF- $\beta$ 1 observando además que estos niveles estaban relacionados con la severidad de la cicatrización conjuntival (Satici *et al.* 2003).

Recientemente, también se ha sugerido su participación en la patogénesis del glaucoma de ángulo abierto (Fuchshofer & Tamm 2011).

En el caso particular de las enfermedades de la superficie ocular, se ha descrito que este factor se encuentra incrementado en el epitelio conjuntival de pacientes con VKC (Leonardi *et al.* 2000; Abu El-Asrar *et al.* 2006; Leonardi *et al.* 2011). El TGF- $\beta$  también se ha relacionado con la eosinofilia tisular en la VKC (Hingorani *et al.* 1998; Ohtomo *et al.* 2010). Además, los niveles elevados de TGF- $\beta$ 1 se han relacionado con la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) en fibroblastos conjuntivales, sugiriendo que junto con otras citoquinas, también podría tener una función crucial en la neovascularización y formación de papilas gigantes en AKC /VKC (sano-Kato *et al.* 2005).

Se ha descrito también una expresión incrementada de TGF- $\beta$  en pterigium, enfermedad que consiste en un tejido proliferativo fibrovascular que crece sobre la córnea (Kria *et al.* 1996). El TGF- $\beta$  también ha sido asociado con la enfermedad de injerto contra huésped crónica (*graft-versus-host disease*, GVHD) de la glándula lacrimal, donde la fibrosis y el exceso de producción de matriz extracelular son característicos (Ogawa *et al.* 2001). En un estudio reciente se ha observado que el uso de un inhibidor del TGF- $\beta$  retardaba la progresión de SOS moderado a severo en pacientes con GVHD (Ogawa *et al.* 2010).

Más recientemente, también se ha relacionado el TGF- $\beta$  con SOS en humanos, (Chotikavanich *et al.* 2009; Zheng *et al.* 2010b) y estrés disecante experimental en modelos animales (de Paiva *et al.* 2009), atribuyéndole efectos dañinos a los tejidos de la superficie ocular. Se ha propuesto que el TGF- $\beta$ , a través de su implicación en el desarrollo de Th17 junto con IL-6, estimularía la producción de MMPs por el epitelio corneal que media la ruptura proteolítica de las uniones estrechas epiteliales que mantienen la función de barrera corneal. Además, se ha observado una correlación positiva significativa entre los niveles de TGF- $\beta$ 1 y la severidad clínica de los parámetros característicos de SOS como el cuestionario OSDI (*Ocular Surface Disease Index*), tiempo de ruptura lagrimal o TBUT (*tear break-Up time*), tinción de fluoresceína corneal y conjuntival, test de Schirmer y citología por impresión conjuntival (CIC) (de Paiva *et al.* 2009). La bioactividad del TGF- $\beta$  en lágrimas de pacientes de SOS es mayor (79.1%) que en los controles normales (37,6%) (Zheng *et al.* 2010b).

## 6. MOLÉCULAS ANTI-TGF- $\beta$

Los efectos perjudiciales del TGF- $\beta$  en las diversas patologías han llevado a varios grupos a desarrollar estrategias para neutralizar esta citoquina. El TGF- $\beta$  se presenta como una atractiva diana terapéutica para la terapia de enfermedades fibróticas, en las que, en su mayoría, una terapia antiinflamatoria no es suficientemente eficaz. Así, se han presentado oligonucleótidos antisentido que bloquean su producción (Arias *et al.* 2003;Philipp *et al.* 2005), anticuerpos frente a TGF- $\beta$  (Denis 1994;McCormick *et al.* 1999), así como péptidos sintéticos (Huang *et al.* 1997;Kondou *et al.* 2003) que pueden bloquear eficazmente su actividad, observándose su eficacia en modelos animales. Se han desarrollado también inhibidores selectivos que bloquean las vías de señalización intracelular de TGF- $\beta$  como la fosforilación de Smad-3 (Laping *et al.* 2002).

Una de esas terapias incluye el uso de péptidos sintéticos inhibidores P144 y P17 desarrollados en el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA)-Universidad de Navarra y cuya patente ostenta la empresa española Digna Biotech ([www.dignabiotech.com](http://www.dignabiotech.com)). Estos péptidos han demostrado ser altamente eficaces bloqueando la actividad profibrogénica del TGF- $\beta$  en distintos tejidos, tales como hígado, corazón y piel (Ezquerro *et al.* 2003;Ruiz-de-Erenchun *et al.* 2005;Santiago *et al.* 2005;Dotor *et al.* 2007;Gil-Guerrero *et al.* 2008;Hermida *et al.* 2009;Serrati *et al.* 2009), además de en fibroblastos en cultivo (Maldonado *et al.* "In vitro effect of recently identified anti-TGFbeta 1 peptides on the rabbit corneal epithelial cell line, SIRC" ARVO Meeting abstract Mayo 2008). Ambos péptidos se encuentran en la actualidad en fase preclínica.

El P144 es un péptido de 14 aminoácidos (Tabla 1) derivado de la secuencia del receptor humano de tipo III (betaglicano) del TGF- $\beta$ 1 cuya secuencia comprende los residuos situados entre los aminoácidos 730 y 743 (Fig. 8). La elección de la secuencia de este péptido se realizó comparando las secuencias del TGF- $\beta$  y la de su receptor con el fin de averiguar secuencias específicas con mucha afinidad de unión (Ezquerro *et al.* 2003). De entre todas las secuencias escogidas, el P144 fue el péptido que inhibió de manera más potente la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1. El péptido P144 ha sido designado en 2005 por la European Medicines Agency (EMA) y en junio de 2006 por la Food and Drug Administration de EEUU (FDA), como medicamento huérfano por su valor terapéutico potencial en el tratamiento de algunas enfermedades raras o poco comunes.

La elección de la secuencia del otro péptido, el P17 de 15 aminoácidos (Tabla 1), se realizó enfrentando el TGF- $\beta$  frente a una librería de fagos M13. Se analizaron las múltiples secuencias positivas obtenidas y se escogieron los péptidos que presentaban un mayor porcentaje de inhibición del TGF- $\beta$  en un modelo *in vitro* (Dotor *et al.* 2007). Por otro lado, basándose en estudios que han probado la eficacia del P17 en un modelo animal de fibrosis pulmonar, se están llevando a cabo los estudios necesarios para el desarrollo del péptido P17 como nuevo agente terapéutico para la dicha enfermedad (Arribillaga *et al.* 2011).

**Tabla 1. Estructura de los péptidos anti-TGF- $\beta$**

<b>P144</b>	Thr-Ser-Leu-Asp-Ala-Ser-Ile-Ile-Trp-Ala-Met-Met-Gln-Asn
<b>P17</b>	Lys-Arg-Ile-Trp-Phe-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Trp-Tyr-Glu-Arg-Ala

Thr: Treonina, Ser: Serina, Leu: Leucina, Asp: Ácido aspártico, Ala: Alanina, Ile: Isoleucina, Trp: Triptófano, Met: Metionina, Gln: Glutamina, Asn: Asparagina, Lys: Lisina, Arg: Arginina, Phe: Fenilalanina, Pro: Prolina, Tyr: Tirosina, Glu: Ácido glutámico.

Tanto P144 como P17 están patentados en sus aplicaciones como inhibidores de TGF- $\beta$ . Los dos tienen el mismo mecanismo de acción, basado en la unión directa al TGF- $\beta$ 1 activo, bloqueando su interacción con los receptores de membrana. De esta manera inhiben la actividad biológica de esta citoquina y así, se ha observado que P17 inhibe el TGF- $\beta$  con una afinidad de unión del 100% para TGF- $\beta$ 1, 80% para TGF- $\beta$ 2 y 30% para TGF- $\beta$ 3 (Gil-Guerrero *et al.* 2008).

La inhibición sistémica de TGF- $\beta$ , sin embargo, plantea problemas de seguridad importantes ya que este factor ejerce una acción inmunoreguladora potente y pleiotrópica. Por lo tanto, una inhibición local en lugar de una sistémica representa una estrategia alternativa para el desarrollo de terapias más seguras.

Por lo anteriormente expuesto, y dado que parte de los efectos descritos del TGF- $\beta$  sobre las células epiteliales se pueden relacionar con el daño observado en los procesos inflamatorios crónico-graves de la superficie ocular, se planteó el bloqueo tópico ocular del TGF- $\beta$  con los péptidos P144 y/o P17 como una posible terapia en los mismos. Por ello se estudió el efecto de estos péptidos sobre diversos aspectos funcionales de las células expuestas a TGF- $\beta$ .



## **II.-JUSTIFICACIÓN**



Diversos estudios han demostrado que en los procesos inflamatorios no sólo intervienen las células del sistema inmunitario, sino que además, la participación activa del epitelio sería importante en el proceso de cronificación de la inflamación y/o en su iniciación. La regulación de la funcionalidad de las células epiteliales se postula, por tanto, como una posible diana terapéutica.

Por otra parte, la presencia de TGF- $\beta$  se haya incrementada en diversas patologías inflamatorias graves que afectan a la superficie ocular, cuyo origen no está del todo aclarado. Aunque el TGF- $\beta$  se considera una molécula con propiedades fundamentalmente antiinflamatorias, diversas publicaciones están poniendo de manifiesto que, en determinadas circunstancias, su presencia pudiera ser localmente perjudicial. Esta molécula podría provocar en las células epiteliales respuestas que influirían notablemente en el desarrollo del proceso inflamatorio.

El esclarecimiento de la relación entre las células epiteliales de la superficie ocular y el TGF- $\beta$  aportaría nuevos datos que ayuden a entender la participación de ambos en los procesos inflamatorios de la superficie ocular. Por una parte, las células epiteliales podrían actuar como fuente de TGF- $\beta$ , secretando esta molécula y modificando su secreción en condiciones inflamatorias. Por otra parte, las células epiteliales también podrían actuar como receptoras y alterar su funcionalidad en respuesta a este factor. El conocimiento de esta información podrá ayudar al diseño y desarrollo de nuevas vías terapéuticas.

En este sentido, diversos estudios han probado ya la eficacia de dos péptidos anti-TGF- $\beta$  (P17 y P144) en diversos modelos. En este trabajo se pretende estudiar si estos péptidos son capaces de revertir "*in vitro*" los efectos observados en la funcionalidad de las células epiteliales de la superficie ocular en respuesta al TGF- $\beta$  que pudieran ser considerados como perjudiciales. Si los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que el uso de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P17 y/o P144 es beneficioso, se podría plantear su uso como una posible terapia para el tratamiento de los casos de inflamación ocular crónico-graves.



### **III.-HIPÓTESIS**



“Las células epiteliales de la superficie ocular producen y son receptoras de TGF- $\beta$ . Esta secreción de TGF- $\beta$  y la expresión de sus receptores pueden alterarse en condiciones inflamatorias, influyendo en la funcionalidad de las células epiteliales. La alteración de la respuesta de las células epiteliales en respuesta a TGF- $\beta$  contribuye a la cronificación y/o inicio de un proceso inflamatorio que es susceptible de regulación por una terapia anti-TGF- $\beta$ ”.





#### **IV.-OBJETIVOS**



## 1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo de investigación ha sido profundizar en el conocimiento acerca de la participación del epitelio de la superficie ocular durante el desarrollo de los procesos inflamatorios crónico-severos que pueden conducir a la pérdida de visión; en particular, el objetivo ha sido tratar de dilucidar la implicación del TGF- $\beta$  en dichos procesos, determinando: 1) si la células de la superficie ocular son una posible fuente de TGF- $\beta$  y 2) los efectos que esta molécula produce sobre las células. El fin último de este estudio es que nos permita diseñar nuevas vías terapéuticas en los que la célula epitelial sea la diana principal; de esta manera, se podrá controlar y evitar la contribución de dichas células al proceso de iniciación y/o propagación del proceso inflamatorio, evitando así posiblemente la cronicidad del mismo.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para comprobar nuestra hipótesis, nuestros objetivos concretos fueron:

- *Objetivo 1:*

*Determinar el patrón de secreción de TGF- $\beta$  por la línea celular epitelial conjuntival humana IOBA-NHC y por la línea epitelial corneal humana HCE en condiciones basales y en respuesta a diversos tipos de moléculas inflamatorias.*

Este objetivo pretendió comprobar si las células epiteliales corneales y conjuntivales actúan como fuente de las diferentes isoformas de TGF- $\beta$ , así como comprobar si esta secreción se encuentra alterada en diferentes condiciones inflamatorias de la superficie ocular.

- *Objetivo 2:*

*Determinar la expresión de receptores de TGF- $\beta$  en las líneas celulares HCE e IOBA-NHC en condiciones basales y en diferentes condiciones inflamatorias.*

Este objetivo pretendió conocer el patrón de expresión de receptores de TGF- $\beta$  para determinar si las células corneales y conjuntivales son capaces de responder a esta molécula y por tanto, si forma parte de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta del epitelio de la superficie ocular en los procesos inflamatorios. Se comprobó además, si las condiciones inflamatorias de la superficie ocular modificaban esa expresión alterando, por tanto, la capacidad de responder al TGF- $\beta$ .

- *Objetivo 3:*

*Determinar la activación de transducción de señales implicadas en las respuestas a TGF- $\beta$ .*

Este objetivo ayudó a conocer cuales son los mecanismos intracelulares activados en las respuestas de las células al TGF- $\beta$ .

- *Objetivo 4:*

*Determinar la modificación por TGF- $\beta$  de la expresión de receptores para diferentes moléculas implicadas en respuestas inflamatorias.*

El patrón de expresión de receptores para diferentes tipos de moléculas inflamatorias ayudó a conocer los mecanismos moleculares implicados en la respuesta del epitelio de la superficie ocular al TGF- $\beta$ .

- *Objetivo 5:*

*Determinar el patrón de secreción celular por la línea celular epitelial conjuntival humana IOBA-NHC y por la línea epitelial corneal humana HCE en condiciones basales y en respuesta a TGF- $\beta$ .*

Este objetivo pretendió conocer y caracterizar cuales son las principales moléculas (citoquinas, quimioquinas, metaloproteinasas y otras moléculas involucradas en procesos inflamatorios) secretadas por las células epiteliales en respuesta al TGF- $\beta$ .

- *Objetivo 6:*

*Determinar el efecto del TGF- $\beta$  en la transición epitelio-mesenquimal en las líneas celulares HCE e IOBA-NHC.*

Con este objetivo se pretendió comprobar si el TGF- $\beta$  actúa como inductor de la EMT en un microambiente inflamatorio, pudiendo tener un papel importante en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias de la superficie ocular.

- *Objetivo 7:*

*Estudiar la eficacia de dos péptidos sintéticos anti-TGF- $\beta$  (P144 y P17) en la modulación de la respuesta del epitelio corneal y conjuntival.*

Este objetivo pretendió estudiar el efecto los péptidos anti-TGF- $\beta$  sobre la funcionalidad de las células epiteliales corneales y conjuntivales *in vitro*, comprobando si la presencia de dichos péptidos revertía y/o modificaba las respuestas a TGF- $\beta$  tanto en condiciones basales como estimuladas por TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2. Con este objetivo se pretendió alcanzar información para poder proponer una nueva vía terapéutica para la inflamación crónica y grave de la superficie ocular.



## **V.- MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. CULTIVOS CELULARES

Para la realización del presente estudio se emplearon la línea celular HCE de epitelio corneal humano, caracterizada por Araki-Sasaki et al (Araki-Sasaki *et al.* 1995) y la línea celular IOBA-NHC (marca registrada Nº 2.537.742 en la Oficina Española de Patentes y Registros), derivada de epitelio conjuntival humano, obtenida y caracterizada por el grupo de superficie ocular del IOBA (Diebold *et al.* 2003).

- *Línea celular de epitelio corneal humano, HCE*

La línea celular HCE (*human corneal epithelial cells*) es utilizada como modelo de células epiteliales corneales; ésta es una línea celular creada a partir de cultivos primarios de células epiteliales corneales humanas (donante de 48 años) infectadas con un vector SV-40 adenovirus recombinante y que fueron clonadas para obtener una línea celular creciente continua (Araki-Sasaki *et al.* 1995). Se ha comprobado que esta línea celular continúa creciendo durante más de 40 generaciones exhibiendo una apariencia similar a células epiteliales corneales normales en cultivo. Además, se ha visto que estas células conservan todas las propiedades morfológicas, citológicas y aspectos bioquímicos de las células epiteliales, incluyendo la formación de desmosomas, desarrollo de microvilli así como la expresión de citoqueratinas específicas de la córnea (Araki-Sasaki *et al.* 1995).

- *Línea celular de epitelio conjuntival humano, IOBA-NHC*

La línea celular IOBA-NHC (*normal human conjunctiva*) se utiliza como modelo de células epiteliales conjuntivales humanas. Es una línea celular epitelial no transfectada, inmortalizada espontáneamente a partir de células epiteliales conjuntivales humanas normales (Diebold *et al.* 2003). Esta línea celular ha demostrado tener una elevada capacidad proliferativa *in vitro* y una morfología y características funcionales típicas propias del epitelio conjuntival humano normal. Se ha demostrado además, que esta línea celular presenta una respuesta inflamatoria cuando se expone a TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  incrementando la expresión de los marcadores ICAM-1 y HLA-DR (Diebold *et al.* 2003) y la secreción de citoquinas y quimioquinas implicadas en el reclutamiento de células inflamatorias (Siemasko *et al.* 2005; Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2008). Se ha visto, además, que en condiciones inflamatorias altera la expresión de ciertos neuro-receptores (Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2005). Así mismo, también se ha comprobado que las células IOBA-NHC, al ser sometidas a la acción de citoquinas tipo Th1 y Th2, alteran la expresión de moléculas implicadas en la uniones intercelulares, como ZO-1, desmoplaquina I-II o conexina 43 (Calonge *et al.* 2006). Se ha observado además que ambas líneas celulares, HCE

e IOBA-NHC, expresan receptores de ácido hialurónico implicados en procesos inflamatorios, tanto CD44 (Hornof *et al.* 2008; de la Fuente M. *et al.* 2008) como RAHMM (García-Posadas *et al.* 2011), de una forma similar a la expresión en el tejido corneal y conjuntival humano respectivamente, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico.

El medio de cultivo de las células epiteliales corneales HCE fue DMEM/F12 (Invitrogen-Gibco, Inchinnan, RU) suplementado con 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano (EGF), 0,1 µg/ml de toxina colérica, 5 µg/ml de insulina pancreática bovina, 0,5% DMSO, 15% de suero bovino fetal (FBS) descomplementado (30 min a 65°C) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomicina), todos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

Las células IOBA-NHC fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM/F12 (Invitrogen-Gibco) suplementado con 2 ng/ml de EGF humano, 0,1 µg/ml de toxina colérica, 1 µg/ml de insulina pancreática bovina, 10% de suero bovino fetal (FBS), 5 µg/ml de hidrocortisona y antibióticos (50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina y 2,5 µg/ml de anfotericina B), todos de Sigma-Aldrich.

Las células se incubaron en un incubador Galaxi R (RS Biotech, Livingston, RU) a 37°C bajo condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad, cambiándoles el medio cada 2/3 días. Cuando las células alcanzaron la confluencia fueron tratadas con tripsina (Invitrogen-Gibco) y se contaron para sembrarlas en la concentración adecuada. Para llevar a cabo la cuantificación celular y determinar el porcentaje de células viables, se utilizó una cámara de Neubauer y el test de exclusión del azul Tripán (Sigma-Aldrich).

## 2. TRATAMIENTO CON CITOQUINAS

Para este estudio, se eligió someter a las células a tratamientos con IL-4, IL-13, TNF-α, IFN-γ, IL-17, TGF-β1 y TGF-β2 dada la alta implicación de dichas moléculas en procesos de inflamación crónica-grave de la superficie ocular. Las dosis y tiempos de tratamiento se eligieron basándose tanto en resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, como en lo descrito en la literatura (Richter *et al.* 2001; Meyer-Hoffert *et al.* 2003; Zhan *et al.* 2003; Kim *et al.* 2004; Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2005; Leonardi *et al.* 2006; Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2008)(Tabla 2).

Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de área o en placas multipocillos de 10 cm<sup>2</sup> de área (Nunc, Dinamarca). Se plantaron y cuando llegaron al 95% de confluencia (aproximadamente en 48 h) se les retiró el medio de cultivo y se mantuvieron durante 24 h

con medio de cultivo DMEM/F12 puro, sin ningún aditivo, para evitar el posible efecto de alguna de las sustancias presentes en el suero o de alguno de los suplementos propios del medio de crecimiento de las células. Pasadas las 24 h en medio puro, se retiró ese medio y se les aplicaron los distintos tratamientos (disueltos en medio puro) según el experimento concreto (Tabla 2).

En otro set de experimentos, las células fueron expuestas a TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, en las condiciones anteriormente descritas, en presencia de dos péptidos anti-TGF- $\beta$ , P144 o P17 (200  $\mu$ g/ml) (Digna Biotech, España) que han sido desarrollados por la Universidad de Navarra, para estudiar el efecto de la inhibición del TGF- $\beta$  en células estimuladas con TGF- $\beta$ . Los péptidos se disolvieron en medio de cultivo. Mientras que P17 es soluble en agua, P144 es parcialmente hidrofóbico, por lo que la solución madre de P144 fue sonicada para reducir el tamaño de las partículas y para aumentar la solubilidad antes de los ensayos *in vitro* (Ezquerro *et al.* 2003; Ruiz-de-Erenchun *et al.* 2005; Santiago *et al.* 2005; Dotor *et al.* 2007).

En todos los casos, células tratadas solo con medio puro se usaron como controles. En cada caso, salvo indicado, se hicieron 3 experimentos independientes por duplicado. Finalizados los tratamientos, se retiraron los sobrenadantes, que se centrifugaron y se guardaron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; las células se fijaron con metanol frío o se lisaron, y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para inmunofluorescencia o ensayos de Western blotting, respectivamente.

**Tabla 2: Tratamientos con citoquinas.**

Molécula	Casa comercial	Concentración	Tiempo de exposición
TNF- $\alpha$	PeptoTech, RU	25 ng/ml	48 h
IFN- $\gamma$	PeptoTech, RU	500 U/ml	48 h
IL-4	PeptoTech, RU	20 ng/ml	48 h
IL-13	PeptoTech, RU	20 ng/ml	48 h
IL-17	PeptoTech, RU	20 ng/ml	48 h
TGF- $\beta$ 1	PeptoTech, RU	10 ng/ml	30 min, 2 h, 24 h, 48 h
TGF- $\beta$ 2	PeptoTech, RU	10 ng/ml	30 min, 2 h, 24 h, 48 h

RU: Reino Unido

### 3. LISIS CELULAR Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para la extracción de proteínas, una vez retirados los medios, se lavaron las células con PBS frío y se homogeneizaron en tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA) (10 mM Tris HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% ácido desoxicólico; 1% Triton X-100; 0.1% SDS; 1 mM EDTA),

suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (10  $\mu$ l/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF); 6  $\mu$ l/ml de aprotinina y un inhibidor de fosfatasa ortovanadato sódico (100 nM) todos ellos de Sigma-Aldrich. Tras la homogenización, las muestras se incubaron durante media hora en hielo y posteriormente se centrifugaron a 14.000 rpm, a 4°C, durante media hora. Se recogieron los sobrenadantes, se alicuotaron y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

#### **4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES**

La determinación de proteínas se realizó mediante el ensayo del ácido bicínico BCA (Pierce, Rockford, IL, EEUU). La elección de este ensayo se realizó en base a que era el único compatible con el tampón empleado para la homogenización conforme a las especificaciones técnicas del fabricante. Este método combina la reducción del  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  por proteínas en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección colorimétrica selectiva y elevada sensibilidad del catión cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) usando un reactivo con BCA. Cada ión  $\text{Cu}^{+1}$  reacciona con dos moléculas de BCA formando un complejo soluble en agua con absorción colorimétrica a una longitud de onda de 562 nm. El método de análisis cuantitativo se realizó mediante una curva patrón, utilizando diluciones seriadas de albúmina sérica bobina (BSA) de concentración conocida para realizar los estándares. Brevemente, se pipetearon 25  $\mu$ l de cada estándar o muestra desconocida en cada pocillo. Cada muestra se añadió por duplicado. Posteriormente se añadió 200  $\mu$ l del reactivo de trabajo a cada pocillo y se incubó a 37°C durante 30 min. Se dejó enfriar la placa y se midió la absorción colorimétrica en un multilector de microplacas (SpectraMAX<sup>®</sup>M5, Molecular Devices, EEUU) a una longitud de onda de 562 nm, usando como longitud de onda de referencia 450 nm. El método de análisis cuantitativo se realizó mediante la curva patrón utilizando el programa SoftMaxPro 4.8 (Molecular Devices).

#### **5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOTTING**

Las muestras de proteína total de lisados celulares, se mezclaron en proporción 1:1 con el reactivo de Laemmli (Sample Buffer 2x) (Sigma-Aldrich). Las muestras se desnaturalizaron y redujeron calentándolas a 110 °C durante 5 min en un calentador de bloque. Se separaron las proteínas según su peso molecular, de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli 1970), en condiciones reductoras y desnaturalizantes, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en una cubeta Mini-PROTEAN II o Tetracell IV (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). La misma cantidad de proteína se cargó para cada muestra (20  $\mu$ g de proteína total en el homogenado). Como marcador de peso molecular se empleó el "Precision Dual Color Plus" (Bio-Rad). Como control positivo de los anticuerpos se usaron lisados celulares

recomendados en cada caso por la compañía (Tabla 3). La electroforesis se llevó a cabo durante 1 h y 30 min a 140 V.

Para la identificación de las proteínas de interés, una vez separadas las proteínas totales en función de su peso molecular mediante la electroforesis, se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,2  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad). El proceso de transferencia se llevó a cabo a 350 mA durante 1 h y media. Posteriormente, las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h en tampón de bloqueo consistente en 5% leche en polvo + 4% de FBS en TBS-T (TBS (Bio-Rad) suplementado con 0,05% de Tween20 (Sigma-Aldrich) para todos los anticuerpos excepto anti-SMAD-2 y anti-SMAD-7 en los que el tampón de bloqueo consistió en 3% BSA en TBS-T.

Para la inmunodetección de las proteínas, se incubaron las membranas a 4°C durante 18 h con los anticuerpos primarios (Tabla 3) diluidos en el tampón de bloqueo correspondiente. Al término de la incubación, las membranas se lavaron 3 veces con tampón TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4) conjugado con peroxidasa de rábano, diluido en TBS-T.

El revelado de la actividad peroxidásica, se realizó por quimioluminiscencia, utilizando el kit revelador Immun-Star<sup>TM</sup> Western C<sup>TM</sup> (Bio-Rad), siendo este método el más sensible con capacidad de detección de femtogramos de proteína. La detección se realizó mediante el sistema de documentación de geles Chemi-Doc XRS (Bio-Rad). La intensidad de las bandas resultantes se determinó mediante análisis volumétrico referido como porcentaje de la banda control (células no tratadas), con el software Quantity One (Bio-Rad).

Como control de carga se usó en todos los casos un anticuerpo frente a  $\alpha$ -actinina; para ello se procedió a deshibridar la membrana incubándola con la solución *Restore<sup>TM</sup> Stripping Buffer* (ThermoScientific, Massachusetts, EEUU) durante 1 h a 60°C. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces con TBS-T y se bloqueó durante 1 h en tampón de bloqueo consistente en 4% de suero de burro (Sigma-Aldrich) + 5% de leche en polvo en TBS-T y se continuó con el procedimiento de incubación con el anticuerpo anti  $\alpha$ -actinina explicado anteriormente.

Para la detección de las formas no fosforiladas de pSMAD2, pSTAT-1, pSTAT-6 y pI $\kappa$ B $\alpha$  se procedió al proceso de deshibridación (descrito anteriormente) de las membranas utilizadas para la detección de las formas fosforiladas.

**Tabla 3: Datos de los diferentes anticuerpos primarios utilizados para la técnica de Western blotting .**

Anticuerpo	Ig	Especie	Mo/Po	PM (kDa)	Casa comercial	Referencia	Dilución	Control positivo (Ref)*
Anti-TGF- $\beta$ RI	Ig G	C	Po	53	Sta Cruz Biotech	sc-398	1/500	A549 (sc-2413)
Anti-TGF- $\beta$ RII	Ig G	C	Po	70	Sta Cruz Biotech	sc-400	1/500	Hep G2 (sc-2227)
Anti pSMAD2	Ig G	C	Po	52	Chemicom-Millipore	AB-3849	1/200	Hep 62+TGF- $\beta$ (sc-24702)
Anti SMAD2	Ig G	Cb	Po	45	AbD Serotec	AHP694	1/200	HeLa (sc-2200)
Anti SMAD7	Ig G	C	Po	51	Sta Cruz Biotech	sc-134013	1/200	HeLa (sc-2200)
Anti TLR-4	Ig G	C	Po	89	Sta Cruz Biotech	sc-10741	1/200	HeL 92.1.7 (sc-2270)
Anti pSTAT-1	Ig G	C	Po	87	Abcam	ab30645	1/1000	HeLa tratadas con IFN- $\alpha$ (sc-24807)
Anti STAT-1	Ig G	C	Po	84,91	Sta Cruz Biotech	sc-346	1/200	HeLa (sc-2200)
Anti pSTAT-6	Ig G	C	Po	105	Sta Cruz Biotech	sc-101808	1/200	HeLa tratadas con IL-4 (sc-24686)
Anti STAT-6	Ig G	C	Po	120	Sta Cruz Biotech	sc-1698	1/200	HeLa (sc-2200)
Anti plkB $\alpha$	Ig G	C	Po	41	Sta Cruz Biotech	sc-101713	1/200	HeLa tratadas con TNF- $\alpha$ (sc-2228)
Anti I $\kappa$ B $\alpha$	Ig G	C	Po	37	Sta Cruz Biotech	sc-203	1/200	HeLa (sc-2200)
Anti $\alpha$ -actinina	Ig G <sub>1</sub>	R	Mo	100	Sta Cruz Biotech	sc-17829	1/500	HeLa (sc-2200)

Ig: Inmunoglobulina. C: conejo, Cb: cabra, R: ratón. Mo: Monoclonal, Po: Policlonal. PM: Peso molecular. \* Todos los lisados celulares utilizados como controles positivos fueron de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU.

**Tabla 4: Datos de los diferentes anticuerpos secundarios utilizados para la técnica de Western blotting.**

Anticuerpo	Ig	Especie	Mo/Po	Casa comercial	Referencia	Dilución
Anti conejo-HRP	Ig G	Cb	Po	Sta Cruz Biotech	sc-2004	1/2000
Anti cabra-HRP	Ig G	B	Po	Sta Cruz Biotech	sc-2020	1/2000
Anti ratón-HRP	Ig G	B	Po	Jackson Laboratories	715-035-150	1/5000

Ig: Inmunoglobulina. Cb: cabra, B: Burro. Mo: Monoclonal, Po: Policlonal. HRP: Peroxidasa de rábano.

## **6. INMUNOFLUORESCENCIA**

El día de uso, las células fijadas se descongelaron y fueron hidratadas durante 30 min a temperatura ambiente. Se bloquearon durante 1 h en tampón de bloqueo consistente en PBS y 0,2% de Tritón X-100 suplementado con: 4% FBS (para los anticuerpos anti pSMAD2, anti IL-17R y anti TLR-4), con 4% FBS y 3% de BSA para los anticuerpos anti TGF- $\beta$  RI y RII, con 4% de suero de burro (para los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  RIII, anti SMAD2 y anti SMAD7) y PBS con 5% de suero de burro para el anticuerpo anti e-cadherina. Posteriormente se incubó durante 18 h a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 5) diluido en su tampón de bloqueo. Finalizada la incubación, las células se lavaron 3 veces y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 6) unido a Alexa fluor 488 o isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluido en PBS. Las células se lavaron de nuevo 3 veces y los núcleos se contratiñeron con ioduro de propidio (PI) (Molecular Probes, Leiden, Holanda) diluido 1/12.000. Se montaron los portas con medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories, EEUU) y fueron visualizados en un microscopio invertido de epifluorescencia (modelo AF6000; Leica, Alemania). Todos los ensayos se analizaron por duplicado o triplicado y se hicieron fotos digitales de los diferentes tratamientos. En todos los casos se incluyeron controles negativos, tanto con ausencia de anticuerpo primario como con el uso de los controles de isotipo (sc-2027 y sc-2028, Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU) correspondientes en lugar de anticuerpos primarios.

### **6.1 Cuantificación de la expresión observada por inmunofluorescencia**

Para un análisis más objetivo de la expresión observada por inmunofluorescencia se hizo una cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Para ello se empleó el software Leica Application Suite 2.02, que permite medir la fluorescencia en un campo determinado de la preparación previamente seleccionado (intensidad de fluorescencia media). Para este análisis, se seleccionaron al azar campos del mismo área que contuvieran una media de 10 células. Las medias se hicieron con un mínimo de 4 fotografías por tratamiento en un mínimo de dos ensayos de inmunofluorescencia distintos.

**Tabla 5: Datos de los diferentes anticuerpos primarios utilizados para la técnica de inmunofluorescencia .**

Anticuerpo	Ig	Especie	Mo/Po	Casa comercial	Referencia	Dilución
Anti-TGF- $\beta$ RI	Ig G	C	Po	Sta Cruz Biotech	sc-398	1/50
Anti-TGF- $\beta$ RII	Ig G	C	Po	Sta Cruz Biotech	sc-220	1/50
Anti-TGF- $\beta$ RIII	Ig G	Cb	Po	Sta Cruz Biotech	sc-6199	1/50
Anti pSMAD2	Ig G	C	Po	Chemicom-Millipore	AB-3849	1/50
Anti SMAD2	Ig G	Cb	Po	AbD Serotec	AHP694	1/100
Anti SMAD7	Ig G <sub>2a</sub>	R	Mo	Sta Cruz Biotech	sc-101152	1/50
Anti TLR-4	Ig G	C	Po	Abcam	ab47093	1/100
Anti TLR-4	Ig G	C	Po	Sta Cruz Biotech	sc-10741	1/200
Anti-IL-17R	Ig G	C	Po	Sta Cruz Biotech	sc-30175	1/50
Anti e-cadherina	Ig G <sub>2a</sub>	R	Mo	BD Biosciences	610181	1/100

Ig: Inmunoglobulina. C: conejo, Cb: cabra, R: ratón. Mo: Monoclonal, Po: Policlonal.

**Tabla 6: Datos de los diferentes anticuerpos secundarios utilizados para la técnica de inmunofluorescencia .**

Anticuerpo	Ig	Especie	Mo/Po	Casa comercial	Referencia	Dilución
Anti conejo conjugado a Alexa fluor 488	Ig G	B	Po	Invitrogen	A21206	1/200
Anti cabra conjugado a Alexa fluor 488	Ig G	B	Po	Invitrogen	A11055	1/200
Anti ratón conjugado a Alexa fluor 488	Ig G	B	Po	Invitrogen	A21202	1/200

Ig: Inmunoglobulina. B: Burro. Mo: Monoclonal, Po: Policlonal.



## 7. OBTENCIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES HUMANAS

Para el estudio de la expresión de receptores de TGF- $\beta$  en muestras humanas se utilizaron muestras de córnea limbal y central y citologías de impresión para la obtención de células epiteliales conjuntivales.

- *Córnea limbal y central*

Se obtuvieron tejidos humanos normales corneoesclerales (n=2) de 3 a 5 días post-mortem del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. El tejido humano se utilizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Las células epiteliales del limbo y de la córnea central se obtuvieron utilizando un método descrito previamente (de Paiva *et al.* 2005;Chen *et al.* 2006), con algunas modificaciones. En resumen, se utilizó un trépano de 7,5 mm para aislar la córnea del limbo y se raspó el epitelio en el botón central de la córnea. Posteriormente se recortó el anillo corneoescleral y se retiraron la capa endotelial y los restos de iris. El anillo limbar se incubó con 5 mg/ml de dispasa II (StemCell Technologies, Grenoble, Francia) a 37°C durante 2 h. Se recogieron las láminas epiteliales limbares y se trataron con 0,25% de tripsina y 0,03% de EDTA (Invitrogen-Gibco, Inchinnan, Reino Unido) a 37°C durante 10 min para aislar células individuales.

- *Citología de impresión (CIC) para la obtención de células epiteliales conjuntivales*

Las muestras de las CIC fueron recogidas de 68 donantes sanos (32 hombres, 36 mujeres; edad media 62,6  $\pm$  8,3 años) según el método descrito previamente (Corrales *et al.* 2003;Corrales *et al.* 2011). Antes del inicio del estudio, se obtuvo la aprobación del Comité de Ética así como un consentimiento informado, basado en los principios de la Declaración de Helsinki, de todos los participantes. Se excluyó del estudio a los donantes sanos que habían utilizado alguna vez o estaban actualmente usando lentes de contacto, a los que tenían alguna enfermedad ocular o general, o habían utilizado cualquier medicamento ocular o sistémico durante los últimos seis meses que pudieran afectar la expresión génica.

## 8. AISLAMIENTO DE ARN, TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A TIEMPO REAL

- *Aislamiento de ARN y transcripción inversa*

Las cultivos se desarrollaron hasta que las células alcanzaron el 90% de confluencia; se lavaron con PBS (Gibco), se lisaron con tampón de lisis RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) que contiene 1% de 2-mercaptoetanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se guardaron a -80°C

para el aislamiento total del ARN. Este fue extraído usando un RNeasy Mini Kit (Qiagen) y se trató con DNasa libre de RNasa (Qiagen). Se comprobó la integridad de la distribución y el tamaño del ARN purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El primer ADNc se sintetizó a partir del ARN total (2-5 µg) con hexámeros aleatorios (Invitrogen Life Technologies, Paisley, RU) usando la M-MuLV transcriptasa inversa (Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads, Amersham Pharmacia Europe GmbH Biotech, Freiburg, Alemania).

- *PCR a tiempo real*

La PCR a tiempo real se llevó a cabo utilizando los cebadores específicos seleccionados de SA Biosciences' RT<sup>2</sup> qPCR *Primer assays database* (número de identificación de SA Biosciences: PPH00237, PPH00339B y PPH00399E para *TGF-β-RI*, *TGF-β-RII* y *TGF-β-RIII*, respectivamente), una tinción de detección SYBR® Green I (Applied Biosystems, Warrington, RU) y un sistema de termociclado (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems) con la configuración por defecto (pre- desnaturalización a 95° C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, la hibridación y extensión a 60°C durante 1 min). Se utilizó una alícuota de cDNA (2 µl) para la PCR en un volumen total de 20 µl conteniendo lo siguiente: 1 µl de cebadores diana (*target primers*) y 10 µl de 2X Poder SYBR® Green PCR Master Mix. Los ensayos se realizaron por duplicado en cada experimento y se repitieron en al menos tres conjuntos diferentes de células. Un control (sin muestra) y el ARN total sin retrotranscripción se incluyeron en todos los experimentos para evaluar la PCR y la contaminación de ADN de los reactivos utilizados, respectivamente. El gen GAPDH se utilizó como una referencia endógena para cada reacción para corregir las diferencias en la cantidad de ARN total añadido. Se llevó a cabo el programa de la curva de fusión y se generó una curva de disociación para cada pocillo en toda la placa para verificar la identidad de cada producto de amplificación génica. Los resultados de la PCR cuantitativa se analizaron por el método comparativo CT (Applied Biosystems usuario Boletín N<sup>o</sup>2 (P/N 4303859), donde el incremento de la diana =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , y se normalizaron por el valor de Ct de GAPDH, usando el nivel de ARNm en las células IOBA-NHC como el calibrador.

## **9. MEDIDA DE LA SECRECIÓN CELULAR**

### **9.1 Análisis multianálisis por tecnología X-MAP (Luminex™)**

Se determinó la concentración total de las 3 isoformas de TGF-β (TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3), de 22 citoquinas/quimioquinas (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40,

IL-12p70, IL-13, IL-15, IP-10, eotaxina-1, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES y TNF- $\alpha$ ) y de las metaloproteinasas (MMP)-1, MMP-3, MMP-9, y MMP-13 en los sobrenadante de los cultivos celulares. Para ello, se utilizaron tres ensayos comerciales multiplex basados en la tecnología X-Map de la casa comercial Upstate-Millipore (Wattford, RU) para los ensayos de TGF- $\beta$  y los de citoquinas/quimioquinas, y de la casa comercial R & D Systems (RU) para el análisis de MMPs.

Todos los ensayos se realizaron siguiendo los protocolos del fabricante. En resumen, se incubaron 50  $\mu$ l de cada muestra en la oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente (TGF- $\beta$  y MMP) o durante la noche a 4 °C (22 plex de citoquinas/quimioquinas) en un agitador de placas, bien con microesferas anti-TGF- $\beta$ 1, -TGF- $\beta$ 2 y -TGF- $\beta$ 3 de humano, microesferas anti-multicitoquinas humanas, o microesferas anti-MMPs humanas. En el caso concreto de la determinación de las isoformas de TGF- $\beta$ , las muestras fueron previamente acidificadas durante 1 h con HCl y posteriormente neutralizadas con NaOH, para la liberación de TGF- $\beta$  latente. Después de la incubación, las microesferas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo de captura correspondiente marcado con biotina durante 1 h y media, seguido de una incubación de 30 min con una solución de estreptavidina-ficoeritrina. Las microesferas fueron lavadas y leídas en un Luminex™ IS-100 (Luminex Corporation, Austin, Tx, EE.UU). Se utilizaron curvas patrón a partir de estándares de concentración conocida de TGF- $\beta$ , citoquinas o MMPs recombinantes humanas, para convertir unidades de fluorescencia a concentración en pg/ml de TGF- $\beta$ , citoquinas y MMPs, respectivamente. Los datos fueron analizados con el software BeadView™ (Upstate- Millipore, RU). Los niveles mínimos detectables de citoquinas/quimioquinas fueron de 1,5 pg/ml para RANTES; 2,4 pg/ml para GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IP-10 y TNF- $\alpha$ ; y 4,4 pg/ml para eotaxina-1, IFN- $\gamma$ , IL-12p40, MCP-1 y MIP-1 $\alpha$ . El ensayo de MMPs reconocía MMPs totales, incluyendo las formas pro- madura y unida al inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP). Los niveles mínimos detectables de MMPs fueron 4,4 pg/ml para MMP-1; 1,3 pg/ml para MMP-3; 7,4 pg/ml para MMP-9 y 15,9 pg/ml para MMP-13. Los niveles mínimos detectables de las isoformas de TGF- $\beta$  fueron 12 pg/ml para TGF- $\beta$ 1 y 6 pg/ml para TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3.

## **9.2 Análisis por ELISA**

La determinación de SLPI, TSLP, MIP-3 $\alpha$  e IL-23 se llevó a cabo mediante ELISA con ensayo comercial Quantikine® (R & D Systems) y la de IL-27 mediante un kit de ELISA de Diaclone (Gene-probe, San Diego, CA, EEUU), ambos de tipo sandwich indirecto. Los ensayos se

realizaron siguiendo el protocolo del fabricante; en resumen, se añadieron 100  $\mu$ l de tampón de dilución en todos los pocillos. Se preparó una curva patrón realizando diluciones seriadas con el estándar. Se añadieron 100  $\mu$ l de soluciones estándar (50  $\mu$ l para TSLP), controles o muestras previamente centrifugadas en los correspondientes pocillos, y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa 3 veces con 300  $\mu$ l de solución de lavado. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ l de conjugado-HRP por pocillo. Se cubrió la placa y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las placas 3 veces en las mismas condiciones, se añadieron 200  $\mu$ l por pocillo de la solución de sustrato-TMB y se incubó la placa durante 20 min a temperatura ambiente, evitando la exposición directa a la luz. Finalmente, se añadieron 50  $\mu$ l por pocillo de la solución de parada proporcionada en el kit.

Las densidades ópticas se midieron a 450 nm con corrección a 540 nm en un espectrofotómetro multilector de microplacas (SpectraMAX<sup>®</sup>M5, Molecular Devices, EEUU) y se calculó la concentración de las muestras interpolando los resultados en la recta patrón de los estándares correspondientes en cada caso.

El nivel mínimo de detección fue 25 pg/ml para SLPI; 3,46 pg/ml para TSLP; 0,47pg/ml para MIP-3 $\alpha$ ; 6,8 pg/ml para IL-23 y 12,8 pg/ml para IL-27.

Adicionalmente a los ensayos de Luminex, se utilizaron kits de ELISA Quantikine<sup>®</sup> TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (R & D Systems) para medir los niveles de TGF- $\beta$ 1 y de TGF- $\beta$ 2 en determinados experimentos, siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras fueron activadas con HCl, como se describió anteriormente, para la liberación del TGF- $\beta$  latente. Se midieron ambas muestras, acidificada correspondiente al TGF- $\beta$  total y no-acidificada correspondiente al TGF- $\beta$  activado. Las muestras fueron analizadas por triplicado. El nivel mínimo de detección fue 4,61 y 7 pg/ml para TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 respectivamente. Las densidades ópticas se midieron a 450 nm con corrección a 540 nm en un multilector de microplacas (SpectraMAX<sup>®</sup>M5) y se calculó la concentración de las muestras interpolando los resultados en la recta patrón de los estándares correspondientes en cada caso.

## **10. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR**

La viabilidad celular se determinó por ensayo XTT (Sigma-Aldrich). Esta prueba se basa en la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables para cortar el anillo de tetrazolio del XTT (2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxyanilida) produciendo cristales de formazán naranjas, que son solubles en soluciones acuosas, valorándose su absorción espectrofotométricamente. Debido a que esta reacción sólo ocurre

en mitocondrias de las células viables, es un método especialmente útil en la determinación de células vivas metabólicamente activas. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. De forma resumida, tras el tratamiento de células con IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-17 + TNF- $\alpha$  y con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (Tabla 1), en presencia/ausencia de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P144 y P17, el medio de cultivo fue reemplazado con medio de cultivo DMEM/F12 libre de rojo fenol (Invitrogen-Gibco) antes de añadir solución XTT; los cultivos se incubaron a 37 °C durante 15 h. Las placas se leyeron en un multilector de microplacas (SpectraMAX®M5) usando una longitud de onda de 450 nm y una referencia de 620 nm. Como controles se utilizaron células en cultivo sin ningún tipo de tratamiento. La viabilidad celular se expresó como un porcentaje de la lectura con respecto al control. Cada ensayo se realizó tres veces.

### **11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los valores están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). En los estudios de secreción de TGF- $\beta$ , citoquinas/quimioquinas, SLPI y MMPs se usó la prueba de la *t* de Student para la comparación de dos grupos de muestras independientes, después de haber realizado un test de Levene para evaluar la homogeneidad de las varianzas en dichos grupos. Para los datos densitométricos de los estudios de Western blotting, se usó la prueba *t* para una muestra para las comparaciones entre los valores de intensidad de la banda de las células tratadas (expresada como porcentaje de la intensidad de la banda control) y la intensidad de la banda de control, establecido en 100. La significación estadística del efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  se analizó mediante análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de Sheffé como una prueba post-hoc; si había una heterogeneidad significativa de la varianza entre los grupos, se utilizó el test post-hoc de Games-Howell. Valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. La estadística se analizó mediante el paquete estadístico SPSS (SPSS 18.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL).



## **VI.-RESULTADOS**



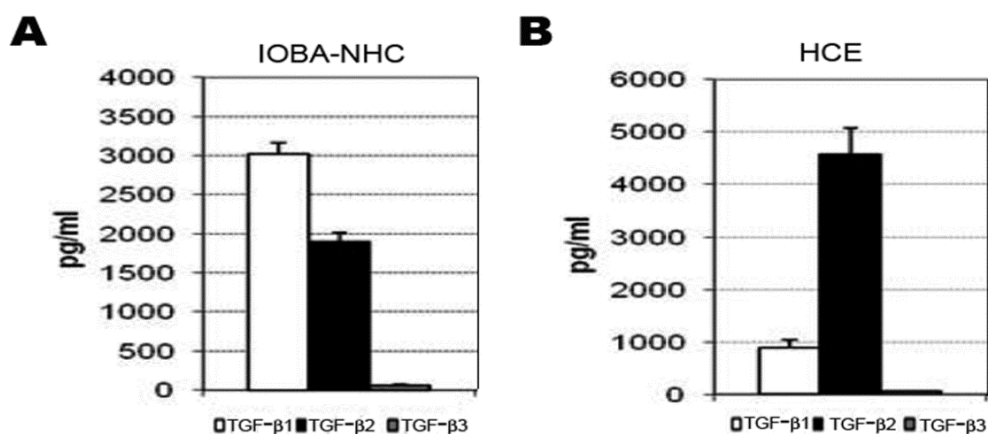


## 1. CÉLULAS EPITELIALES CORNEALES Y CONJUNTIVALES COMO “FUENTE” DE TGF- $\beta$

### 1.1 Estudio de la secreción de las 3 isoformas de TGF- $\beta$ (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) por las células HCE e IOBA-NHC

#### 1.1.1 Condiciones basales

Se determinó si las células epiteliales conjuntivales IOBA-NHC o las células corneales HCE podrían ser una potencial fuente de TGF- $\beta$ . Para ello se analizaron los niveles de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en los sobrenadantes de los cultivos de células no tratadas, para estudiar la expresión basal de proteína. Se comprobó que ambas líneas celulares secretaban TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 de manera constitutiva, pero con un patrón de secreción diferente: mientras las células IOBA-NHC secretaban mayoritariamente TGF- $\beta$ 1 (Fig. 8A), las células corneales secretaban mayoritariamente TGF- $\beta$ 2 (Fig. 8B). La isoforma TGF- $\beta$ 3 no se detectó en ninguno de los tipos celulares (Fig. 8 A, B).



**Figura 8. Análisis de la secreción de TGF- $\beta$  por células IOBA-NHC y HCE.** Análisis de la secreción de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en células IOBA-NHC (A) y HCE (B) en condiciones basales. Los datos son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado.

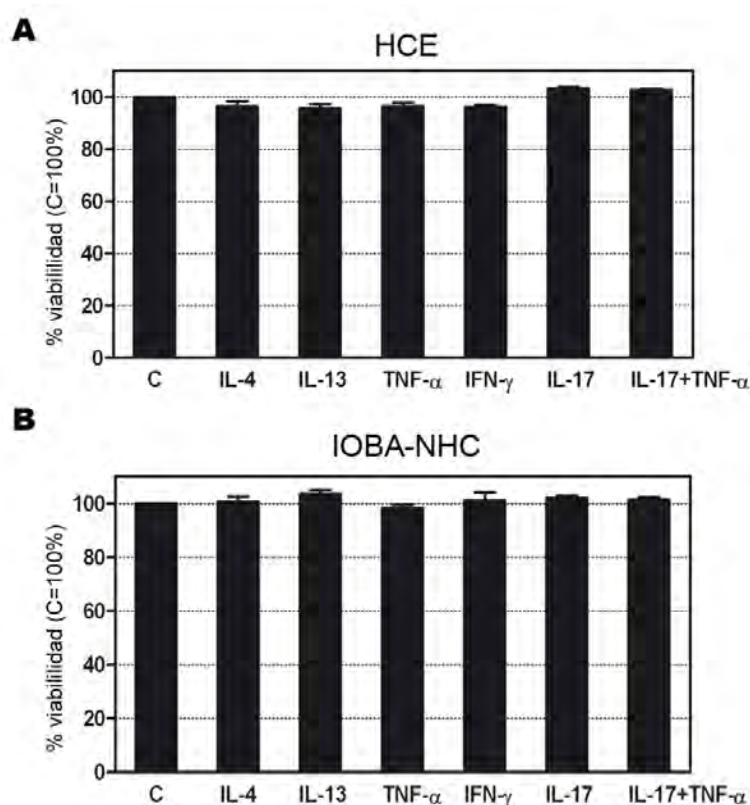
#### 1.1.2 Estudio de la modificación de la secreción basal de TGF- $\beta$ bajo condiciones proinflamatorias

Se cultivaron las células durante 48 h en presencia de citoquinas cuya presencia se ha destacado como implicada en enfermedades inflamatorias crónicas. En concreto, se estudió el efecto de las citoquinas tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4 e IL-13), Th17 (IL-17) así como de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en la secreción de TGF- $\beta$ , tanto en su forma latente, como en su forma activa. Se estudió la secreción de TGF- $\beta$ 1 en células IOBA-NHC y de TGF- $\beta$ 2 en células

HCE, por ser las principales isoformas secretadas de forma basal respectivamente por cada tipo celular, según los resultados descritos anteriormente.

- *Viabilidad celular tras tratamiento con citoquinas inflamatorias*

Previamente, y para descartar un posible efecto tóxico de las citoquinas proinflamatorias en la viabilidad celular, se realizó un ensayo XTT de citotoxicidad celular. No se observaron diferencias significativas tras las 48 h de tratamientos con los diferentes estímulos, ni en las células HCE (Fig. 9A) ni en las células IOBA-NHC (Fig. 9B). Todos los valores de viabilidad celular fueron del 90% o superiores.



**Figura 9. Viabilidad de las células HCE e IOBA-NHC tras la exposición a citoquinas proinflamatorias.** Análisis por ensayo XTT de la viabilidad de las células HCE (A) e IOBA-NHC (B) tras estimulación con IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml), TNF- $\alpha$  (25 ng/ml), IFN- $\gamma$  (500 U/ml), IL-17 (20 ng/ml) e IL-17+TNF- $\alpha$  durante 48 h. Los datos son la media  $\pm$  SEM de n=16 y están expresados como porcentaje de viabilidad con respecto a las células control no estimuladas (C=100%).

- *Efecto de la exposición de las células a la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , la citoquina tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) y las citoquinas tipo Th2 (IL-4 e IL-13) sobre la secreción de TGF- $\beta$*

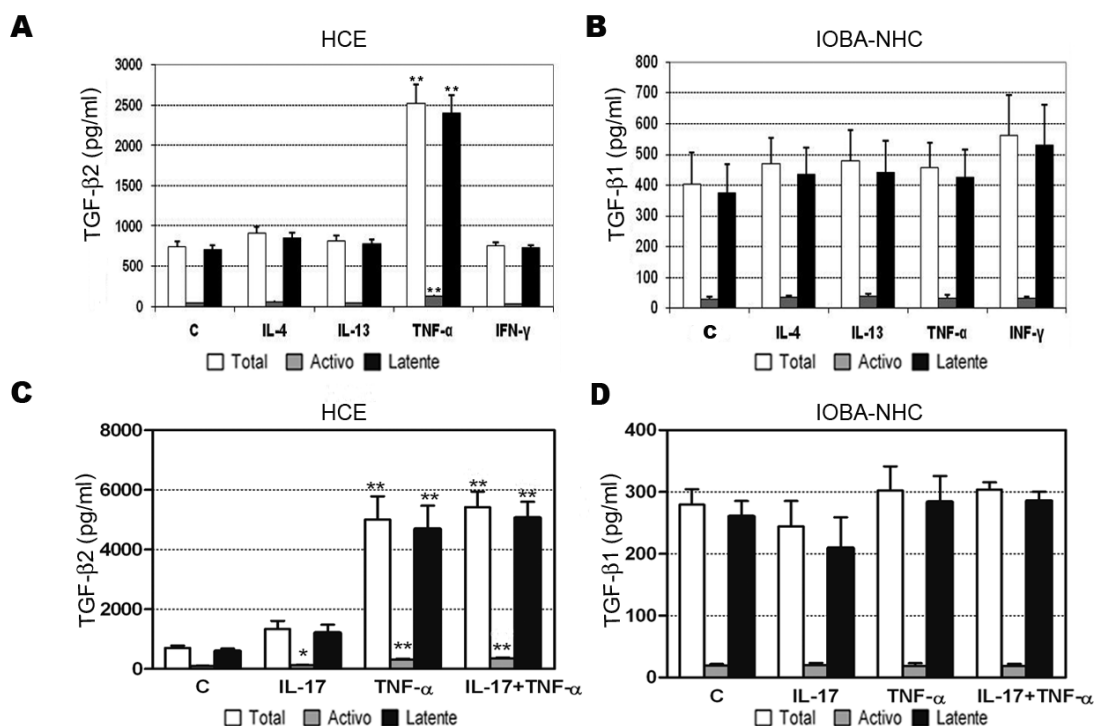
Se analizó la secreción de TGF- $\beta$  en los sobrenadantes de las células tratadas con la TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13 durante 48 h, mediante ensayo de ELISA. Los resultados obtenidos revelaron

que el TGF- $\beta$  secretado al medio se encontraba principalmente, en ambos tipos celulares, en su forma latente, aunque se encontró una pequeña cantidad en forma activa (Fig. 10). En estas condiciones de inflamación, en las células epiteliales corneales, se observó un aumento significativo en la secreción de TGF- $\beta$ 2 cuando las células eran estimuladas con la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , tanto en la forma latente mayoritariamente secretada, como en la activa (Fig. 10A). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas respecto a los niveles basales en la secreción de TGF- $\beta$ 1 por las células conjuntivales (Fig. 10B).

- *Efecto de la exposición de las células a la citoquina tipo Th17 (IL-17) sobre la secreción de TGF- $\beta$*

Estudiamos la secreción de TGF- $\beta$  en condiciones inflamatorias Th17 exponiendo las células a IL-17A. Se ha descrito que la IL-17 es capaz de modificar la secreción de citoquinas estimulada por TNF- $\alpha$  en algunos tipos celulares (Maertzdorf *et al.* 2002; van den *et al.* 2005). En concreto, en el caso de células epiteliales de la superficie ocular, resultados obtenidos en nuestro grupo han mostrado que la IL-17 aumenta sinérgicamente la producción de IL-6 e IL-8 estimulada por TNF- $\alpha$  por las células conjuntivales IOBA-NHC, mientras que disminuye significativamente la producción estimulada por TNF- $\alpha$  de IP-10 y RANTES por las células HCE (Benito *et al.* "In vitro study of the involvement of IL-17 in chronic and severe ocular surface inflammatory processes", ARVO meeting abstract Mayo 2012). Por tanto, estudiamos si la IL-17 modifica la secreción de TGF- $\beta$  estimulada por TNF- $\alpha$  en las líneas celulares de la superficie ocular. El estudio de la modificación de la secreción basal en condiciones de inflamación Th17 se llevó a cabo tras 48 h de estimulación con los diferentes tratamientos. Células no estimuladas y estimuladas con TNF- $\alpha$  fueron utilizadas como controles. Se analizó tanto la forma latente como la forma activa secretadas por ensayo multianálisis en un Luminex.

Observamos que en células HCE, la IL-17 incrementaba significativamente la secreción de la forma activa de TGF- $\beta$ 2 (Fig. 10C). Comprobamos, además, en el control de tratamiento con TNF- $\alpha$ , el incremento estadísticamente significativo de la secreción de ambas formas activa y latente con TNF- $\alpha$  que habíamos observado previamente (Fig. 10C). El tratamiento conjunto de IL-17 y TNF- $\alpha$  fue significativamente mayor que el control, pero no hubo efectos significativos con respecto a la estimulación con TNF- $\alpha$ . En las células IOBA-NHC no se apreciaron efectos en la secreción de la isoforma TGF- $\beta$ 1 en estas condiciones de inflamación (Fig. 10D).



**Figura 10. Análisis de la secreción de TGF- $\beta$  por células HCE e IOBA-NHC en condiciones proinflamatorias.** (A, B) Análisis de la secreción de TGF- $\beta$ 2 por células HCE (A) y de TGF- $\beta$ 1 por células IOBA-NHC (B) bajo condiciones inflamatorias tras estimulación con IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml), TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (500 U/ml) durante 48 h. (C, D) Análisis de la secreción de TGF- $\beta$ 2 por células HCE (C) y de TGF- $\beta$ 1 por células IOBA-NHC (D) bajo condiciones inflamatorias tras estimulación con IL-17 (20 ng/ml), TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) e IL-17+TNF- $\alpha$  durante 48 h. Los niveles de TGF- $\beta$  bajo condiciones inflamatorias fueron determinados tanto en sobrenadantes celulares acidificados (niveles totales) como no acidificados (activo) y los niveles de TGF- $\beta$  latente fueron calculados como la diferencia entre los valores total y activo. Los datos son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente de las células basales no estimuladas (C): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

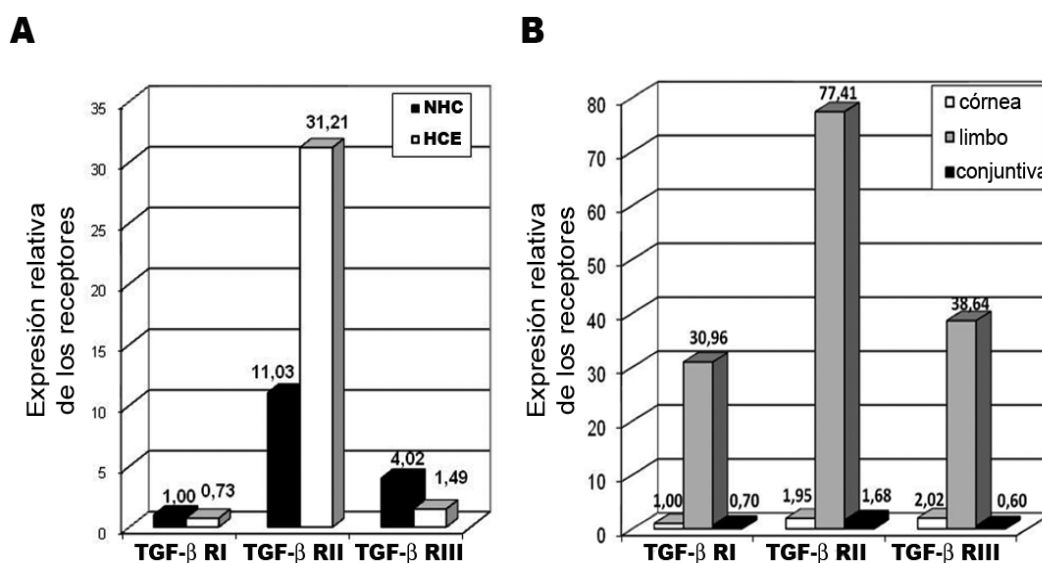
## 2. CÉLULAS EPITELIALES CORNEALES Y CONJUNTIVALES COMO “RECEPTORAS” DE TGF- $\beta$

### 2.1 Expresión de los receptores RI, RII y RIII de TGF- $\beta$

El análisis de la expresión de receptores de TGF- $\beta$  (RI, RII y RIII) se hizo tanto en condiciones basales como en condiciones inflamatorias Th1, Th2, Th17 y tras estimulación con la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ . La expresión se estudió, tanto a nivel de ARNm mediante RT-PCR a tiempo real, como a nivel proteico mediante Western blotting e inmunofluorescencia, para el estudio y cuantificación proteica, así como para su localización celular, respectivamente.

#### 2.1.1 Expresión en condiciones basales

Se observó la expresión génica de los tres tipos de receptores en condiciones basales en los dos tipos celulares por RT-PCR a tiempo real (Fig. 11A). De los tres receptores, el RII de TGF- $\beta$  fue el más expresado, tanto en la línea celular HCE como en la IOBA-NHC (Fig. 11A). Las células HCE presentaron mayores niveles de expresión para este receptor comparado con las IOBA-NHC, mientras que las células IOBA-NHC tenían mayores niveles de TGF- $\beta$  RI y RIII en comparación con las células HCE (Fig. 11A). La expresión de ARNm de los tres tipos de receptores de TGF- $\beta$  se comprobó en epitelio corneal, limbar y conjuntival de muestras humanas. Se observó que las células epiteliales de limbo tenían los mayores niveles de expresión génica para los tres receptores. El TGF- $\beta$  RII fue el receptor más expresado, tanto en este tejido como en las células epiteliales conjuntivales (Fig. 11B).

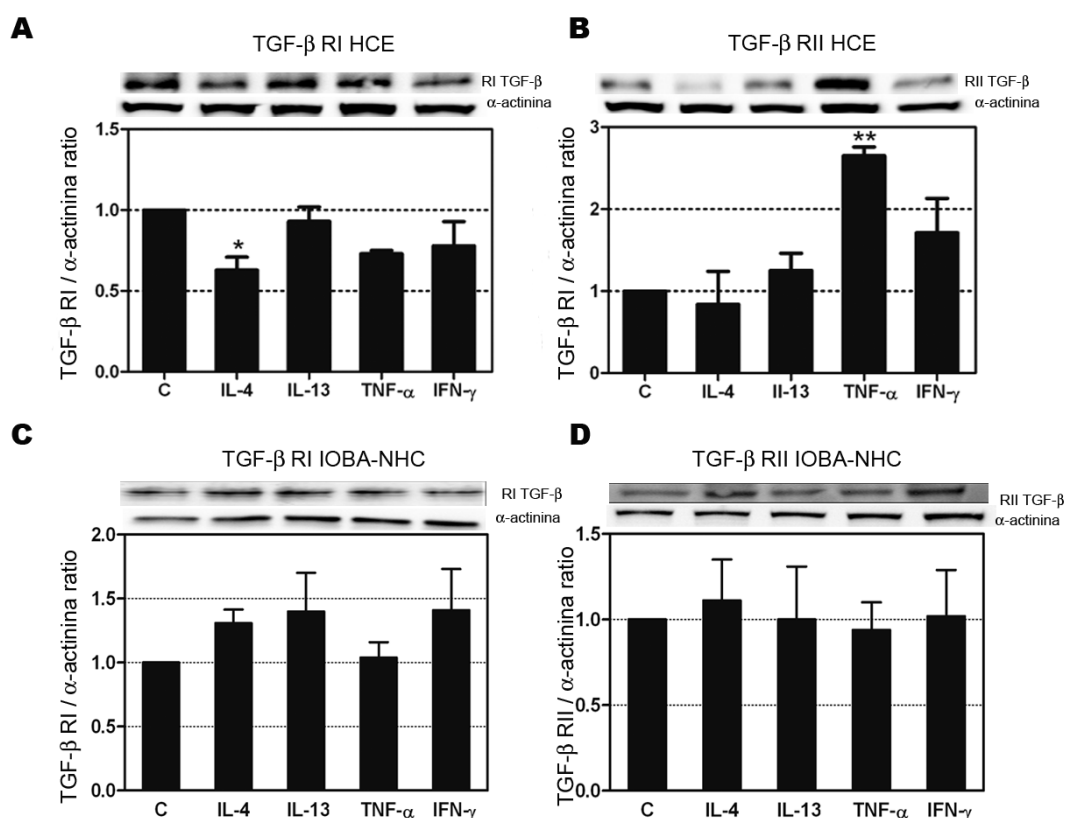


**Figura 11. Expresión basal de los receptores de TGF-β.** Análisis por RT-PCR a tiempo real de la expresión de ARNm de los receptores de TGF-β (*RI*, *RII*, *RIII*) en (A) células IOBA-NHC y HCE en condiciones basales y (B) en tejido corneal y limbar de donantes cadáver y epitelio conjuntival obtenido de sujetos sanos. La expresión se normalizó y se expresó en tanto por 1 de la expresión de TGF-β RI en (A) células conjuntivales o (B) en córnea.

Confirmamos la presencia de proteína de los receptores de TGF-β RI y RII por Western blotting y por inmunofluorescencia; el estudio de la expresión de TGF-β RIII sólo se pudo llevar a cabo mediante inmunofluorescencia porque ninguno de los anticuerpos probados daba un resultado satisfactorio para la técnica de Western blotting.

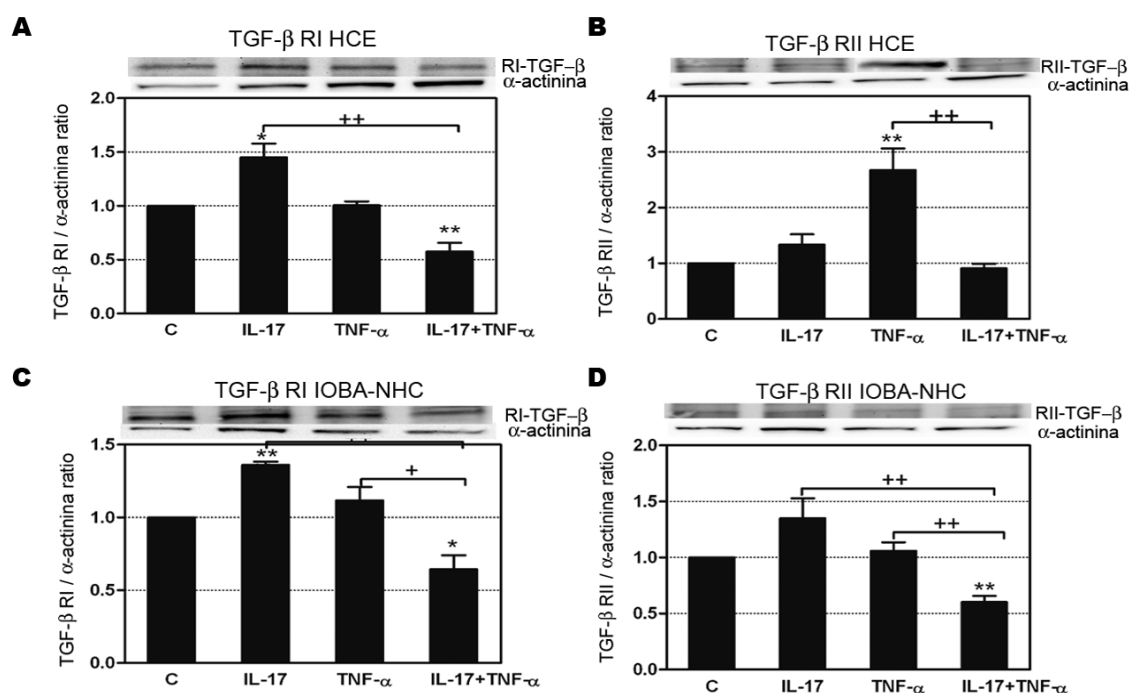
#### 2.1.2 Estudio de la modificación de la expresión basal de receptores de TGF-β bajo condiciones proinflamatorias

Se estudió la expresión de los receptores de TGF-β en células expuestas a condiciones proinflamatorias (TNF-α), Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-4 e IL-13) y Th17 (IL-17 e IL-17 + TNF-α) durante 48 h. Por Western blotting observamos que en las células corneales había un descenso significativo de la expresión de TGF-β RI tras la exposición a IL-4 (Fig. 12A) y un aumento estadísticamente significativo en la expresión de TGF-β RII tras el tratamiento con TNF-α (Fig. 12B). En las células conjuntivales no se observaron cambios significativos en la expresión de los receptores de TGF-β en estas condiciones de inflamación (Fig. 12 C, D).



**Figura 12. Expresión de los receptores de TGF-β en condiciones Th1, Th2 y con la citoquina proinflamatoria TNF-α.** Análisis por Western blotting de la expresión de los receptores de TGF-β (RI y RII) en células HCE (A, B) y en IOBA-NHC (C, D) en condiciones basales (C en eje de abscisas) y bajo condiciones inflamatorias tras 48 h de tratamiento con IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml), TNF-α (25 ng/ml) e IFN-γ (500 U/ml). Se muestra una imagen representativa de Western blotting de la expresión de TGF-β RI, TGF-β RII y α-actinina. Los datos en gráficos de barras corresponden al análisis densitométrico de la intensidad de la banda, y están expresados como el porcentaje de intensidad de la banda con respecto a las células control no estimuladas. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión de α-actinina. Los datos son la media ± SEM de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente de las células basales no estimuladas: \*p<0,05; \*\*p<0,0005.

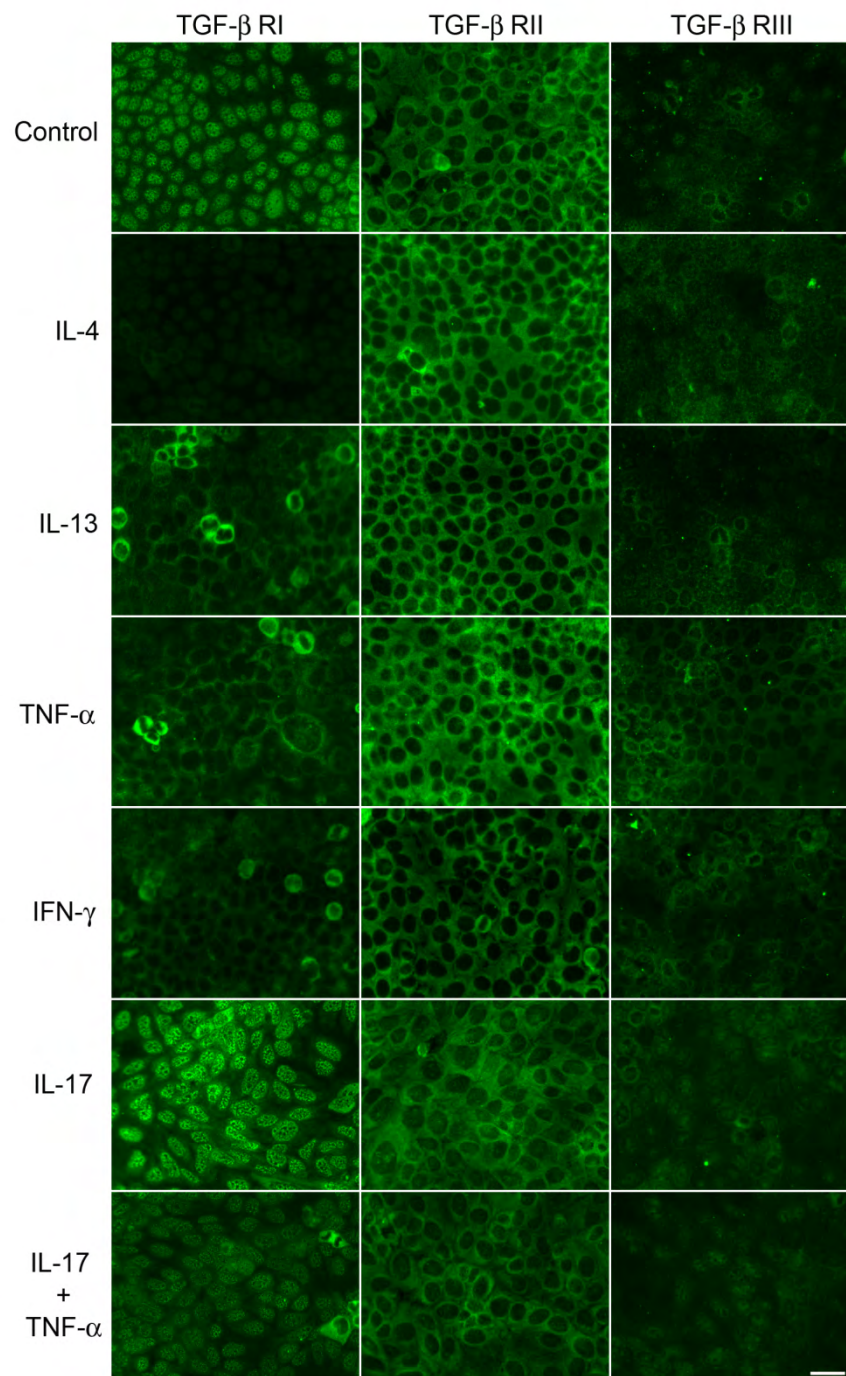
En condiciones inflamatorias Th17, observamos por Western blotting que IL-17 incrementaba significativamente la expresión de RI tanto en células HCE (Fig. 13A) como en IOBA-NHC (Fig. 13C); observamos también que el tratamiento conjunto de IL-17 y TNF-α producía una disminución de la expresión de RI respecto a los niveles expresados con IL-17 en ambos tipos celulares, así como una disminución en la expresión de RII con respecto a la expresión estimulada con TNF-α en células HCE (Fig. 13B) y respecto a la estimulada con IL-17 y TNF-α en las células IOBA-NHC (Fig. 13D).



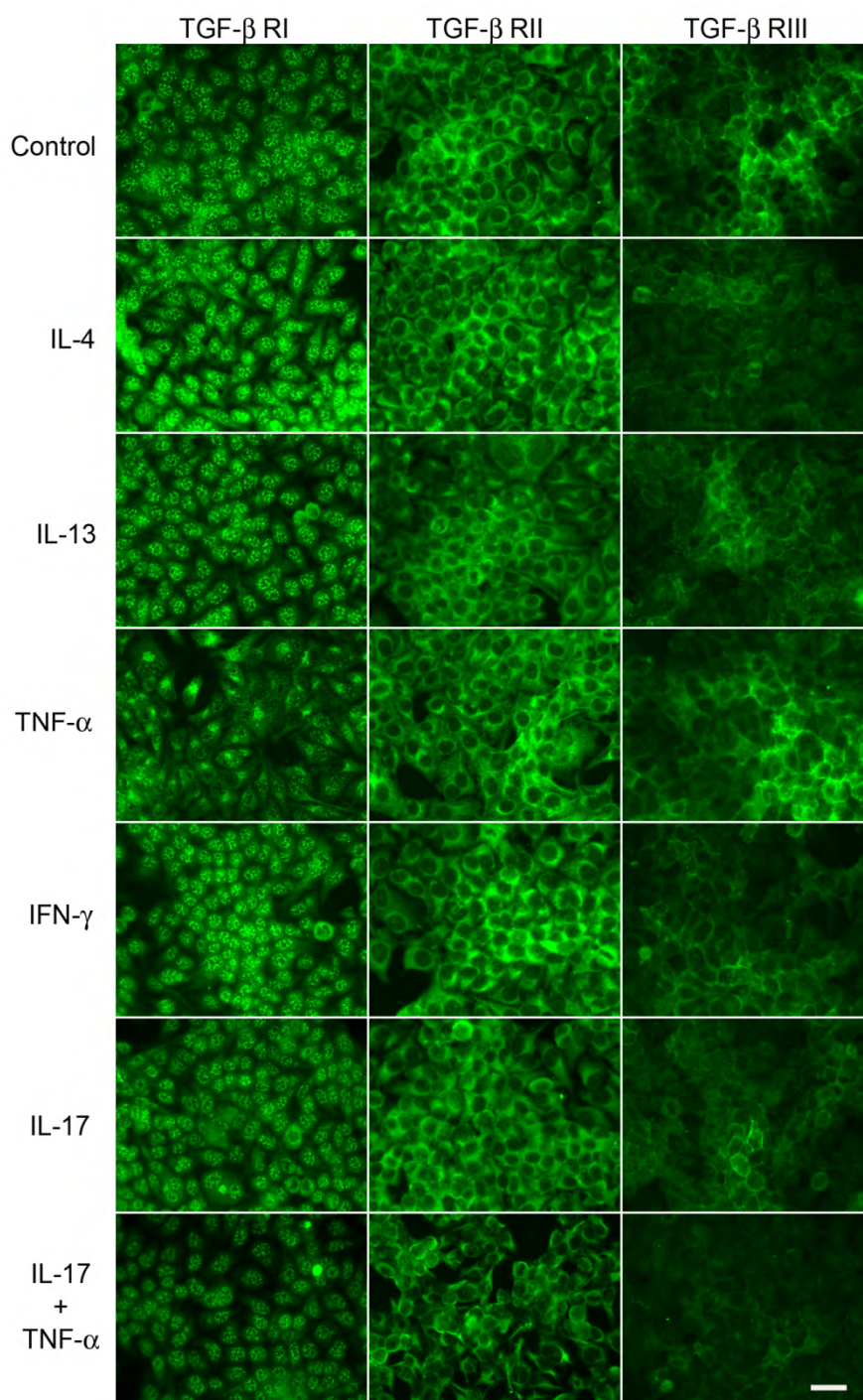
**Figura 13. Expresión de los receptores de TGF- $\beta$  en condiciones proinflamatorias Th17.** Análisis por Western blotting de la expresión de los receptores de TGF- $\beta$  RI (A y C) y RII (B y D) en células HCE (A y B) y en IOBA-NHC (C y D) en condiciones basales y bajo condiciones inflamatorias tras 48 h de tratamiento con IL-17 (20 ng/ml), TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) e IL-17 + TNF- $\alpha$ . Se muestra una imagen representativa de Western blotting de la expresión de TGF- $\beta$  RI, TGF- $\beta$  RII y  $\alpha$ -actinina. Los datos en gráficos de barras corresponden al análisis densitométrico de la intensidad de la banda, y están expresados como el porcentaje de intensidad de la banda con respecto a las células control no estimuladas. Los datos fueron corregidos con respecto a la expresión de  $\alpha$ -actinina. Los datos son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente de las células basales no estimuladas: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,0005$ . \*\*Significativamente diferente de las células tratadas con IL-17 o con TNF- $\alpha$ : + $p < 0,05$ ; ++ $p < 0,01$ .

La localización celular de los receptores de TGF- $\beta$  RI, RII y RIII en células epiteliales corneales y conjuntivales en condiciones basales e inflamatorias se analizó mediante ensayos por inmunofluorescencia en células fijadas (Fig. 14 y 15). En células HCE, la señal del RI del TGF- $\beta$  fue observada predominantemente en el núcleo bajo condiciones basales y de inflamación Th17, y en el citosol tras la exposición a TNF- $\alpha$  y a las citoquinas tipo Th1 (INF- $\gamma$ ) y Th2 (IL-4 e IL-13) (Fig. 14). Mientras, en las células IOBA-NHC la tinción de TGF- $\beta$  RI estaba localizada en la región nuclear en todas las condiciones excepto con el tratamiento con TNF- $\alpha$ , en el cual se observó que la señal de inmunofluorescencia estaba concentrada en el área perinuclear (Fig. 15). Los niveles de expresión de proteína observados por inmunofluorescencia para los tres receptores de TGF- $\beta$  y por Western blotting para TGF- $\beta$  RI y TGF- $\beta$  RII coincidían con los niveles de ARNm en las dos líneas celulares.



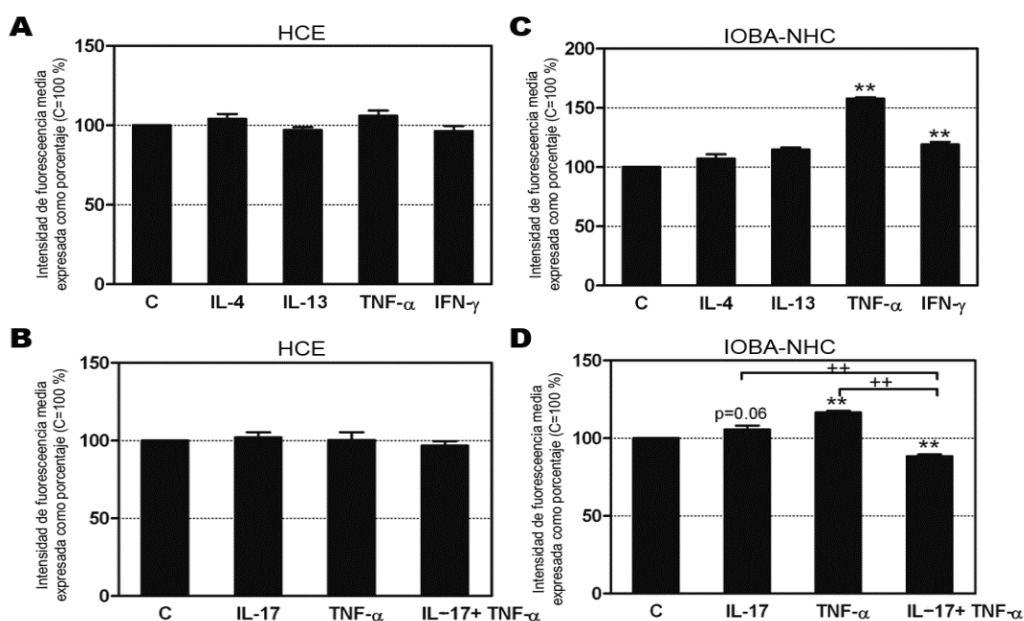


**Figura 14. Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de los receptores de TGF-β en células epiteliales corneales HCE.** La expresión de los receptores de TGF-β (RI, RII y RIII) (verde) fue analizada por inmunofluorescencia en células epiteliales corneales HCE en condiciones basales (control) e inflamatorias después de 48 h de tratamiento con IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml), TNF-α (25 ng/ml), IFN-γ (500 U/ml), IL-17 (20 ng/ml) e IL-17 + TNF-α. Objetivo 40x. Barra de escala: 30 μm.



**Figura 15. Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de los receptores de TGF-β en células epiteliales conjuntivales IOBA-NHC.** La expresión de los receptores de TGF-β (RI, RII y RIII) (verde) fue analizada por inmunofluorescencia en células epiteliales conjuntivales IOBA-NHC en condiciones basales (control) e inflamatorias después de 48 h de tratamiento con IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml), TNF-α (25 ng/ml), IFN-γ (500 U/ml), IL-17 (20 ng/ml) e IL-17 + TNF-α. Objetivo 40x. Barra de escala: 30 μm.

Puesto que no se pudo hacer el estudio de la expresión de proteína de RIII de TGF- $\beta$  mediante Western blotting por problemas con el anticuerpo, evaluamos la expresión de este receptor mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de la expresión observada en los ensayos de inmunofluorescencia con el software Leica Application Suite. Los resultados de esta cuantificación no mostraron diferencias estadísticamente significativas en las células HCE entre la expresión en condiciones basales y en las diferentes condiciones inflamatorias de estimulación (Fig. 16 A, B). Por el contrario, en las células IOBA-NHC, se observó un aumento significativo de la expresión del receptor RIII tras el tratamiento con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Fig. 16 C) y al borde de la significación estadística ( $p=0,06$ ) tras estimulación con IL-17 (Fig. 16 D) si bien el incremento era muy pequeño. Observamos además, que el tratamiento conjunto de IL-17+TNF- $\alpha$  producía una disminución estadísticamente significativa de la expresión de RIII respecto al incremento de la expresión observado con IL-17 y TNF- $\alpha$  (Fig. 16D).



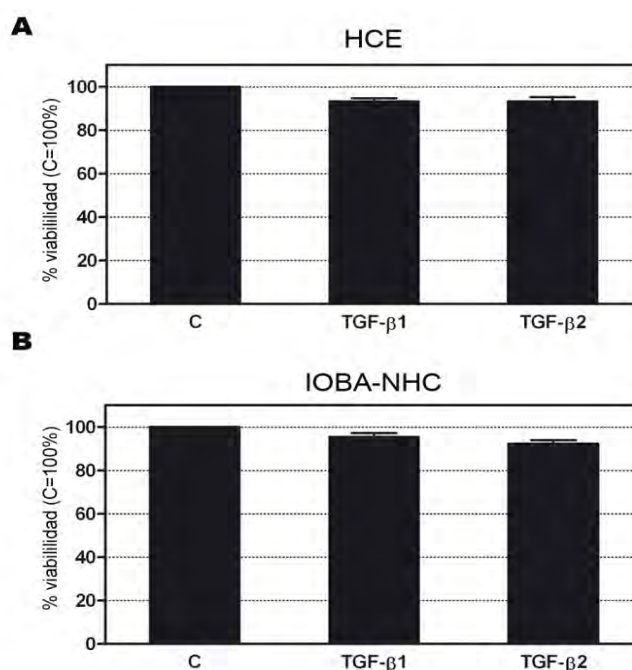
**Figura 16. Análisis de la intensidad de fluorescencia media de los ensayos de inmunofluorescencia para la expresión del receptor III de TGF- $\beta$  (RIII) en diferentes condiciones proinflamatorias.** Análisis de la expresión del receptor de TGF- $\beta$  RIII en células HCE (A, B) y en IOBA-NHC (C, D) en condiciones basales (C) y bajo condiciones inflamatorias después de 48 h de tratamiento con IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml), TNF- $\alpha$  (25 ng/ml), IFN- $\gamma$  (500 U/ml), IL-17 (20 ng/ml) e IL-17+ TNF- $\alpha$ . Los datos en gráficos de barras corresponden al análisis de la intensidad de fluorescencia media, y están expresados como el porcentaje de intensidad de fluorescencia con respecto a las células control no estimuladas. Los datos son la media  $\pm$  SEM de los datos de cuatro fotografías por tratamiento llevados a cabo por duplicado en dos experimentos independientes. \*Significativamente diferente comparado con las células basales no estimuladas: \*\* $p<0,0005$ . ++Significativamente diferente comparado con las células tratadas con IL-17 o TNF- $\alpha$ : ++ $p<0,01$ .

## 2.2 Activación de transducción de señales implicadas en las respuestas a TGF- $\beta$

Con el objetivo de conocer los mecanismos intracelulares activados en las respuestas a TGF- $\beta$  en las células epiteliales corneales y conjuntivales, analizamos la fosforilación y translocación nuclear del factor de transcripción SMAD-2 y del factor inhibidor SMAD-7.

### 2.2.1 Análisis de la viabilidad celular tras la exposición a TGF- $\beta$ .

Para descartar un posible efecto tóxico de la isoformas de TGF- $\beta$  en la viabilidad celular se realizó un ensayo XTT. Todos los valores de viabilidad celular fueron del 90% o superiores; no se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular ni en células HCE (Fig. 17 A) ni en las células IOBA-NHC (Fig. 17 B).



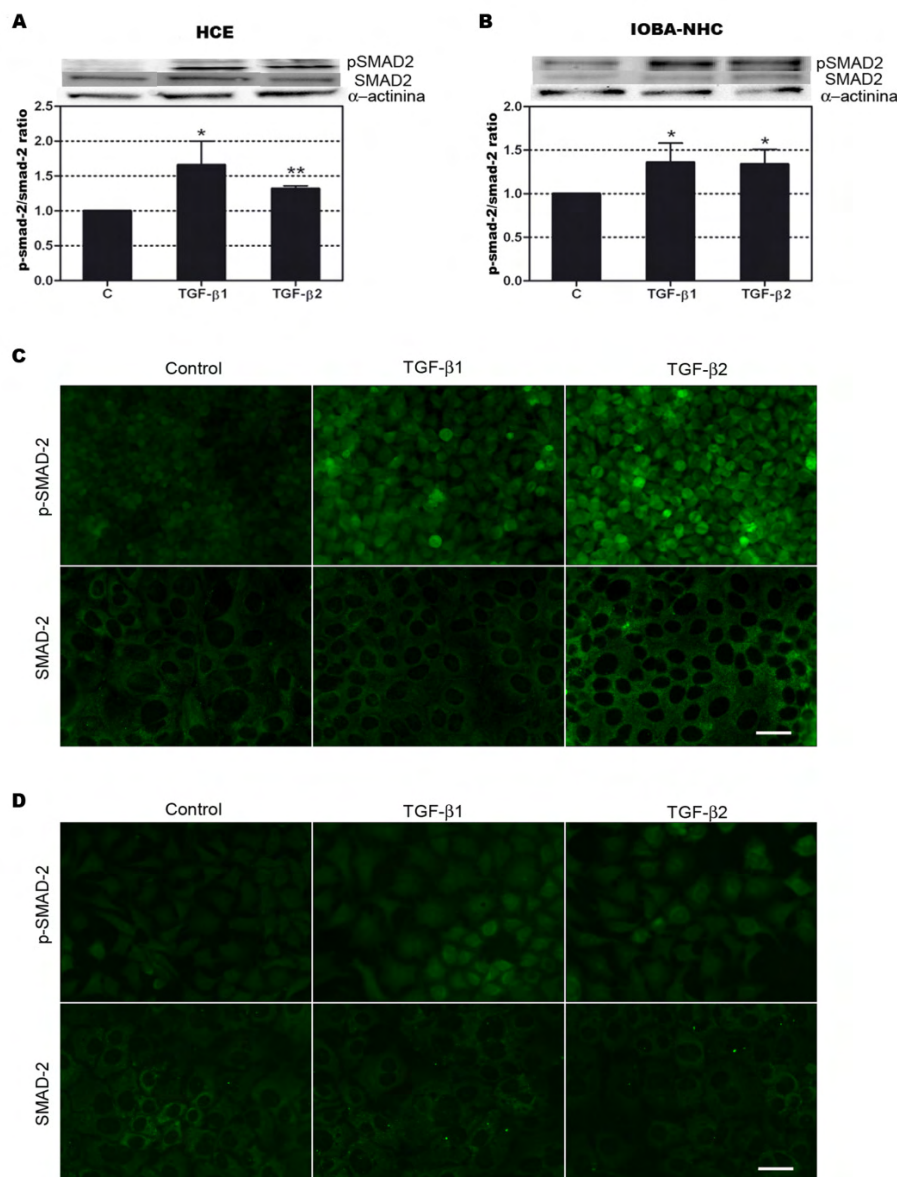
**Figura 17. Viabilidad de las células HCE e IOBA-NHC tras la exposición a TGF- $\beta$ .** Análisis por ensayo XTT de la viabilidad de las células HCE (A) e IOBA-NHC (B) tras estimulación con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml) durante 48 h. Los datos son la media  $\pm$  SEM de n=16 y están expresados como porcentaje de viabilidad con respecto a las células control no estimuladas (C=100%).

### 2.2.2 Análisis de la fosforilación y translocación al núcleo del factor de transcripción SMAD-2 tras el tratamiento con TGF- $\beta$

Confirmamos que ambos tipos celulares, HCE e IOBA-NHC, respondían al TGF- $\beta$  incrementando la fosforilación de SMAD-2 (vía canónica intracelular para TGF- $\beta$ ) y con translocación nuclear tras 30 min de tratamiento con ambas isoformas de TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 y



TGF- $\beta$ 2. El incremento en la fosforilación se observó por Western blotting (Fig. 18 A, B) y la translocación nuclear por tinción de inmunofluorescencia (Fig. 18 C, D).

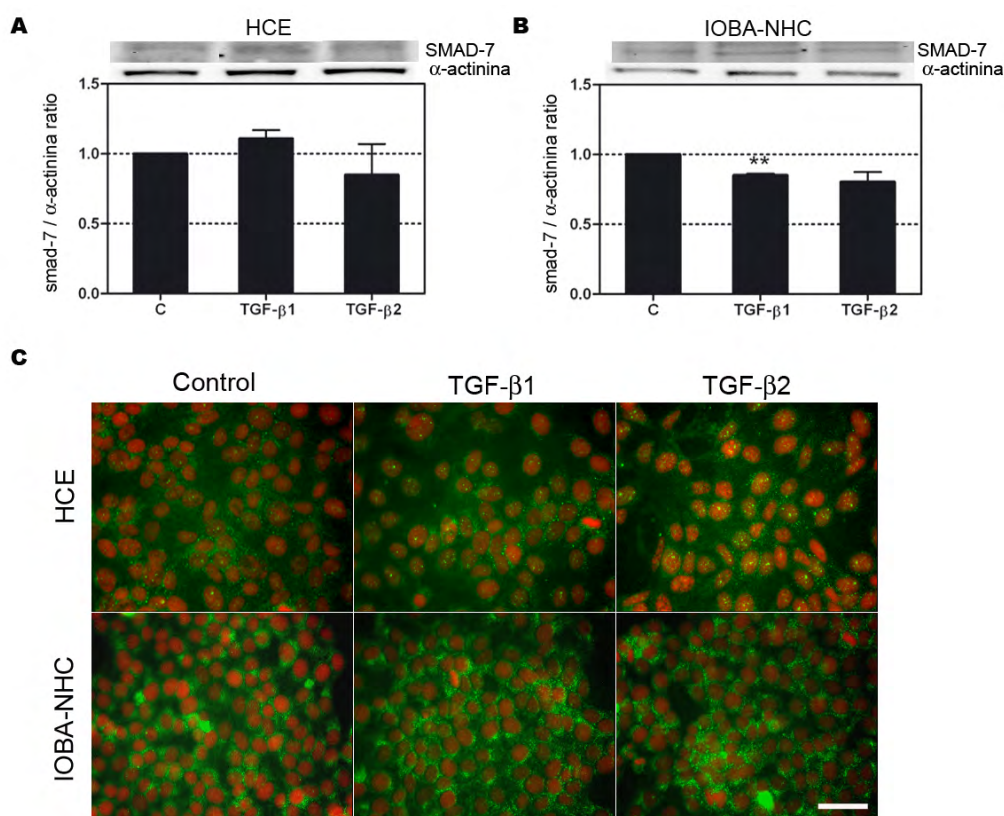


**Figura 18. Expresión y translocación nuclear de pSMAD2 en células epiteliales corneales y conjuntivales en condiciones basales y estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.** Las células fueron tratadas con TGF- $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 (10 ng/ml) durante 30 min. (A y B) Análisis de Western Blotting en células HCE (A) y en IOBA-NHC (B). Se muestra una imagen representativa de la expresión de pSMAD-2, SMAD-2 y  $\alpha$ -actinina. Las barras corresponden al análisis densitométrico de la intensidad de la banda, expresado como el porcentaje de la intensidad de la banda con respecto a células control no estimuladas. Los datos están expresados como el ratio de pSMAD-2 /SMAD-2 y fueron corregidos con respecto a la expresión de  $\alpha$ -actinina. Los datos son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente del control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ . (C y D) Análisis de inmunofluorescencia de pSMAD-2 y SMAD-2 (verde) en células HCE (C) e IOBA-NHC (D). Objetivo 40x. Barra de escala: 30  $\mu$ m.

### 2.2.3 Análisis de la expresión de SMAD-7

Además de la fosforilación y translocación nuclear de SMAD-2, se analizó la expresión de SMAD-7 a los 30 min de tratamiento con las isoformas de TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.

Tanto las células HCE como las IOBA-NHC expresaron SMAD-7 en condiciones basales (Fig. 19). En las células IOBA-NHC se observó por Western blotting una disminución estadísticamente significativa de la expresión de SMAD-7 con la isoforma TGF- $\beta$ 1 (Fig. 19B). Confirmamos estos resultados por ensayo de inmunofluorescencia. No se observaron diferencias de localización celular de SMAD-7 entre los controles y tras los diferentes tratamientos en ninguno de los 2 tipos celulares (Fig. 19C).



**Figura 19. Expresión de SMAD7 en células epiteliales corneales y conjuntivales en condiciones basales y estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.** Análisis por Western blotting de la expresión de SMAD-7 en células (A) HCE y (B) IOBA-NHC estimuladas con TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) y TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml) durante 30 min. Se muestra una imagen representativa de la expresión de SMAD-7 y  $\alpha$ -actinina. Las barras corresponden al análisis densitométrico de la intensidad de la banda, expresado como el porcentaje de la intensidad de la banda con respecto a células control no estimuladas. Los datos fueron corregidos con respecto a la expresión de  $\alpha$ -actinina. Los datos son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente del control: \*\* $p < 0,005$ . (C) Análisis por inmunofluorescencia de SMAD-7 (verde). Los núcleos celulares fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo). Objetivo 40x. Barra de escala: 30  $\mu$ m.

#### 2.2.4 Análisis de la activación de otras vías de señalización implicadas en respuestas a otros estímulos inflamatorios: pSTAT-1/STAT-1, pSTAT-6/STAT6, pI $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$

Para determinar si parte de los efectos del TGF- $\beta$  sobre las células pudieran ser debidos a la activación de otras vías de señalización, se estudió si TGF- $\beta$  activaba la vía de señalización inflamatoria de NF $\kappa$ B (vía de señalización del TNF- $\alpha$ ), y las vías de señalización pSTAT-1/STAT-1 y de pSTAT-6/STAT-6 de IFN- $\gamma$  y de IL-4 e IL-13 respectivamente, en las células epiteliales corneales y conjuntivales. Este estudio se llevó a cabo analizando por Western blotting la expresión de estos factores de transcripción y su fosforilación.

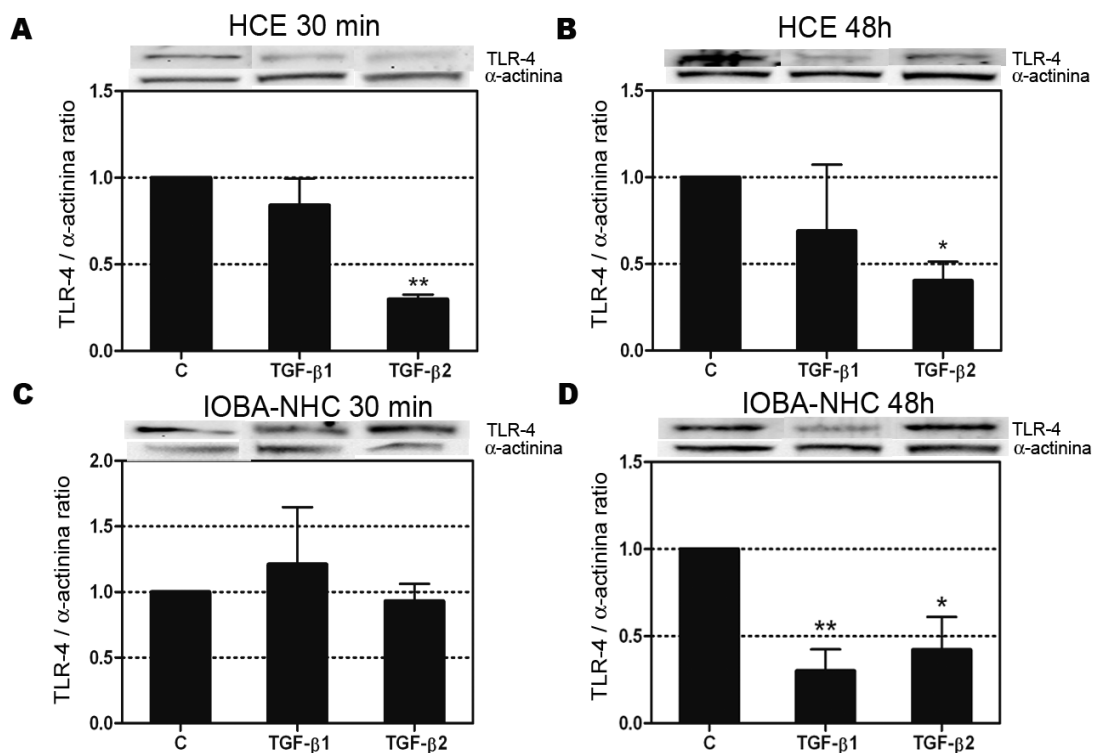
No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la activación de la vía de señalización inflamatoria del factor de transcripción NF $\kappa$ B, ya que no se observó ninguna diferencia significativa en la relación pI $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibidor de NF $\kappa$ B) tras estimulación con TGF- $\beta$  durante 30 min en ninguno de los 2 tipos celulares estudiados. Tampoco se observó activación por TGF- $\beta$  en células HCE e IOBA-NHC de la vía de señalización pSTAT-1/STAT-1 ni de la vía pSTAT-6/STAT-6 (datos no mostrados).

### **2.3 Modificación por TGF- $\beta$ de la expresión de receptores para diferentes moléculas implicadas en respuestas inflamatorias**

#### 2.3.1 Análisis del receptor tipo Toll TLR-4

Dada la implicación del receptor tipo Toll TLR-4 en los procesos inflamatorios de la superficie ocular, analizamos si la expresión en células HCE e IOBA-NHC se modificaba por el tratamiento con TGF- $\beta$ . El análisis se hizo tanto a los 30 min de tratamiento con TGF- $\beta$ , para ver su efecto a corto plazo, como a las 48 h de tratamiento, para ver el efecto a más largo plazo.

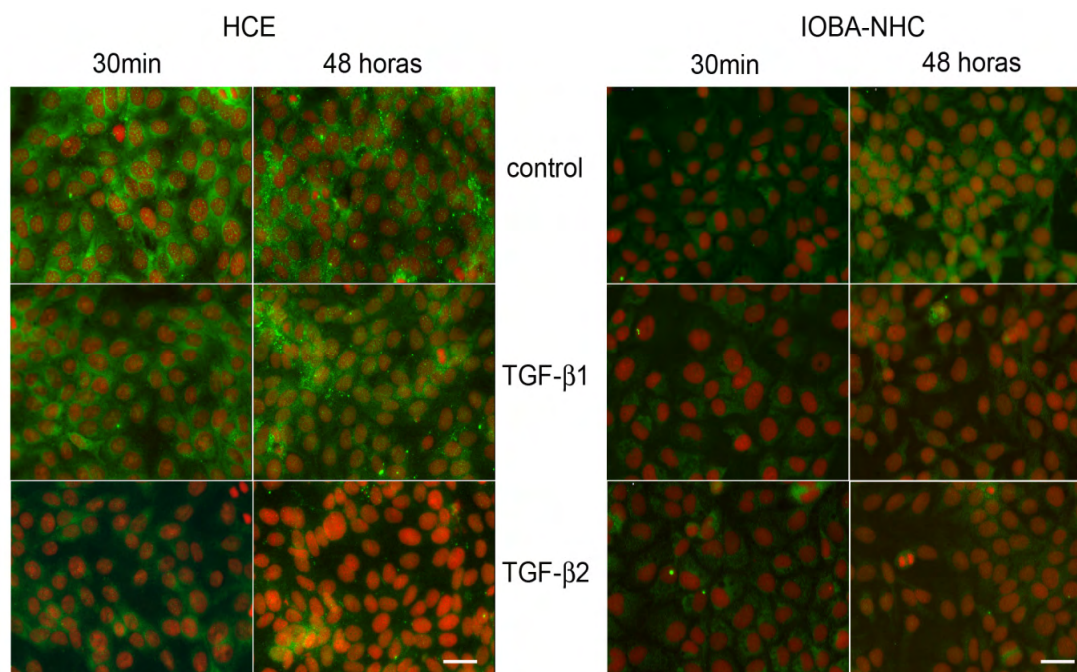
Los resultados obtenidos mediante Western blotting mostraron que el tratamiento con la isoforma TGF- $\beta$ 2 producía una disminución estadísticamente significativa de la expresión de TLR-4 en células HCE tanto a 30 min como a 48 h (Fig. 20 A, B). La isoforma TGF- $\beta$ 1 también disminuyó la expresión, pero este efecto no fue estadísticamente significativo (Fig. 20 A, B). En las células epiteliales conjuntivales IOBA-NHC, se observó una disminución significativa de la expresión de TLR-4 tras el tratamiento durante 48 h con ambas isoformas de TGF- $\beta$  (Fig. 20 C, D).



**Figura 20. Expresión de TLR-4 en células epiteliales corneales y conjuntivales en condiciones basales y estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.** Análisis por Western blotting del efecto de TGF- $\beta$  en la expresión de TLR-4 en células epiteliales corneales (HCE) (A, B) y en células epiteliales conjuntivales (IOBA-NHC) (C, D) a los 30 min (A, C) y 48 h (B, D) de tratamiento. Se muestra una imagen representativa de la expresión de TLR-4 y de  $\alpha$ -actinina. Las barras corresponden al análisis densitométrico de la intensidad de la banda, expresado como el porcentaje de la intensidad de la banda de TLR-4 con respecto a células control no estimuladas (C). Los datos fueron corregidos con respecto a la expresión de  $\alpha$ -actinina. Las barras corresponden a la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes por duplicado. \* Significativamente diferente del control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  respecto a células no estimuladas.

Los análisis mediante ensayos de inmunofluorescencia confirmaron la disminución de expresión observada tras el tratamiento respecto a los niveles basales en ambos tipos celulares (Fig. 21).



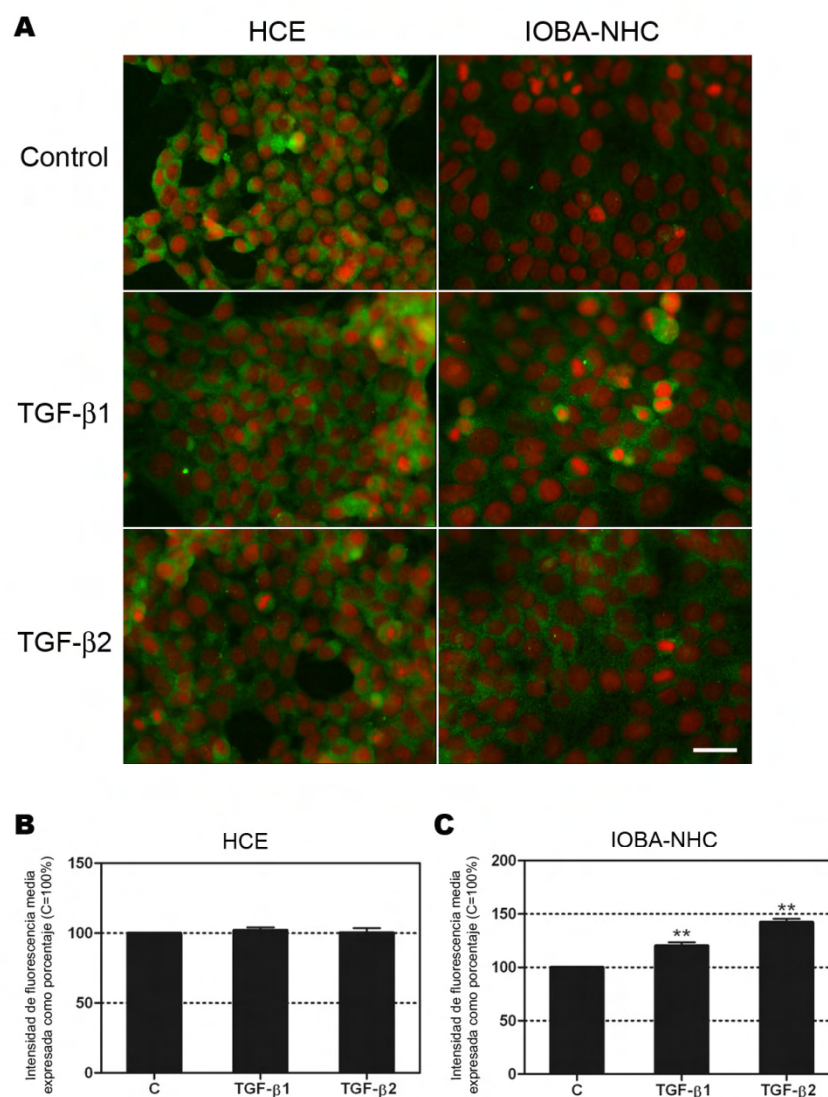


**Figura 21. Expresión de TLR-4.** Detección por microscopía de inmunofluorescencia de TLR-4 (verde) en la línea celular epitelial corneal (HCE) y en la línea celular epitelial conjuntival (IOBA-NHC) tras estimulación con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 a los 30 min y 48 h de tratamiento. Los núcleos celulares fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo). Objetivo 40x. Barra de escala: 30  $\mu$ m.

### 2.3.2 Análisis del receptor IL-17 (IL-17R)

El efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión del receptor de la citoquina inflamatoria IL-17 se analizó por inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos confirmaron que, tanto las células epiteliales conjuntivales IOBA-NHC, como las corneales HCE, expresan receptores para IL-17 en condiciones basales. Se observaron diferencias de intensidad en la expresión basal de estos receptores entre las células HCE e IOBA-NHC, encontrándose una mayor expresión en las células HCE (Fig. 22A).

El análisis de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia mostró que tras el tratamiento durante 48 h con ambas isoformas de TGF- $\beta$ , la expresión del IL-17R se incrementaba significativamente en las células IOBA-NHC; este efecto no se observó en las HCE (Fig. 22B).



**Figura 22. Análisis de la expresión del receptor de IL-17 (IL-17R).** (A) Detección por microscopía de inmunofluorescencia del receptor de IL-17 (IL-17R) (verde) en la línea celular epitelial corneal (HCE) y en la línea celular epitelial conjuntival (IOBA-NHC) tras estimulación con TGF-β1 y TGF-β2 a las 48 h de tratamiento. Los núcleos celulares fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo). Objetivo 40x. Barra de escala: 30 μm. (B) y (C) Análisis de la intensidad de fluorescencia media de los ensayos de inmunofluorescencia para la expresión de IL-17 R en células (B) HCE y (C) IOBA-NHC. Los datos en gráficos de barras están expresados como el porcentaje de intensidad de fluorescencia con respecto a las células control no estimuladas (C). Los datos son la media ± SEM de cuatro fotografías por tratamiento en dos experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente de las células basales no estimuladas: \*\*p<0,05.

## 2.4 Análisis de la secreción celular en condiciones basales y en respuesta a las distintas isoformas de TGF- $\beta$

Para estudiar qué efectos tiene el tratamiento con TGF- $\beta$  sobre la secreción celular por células epiteliales de la superficie ocular, se determinó la secreción de citoquinas y quimioquinas y de SLPI, TSLP y MMPs en las células epiteliales corneales y conjuntivales después de 24 y/o 48 h de exposición a TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2.

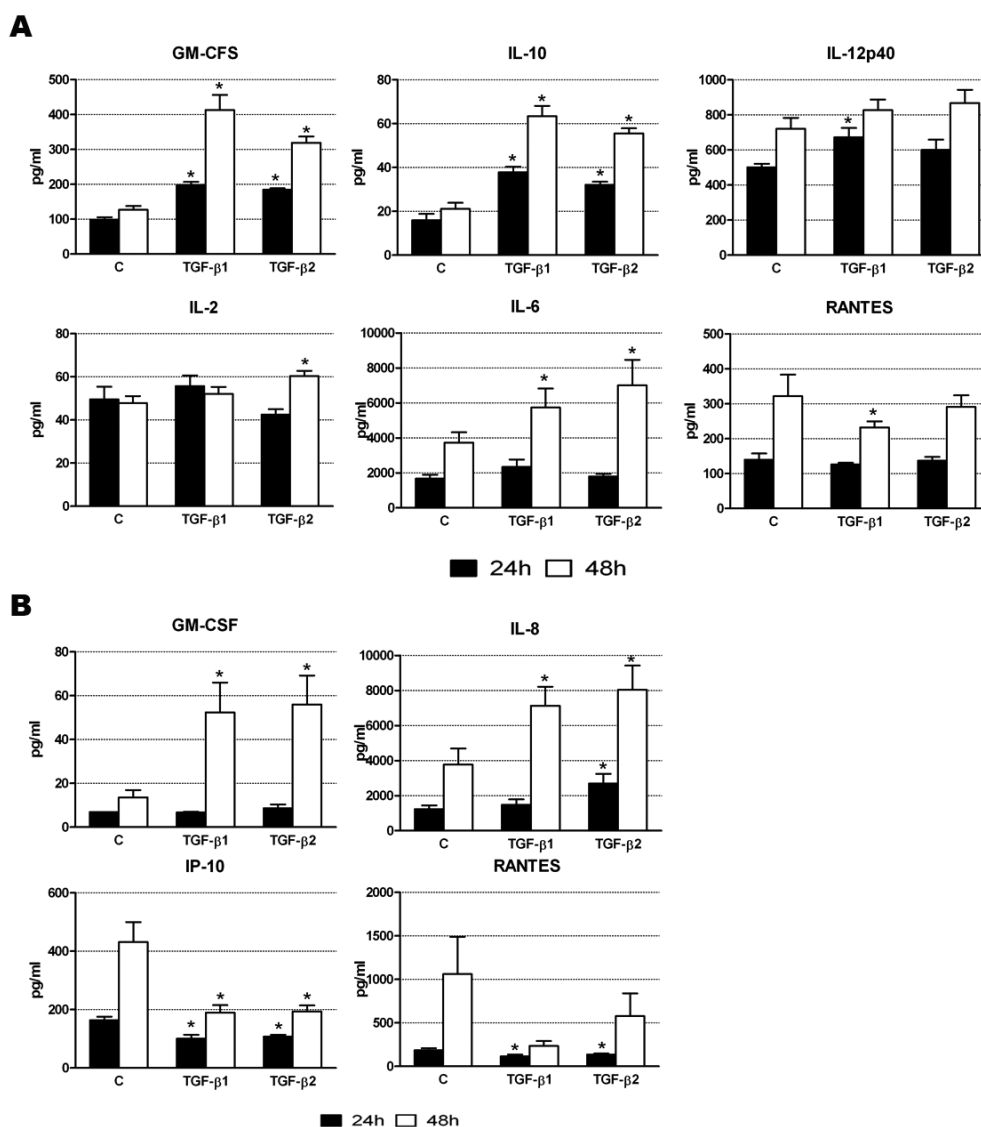
### 2.4.1 Citoquinas/quimioquinas

Se mantuvieron células en condiciones basales (en ausencia de estímulo inflamatorio) como referencia. Para el análisis del patrón de citoquinas/quimioquinas secretado por las células se utilizaron dos métodos:

1) Array de microesferas basado en sistema de detección multi-analito Luminex IS-100 basado en la tecnología X-MAP (Luminex<sup>TM</sup> Corporation, Austin, Tx, USA) para el estudio de la secreción de Eotaxina-1, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IP-10, MCP-1, MIP1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  y RANTES.

2) Ensayos de ELISA para el estudio de la secreción de MIP-3 $\alpha$ /CCL-20, IL-23 e IL-27.

Todas las citoquinas se analizaron en ambos tipos celulares. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con TGF- $\beta$  modificaba el patrón de secreción celular de citoquinas y quimioquinas con algunas diferencias dependiendo del tipo celular (corneal o conjuntival), el tiempo de exposición al TGF- $\beta$  (24 h o 48 h) y el tipo de isoforma de TGF- $\beta$  ( $\beta$ 1 o  $\beta$ 2) utilizado en la estimulación. En concreto, se observaron los siguientes cambios (sólo se muestran los cambios que presentaron diferencias significativas)(Fig. 23): se observó que la secreción de GM-CSF estaba incrementada significativamente en ambos tipos celulares tras 24 h (HCE) o 48 h (HCE e IOBA-NHC) de exposición a TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (Fig. 23 A y B). En células HCE (Fig. 23A) la secreción de IL-10 tras 24 o 48 h y de IL-6 tras 48 h de exposición a TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2 se vio incrementada. El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 en este tipo celular también incrementó significativamente la secreción de IL-12p40 a las 24 h, mientras que disminuyó significativamente la secreción de RANTES después de 48 h. El tratamiento con TGF- $\beta$ 2 significativamente incrementó la secreción de IL-2. En las células IOBA-NHC (Fig. 23B) se observó un incremento en la secreción de IL-8 tras la exposición durante 24 h a TGF- $\beta$ 1 y a TGF- $\beta$ 2 tanto a 24 h como a 48 h. La secreción de IP-10 (tras 24 y 48 h) y RANTES (tras 24 h) se vio significativamente disminuída tras la exposición tanto a TGF- $\beta$ 1 como a TGF- $\beta$ 2.

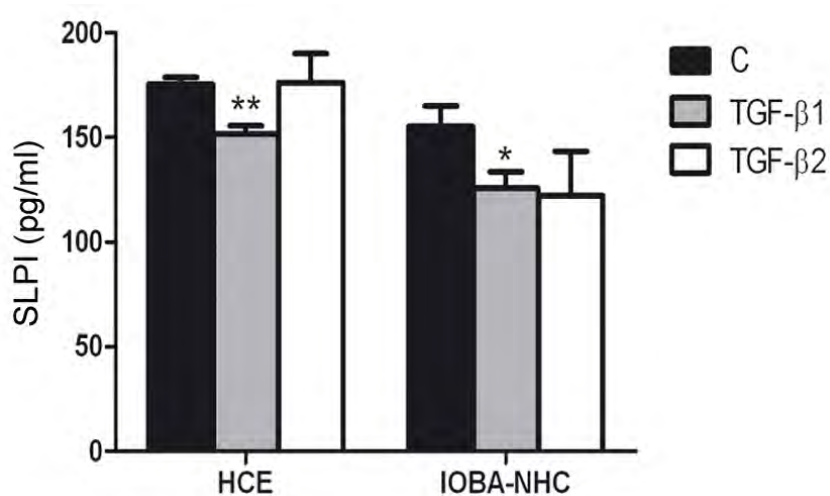


**Figura 23. Efectos del TGF- $\beta$  sobre la secreción de citoquinas/quimioquinas en células HCE e IOBA-NHC.** La secreción de citoquinas y quimioquinas por células epiteliales corneales (HCE) (A) y conjuntivales (IOBA-NHC) (B) fue determinada en sobrenadantes celulares en condiciones basales y tras 24 h (barras cerradas) y 48 h (barras abiertas) de exposición a TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml). Los datos son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. Sólo se muestran aquellas citoquinas o quimioquinas que presentaron diferencias significativas respecto a los niveles basales en cada tipo celular. \*Significativamente diferente comparado con la secreción basal: \* $p < 0,05$ .

Adicionalmente, se estudió la secreción de las citoquinas/quimioquinas MIP-3 $\alpha$ /CCL-20, IL-23 e IL-27 por ELISA, tras 48 h de exposición a TGF- $\beta$ . No se observaron diferencias significativas en la secreción de MIP-3 $\alpha$  ni de IL-23 para ninguno de los tipos celulares tras los diferentes tratamientos (datos no mostrados). No se detectó secreción de IL-27 en ningún tipo celular tras 48 h de tratamiento con TGF- $\beta$  (datos no mostrados).

#### 2.4.2 Inhibidor de la proteasa de leucocitos secretores (*Secretory leucocyte protease inhibitor*, SLPI)

Para llevar a cabo el estudio del efecto del TGF- $\beta$  sobre la secreción de SLPI por células epiteliales de la superficie ocular, se procedió al cultivo de las células HCE e IOBA-NHC en presencia/ausencia de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 durante 48 h, y se analizó dicha secreción mediante ensayo de ELISA. Se observó que ambos tipos celulares secretaron SLPI basalmente; además, se observó que tras 48 h de exposición, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 produjo una disminución estadísticamente significativa de la secreción basal en ambos tipos celulares (Fig. 24).



**Figura 24. Efecto del TGF- $\beta$  sobre la secreción de SLPI por células epiteliales corneales (HCE) y conjuntivales (IOBA-NHC).** La secreción de SLPI por células epiteliales corneales (HCE) y conjuntivales (IOBA-NHC) fue estudiada en condiciones basales (C) y tras 48 h de exposición a TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml). Los datos son la media de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente de las células basales no estimuladas (control): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

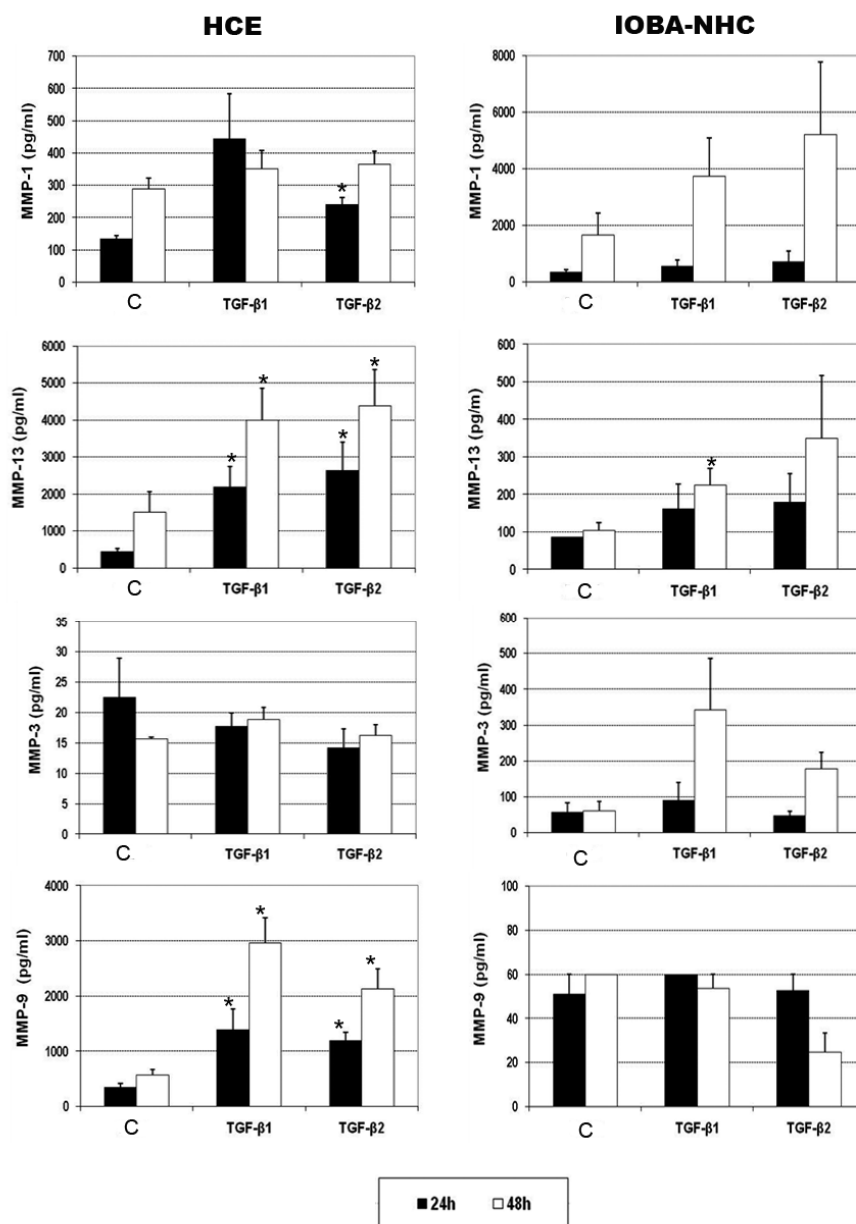
#### 2.4.3 Linfopoyetina estromal tímica (*Thymic Stromal Lymphopoietin*, TSLP)

Se analizó también, mediante ELISA convencional, la expresión de la molécula TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) en condiciones basales y tras 48 h de estimulación con TGF- $\beta$ . No se detectó secreción de TSLP en ninguno de los casos estudiados (datos no mostrados).

#### 2.4.4 Metaloproteinasas (MMPs)

Dada la implicación de las MMPs en los procesos inflamatorios, se analizó la secreción de metaloproteinasas 1, 3, 9 y 13 mediante la determinación simultánea multianálisis en un Luminex IS-100 tras 24 h y 48 h de estimulación de las células con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.

Se observaron diferentes patrones en la expresión basal de MMPs para células corneales HCE y conjuntivales IOBA-NHC: las células HCE secretaron principalmente MMP-9 y MMP-13 y bajos niveles de MMP-1, mientras que las células IOBA-NHC secretaron elevados niveles de MMP-1, seguido por bajos niveles de MMP-3 y MMP-13 y niveles casi no detectables de MMP-9 (Fig. 25). Las secreciones de MMP-9 y MMP-13 estaban significativamente incrementadas en células HCE tras 24 y 48 h de tratamientos con TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2, y la MMP-1 tras 24 h de exposición a TGF- $\beta$ 2 (Fig. 25). En las células IOBA-NHC, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 incrementó significativamente la secreción de MMP-13 a las 48 h de tratamiento; se observó además, que los niveles de MMP-1 estaba incrementados en células IOBA-NHC después de 48 h de tratamiento con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, sin embargo, no se detectaron efectos estadísticamente significativos en este caso.

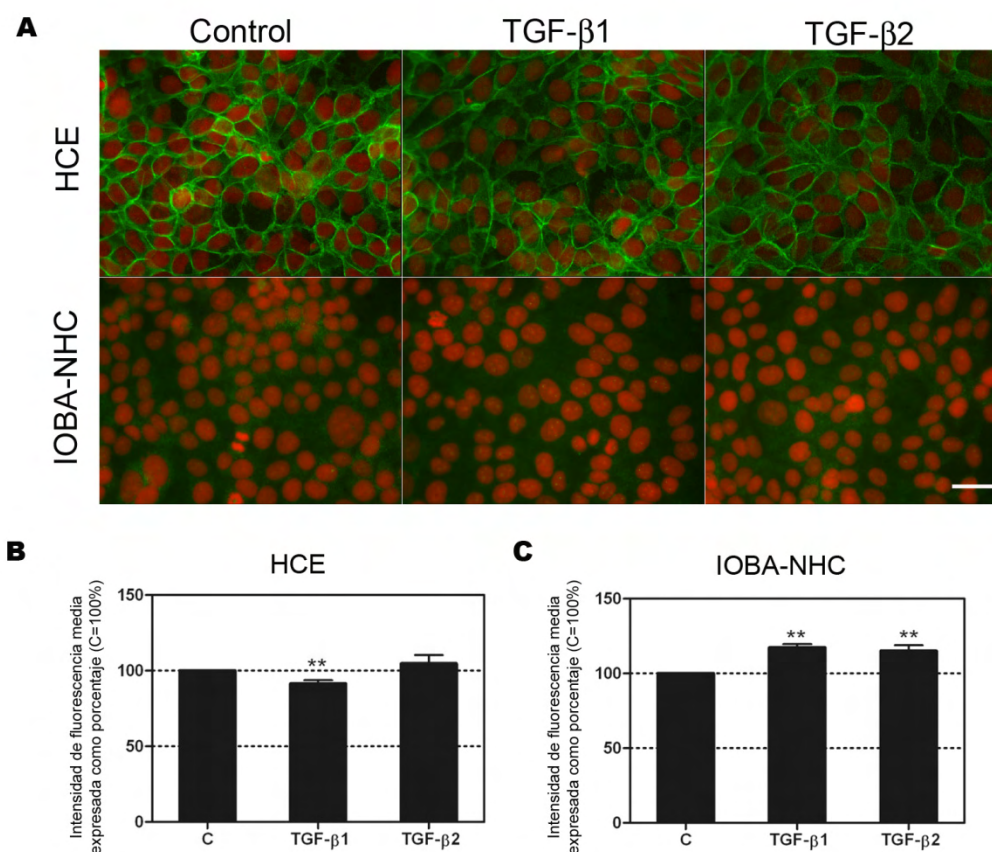


**Figura 25. Efectos del TGF-β sobre la secreción de metaloproteinasas por células epiteliales corneales (HCE) y conjuntivales (IOBA-NHC).** La secreción de MMP-1, MMP-3, MMP-9 y MMP-13 por células HCE e IOBA-NHC fue determinada en sobrenadantes celulares en condiciones basales (C) y tras 24 (barras cerradas) y 48 h (barras abiertas) de exposición a TGF-β1 o TGF-β2 (10 ng/ml). Los datos son la media de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente comparado con la secreción basal a su tiempo correspondiente: \*p<0,05.

## 2.5 Análisis del efecto del TGF- $\beta$ en la transición epitelial a mesenquimal: estudio de la expresión de e-cadherina

Uno de los efectos que el TGF- $\beta$  provoca sobre células epiteliales es provocar en ellas transición a célula tipo mesenquimal. Para llevar a cabo el estudio del efecto del TGF- $\beta$  sobre la transición epitelial mesenquimal (EMT) en las células epiteliales conjuntivales y corneales, se procedió al estudio de la expresión de la proteína e-cadherina en las células en cultivo, tanto en condiciones basales como estimuladas con TGF- $\beta$ , significando que a menor expresión de esta proteína, mayor EMT existía. El estudio se llevó a cabo mediante técnicas de inmunofluorescencia en células fijadas tras someterlas a los tratamientos con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 durante 48 h y se cuantificó la intensidad de fluorescencia media. Se confirmó la expresión basal de e-cadherina en ambos tipos celulares, si bien dicha expresión era mucho mayor en el caso de las células corneales HCE que en las conjuntivales IOBA-NHC en las que la expresión observada fue muy tenue (Fig. 26). Observamos que TGF- $\beta$ 1 inhibía significativamente la expresión de e-cadherina en células HCE, mientras que en las IOBA-NHC ambas isoformas de TGF- $\beta$  produjeron un aumento significativo de la expresión de e-cadherina respecto al control.





**Figura 26. Efecto del TGF- $\beta$  sobre la transición epitelio-mesenquimal (EMT) en células epiteliales corneales (HCE) y conjuntivales (IOBA-NHC).** Se analizó la expresión de e-cadherina (A) Detección por microscopía de inmunofluorescencia de e-cadherina (verde) en células HCE y en IOBA-NHC en condiciones basales (C) o estimuladas durante 48 h con TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) o TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml). Los núcleos celulares fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo). Objetivo 40x. Barra de escala: 30  $\mu$ m (B) y (C) Análisis de la intensidad de fluorescencia media de los ensayos de inmunofluorescencia para la expresión de e-cadherina en células (B) HCE y (C) IOBA-NHC expresada como porcentaje del control de células en ausencia de estímulo (C). \*Significativamente diferente de las células basales no estimuladas: \*\*p<0,05.

### **3. ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS ANTI-TGF- $\beta$ EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA DEL EPITELIO CORNEAL**

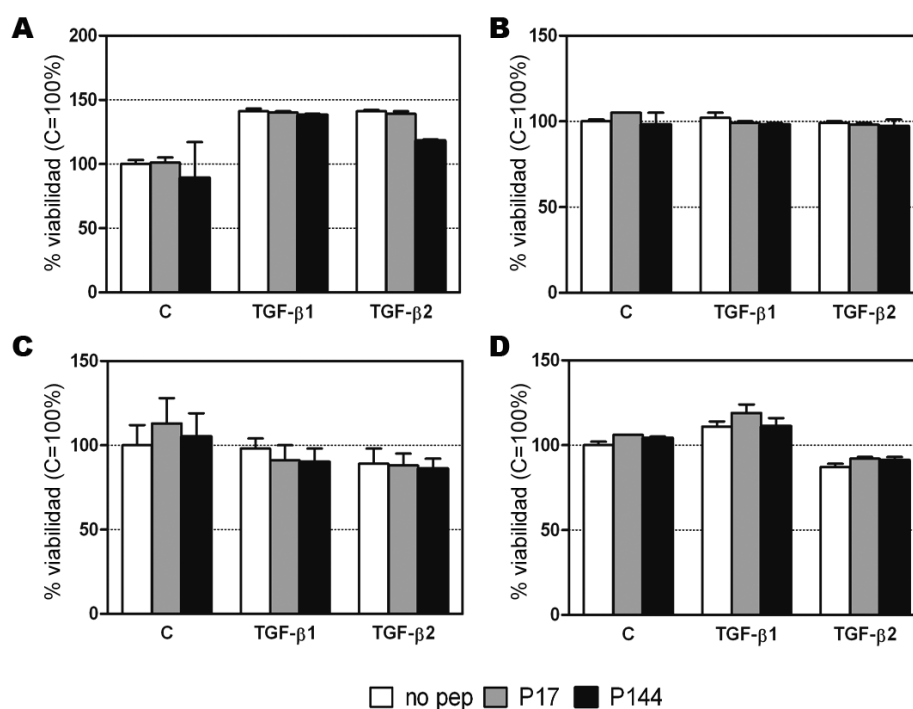
Con objeto de determinar si los péptidos sintéticos anti-TGF- $\beta$  P17 y P144 eran capaces de revertir algunos de los efectos estimulados por esta molécula, se comprobó como afectaban a la funcionalidad celular determinando su efecto sobre:

- 1) La viabilidad celular.
- 2) La activación de transducción de señales implicadas en las respuestas a TGF- $\beta$ .
- 3) La secreción celular.
- 4) La expresión de TLR-4.
- 5) La transición epitelio-mesenquimal.

Los estudios llevados a cabo con estos péptidos se centraron en la línea celular HCE, por ser esta en la que se obtuvieron mejores resultados en cuanto a respuesta a TGF- $\beta$ . Las células fueron expuestas a TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, en presencia o ausencia de los péptidos anti-TGF- $\beta$ , P17 o P144.

#### **3.1 Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$ en la viabilidad celular**

Para descartar que estos péptidos anti-TGF- $\beta$  provocaran efectos tóxicos sobre las células, se realizó un ensayo de viabilidad mediante un ensayo XTT. Se estudiaron 2 tiempos (24 y 48 h) así como 2 dosis de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (1 y 10 ng/ml), no observándose ningún efecto significativo sobre las células en las dosis y tiempo estudiados (Fig. 27).



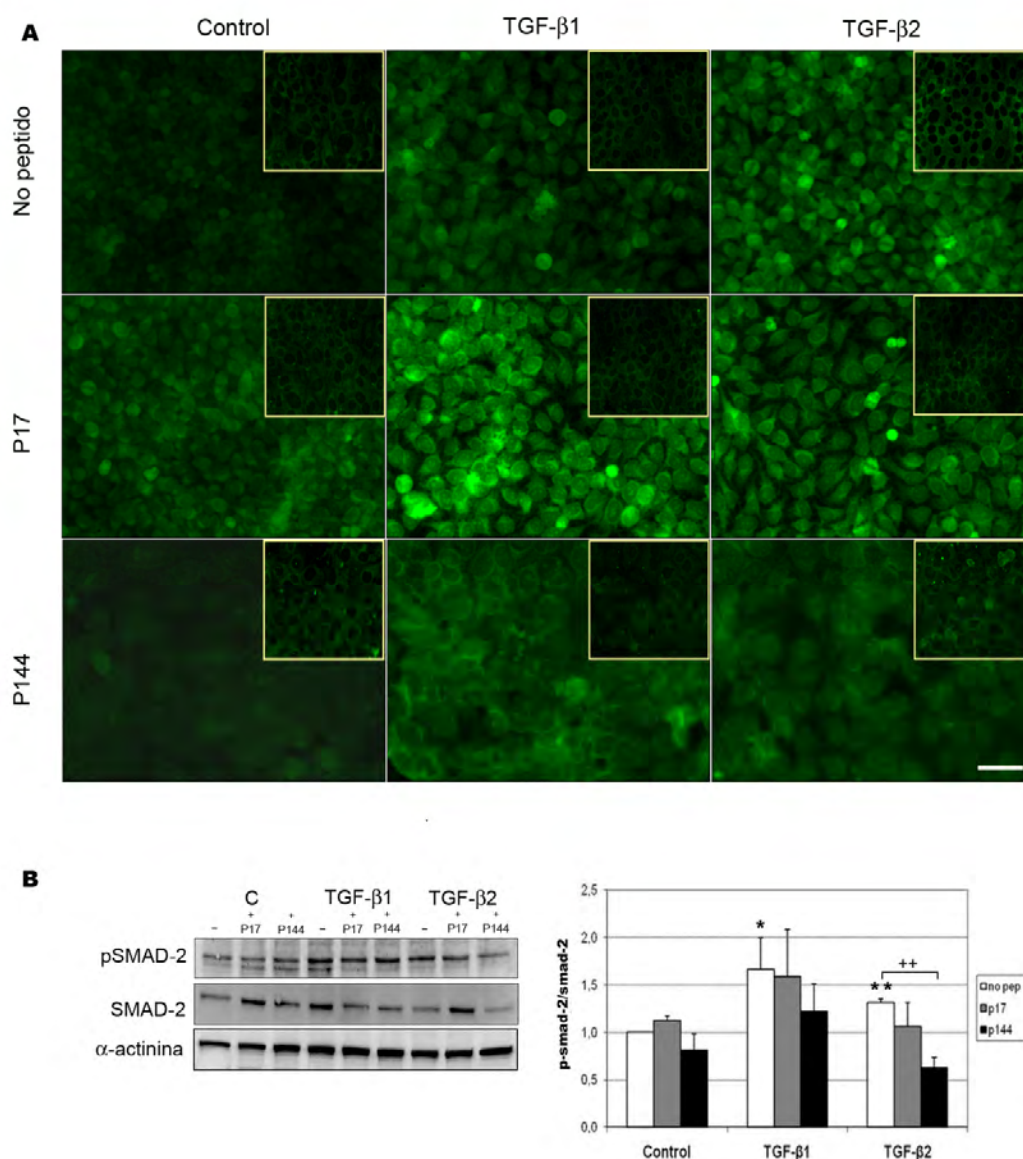
**Figura 27. Efecto de los péptidos anti-TGF-β sobre la viabilidad de las células HCE en condiciones basales y estimuladas con TGF-β1 y TGF-β2.** Las células epiteliales corneales fueron estimuladas con 1 ng/ml (A y B) o 10 ng/ml (C y D) de TGF-β1 y β2 durante 24 h (A y C) o 48 h (B y D) en presencia o ausencia de 200 μg/ml de los péptidos anti-TGF-β P17 y P144. Las barras representan el porcentaje de viabilidad respecto al control (C=100 %).

### 3.2 Efecto de los péptidos anti-TGF-β en la activación de transducción de señales implicadas en las respuestas a TGF-β

#### 3.2.1 Efecto en pSMAD-2/SMAD-2

El efecto de los péptidos anti-TGF-β P17 y P144 sobre la expresión y traslocación nuclear de pSMAD-2 se estudió en células HCE estimuladas por TGF-β durante 30 min. Este estudio se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia (Fig. 28 A) y por Western blotting (Fig. 28 B).

Se observó que el péptido P144 inhibía tanto la expresión como la traslocación al núcleo de pSMAD-2 tanto bajo el estímulo de TGF-β1 como TGF-β2, si bien la disminución en la expresión de proteína sólo resultó ser estadísticamente significativa sobre la estimulación con TGF-β2. La expresión de SMAD-2 no se vio alterada en ningún caso.

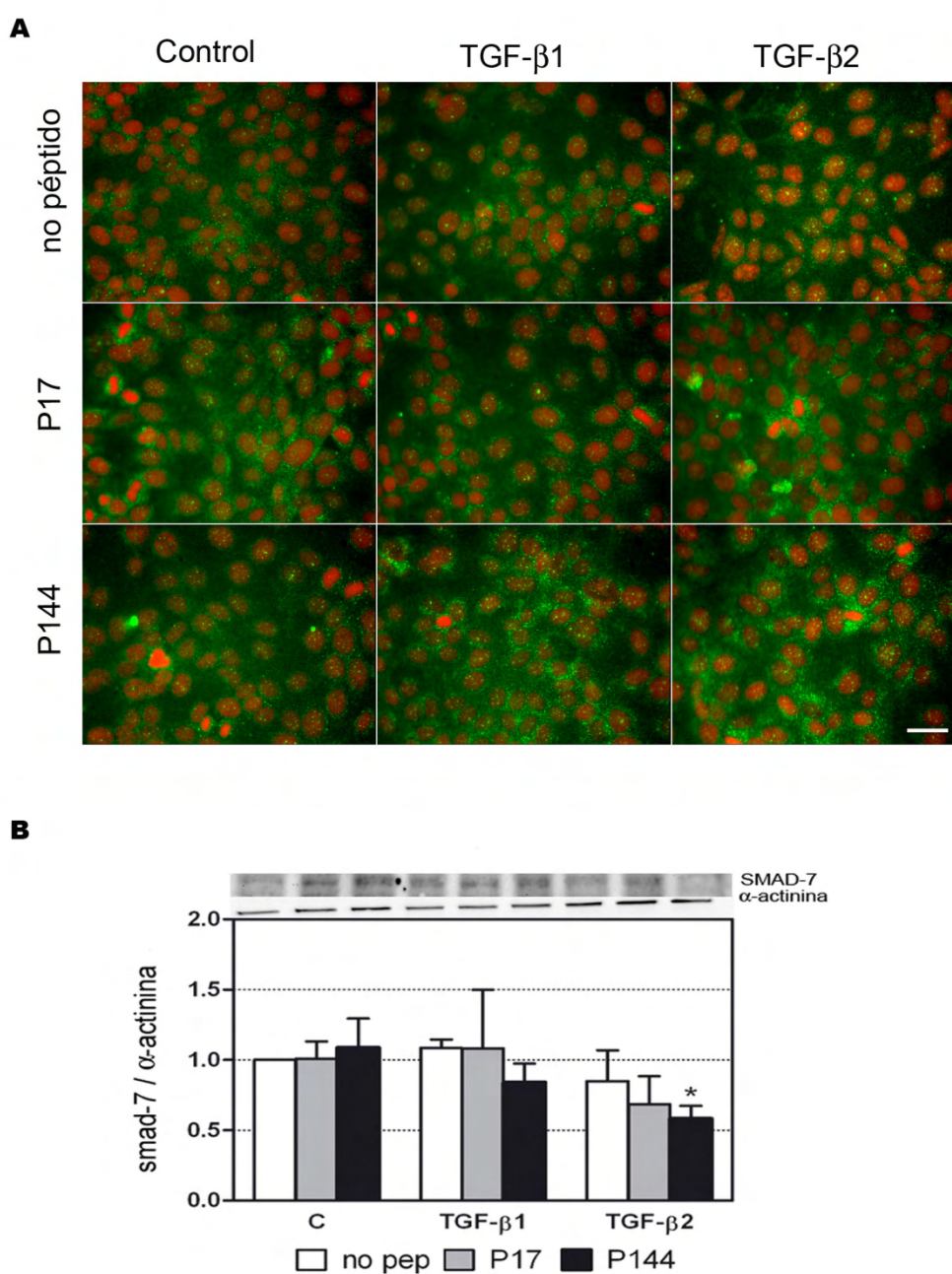


**Figura 28. Efecto de los péptidos anti-TGF-β P144 y P17 en la expresión de pSMAD-2 en células epiteliales corneales en condiciones basales y tratadas con TGF-β1 y TGF-β2.** Las células fueron expuestas a TGF-β1 y TGF-β2 (10 ng/ml) durante 30 min en presencia/ausencia de 200 μg/ml de los péptidos anti-TGF-β P17 y P144. (A) Ensayo de inmunofluorescencia de pSMAD-2 (verde). Los insertos corresponden a la expresión de SMAD-2. Objetivo 40x. Barra de escala: 30 μm (B) Análisis de Western blotting. Se muestra una imagen representativa de la expresión de pSMAD-2, SMAD-2 y α-actinina. Los datos en los gráficos de barras corresponden al análisis densitométrico de la intensidad de la banda, expresada como el porcentaje de intensidad de la banda con respecto a las células control no estimuladas. Los datos están expresados como ratio pSMAD-2/SMAD-2 y fueron corregidos con respecto a la expresión de α-actinina. Los datos son la media de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente del control: \*p<0,05; \*\*p<0,01. †Significativamente diferente comparado con el correspondiente valor estimulado por TGF-β en ausencia de péptido: ††p<0,005.

### 3.2.2 Efecto en SMAD-7

Se estudió el efecto de los péptidos sobre la expresión de SMAD-7, tanto en condiciones control como bajo la estimulación con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 durante 30 min en las células HCE .

Se observó que el péptido P144 inhibía significativamente la expresión de SMAD-7 en células estimuladas con TGF- $\beta$ 2; esta inhibición se observó también en células HCE estimuladas con TGF- $\beta$ 1, si bien en este caso no era un efecto estadísticamente significativo; no se observó ningún efecto de los péptidos sobre la expresión basal no estimulada. Finalmente, no se observó efecto alguno con P17 (Fig. 29).



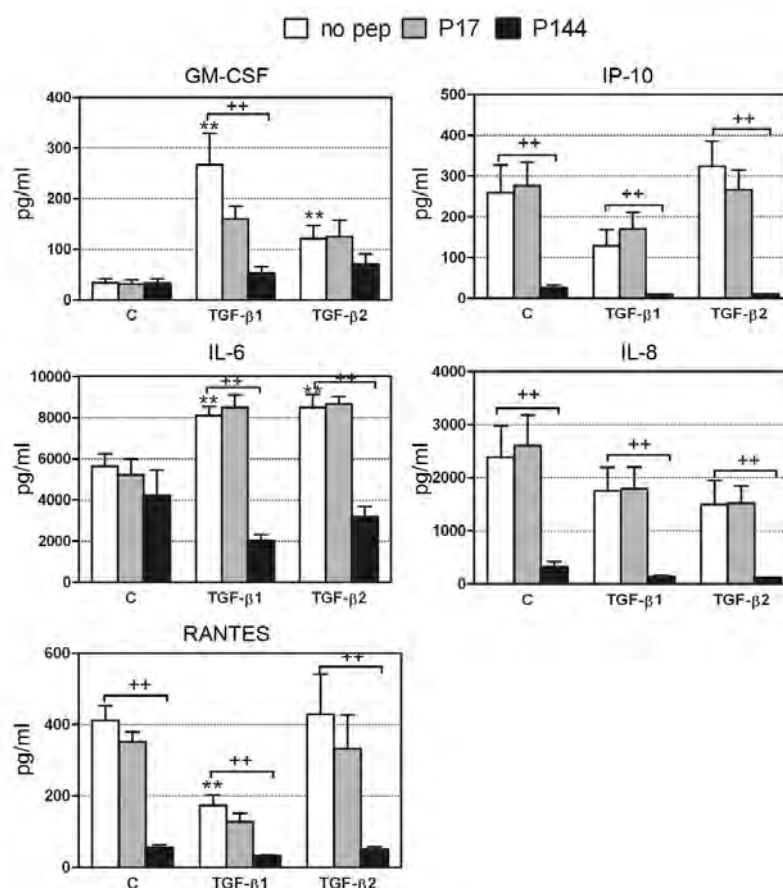
**Figura 29. Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P144 y P17 en la expresión de SMAD-7 en células epiteliales corneales en condiciones basales y tratadas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.** Las células fueron expuestas a TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml) durante 30 min en presencia/ausencia de 200  $\mu$ g/ml de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P17 y P144. (A) Ensayo de inmunofluorescencia de SMAD-7 (verde). Los núcleos fueron contrateñidos con ioduro de propidio (rojo). Objetivo 40x. Barra de escala: 30  $\mu$ m (B) Análisis de Western blotting. Se muestra una imagen representativa de la expresión de SMAD-7 y  $\alpha$ -actinina. Los datos en los gráficos de barras corresponden al análisis densitométrico de la intensidad de la banda, expresada como el porcentaje de intensidad de la banda con respecto a las células control no estimuladas. Los datos fueron corregidos con respecto a la expresión de  $\alpha$ -actinina. Los datos son la media de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente del control: \*p<0,05.

### 3.3 Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$ en la secreción celular

#### 3.3.1 Efecto en la secreción de citoquinas/quimioquinas

Se estudió el efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P144 y P17 sobre la secreción de GM-CSF, IP-10, IL-6, IL-8 y RANTES (moléculas en las que previamente se había observado efectos significativos con la estimulación por TGF- $\beta$ ), en células HCE. El estudio se llevó a cabo por análisis multianálisis en un Luminex.

Observamos que la presencia de P144, pero no de P17, provocó una disminución significativa, tanto a nivel basal como estimulado, de algunas citoquinas. En concreto, se observó que P144 disminuía significativamente la secreción basal de IP-10, IL-8 y RANTES, la secreción estimulada por TGF- $\beta$ 1 de GM-CSF, IP-10, IL-6, IL-8 y RANTES y la secreción estimulada por TGF- $\beta$ 2 de IP-10, IL-6, IL-8 y RANTES en células HCE (Fig. 30).

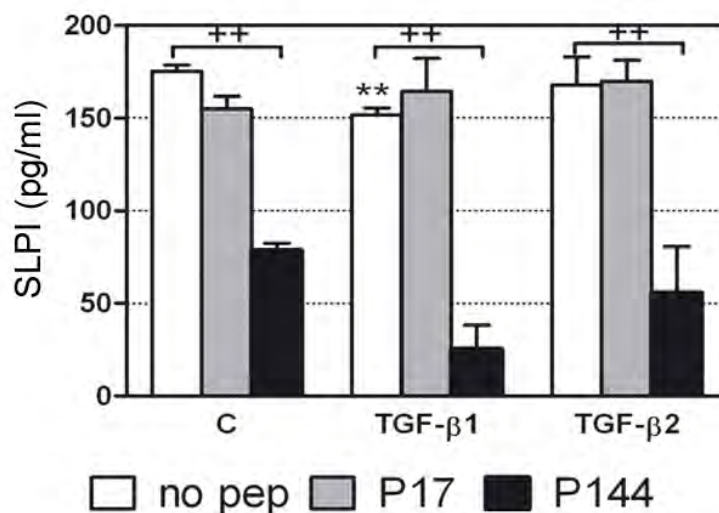


**Figura 30. Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P144 y P17 en la secreción celular de citoquinas/quimioquinas.** Análisis de la secreción de GM-CSF, IP-10, IL-6, IL-8 y RANTES por células epiteliales corneales estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml) durante 48 h en presencia o ausencia de 200  $\mu$ g/ml de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P17 y P144. \*Significativamente diferente comparado con la secreción basal en ausencia de péptido (C): \*\*p<0,000005. +Significativamente diferente comparado con el correspondiente valor estimulado por TGF- $\beta$  en ausencia de péptido: ++p<0,0005.



### 3.3.2 Efecto en la secreción de SLPI

El estudio se llevó a cabo por ELISA y se analizó la secreción de esta molécula tras el tratamiento durante 48 h con TGF- $\beta$  y en presencia/ausencia de los péptidos. Se observó que el P144 inhibía significativamente la secreción de SLPI de células HCE tanto basal como de las células expuestas a TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (Fig. 31).



**Figura 31. Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  sobre la secreción de SLPI.** Análisis de la secreción de SLPI por células epiteliales corneales estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml) durante 48 h en presencia o ausencia de 200  $\mu$ g/ml de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P17 y P144. \*Significativamente diferente comparado con la secreción basal en ausencia de péptido (C): \*\* $p < 0,000005$ . \*Significativamente diferente comparado con el correspondiente valor estimulado por TGF- $\beta$  en ausencia de péptido: ++ $p < 0,0005$ .

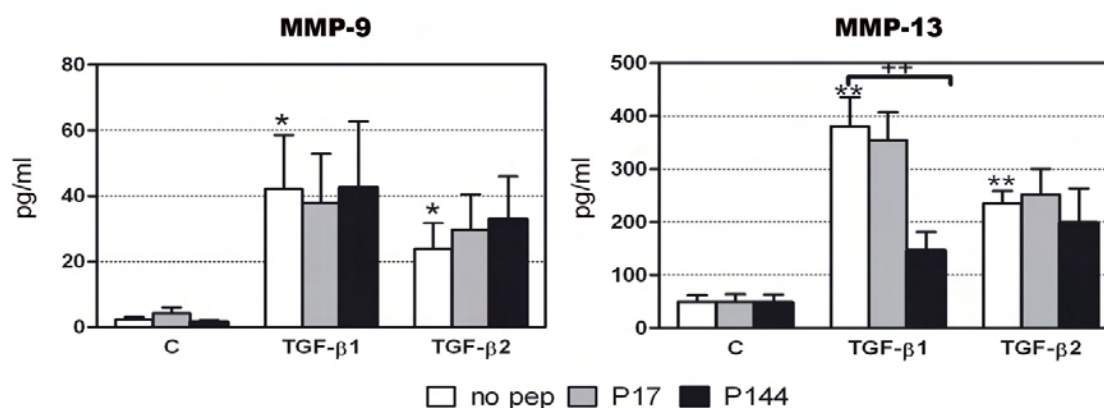
### 3.3.3 Efecto sobre la secreción de metaloproteinasas (MMPs)

Se estudió el efecto de los péptidos sobre la secreción basal y estimulada de MMP-9 y MMP-13 en las células HCE, por ser aquellas cuya secreción se estimulaba significativamente por TGF- $\beta$ .

Los resultados mostraron que P144 inhibía significativamente la secreción de MMP-13 estimulada por TGF- $\beta$ 1 pero no la estimulada por TGF- $\beta$ 2, ni tampoco la secreción de MMP-9 en células corneales (Fig. 32).

El péptido P17 no mostró ningún efecto sobre la secreción de las MMPs estudiadas (Fig. 32).

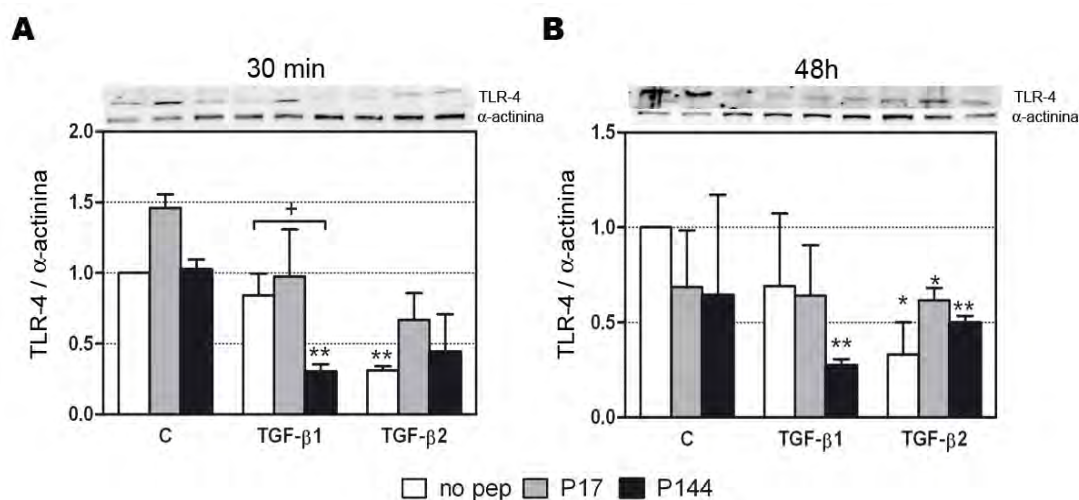




**Figura 32. Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P144 y P17 en la secreción celular de MMPs.** Análisis de la secreción de MMP-9 y MMP-13 por células epiteliales corneales estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml) durante 48 h. \*Significativamente diferente comparado con la secreción basal en ausencia de péptido (C): \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,000005$ . †Significativamente diferente comparado con el correspondiente valor estimulado por TGF- $\beta$  en ausencia de péptido: †† $p < 0,0005$ .

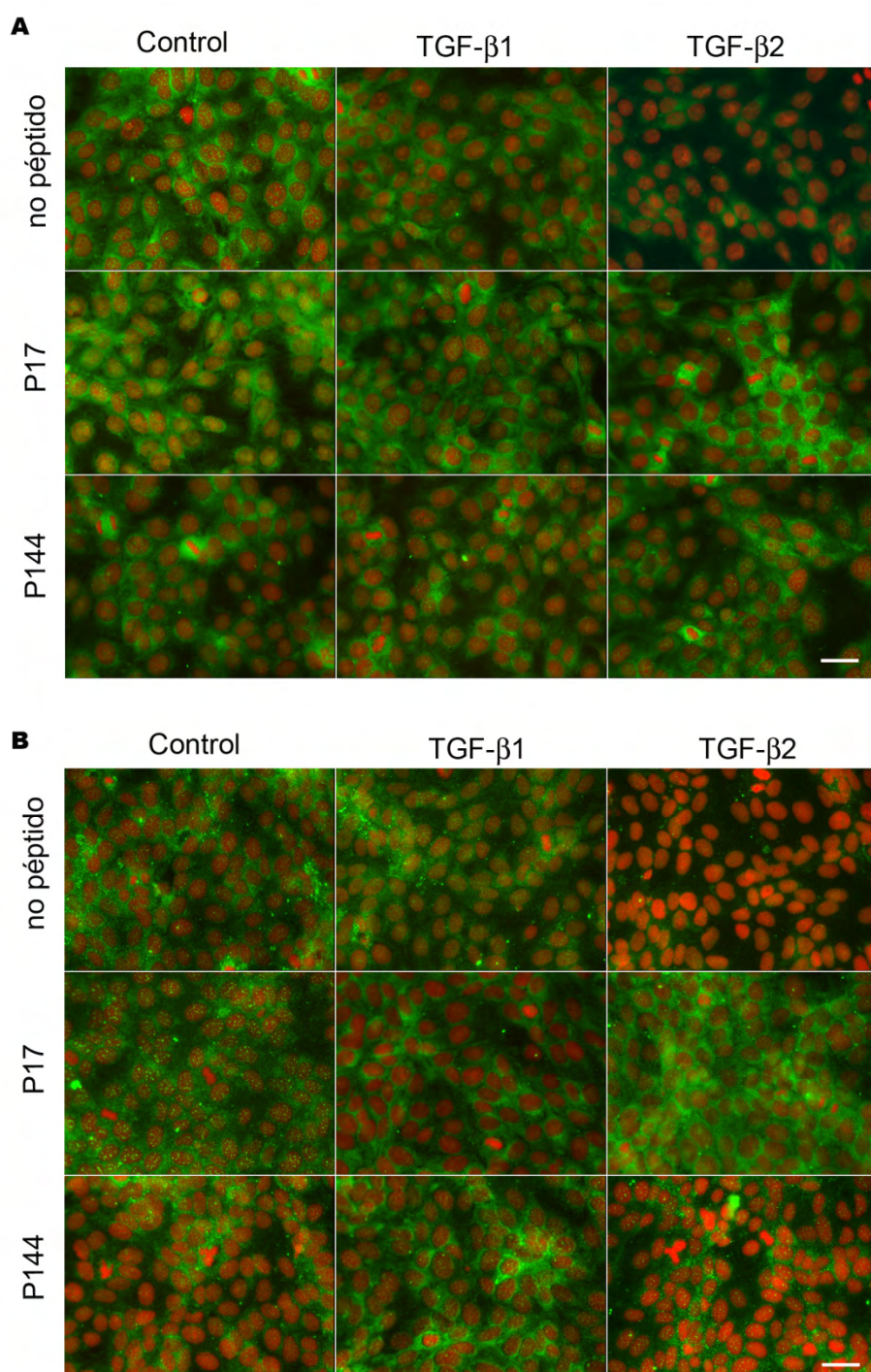
### 3.4 Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$ en la expresión del receptor TLR-4

El análisis del efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  en la expresión del receptor TLR-4 se hizo por Western blotting y por inmunofluorescencia. En el análisis de la expresión de proteína por Western blotting, observamos que en células HCE, P144 disminuía significativamente la expresión de TLR-4 estimulada con TGF- $\beta$ 1 respecto a los niveles basales, tanto a los 30 min como a las 48 h de tratamiento (Fig. 33 A y B). En el tratamiento a 30 min, se observó además, que con P144 también había una disminución estadísticamente significativa respecto a la expresión observada tras estimulación con TGF- $\beta$ 1. En el caso de TGF- $\beta$ 2, se observó un aumento de expresión tras el tratamiento tanto con P17 como con P144 respecto a la expresión observada con TGF- $\beta$ 2; sin embargo, los niveles de expresión en todos los casos fueron inferiores a los niveles basales (Fig. 33 A, B).



**Figura 33. Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P144 y P17 en la expresión de TLR-4 en células epiteliales corneales en condiciones basales y tratadas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.** Análisis mediante Western blotting del efecto de los péptidos P144 y P17 (200  $\mu$ g/ml) sobre la expresión de TLR-4 de células HCE estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml) durante 30 min (A) y 48 h (B). Se muestra una imagen representativa de la expresión de TLR-4 y  $\alpha$ -actinina. Los datos en los gráficos de barras corresponden al análisis densitométrico de la intensidad de la banda, expresada como el porcentaje de intensidad de la banda con respecto a las células control no estimuladas. Los datos fueron corregidos con respecto a la expresión de  $\alpha$ -actinina. Los datos son la media de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. \*Significativamente diferente del control no tratado y con el tratamiento correspondiente en cada caso (C):  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . †Significativamente diferente comparado con el correspondiente valor estimulado por TGF- $\beta$  en ausencia de péptido: † $p < 0,01$ .

Los estudios del efecto de los péptidos sobre la expresión de TLR-4 mediante inmunofluorescencia corroboraron los resultados observados mediante Western blotting (Fig. 34).

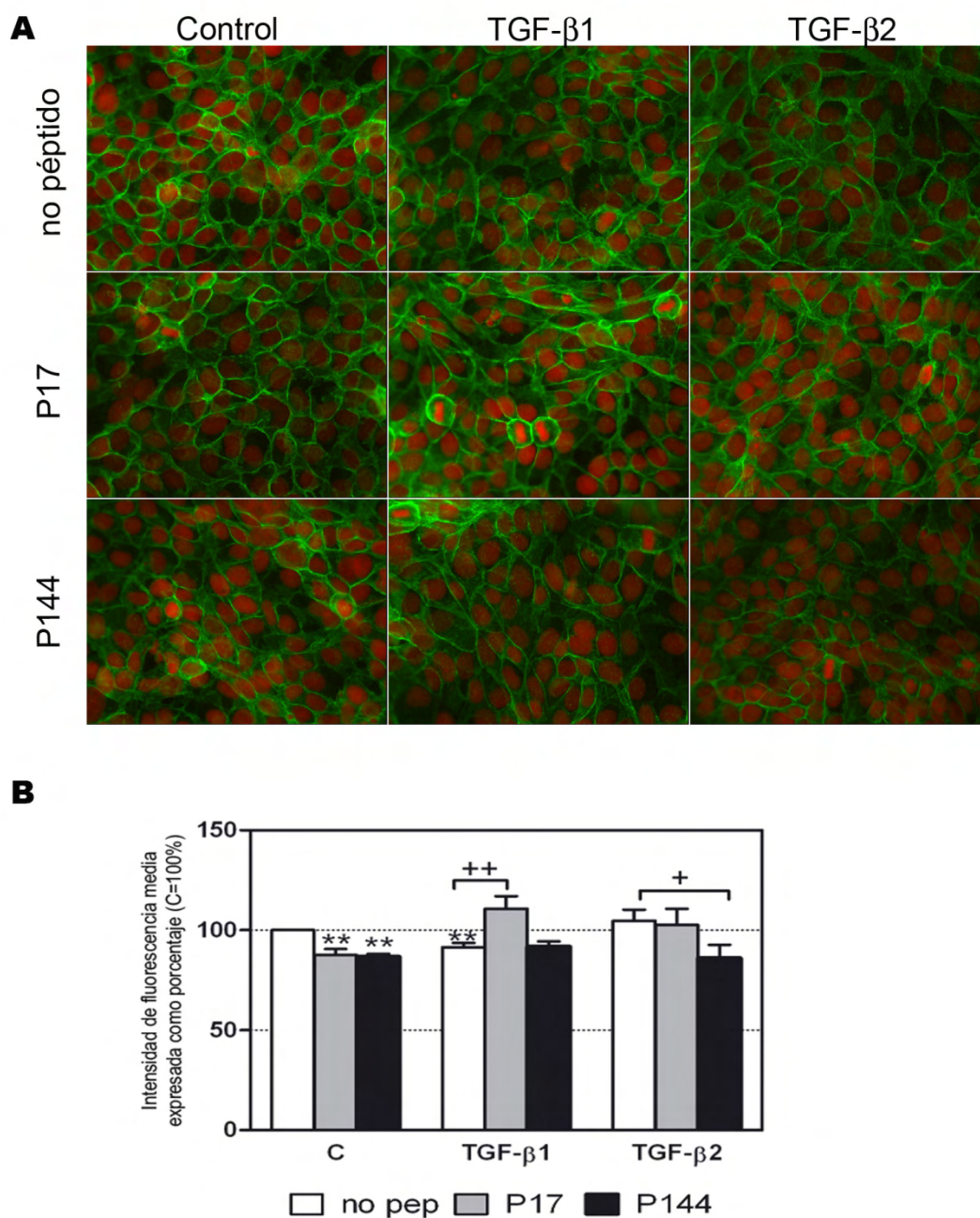


**Figura 34.** Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P144 y P17 en la expresión de TLR-4 en células epiteliales corneales en condiciones basales y tratadas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2. Análisis mediante inmunofluorescencia del efecto de los péptidos P144 y P17 (200  $\mu$ g/ml) sobre la expresión de TLR-4 (verde) de células HCE estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml) durante 30 min (A) y 48 h (B). Los núcleos celulares fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo). Objetivo 40x. Barra de escala: 30  $\mu$ m.

### **3.5 Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$ en la transición epitelio-mesenquimal**

El efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P17 y P144 en la transición epitelio mesenquimal de células epiteliales corneales HCE se analizó por ensayo de inmunofluorescencia de la expresión de e-cadherina a las 48 h de los tratamientos correspondientes con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.

Se observó que en células HCE, tanto P17 como P144 inhibían significativamente la expresión basal no estimulada de e-cadherina; P17 revirtió significativamente la expresión de e-cadherina inhibida por TGF- $\beta$ 1 mientras que P144 inhibió significativamente la expresión estimulada por TGF- $\beta$ 2 (Fig. 35).



**Figura 35. Efecto de los péptidos anti-TGF- $\beta$  P144 y P17 en la expresión de e-cadherina en células epiteliales corneales en condiciones basales y tratadas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.** Análisis mediante inmunofluorescencia del efecto de los péptidos P144 y P17 (200  $\mu$ g/ml) sobre la expresión de e-cadherina (verde) de células HCE estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (10n g/ml) durante 48 h. Los núcleos celulares fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo). Objetivo 40x. Barra de escala: 30  $\mu$ m (B) Análisis de la intensidad de fluorescencia media de los ensayos de inmunofluorescencia para la expresión de e-cadherina en células HCE. \*Significativamente diferente del control: \*\*p<0,01. +Significativamente diferente comparado con el correspondiente valor estimulado por TGF- $\beta$  en ausencia de péptido: +p<0,01; ++p<0,005.



## **VII.-DISCUSIÓN**





El entendimiento del funcionamiento del sistema visual y el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades de la superficie ocular y daños, depende de la comprensión de los papeles biológicos de los tejidos y moléculas que constituyen el ojo. En el presente trabajo de investigación se ha evaluado *in vitro* la relevancia potencial del TGF- $\beta$  en los procesos inflamatorios de la superficie ocular. En particular, se ha estudiado el efecto del TGF- $\beta$  sobre las células epiteliales corneales y conjuntivales de la superficie ocular, para caracterizar su participación en los procesos inflamatorios de la misma. En primer lugar, se estudió si las células epiteliales de la superficie ocular *in vitro* son una fuente de TGF- $\beta$  y si esta secreción, en condiciones inflamatorias, puede estar aumentada o disminuída, lo que podría influir en el desarrollo del proceso de inflamación. Por otra parte, se estudió si las células epiteliales son receptoras de este factor, expresando sus receptores, y se analizaron varias respuestas celulares a TGF- $\beta$  por las células epiteliales de la superficie ocular *in vitro*, que podrían participar en la cronificación y en el daño tisular. Además, se ha probado el uso de unos péptidos inhibidores de esta molécula, como posible terapia para dichos procesos.

Los estudios *in vivo*, llevados a cabo en modelos animales, presentan el inconveniente de que los resultados obtenidos no son siempre extrapolables al caso del ser humano. Por ello, un complemento de estos estudios son los sistemas *in vitro*, que permiten la posibilidad de estudiar la influencia de metabolitos en el comportamiento de las células en condiciones de experimentación perfectamente definidas y controladas. Entre los estudios *in vitro*, el uso de cultivos primarios tiene la ventaja de la similaridad biológica a los tejidos normales o enfermos, sin embargo, estos estudios resultan complejos debido a la escasez de tejido disponible, así como a la dificultad para su obtención. Además, los cultivos primarios, entre ellos los cultivos primarios de células epiteliales corneales y conjuntivales humanas, normalmente no crecen más de uno o dos pases y no pueden revivir tras el almacenaje en nitrógeno líquido, con lo cual resulta muy costoso obtener el suficiente número de células para poder reproducir experimentos. El uso de líneas celulares establecidas, en este caso la línea HCE de células de epitelio corneal humano y la línea IOBA-NHC de epitelio conjuntival humano, es una parte integral del arsenal de técnicas en ciencias de la superficie ocular y han sido utilizadas en numerosos estudios (Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2005; Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2008; Castro-Munozledo 2008; Tong *et al.* 2009; Garcia-Posadas *et al.* 2011; Hattori *et al.* 2011; Pellinen *et al.* 2012). El uso de estas líneas celulares como herramienta de laboratorio para la investigación de enfermedades tiene numerosas ventajas, incluyendo la homogeneidad del tipo celular, la reproducibilidad incrementada, mayor accesibilidad así como la definición y

control de parámetros ambientales y experimentales, permitiendo todo ello una mayor rapidez y un menor coste.

Se ha observado que los epitelios, incluyendo los de la superficie ocular, no sólo actúan como barrera física sino que, además, desempeñan un papel importante en el proceso inflamatorio y se ha propuesto que podrían estar involucradas en la perpetuación de la inflamación y/o en su iniciación (Heiman *et al.* 2005; Rimoldi *et al.* 2005; Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2008; Cao *et al.* 2011; Freishtat *et al.* 2011). Las células epiteliales de varias mucosas son capaces de participar activamente en enfermedades inflamatorias, no sólo expresando distintos tipos de moléculas de adhesión y co-estimuladoras sino, además, secretando ellas mismas diversas citoquinas y quimioquinas (Hingorani *et al.* 1998; Irkec & Bozkurt 2003). En concreto, en un estudio de nuestro grupo, observamos que las células epiteliales conjuntivales IOBA-NHC eran una fuente importante de citoquinas y quimioquinas, cuya secreción era regulada por citoquinas proinflamatorias y que podrían tener un papel importante en el inicio, la amplificación y/o la regulación de la superficie ocular (Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2008). La regulación de la participación activa del epitelio podría ser, por tanto, una buena alternativa terapéutica en los casos de inflamación crónica de la superficie ocular.

- *Células epiteliales como “fuente” de TGF-β*

En este estudio, se ha demostrado que las células epiteliales de la superficie ocular son una fuente de TGF-β, ya que tanto las células HCE como las IOBA-NHC secretan TGF-β1 y TGF-β2. Curiosamente, se ha observado que las células epiteliales conjuntivales secretan sobretodo la isoforma TGF-β1, mientras que las células epiteliales corneales secretan principalmente TGF-β2. Estos resultados coinciden con los descritos previamente por Nishida y cols. sobre la expresión de ARNm y proteína de las isoformas de TGF-β en córnea humana (Nishida *et al.* 1994; Nishida *et al.* 1995). La isoforma TGF-β1 ha sido relacionada principalmente con la diferenciación de células T productoras de Th17 en el contexto de un medio de citoquinas inflamatorias (Veldhoen *et al.* 2006). De esta manera, las células epiteliales conjuntivales podrían participar activamente en el proceso inflamatorio. Por otro lado, el TGF-β2 representa el 80-90% de la actividad inhibitoria del TGF-β en el humor acuoso (Cousins *et al.* 1991) y ha emergido como uno de los más importantes mediadores del privilegio inmune, actuando como un factor inmunomodulador soluble que actúa para suprimir células y moléculas que median la inflamación inmune innata y adaptativa (Hori *et al.* 2010). La secreción de la isoforma TGF-β2 por células epiteliales corneales podría estar relacionada con el privilegio inmune de la córnea, para protegerla del daño inflamatorio y prevenir la pérdida de visión. Se han descrito

diferentes efectos para las isoformas TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en modelos de inflamación de las vías aéreas y remodelación, mostrando que ambas isoformas presentan una combinación de funciones específicas y compartidas en la regulación de la inflamación y remodelación de las vías aéreas inducidas por alérgenos (Bottoms *et al.* 2010).

Posteriormente, se estudió el efecto de varias citoquinas inflamatorias (involucradas en procesos de inflamación de la superficie ocular) en la regulación de la secreción de TGF- $\beta$ 1 en células conjuntivales y TGF- $\beta$ 2 en células corneales. En el estudio se incluyeron citoquinas involucradas en los diferentes tipos de respuestas celulares, Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4 e IL-13) y Th17 (IL-17) así como la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ . Previamente a este estudio, se observó que los diferentes tratamientos no producían diferencias significativas en la viabilidad celular, asegurándonos así, por tanto, que las diferencias observadas en las posteriores medidas eran debidas a los efectos de los diferentes estímulos y no a diferencias en el número o la viabilidad de las células. Observamos que el TNF- $\alpha$  incrementaba significativamente la secreción de TGF- $\beta$ 2 en células HCE, tanto de la forma latente como de la forma activa, mientras que IL-17 incrementaba la secreción de la forma activa. Esta modificación de la secreción de TGF- $\beta$ 2 por las células epiteliales corneales observada sugiere que, en determinadas condiciones inflamatorias, las células epiteliales corneales podrían responder regulando el exceso de respuesta inflamatoria; esta respuesta de defensa podría también estar relacionada con el privilegio inmune de la córnea. En células conjuntivales no se observó modificación de la secreción de TGF- $\beta$ 1 en condiciones inflamatorias discrepando, por tanto, de lo observado por Calder y cols. (Calder *et al.* "Conjunctival Expression of Interleukin-17 Receptors in Chronic Allergic Eye Disease: An Immunoregulatory Role for Interleukin-17 on Conjunctival Epithelial Cells." ARVO Meeting abstract Abril 2011) que observaron que la interacción IL-17 con su receptor incrementaba la producción de TGF- $\beta$ 1 por células epiteliales conjuntivales IOBA-NHC. Estas diferencias observadas pueden ser debidas a una diferente capacidad estimuladora de las citoquinas IL-17 utilizadas en los estudios o quizá a diferentes estadios celulares. Será necesario un nuevo análisis para aclararlo.

- *Células epiteliales como "dianas" a la acción del TGF- $\beta$*

Nuestros resultados también han demostrado que las células epiteliales de la superficie ocular podrían ser una diana potencial para TGF- $\beta$ , ya que tanto las células epiteliales corneales como conjuntivales expresan receptores de TGF- $\beta$  RI, RII y RIII. Estos resultados coinciden con lo publicado previamente por otros autores que describen la expresión de los

receptores de TGF- $\beta$  por las células epiteliales de la superficie ocular o en modelos animales de rata (Obata *et al.* 1996; Joyce & Zieske 1997; Zieske *et al.* 2001; Meyer-Ter-Vehn *et al.* 2008). Entre los estudios en tejidos humanos, la expresión de los tres receptores RI, RII y RIII solamente había sido descrita en córnea (Joyce & Zieske 1997), mientras que para la conjuntiva sólo se había publicado la expresión de RII (Meyer-Ter-Vehn *et al.* 2008). Nuestros resultados confirman la expresión de estos receptores y aportan la observación de la expresión de RI y RIII en epitelio conjuntival. Entre los tres subtipos de receptores, TGF- $\beta$  RII fue el más expresado tanto en las células HCE, como en las IOBA-NHC, lo que está de acuerdo con el patrón de genes observado en muestras humanas. La localización del TGF- $\beta$ -RI en la región nuclear observada tanto en las células HCE como IOBA-NHC, ha sido también descrita previamente en células Mv1Lu y A549, tanto después de la exposición a TGF- $\beta$  como tras inducir una detención del crecimiento, habiéndose propuesto una función potencial intracelular para RI (Zwaagstra *et al.* 1999; Zwaagstra *et al.* 2000). En un estudio reciente en células de cáncer de pecho se atribuye a TGF- $\beta$  RI una función reguladora en el procesamiento del ARN postranscripcional en el núcleo celular (Chandra *et al.* 2012).

Posteriormente, se analizó la expresión de los receptores de TGF- $\beta$  por células epiteliales corneales y conjuntivales bajo condiciones inflamatorias. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de los receptores RI, RII y RIII del TGF- $\beta$  estaba regulada diferencialmente dependiendo del tipo de citoquinas a las que estaban expuestos. La disminución de la expresión de TGF- $\beta$  RI observada tras la estimulación con IL-4, el incremento de RII observado tras la estimulación con TNF- $\alpha$  y de RI con IL-17 en células epiteliales corneales, así como el incremento observado en células IOBA-NHC de la expresión de RI tras la exposición a IL-17 y de RIII con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , podría implicar diferencias en el comportamiento celular en respuesta al TGF- $\beta$  en condiciones patológicas de la superficie ocular dependiendo del ambiente de citoquinas Th1, Th2 o Th17 existente en cada momento. Por tanto, estos resultados sugieren que la regulación de los receptores de TGF- $\beta$  podría estar involucrada en la respuesta al TGF- $\beta$  en condiciones patológicas de la superficie ocular.

Observamos, además, que el tratamiento simultáneo con las citoquinas IL-17 y TNF- $\alpha$  producía menor expresión de los receptores de TGF- $\beta$  que cuando se trataba las células con estas citoquinas individualmente. En otros estudios de nuestro grupo (Benito *at al.* "In vitro study of the involvement of IL-17 in chronic and severe ocular surface inflammatory processes" ARVO Meeting abstract Mayo 2012), hemos observado que el tratamiento conjunto de IL-17 y TNF- $\alpha$  tiene un efecto sinérgico en la secreción de IL-6 e IL-8 por células IOBA-NHC, mientras

que en células corneales HCE se observaba que IL-17 inhibía la secreción de RANTES e IP-10 estimulada por TNF- $\alpha$ . Este efecto inhibitorio de la expresión de receptores de TGF- $\beta$ , así como de la secreción de IP-10 y RANTES observado en las células corneales podría ser debido al privilegio inmunoprotector de las células epiteliales de la córnea y apoya la idea de que IL-17 en determinadas circunstancias podría contribuir al privilegio inmune de la córnea sugerido por otros autores (Cunnusamy *et al.* 2010). El efecto antagónico de la actuación conjunta de estas citoquinas, ha sido previamente descrito para la secreción de citoquinas como RANTES en queratinocitos (Albanesi *et al.* 1999), y en miofibroblastos intestinales (Andoh *et al.* 2002), así como en células endoteliales de pulmón para la producción de GM-CSF (Numasaki *et al.* 2004). Andoh y cols. postulan que la IL-17 podría activar factores de inhibición que actuarían sobre elementos reguladores inducidos por TNF- $\alpha$  en la región “upstream”; proponen que esta inhibición podría ser un mecanismo autorregulador para la prevención del exceso de infiltrado y activación de células T y otros leucocitos. Este efecto podría también estar ocurriendo para la expresión de los receptores de TGF- $\beta$  en las células corneales y conjuntivales de la superficie ocular; la inhibición observada en la expresión de los mismos bajo tratamiento con IL-17 + TNF- $\alpha$ , podría ser un mecanismo de autorregulación, como mecanismo protector ante una respuesta inflamatoria excesiva o persistente que podría producir daño tisular. Por la tanto, es probable que IL-17 pueda tener mecanismos de actuación diferentes para regular la expresión de dichos receptores en dependencia de si actúa individualmente o conjuntamente con TNF- $\alpha$  u otra citoquina/quimioquina; serán necesarios más estudios para confirmarlo.

El incremento paralelo en la secreción de TGF- $\beta$ 2 y la expresión de TGF- $\beta$  RII tras la exposición *in vitro* a TNF- $\alpha$  en células epiteliales corneales, sugiere que TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$  RII podrían ser también las principales moléculas relacionadas con TGF- $\beta$  cuya expresión estuviera incrementada en córneas en condiciones inflamatorias *in vivo*. Un incremento similar en ambas moléculas fue observado tras una queratectomía fotorrefractiva con láser excimer en córneas de rata por Chen y cols. (Chen *et al.* 2000).

Esta modificación de la expresión observada en condiciones inflamatorias, tanto de las isoformas del TGF- $\beta$  como de los receptores, corroboran lo anteriormente descrito de la alteración de la expresión génica de las isoformas TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 y el RIII de TGF- $\beta$  en la conjuntiva de pacientes con SOS (Benito *et al.* 2012 “*Effect of TGF- $\beta$  on ocular surface epithelial cells*” manuscrito enviado en revisión), lo que confirma que la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$  y sus receptores podrían estar involucrados en las condiciones inflamatorias de la superficie ocular. Además, tanto las células epiteliales corneales como

conjuntivales son capaces de secretar varias citoquinas, tanto basalmente como tras estimulación (Hingorani *et al.* 1998; Irkec & Bozkurt 2003; Enriquez-de-Salamanca *et al.* 2008), incluyendo la IL-1 y la IL-6. Puesto que se ha descrito que el TGF- $\beta$  en combinación con la IL-6 diferencia células T hacia Th17 (Bettelli *et al.* 2006; Mangan *et al.* 2006; Volpe *et al.* 2008), se puede hipotetizar que en condiciones inflamatorias de la superficie ocular, el TGF- $\beta$ , tanto el secretado por células T reguladoras como por células epiteliales, junto con citoquinas secretadas por células epiteliales, podría estar involucrado en la diferenciación local hacia Th17.

Respecto a la transducción de señales estimulada por TGF- $\beta$ , este estudio confirma que los receptores de TGF- $\beta$  expresados por las células HCE e IOBA-NHC son funcionales, ya que se observó la fosforilación y translocación nuclear de SMAD-2 tras la exposición celular a TGF- $\beta$ , confirmando que las líneas celulares HCE e IOBA-NHC eran adecuadas para el estudio del efecto del TGF- $\beta$  sobre las células. El incremento de los niveles de fosforilación de SMAD-2 por TGF- $\beta$  fue también observado de una manera dosis-dependiente en la línea celular HCE por Aomatsu y cols. (Aomatsu *et al.* 2010).

Observamos, además, que la proteína SMAD-7, reguladora de la señalización de TGF- $\beta$ , está disminuída por TGF- $\beta$ 1 en células epiteliales conjuntivales IOBA-NHC. Las proteínas SMAD inhibitoras (SMAD-6 y SMAD-7) son inducidas transcripcionalmente por TGF- $\beta$  (Kamiya *et al.* 2010) y regulan sus vías de señalización negativamente (Itoh & ten 2007), estableciendo así un importante circuito de retroalimentación negativo; sin embargo, en situaciones de inflamación o fibrosis, la cantidad de TGF- $\beta$  a la que están expuestas las células quizá no active el sistema de retroalimentación y por tanto, a este nivel, no se produce la regulación de SMAD-7 sobre la activación de SMAD-2, potenciando así el proceso inflamatorio. En nuestro caso, la disminución observada de la expresión de SMAD-7 concuerda con el incremento en la fosforilación en SMAD-2.

Aunque se ha demostrado que el TGF- $\beta$ , además de la vía de SMADs, también activa otros mediadores de señalización (vías no canónicas) tales como la cascada de las MAPK (ERK, JNK, p38, pI3P) quinasas, PP2A fosfatasa y miembros de la familia Rho (Derynck & Zhang 2003), estas vías no han sido analizadas en este estudio. A diferencia de la vía SMAD, estas vías alternativas son activadas en un contexto y de una manera específica del tipo celular y no se consideraron objetivo de este estudio.

Diversos autores han descrito la activación por factores de crecimiento (tales como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de hepatocitos y el factor de crecimiento derivado de plaquetas) de proteínas STAT características de las vías de señalización de interferones, IL-4 e IL-13 en varios tipos celulares (Leaman *et al.* 1996;Boccaccio *et al.* 1998). También, se han descrito interacciones de la señalización TGF- $\beta$ /SMAD con la vía de señalización  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ /NF $\kappa$ B que determina la respuesta de las células a la estimulación con TNF- $\alpha$ , e implicada en la patogénesis de varias enfermedades proinflamatorias (Ulloa *et al.* 1999;Bitzer *et al.* 2000). Con objeto de conocer si alguna de estas vías de señalización se pudiera hallar implicada, analizamos si TGF- $\beta$  las activaba en las células epiteliales corneales y conjuntivales, no observándose activación de estas vías en ninguno de los tipos celulares estudiados.

Por otro lado, nuestro estudio también ha abordado el efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión de los receptores para moléculas implicadas en procesos inflamatorios, como el receptor tipo Toll TLR-4 y el receptor para la IL-17. Los resultados obtenidos han confirmado que, tanto las células epiteliales conjuntivales IOBA-NHC como las corneales HCE, expresan basalmente ambos tipos de receptores. La expresión de TLR-4 ya había sido descrita previamente en estos dos tipos celulares (Song *et al.* 2001;Ueta *et al.* 2004;Bonini *et al.* 2005). Sin embargo, aunque la expresión de IL-17R estaba descrita en células epiteliales conjuntivales (Calder *et al.* "Conjunctival Expression of Interleukin-17 Receptors in Chronic Allergic Eye Disease: An Immunoregulatory Role for Interleukin-17 on Conjunctival Epithelial Cells." ARVO Meeting abstract Abril 2011) y en otros tipos de células epiteliales (Yao *et al.* 1997), no había sido descrita previamente en células corneales. Nuestros resultados muestran que la exposición celular a la isoforma TGF- $\beta$ 2 inhibe la expresión del TLR-4 en las células HCE e IOBA-NHC mientras que TGF- $\beta$ 1 lo hacía en las IOBA-NHC únicamente. Estos resultados coinciden con los que fueron observados para la isoforma TGF- $\beta$ 1 en tejidos inflamados y en células dendríticas de modelos animales murinos (Cartney-Francis *et al.* 2004;Mou *et al.* 2004). En base a estos resultados parece que el TGF- $\beta$  actuaría en este caso como molécula antiinflamatoria, participando en el control de la respuesta inflamatoria inducida por TLRs, confirmando, por tanto, la naturaleza bipolar (anti y pro-inflamatoria) de esta molécula descrita en diversos estudios (Wahl 2007;Saxena *et al.* 2008).

En relación al efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión del receptor para IL-17, en las células IOBA-NHC se observó un aumento tras el tratamiento con las isoformas de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2). También se ha observado un incremento significativo en la expresión de este receptor en biopsias conjuntivales de pacientes con VKC y AKC respecto a SAC (conjuntivitis

alérgica estacional) (Calder *et al.* "Conjunctival Expression of Interleukin-17 Receptors in Chronic Allergic Eye Disease: An Immunoregulatory Role for Interleukin-17 on Conjunctival Epithelial Cells." ARVO Meeting abstract Abril 2011) lo que sugiere que TGF- $\beta$  podría estar implicado en el incremento de expresión de este receptor en estas enfermedades inflamatorias de la superficie ocular.

- *Efecto del TGF- $\beta$  sobre la secreción celular*

Los resultados de este estudio demuestran que, además de ser una fuente de TGF- $\beta$  y expresar los receptores para esta molécula, las células epiteliales corneales y conjuntivales, respondían también a TGF- $\beta$ . Se comprobó que la exposición a TGF- $\beta$  modificaba la secreción de citoquinas/quimioquinas por las células epiteliales corneales y conjuntivales cultivadas. El efecto observado fue dependiente del tipo celular (corneal o conjuntival) y la isoforma de TGF- $\beta$  ( $\beta$ 1 o  $\beta$ 2) usada para la estimulación. Estos resultados están de acuerdo con los descritos en células epiteliales de las vías aéreas humanas (Jagels & Hugli 2000; Ge *et al.* 2010), a los que el tratamiento con TGF- $\beta$  también afectó su respuesta de secreción de citoquinas. En esas células, la exposición a TGF- $\beta$  aumentó selectivamente la producción de GM-CSF y RANTES mientras que suprimió la producción de IL-8. Jagels y cols. (Jagels & Hugli 2000) propusieron que TGF- $\beta$  podría tener un papel esencial en la respuesta de las células epiteliales de las vías aéreas en inflamación alérgica y crónica a citoquinas quimiotácticas, ya que el perfil de respuesta de quimioquinas promovido por TGF- $\beta$  podría favorecer el reclutamiento de eosinófilos, linfocitos y monocitos. En nuestro estudio, la estimulación con TGF- $\beta$  aumentó significativamente la secreción de GM-CSF, IL-2, IL-12p40, IL-6 e IL-10 por células epiteliales corneales y de GM-CSF e IL-8 por células epiteliales conjuntivales. Además, la estimulación con TGF- $\beta$  disminuyó significativamente la secreción de RANTES en ambas líneas celulares e IP-10 en células epiteliales conjuntivales. A pesar de que las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas, en algunos casos como la secreción de IL-2 y de RANTES las alteraciones de secreción observadas fueron pequeñas y podrían no ser fisiológicamente relevantes.

El GM-CSF es un factor que estimula la producción de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos (Hamilton & Anderson 2004). La subunidad p40 de la IL-12 ha sido descrita como factor estimulador de células NK (*natural killer*) (Hsieh *et al.* 1993). La IL-6 es una citoquina multifuncional y pleiotrópica, implicada en los procesos inflamatorios promoviendo la proliferación de células T, la diferenciación y supervivencia de células B y la producción de células plasmáticas de IgG, IgA e IgM (Hirano *et al.* 1985); esta citoquina dirige



el tráfico y activación de leucocitos e induce la producción de proteínas de fase aguda por hepatocitos (Hurst *et al.* 2001). La IL-8, RANTES e IP-10 son potentes quimioquinas que actúan como quimioatrayentes y activadores, de neutrófilos en el caso de la IL-8 (Huber *et al.* 1991), y de monocitos y linfocitos en el caso de RANTES y de IP-10 (Nickel *et al.* 1999). Sin embargo, las citoquinas IL-2 e IL-10 se relacionan con procesos de inmunosupresión, ya que la IL-2 es una citoquina esencial para el desarrollo de células Treg y la IL-10 es un factor antiinflamatorio que afecta directamente la función de células presentadoras de antígenos disminuyendo la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II y moléculas coestimuladoras en la superficie de macrófagos y monocitos (Akdis & Akdis 2009) e inhibiendo la expresión de algunas citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y receptores de quimioquinas (de Waal *et al.* 1991). Además de estos efectos antiinflamatorios, también se les han atribuido propiedades proinflamatorias; así la IL-10 afecta directamente a la activación de células T (Taylor *et al.* 2007), promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de células B humanas e incrementa la producción de IgG<sub>4</sub> (Akdis & Akdis 2009). La IL-2 también se ha demostrado que actúa como un factor de crecimiento para las células B, estimulando la síntesis de anticuerpos y promoviendo la proliferación y diferenciación de células NK (*natural killer*), incrementando sus funciones citolíticas (Malek 2008). Por tanto, esta secreción de citoquinas y quimioquinas alterada en respuesta al TGF- $\beta$  en las células epiteliales de la superficie ocular podría participar en el reclutamiento de células inflamatorias y en la cronificación del proceso inflamatorio. Estos resultados añaden una prueba más de la complejidad de la respuesta *in vivo*, con diferencias en las respuestas celulares de dos tipos celulares epiteliales que están presentes en la superficie ocular y señalando un papel esencial para el TGF- $\beta$  en la respuesta de las células epiteliales de la superficie ocular en la inflamación, como fue sugerido por Jagels y cols., entre otros, para las células epiteliales de las vías aéreas (Jagels & Hugli 2000).

La secreción de SLPI por las células también fue modificada tras la exposición a TGF- $\beta$ . El SLPI es un miembro de la familia Kazal de inhibidores de serin proteasas, que es secretado por células epiteliales en las superficies mucosas, incluyendo la conjuntiva humana (Sathe *et al.* 1998; Sakata *et al.* 2000). Además de su actividad inhibidora de proteasas, también se ha descrito que tiene actividad anti-inflamatoria (Ward & Lentsch 2002; Nukiwa *et al.* 2008). La inhibición de la secreción de SLPI por las células HCE e IOBA-NHC tras la exposición a TGF- $\beta$  durante 48 h está de acuerdo con lo descrito por Jaumann y cols. (Jaumann *et al.* 2000) y Luo y cols. (Luo *et al.* 2008) que observaron este efecto inhibitor en células epiteliales pulmonares.

Estos autores sugieren que este efecto provocado por el TGF- $\beta$  podría estar relacionado con el daño observado en el epitelio bronquial en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Además, basados en los resultados *in vitro*, parece que el TGF- $\beta$  secretado *in vivo* localmente podría estar relacionado con el daño epitelial ocular observado en varias enfermedades inflamatorias crónicas de la superficie ocular, como AKC, VKC, pterigium o SOS, en las cuales se han descrito niveles elevados de TGF- $\beta$  (Kria *et al.* 1996;Leonardi *et al.* 2000;Abu El-Asrar *et al.* 2006;Chotikavanich *et al.* 2009).

Por otro lado, también se ha sugerido la participación de las células epiteliales de la mucosa en la iniciación de la inflamación alérgica ocular a través de la producción de linfopoyetina estromal tímica (TSLP) activadora de células dendríticas (Zheng *et al.* 2010c); Zheng y cols. observaron un incremento de la molécula TSLP en un modelo animal de conjuntivitis alérgica, tanto en el epitelio corneal como conjuntival. Además, se ha observado la expresión y regulación de esta molécula en tejido corneal humano y en cultivos primarios de células corneales por componentes microbianos así como por citoquinas inflamatorias (Ma *et al.* 2009). A nivel extraocular, los niveles elevados de esta molécula se han relacionado con el desarrollo de enfermedades inflamatorias de las vías aéreas, intestino y piel, induciendo una respuesta inflamatoria tipo Th2 e iniciando así una inflamación alérgica (Soumelis *et al.* 2002;Liu *et al.* 2007). En base a esta idea quisimos estudiar si TGF- $\beta$  podría estar implicado en la secreción de esta molécula en los procesos inflamatorios de la superficie ocular. Sin embargo, en nuestro estudio *in vitro*, no se detectó la presencia de esta molécula ni en condiciones basales ni en ninguna de las condiciones pro-inflamatorias estudiadas. Esto quizá haya sido sea debido a que la técnica utilizada no tuviera la sensibilidad de detección adecuada para la producción en el modelo *in vitro* utilizado para el estudio.

También hemos estudiado la producción de MMPs por las células epiteliales corneales y conjuntivales tras la exposición a TGF- $\beta$ . Las MMPs se clasifican en función de la especificidad de sustrato y difieren en su estructura; su acción combinada es capaz de conducir a la degradación de la práctica totalidad de los componentes macromoleculares de la matriz extracelular. Las MMPs juegan un papel fundamental en la remodelación tisular, la cicatrización y en la inflamación (Li & Pflugfelder 2005;Ollivier *et al.* 2007), y se caracterizan, principalmente la MMP-9, por producir la degradación del colágeno así como por cortar los componentes de la membrana basal epitelial y las proteínas de uniones estrechas (como ZO-1 y ocludina) que mantienen la función de barrera epitelial corneal (Behzadian *et al.* 2001). En este estudio analizamos la regulación de la expresión de las colagenasas MMP-1 y MMP-13, la

gelatinasa MMP-9 y la estromelina MMP-3. El tratamiento con las isoformas TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 incrementó significativamente la secreción de MMP-1, MMP-9 y MMP-13 en células epiteliales corneales. Nuestros resultados en células epiteliales corneales cultivadas coinciden con estudios previos de Kim y cols. (Kim *et al.* 2004) en los cuales se determinó el efecto de la exposición a TGF- $\beta$  en cultivos primarios de células epiteliales corneales. Ellos observaron que TGF- $\beta$ 1 estimulaba la expresión y producción de gelatinasa (MMP-9), colagenasas (MMP-1, MMP-13) y estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11) y propusieron que TGF- $\beta$ 1 podría tener una función en la patogénesis de enfermedades de la superficie ocular mediadas por MMPs, como la ulceración corneal. También se ha descrito una implicación de las MMPs en la patogénesis de SOS (Pflugfelder *et al.* 2005;Corrales *et al.* 2006) y en otras enfermedades de la superficie ocular como VKC (Kumagai *et al.* 2002;Leonardi *et al.* 2009) o pterigium (Tsai *et al.* 2010;Seet *et al.* 2012).

Diversos autores sugieren que el proceso de transición epitelio mesenquimal (EMT) parece ser inducido por la acción integrada de los muchos estímulos entre los que se encuentra el TGF- $\beta$  (Miettinen *et al.* 1994;Piek *et al.* 1999;Bhowmick *et al.* 2001). Este proceso, en enfermedades crónicas, genera nuevas células mesenquimales que incrementan la producción de matriz extracelular y por otro lado, causa la pérdida de células epiteliales contribuyendo a la destrucción del parénquima (Guarino 1995;Kalluri & Neilson 2003). En las células de la superficie ocular, observamos que el TGF- $\beta$ 1 promueve la EMT en las células corneales coincidiendo con los resultados previamente publicados (Aomatsu *et al.* 2010;Reneker *et al.* 2010). Estos resultados sugieren que el TGF- $\beta$  podría actuar sobre células corneales transformándolas en miofibroblastos productores de matriz extracelular y activando el proceso fibrótico en la superficie ocular. Sin embargo, se observó que ninguna de las isoformas de TGF- $\beta$  activan la EMT en células conjuntivales; estos resultados estarían en contradicción con la menor expresión de e-cadherina observada en el epitelio conjuntival de pacientes con conjuntivitis alérgica estacional (SAC) (Hughes *et al.* 2006) por lo que serán necesarios nuevos estudios para aclararlo.

- *Eficacia del bloqueo del TGF- $\beta$  con péptidos anti-TGF- $\beta$  P17 y P144*

En base a los resultados obtenidos, parece que la relación entre el TGF- $\beta$  y las células epiteliales puede ser dual. Por un lado, las células epiteliales pueden ser una fuente del factor y, por otro lado, el TGF- $\beta$  puede actuar sobre las células epiteliales estimulando una respuesta en ellas, contribuyendo al proceso inflamatorio. Por lo anteriormente expuesto, y dado que

parte de los efectos descritos del TGF- $\beta$  sobre las células epiteliales se pueden relacionar con el daño observado en los procesos inflamatorios crónico-graves de la superficie ocular, se planteó el bloqueo del TGF- $\beta$  como una potencial terapia en los mismos.

Para ello, se estudió el efecto *in vitro* de dos péptidos anti-TGF- $\beta$  (P144 y P17) en varias de las respuestas celulares activadas observadas. Diversas publicaciones de estudios previos con los péptidos anti-TGF- $\beta$  P144 y P17 han mostrado que son capaces de bloquear la capacidad profibrogénica del TGF- $\beta$ . El péptido P144 ha demostrado tener buena eficacia en modelos animales de fibrosis hepática (Ezquerro *et al.* 2003), de esclerosis dérmica inducida por bleomicina (Santiago *et al.* 2005) y en fibrosis periprotésica de silicona (Ruiz-de-Erenchun *et al.* 2005) y está en pruebas de ensayo clínico en fase II para el tratamiento de esclerodermia ([www.dignabiotech.com/r\\_d.Pipeline.asp](http://www.dignabiotech.com/r_d.Pipeline.asp)). Por otra parte, el péptido P17 inhibe la actividad del TGF- $\beta$  *in vitro* e *in vivo* en modelos de fibrosis hepática (Dotor *et al.* 2007) y ha sido caracterizado como un inmunomodulador (Gil-Guerrero *et al.* 2008). Además, se ha demostrado recientemente el efecto de ambos péptidos en la inhibición del desarrollo de la neovascularización coroidea inducida por láser en un modelo de rata (Recalde *et al.* 2011).

En este estudio, se probó el efecto de estos dos péptidos sobre las respuestas al TGF- $\beta$  de las células HCE por ser el tipo celular que presentó una mayor respuesta al TGF- $\beta$ , para determinar si eran capaces de revertir algunos de los efectos estimulados por esta molécula.

En primer lugar, comprobamos que los péptidos no provocaban ningún efecto tóxico sobre las células ni alteraban su viabilidad. Estudios previos *in vivo* de otros grupos en ratas tampoco mostraron signos de toxicidad con el péptido P144, sugiriendo que su administración es segura en las dosis utilizadas (Hermida *et al.* 2009).

Nuestros resultados muestran que P144 era capaz de disminuir significativamente algunos procesos relacionados con TGF- $\beta$  en células epiteliales corneales *in vitro* mientras que, el otro péptido P17, se ha mostrado menos eficaz.

Observamos que el P144 disminuía la secreción basal (autoestimulada por TGF- $\beta$  endógeno) de IP-10, IL-8 y RANTES y la estimulada por TGF- $\beta$  exógeno de GM-CSF, IP-10, IL-6, IL-8 y RANTES, citoquinas y quimioquinas relacionadas con procesos inflamatorios. Además, el P144 inhibió significativamente la secreción de MMP-13 estimulada por TGF- $\beta$ 1, aunque no la estimulada por TGF- $\beta$ 2, quizá debido a que ambos péptidos se diseñaron basados en la estructura del TGF- $\beta$ 1, siendo quizá más débil la unión de los péptidos al TGF- $\beta$ 2 a pesar de la homología entre ambas isoformas de TGF- $\beta$ . No observamos ningún efecto de los péptidos en

la secreción de MMP-9 estimulado por TGF- $\beta$ , lo que apunta a que otros factores, además de TGF- $\beta$ , puedan estar involucrados en la producción de dicha molécula. Otra posibilidad podría ser que la secreción de MMP-9 estuviera activada en las células epiteliales corneales por una vía alternativa de señalización como la vía ERK de las MAPK, como se ha descrito en podocitos y queratinocitos tras estimulación con TGF- $\beta$ 1 (Santibanez *et al.* 2002;Liu *et al.* 2005).

La activación de las vías de señalización implicadas en las respuestas a TGF- $\beta$  también se inhibió con P144. Parte de la inhibición observada puede relacionarse con la menor expresión de pSMAD-2 y translocación nuclear observada. Estos resultados están de acuerdo con los estudios llevados a cabo por Maldonado y cols. sobre el efecto *in vitro* de los péptidos anti-TGF- $\beta$  sobre células fibroblásticas corneales de conejo (células SIRC y cultivos primarios) que mostraron que el péptido P144 inhibe eficazmente los procesos de fibrogénesis en dichas células (Maldonado *et al.* "In vitro effect of recently identified anti-TGFbeta 1 peptides on the rabbit corneal epithelial cell line, SIRC" ARVO Meeting abstract Mayo 2008). En dichos estudios se comprobó que el péptido P144 inhibía eficazmente la activación de transducción de señales vía pSMAD-2 en ambos tipos celulares mientras que P17 fue menos eficaz.

La transición epitelio-mesenquimal activada por TGF- $\beta$ 1 en células corneales fue inhibida por P17. El P144 por el contrario disminuyó la expresión de e-cadherina tanto basal como estimulada por TGF- $\beta$ 2 lo que implicaría que podría favorecer la transición epitelio mesenquimal.

Curiosamente y en contradicción con lo esperado, cuando se estudió el efecto de los péptidos sobre la expresión de TLR-4 y SLPI, no observamos el efecto de recuperación de los niveles de expresión de TLR-4 ni de secreción de SLPI inhibidos por TGF- $\beta$  con los péptidos. En algunos casos, observamos que la inhibición de la expresión de estas moléculas era incluso mayor. Si bien la eficacia de inhibición de la actividad profibrogénica de TGF- $\beta$  por estos péptidos ha sido comprobada y ratificada en diversos estudios (Ezquerro *et al.* 2003;Santiago *et al.* 2005;Hermida *et al.* 2009), es posible que en este caso, el efecto no sólo de no reversión del efecto del TGF- $\beta$ , sino también de una potenciación de la inhibición, sea debido a que los péptidos estén actuando sobre alguna otra molécula de las vías de señalización implicadas en la expresión del TLR-4 o SLPI o que el efecto de otras moléculas como citoquinas producidas por ellas mismas produzcan un efecto auto y/o paracrino sobre su expresión que sea mayor que el producido por el TGF- $\beta$ . También puede haber ocurrido, simplemente, que las dosis y el tiempo de exposición no hayan sido los adecuados para mostrar este efecto. Este resultado

observado fue totalmente inesperado y serán necesarios nuevos estudios para confirmarlo y esclarecerlo.

Este estudio refuerza la relevancia del TGF- $\beta$  en inflamación de la superficie ocular. Los resultados sugieren que el TGF- $\beta$  podría tener un papel importante en las respuestas inflamatorias locales de las células epiteliales de la superficie ocular a través de la regulación de citoquinas y quimioquinas, la producción de SLPI y/o MMPs, entre otros mecanismos. A través del TGF- $\beta$  y la secreción de citoquinas/quimioquinas, las células epiteliales de la superficie ocular podrían participar localmente en la diferenciación Th17. Algunas de estas respuestas fueron parcialmente revertidas por una terapia anti-TGF- $\beta$  con el péptido P144, sugiriendo que la regulación de la expresión local de TGF- $\beta$  podría ser una buena nueva propuesta terapéutica para las enfermedades inflamatorias de la superficie ocular. El otro péptido anti-TGF- $\beta$  probado en el estudio, P17, resultó en general menos eficaz, exceptuando la inhibición del proceso de transición epitelio mesenquimal inducido por TGF- $\beta$ 1 observado; esto quizá pueda ser debido a que las dosis utilizadas de este péptido no fueron las adecuadas para mostrar sus efectos o quizá a que los tiempos de exposición no fueron los correctos. Serán necesarios nuevos estudios para aclararlo.

## **VIII.-RESUMEN DE LOS RESULTADOS**





Resumen de los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral:

**Objetivo 1: Determinar el patrón de secreción de TGF- $\beta$  por la línea celular epitelial conjuntival humana IOBA-NHC y por la línea epitelial corneal humana HCE en condiciones basales y en respuesta a diversos tipos de moléculas inflamatorias.**

1. Las células epiteliales conjuntivales IOBA-NHC y corneales HCE secretan TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en condiciones basales, pero no TGF- $\beta$ 3; Las células IOBA-NHC secretan mayoritariamente TGF- $\beta$ 1 mientras que las células HCE secretan principalmente TGF- $\beta$ 2.
2. En las células IOBA-NHC no se produce modificación de la secreción de TGF- $\beta$  en condiciones de inflamación.
3. Dicha secreción se estimula en condiciones inflamatorias en células HCE. El TNF- $\alpha$  incrementa significativamente la secreción de TGF- $\beta$ 2 (formas latente y activa), mientras que la IL-17 incrementa la secreción de la forma activa.

**Objetivo 2: Determinar la expresión de receptores de TGF- $\beta$  en las líneas celulares HCE e IOBA-NHC en condiciones basales y en diferentes condiciones proinflamatorias.**

4. Las células IOBA-NHC y HCE expresan los receptores de TGF- $\beta$  (RI, RII y RIII) en condiciones basales y su expresión se modifica en condiciones inflamatorias. La expresión de TGF- $\beta$  RI en las células HCE se ve significativamente disminuída con IL-4, mientras que la expresión de TGF- $\beta$  RII se incrementa significativamente con TNF- $\alpha$ .
5. La IL-17 incrementa significativamente la expresión de TGF- $\beta$  RI en ambos tipos celulares conjuntivales y corneales. El tratamiento conjunto de IL-17 y TNF- $\alpha$  disminuyó significativamente la expresión de los tres tipos de receptores de TGF- $\beta$  (RI, RII y RIII) respecto a la observada tras estimulación con IL-17 o con TNF- $\alpha$  por separado.

**Objetivo 3: Determinar la activación de transducción de señales implicadas en las respuestas a TGF- $\beta$ .**

6. Ambos tipos celulares conjuntivales y corneales, responden al TGF- $\beta$  incrementando la fosforilación y posterior traslocación al núcleo del factor de transcripción SMAD-2.
7. El TGF- $\beta$ 1 disminuye significativamente la expresión de SMAD-7 en células conjuntivales IOBA-NHC.
8. No se observó activación por TGF- $\beta$  de otras vías de señalización implicadas en respuestas a otros estímulos inflamatorios ni en células IOBA-NHC ni en células HCE.

**Objetivo 4: Determinar modificación por TGF- $\beta$  de la expresión de receptores para diferentes moléculas implicadas en respuestas inflamatorias.**

9. El TGF- $\beta$ 2 disminuye significativamente la expresión del receptor tipo Toll TLR-4 en células IOBA-NHC (48 h) y en células HCE (30 min y 48 h). El TGF- $\beta$ 1 disminuye la expresión en células IOBA-NHC (48 h).
10. Las células IOBA-NHC y HCE expresan el receptor de IL-17 (IL-17R). Tanto TGF- $\beta$ 1 como TGF- $\beta$ 2 incrementan significativamente dicha expresión en células IOBA-NHC.

**Objetivo 5: Determinar el patrón de secreción celular por la línea celular epitelial conjuntival humana IOBA-NHC y por la línea epitelial corneal humana HCE en condiciones basales y en respuesta a TGF- $\beta$ .**

11. El tratamiento con TGF- $\beta$  modifica el patrón de secreción celular con algunas diferencias dependiendo del tipo celular (conjuntival o corneal), el tiempo de exposición (mayor o menor) y el tipo de isoforma de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2).
12. Bajo la acción de TGF- $\beta$  exógeno, se altera la secreción de algunas citoquinas/quimioquinas implicadas en el reclutamiento de células inflamatorias: incrementa la secreción de GM-CSF e IL-8 por células epiteliales conjuntivales y de GM-CSF, IL-2, IL-12p40, IL-6 e IL-10 por células epiteliales corneales. Además, el TGF- $\beta$  disminuye la secreción de RANTES en ambas líneas celulares y de IP-10 en células IOBA-NHC.
13. Las células IOBA-NHC y HCE secretan basalmente SLPI y la secreción de esta molécula antiproteasa disminuye tras la exposición a TGF- $\beta$ 1 durante 48 h en ambos tipos celulares.
14. No se detecta secreción de la molécula TSLP por células por IOBA-NHC ni por HCE.
15. TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 incrementan la producción de metaloproteinasas MMP-9 y MMP-13 por células epiteliales corneales.

**Objetivo 6: Determinar el efecto del TGF- $\beta$  en la transición epitelio-mesenquimal en las líneas celulares IOBA-NHC y HCE.**

16. En células IOBA-NHC ambas isoformas de TGF- $\beta$  inhiben la transición epitelio-mesenquimal; la isoforma TGF- $\beta$ 1 favorece la transición epitelio-mesenquimal en células HCE.

**Objetivo 7: Estudiar la eficacia de dos péptidos sintéticos anti-TGF- $\beta$  (P144 y P17) en la modulación de la respuesta del epitelio corneal.**

17. Los péptidos anti-TGF- $\beta$  P17 y P144 no alteran la viabilidad celular.
18. El péptido P144 inhibe significativamente la fosforilación de SMAD-2 estimulada por TGF- $\beta$ 2 y su translocación al núcleo.
19. El péptido P144 inhibe la expresión de SMAD-7 estimulada por TGF- $\beta$ 2.
20. El péptido P144 inhibe significativamente la secreción de varias citoquinas, tanto estimulada por TGF- $\beta$  como basal. El péptido P144 inhibe significativamente la secreción basal de IL-8, IP-10 y RANTES y la estimulada por TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 de GM-CSF, IL-6, IL-8, IP-10 y RANTES.
21. El péptido P144 inhibe la secreción de SLPI tanto basal como de las células expuestas a TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.
22. El péptido P144 inhibe significativamente la secreción de MMP-13 estimulada por TGF- $\beta$ 1.
23. El péptido P144 disminuye significativamente la expresión del receptor tipo Toll TLR-4 tras estimulación con TGF- $\beta$ 1.
24. Tanto el péptido P17 como el péptido P144 inhiben significativamente la expresión basal no estimulada de e-cadherina. El péptido P17 revierte significativamente la expresión inhibida por TGF- $\beta$ 1 mientras que el péptido P144 inhibe significativamente la expresión estimulada por TGF- $\beta$ 2.



## **IX.CONCLUSIONES**



Los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral, permiten concluir que:

- I. Las células epiteliales conjuntivales y corneales de la superficie ocular, representadas en este trabajo por dos líneas celulares, desempeñan un papel importante en los procesos de inflamación de la misma participando como “donantes”, es decir, actuando como fuente de TGF- $\beta$ . Esta secreción basal de TGF- $\beta$  se encuentra alterada en condiciones inflamatorias, lo que podría influir en el desarrollo y cronificación de los procesos inflamatorios en la clínica.
- II. Las células epiteliales conjuntivales y corneales de la superficie ocular actúan como “receptoras” de TGF- $\beta$  expresando sus receptores RI, RII y RIII con diferente intensidad según el tipo celular; estos receptores son funcionales en ambos tipos celulares. La expresión de estos receptores de TGF- $\beta$  puede alterarse durante los procesos inflamatorios modificando, por tanto, la respuesta de las células de la superficie ocular a este factor.
- III. Las células epiteliales conjuntivales y corneales de la superficie ocular responden al TGF- $\beta$  modificando *in vitro* sus respuestas. Por lo tanto, el TGF- $\beta$  puede desempeñar un papel importante en las respuestas inflamatorias de las células epiteliales de la superficie ocular, a través de la modificación de la secreción de citoquinas/quimioquinas, MMPs, SLPI y de la expresión de receptores para IL-17 y TLR-4. Esta alteración de las respuestas celulares y de la expresión de receptores para moléculas inflamatorias podría participar en el proceso de cronificación y en el daño tisular. Así mismo, el TGF- $\beta$  ejerce un papel regulador en el proceso de EMT.
- IV. El bloqueo del TGF- $\beta$  revierte varios efectos en la funcionalidad de las células epiteliales de la superficie ocular, que pudieran ser considerados como perjudiciales y que se pueden relacionar con los daños observados en los casos de inflamación crónica y grave. La modulación de la expresión de este factor podría ser, por tanto, una terapia potencial para determinadas patologías inflamatorias de la superficie ocular.





## **X.- BIBLIOGRAFÍA**



## Referencias

The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul.Surf.* 5: 75-92.

Abu El-Asrar A. M., Al-Mansouri S., Tabbara K. F., Missotten L., & Geboes K. (2006) Immunopathogenesis of conjunctival remodelling in vernal keratoconjunctivitis. *Eye* 20: 71-79.

Adams D. H., Hathaway M., Shaw J., Burnett D., Elias E., & Strain A. J. (1991) Transforming growth factor-beta induces human T lymphocyte migration in vitro. *J.Immunol.* 147: 609-612.

Ahdieh M., Vandenbos T., & Youakim A. (2001) Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281: C2029-C2038.

Akdis C. A. & Akdis M. (2009) Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123: 735-746.

Albanesi C., Cavani A., & Girolomoni G. (1999) IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J.Immunol.* 162: 494-502.

Amadi-Obi A., Yu C. R., Liu X., Mahdi R. M., Clarke G. L., Nussenblatt R. B., Gery I., Lee Y. S., & Egwuagu C. E. (2007) TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nature Medicine* 13: 711-718.

Andoh A., Fujino S., Bamba S., Araki Y., Okuno T., Bamba T., & Fujiyama Y. (2002) IL-17 selectively down-regulates TNF-alpha-induced RANTES gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J.Immunol.* 169: 1683-1687.

Aomatsu K., Arao T., Sugioka K., Matsumoto K., Tamura D., Kudo K., Kaneda H., Tanaka K., Fujita Y., Shimomura Y., & Nishio K. (2011) TGF- $\beta$  induces sustained up-regulation of SNAI1 and SNAI2 through Smad and non-Smad pathways in a human corneal epithelial cell line. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*52 (5): 2437-2443..

Araki-Sasaki K., Ohashi Y., Sasabe T., Hayashi K., Watanabe H., Tano Y., & Handa H. (1995) An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 36: 614-621.

Arias M., Sauer-Lehnen S., Treptau J., Janoschek N., Theuerkauf I., Buettner R., Gressner A. M., & Weiskirchen R. (2003) Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC.Gastroenterol.* 3: 29.

Arribillaga L., Dotor J., Basagoiti M., Riezu-Boj J. I., Borrás-Cuesta F., Lasarte J. J., Sarobe P., Cornet M. E., & Feijoo E. (2011) Therapeutic effect of a peptide inhibitor of TGF-beta on pulmonary fibrosis. *Cytokine* 53: 327-333.

- Assoian R. K., Komoriya A., Meyers C. A., Miller D. M., & Sporn M. B. (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry* 258: 7155-7160.
- Baker B. S. (2006) The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin.Exp.Immunol.* 144: 1-9.
- Bakin A. V., Rinehart C., Tomlinson A. K., & Arteaga C. L. (2002) p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J.Cell Sci.* 115: 3193-3206.
- Barnard J. A., Lyons R. M., & Moses H. L. (1990) The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim.Biophys.Acta* 1032: 79-87.
- Barton K., Nava A., Monroy D. C., & Pflugfelder S. C. (1998) Cytokines and tear function in ocular surface disease. *Adv.Exp.Med.Biol.* 438: 461-469.
- Behzadian M. A., Wang X. L., Windsor L. J., Ghaly N., & Caldwell R. B. (2001) TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 42: 853-859.
- Beriou G., Bradshaw E. M., Lozano E., Costantino C. M., Hastings W. D., Orban T., Elyaman W., Khoury S. J., Kuchroo V. K., Baecher-Allan C., & Hafler D. A. (2010) TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *J.Immunol.* 185: 46-54.
- Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T. B., Oukka M., Weiner H. L., & Kuchroo V. K. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238.
- Bhowmick N. A., Ghiassi M., Bakin A., Aakre M., Lundquist C. A., Engel M. E., Arteaga C. L., & Moses H. L. (2001) Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol.Biol.Cell* 12: 27-36.
- Bitzer M., von G. G., Liang D., Dominguez-Rosales A., Beg A. A., Rojkind M., & Bottinger E. P. (2000) A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev.* 14: 187-197.
- Boccaccio C., Ando M., Tamagnone L., Bardelli A., Michieli P., Battistini C., & Comoglio P. M. (1998) Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 391: 285-288.
- Bond M., Chase A. J., Baker A. H., & Newby A. C. (2001) Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc.Res.* 50: 556-565.
- Bonini S., Micera A., Iovieno A., Lambiase A., & Bonini S. (2005) Expression of Toll-like receptors in healthy and allergic conjunctiva. *Ophthalmology* 112: 1528-1529.
- Bottoms S. E., Howell J. E., Reinhardt A. K., Evans I. C., & McAnulty R. J. (2010) Tgf-Beta isoform specific regulation of airway inflammation and remodelling in a murine model of asthma. *PLoS.One.* 5: e9674.

- Caestecker M. (2004) The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15: 1-11.
- Calonge M., Enríquez de Salamanca A., García Vazquez C., & Stern M. E. Specific patterns of conjunctival epithelial barrier alteration induced by Th1 versus Th2 cytokines. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 47: E-Abstract 5584. 2006.
- Calonge M. (1999) Classification of ocular atopic/allergic disorders and conditions: an unsolved problem. *Acta Ophthalmol.Scand.Suppl* 10-13.
- Calonge M., Enriquez-de-Salamanca A., Diebold Y., Gonzalez-Garcia M. J., Reinoso R., Herreras J. M., & Corell A. (2010) Dry eye disease as an inflammatory disorder. *Ocul.Immunol.Inflamm.* 18: 244-253.
- Cao J., Ren G., Gong Y., Dong S., Yin Y., & Zhang L. (2011) Bronchial epithelial cells release IL-6, CXCL1 and CXCL8 upon mast cell interaction. *Cytokine* 56: 823-831.
- Capaldo C. T. & Nusrat A. (2009) Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim.Biophys.Acta* 1788: 864-871.
- Cartney-Francis N., Jin W., & Wahl S. M. (2004) Aberrant Toll receptor expression and endotoxin hypersensitivity in mice lacking a functional TGF-beta 1 signaling pathway. *J.Immunol.* 172: 3814-3821.
- Castro-Munozledo F. (2008) Corneal epithelial cell cultures as a tool for research, drug screening and testing. *Experimental Eye Research* 86: 459-469.
- Chandra M., Zang S., Li H., Zimmerman L. J., Champer J., Tsuyada A., Chow A., Zhou W., Yu Y., Gao H., Ren X., Lin R. J., & Wang S. E. (2012) Nuclear Translocation of Type I Transforming Growth Factor beta Receptor Confers a Novel Function in RNA Processing. *Mol.Cell Biol.* 32: 2183-2195.
- Chang S. H. & Dong C. (2007) A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res.* 17: 435-440.
- Chauhan S. K., El A. J., Ecoiffier T., Goyal S., Zhang Q., Saban D. R., & Dana R. (2009) Autoimmunity in dry eye is due to resistance of Th17 to Treg suppression. *J.Immunol.* 182: 1247-1252.
- Cheifetz S., Hernandez H., Laiho M., ten D. P., Iwata K. K., & Massague J. (1990) Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 265: 20533-20538.
- Chen C., Michelini-Norris B., Stevens S., Rowsey J., Ren X., Goldstein M., & Schultz G. (2000) Measurement of mRNAs for TGFs and extracellular matrix proteins in corneas of rats after PRK. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 41: 4108-4116.
- Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K. J., Li L., Marinos N., McGrady G., & Wahl S. M. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor foxp3. *J.Exp.Med.* 198: 1875-1886.

- Chen Z., Evans W. H., Pflugfelder S. C., & Li D. Q. (2006) Gap junction protein connexin 43 serves as a negative marker for a stem cell-containing population of human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 24: 1265-1273.
- Chi W., Zhu X., Yang P., Liu X., Lin X., Zhou H., Huang X., & Kijlstra A. (2008) Upregulated IL-23 and IL-17 in Behcet patients with active uveitis. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 49: 3058-3064.
- Chotikavanich S., de Paiva C. S., Li d. Q., Chen J. J., Bian F., Farley W. J., & Pflugfelder S. C. (2009) Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 50: 3203-3209.
- Chung D. R., Kasper D. L., Panzo R. J., Chitnis T., Grusby M. J., Sayegh M. H., & Tzianabos A. O. (2003) CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J.Immunol.* 170: 1958-1963.
- Connor T. B., Jr., Roberts A. B., Sporn M. B., Danielpour D., Dart L. L., Michels R. G., de B. S., Enger C., Kato H., Lansing M., & . (1989) Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. *J.Clin.Invest* 83: 1661-1666.
- Copeland N. G., Gilbert D. J., Schindler C., Zhong Z., Wen Z., Darnell J. E., Jr., Mui A. L., Miyajima A., Quelle F. W., Ihle J. N., & . (1995) Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 29: 225-228.
- Corrales R. M., Calonge M., Herreras J. M., Saez V., & Chaves F. J. (2003) Human epithelium from conjunctival impression cytology expresses MUC7 mucin gene. *Cornea* 22: 665-671.
- Corrales R. M., Narayanan S., Fernandez I., Mayo A., Galarreta D. J., Fuentes-Paez G., Chaves F. J., Herreras J. M., & Calonge M. (2011) Ocular mucin gene expression levels as biomarkers for the diagnosis of dry eye syndrome. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 52: 8363-8369.
- Corrales R. M., Stern M. E., de Paiva C. S., Welch J., Li D. Q., & Pflugfelder S. C. (2006) Desiccating stress stimulates expression of matrix metalloproteinases by the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 47: 3293-3302.
- Cortez D. M., Feldman M. D., Mummidi S., Valente A. J., Steffensen B., Vincenti M., Barnes J. L., & Chandrasekar B. (2007) IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 293: H3356-H3365.
- Cousins S. W., McCabe M. M., Danielpour D., & Streilein J. W. (1991) Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 32: 2201-2211.
- Cunnusamy K., Chen P. W., & Niederkorn J. Y. (2010) IL-17 promotes immune privilege of corneal allografts. *J.Immunol.* 185: 4651-4658.
- D'Ambrosio D., Panina-Bordignon P., & Sinigaglia F. (2003) Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J.Immunol.Methods* 273: 3-13.
- Dahl M. E., Dabbagh K., Liggitt D., Kim S., & Lewis D. B. (2004) Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nat.Immunol.* 5: 337-343.

- de la Fuente M., Seijo B., & Alonso M. J. (2008) Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 49: 2016-2024.
- de Paiva C. S., Chen Z., Corrales R. M., Pflugfelder S. C., & Li D. Q. (2005) ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 23: 63-73.
- de Paiva C. S., Chotikavanich S., Pangelinan S. B., Pitcher J. D., III, Fang B., Zheng X., Ma P., Farley W. J., Siemasko K. F., Niederkorn J. Y., Stern M. E., Li D. Q., & Pflugfelder S. C. (2009) IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol.* 2: 243-253.
- de Waal M. R., Abrams J., Bennett B., Figdor C. G., & de Vries J. E. (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174: 1209-1220.
- Denis M. (1994) Neutralization of transforming growth factor-beta 1 in a mouse model of immune-induced lung fibrosis. *Immunology* 82: 584-590.
- Derynck R., Zhang Y., & Feng X. H. (1998) Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95: 737-740.
- Derynck R. & Zhang Y. E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-584.
- Diebold Y., Calonge M., Enriquez de S. A., Callejo S., Corrales R. M., Saez V., Siemasko K. F., & Stern M. E. (2003) Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 4263-4274.
- Dinarello C. A. (2007) Historical insights into cytokines. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1: S34-S45.
- Doganci A., Eigenbrod T., Krug N., De Sanctis G. T., Hausding M., Erpenbeck V. J., Haddad e., Lehr H. A., Schmitt E., Bopp T., Kallen K. J., Herz U., Schmitt S., Luft C., Hecht O., Hohlfeld J. M., Ito H., Nishimoto N., Yoshizaki K., Kishimoto T., Rose-John S., Renz H., Neurath M. F., Galle P. R., & Finotto S. (2005) The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J. Clin. Invest* 115: 313-325.
- Dotor J., Lopez-Vazquez A. B., Lasarte J. J., Sarobe P., Garcia-Granero M., Riezu-Boj J. I., Martinez A., Feijoo E., Lopez-Sagaseta J., Hermida J., Prieto J., & Borrás-Cuesta F. (2007) Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine* 39: 106-115.
- Durbin J. E., Hackenmiller R., Simon M. C., & Levy D. E. (1996) Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84: 443-450.
- Ehrchen J. M., Sunderkotter C., Foell D., Vogl T., & Roth J. (2009) The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J. Leukoc. Biol.* 86: 557-566.
- Engler C., Chakravarti S., Doyle J., Eberhart C. G., Meng H., Stark W. J., Kelliher C., & Jun A. S. (2011) Transforming growth factor-beta signaling pathway activation in Keratoconus. *Am. J. Ophthalmol.* 151: 752-759.

Enriquez-de-Salamanca A., Calder V., Gao J., Galatowicz G., Garcia-Vazquez C., Fernandez I., Stern M. E., Diebold Y., & Calonge M. (2008) Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: an in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine* 44: 160-167.

Enriquez-de-Salamanca A. & Calonge M. (2008) Cytokines and chemokines in immune-based ocular surface inflammation. *Expert.Rev.Clin.Immunol.* 4: 457-467.

Enriquez-de-Salamanca A., Castellanos E., Stern M. E., Fernandez I., Carreno E., Garcia-Vazquez C., Herreras J. M., & Calonge M. (2010) Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol.Vis.* 16: 862-873.

Enriquez-de-Salamanca A., Siemasko K. F., Diebold Y., Calonge M., Gao J., Juarez-Campo M., & Stern M. E. (2005) Expression of muscarinic and adrenergic receptors in normal human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 46: 504-513.

Ezquerro I. J., Lasarte J. J., Dotor J., Castilla-Cortazar I., Bustos M., Penuelas I., Blanco G., Rodriguez C., Lechuga M. C., Greenwel P., Rojkind M., Prieto J., & Borrás-Cuesta F. (2003) A synthetic peptide from transforming growth factor beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine* 22: 12-20.

Fantini M. C., Monteleone G., & MacDonald T. T. (2007) New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* 13: 1419-1423.

Feng X. H. & Derynck R. (1996) Ligand-independent activation of transforming growth factor (TGF) beta signaling pathways by heteromeric cytoplasmic domains of TGF-beta receptors. *Journal of Biological Chemistry* 271: 13123-13129.

Filmus J. & Kerbel R. S. (1993) Development of resistance mechanisms to the growth-inhibitory effects of transforming growth factor-beta during tumor progression. *Curr.Opin.Oncol.* 5: 123-129.

Foell D., Wittkowski H., Ren Z., Turton J., Pang G., Daebritz J., Ehrchen J., Heidemann J., Borody T., Roth J., & Clancy R. (2008) Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J.Pathol.* 216: 183-192.

Foster C. S. & Calonge M. (1990) Atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 97: 992-1000.

Freishtat R. J., Watson A. M., Benton A. S., Iqbal S. F., Pillai D. K., Rose M. C., & Hoffman E. P. (2011) Asthmatic airway epithelium is intrinsically inflammatory and mitotically dyssynchronous. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 44: 863-869.

Fuchshofer R. & Tamm E. R. (2012) The role of TGF-beta in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Cell Tissue Res.* 347 (1): 279-290.

Fujishima H., Takeuchi T., Shinozaki N., Saito I., & Tsubota K. (1995) Measurement of IL-4 in tears of patients with seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Clin.Exp.Immunol.* 102: 395-398.

Funaba M., Zimmerman C. M., & Mathews L. S. (2002) Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *Journal of Biological Chemistry* 277: 41361-41368.



- Garcia-Posadas L., Contreras-Ruiz L., Lopez-Garcia A., Villaron A. S., Maldonado M. J., & Diebold Y. (2012) Hyaluronan receptors in the human ocular surface: a descriptive and comparative study of RHAMM and CD44 in tissues, cell lines and freshly collected samples. *Histochem.Cell Biol.*137(2): 165-176.
- Ge Q., Moir L. M., Black J. L., Oliver B. G., & Burgess J. K. (2010) TGFbeta1 induces IL-6 and inhibits IL-8 release in human bronchial epithelial cells: the role of Smad2/3. *J.Cell Physiol* 225: 846-854.
- Gil-Guerrero L., Dotor J., Huibregtse I. L., Casares N., Lopez-Vazquez A. B., Rudilla F., Riezu-Boj J. I., Lopez-Sagaseta J., Hermida J., Van D. S., Bezunartea J., Llopiz D., Sarobe P., Prieto J., Borrás-Cuesta F., & Lasarte J. J. (2008) In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1. *J.Immunol.* 181: 126-135.
- Gordon K. J. & Blobel G. C. (2008) Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim.Biophys.Acta* 1782: 197-228.
- Gorelik L. & Flavell R. A. (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat.Rev.Immunol.* 2: 46-53.
- Guarino M. (1995) Epithelial-to-mesenchymal change of differentiation. From embryogenic mechanism to pathological patterns. *Histol.Histopathol.* 10: 171-184.
- Hamilton J. A. & Anderson G. P. (2004) GM-CSF Biology. *Growth Factors* 22: 225-231.
- Harrington L. E., Hatton R. D., Mangan P. R., Turner H., Murphy T. L., Murphy K. M., & Weaver C. T. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat.Immunol.* 6: 1123-1132.
- Hattori M., Shimizu K., Katsumura K., Oku H., Sano Y., Matsumoto K., Yamaguchi Y., & Ikeda T. (2012) Effects of all-trans retinoic acid nanoparticles on corneal epithelial wound healing. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 250(4): 557-563..
- Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y. Y., Grinnell B. W., Richardson M. A., Topper J. N., Gimbrone M. A., Jr., Wrana J. L., & Falb D. (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89: 1165-1173.
- Heiman A. S., Abonyo B. O., Rilling-Reed S. F., & Alexander M. S. (2005) Cytokine-stimulated human lung alveolar epithelial cells release eotaxin-2 (CCL24) and eotaxin-3 (CCL26). *Journal of Interferon and Cytokine Research* 25: 82-91.
- Heldin C. H., Miyazono K., & ten D. P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471.
- Hermida N., Lopez B., Gonzalez A., Dotor J., Lasarte J. J., Sarobe P., Borrás-Cuesta F., & Diez J. (2009) A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc.Res.* 81: 601-609.
- Higuchi A., Kawakita T., & Tsubota K. (2011) IL-6 induction in desiccated corneal epithelium in vitro and in vivo. *Mol.Vis.* 17: 2400-2406.

- Hingorani M., Calder V., Jolly G., Buckley R. J., & Lightman S. L. (1998) Eosinophil surface antigen expression and cytokine production vary in different ocular allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102: 821-830.
- Hirano T., Taga T., Nakano N., Yasukawa K., Kashiwamura S., Shimizu K., Nakajima K., Pyun K. H., & Kishimoto T. (1985) Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82: 5490-5494.
- Hirase K., Sugiyama T., Ikeda T., Sotozono C., Yasuhara T., Koizumi K., & Kinoshita S. (2005) Transforming growth factor beta(2) increases in subretinal fluid in rhegmatogenous retinal detachment with subretinal strands. *Ophthalmologica* 219: 222-225.
- Holgate S. T. (2007) The epithelium takes centre stage in asthma and atopic dermatitis. *Trends Immunol.* 28: 248-251.
- Hori J., Vega J. L., & Masli S. (2010) Review of ocular immune privilege in the year 2010: modifying the immune privilege of the eye. *Ocul.Immunol.Inflamm.* 18: 325-333.
- Hornof M., de la F. M., Hallikainen M., Tammi R. H., & Urtti A. (2008) Low molecular weight hyaluronan shielding of DNA/PEI polyplexes facilitates CD44 receptor mediated uptake in human corneal epithelial cells. *J.Gene Med.* 10: 70-80.
- Hsieh C. S., Macatonia S. E., Tripp C. S., Wolf S. F., O'Garra A., & Murphy K. M. (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260: 547-549.
- Huang S. S., Liu Q., Johnson F. E., Konish Y., & Huang J. S. (1997) Transforming growth factor beta peptide antagonists and their conversion to partial agonists. *Journal of Biological Chemistry* 272: 27155-27159.
- Huang X. & Lee C. (2003) From TGF-beta to cancer therapy. *Curr.Drug Targets.* 4: 243-250.
- Huber A. R., Kunkel S. L., Todd R. F., III, & Weiss S. J. (1991) Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254: 99-102.
- Hughes J. L., Lackie P. M., Wilson S. J., Church M. K., & McGill J. I. (2006) Reduced structural proteins in the conjunctival epithelium in allergic eye disease. *Allergy* 61: 1268-1274.
- Hurst S. M., Wilkinson T. S., McLoughlin R. M., Jones S., Horiuchi S., Yamamoto N., Rose-John S., Fuller G. M., Topley N., & Jones S. A. (2001) Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity.* 14: 705-714.
- Hwang S. Y. & Kim H. Y. (2005) Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients. *Mol.Cells* 19: 180-184.
- Ihle J. N. (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84: 331-334.
- Irkec M. & Bozkurt B. (2003) Epithelial cells in ocular allergy. *Curr.Allergy Asthma Rep.* 3: 352-357.

- Itoh S. & ten D. P. (2007) Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr.Opin.Cell Biol.* 19: 176-184.
- Ivanov I. I., McKenzie B. S., Zhou L., Tadokoro C. E., Lepelley A., Lafaille J. J., Cua D. J., & Littman D. R. (2006) The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126: 1121-1133.
- Jagels M. A. & Hugli T. E. (2000) Mixed effects of TGF-beta on human airway epithelial-cell chemokine responses. *Immunopharmacology* 48: 17-26.
- Jaumann F., Elssner A., Mazur G., Dobmann S., & Vogelmeier C. (2000) Transforming growth factor-beta1 is a potent inhibitor of secretory leukoprotease inhibitor expression in a bronchial epithelial cell line. Munich Lung Transplant Group. *Eur.Respir.J.* 15: 1052-1057.
- Jones C. E. & Chan K. (2002) Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 26: 748-753.
- Joyce N. C. & Zieske J. D. (1997) Transforming growth factor-beta receptor expression in human cornea. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 38: 1922-1928.
- Kalluri R. & Neilson E. G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J.Clin.Invest* 112: 1776-1784.
- Kamiya Y., Miyazono K., & Miyazawa K. (2010) Smad7 inhibits transforming growth factor-beta family type I receptors through two distinct modes of interaction. *Journal of Biological Chemistry* 285: 30804-30813.
- Kang M. H., Kim M. K., Lee H. J., Lee H. I., Wee W. R., & Lee J. H. (2011) Interleukin-17 in various ocular surface inflammatory diseases. *J.Korean Med.Sci.* 26: 938-944.
- Kaplan M. H., Schindler U., Smiley S. T., & Grusby M. J. (1996) Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity.* 4: 313-319.
- Karamichos D., Guo X. Q., Hutcheon A. E., & Zieske J. D. (2010) Human corneal fibrosis: an in vitro model. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 51: 1382-1388.
- Kato A. & Schleimer R. P. (2007) Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 19: 711-720.
- Kim H. S., Shang T., Chen Z., Pflugfelder S. C., & Li D. Q. (2004) TGF-beta1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research* 79: 263-274.
- Kolls J. K. & Linden A. (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 21: 467-476.
- Komiyama Y., Nakae S., Matsuki T., Nambu A., Ishigame H., Kakuta S., Sudo K., & Iwakura Y. (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* 177: 566-573.

- Kon C. H., Occeleston N. L., Aylward G. W., & Khaw P. T. (1999) Expression of vitreous cytokines in proliferative vitreoretinopathy: a prospective study. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 40: 705-712.
- Kondou H., Mushiake S., Etani Y., Miyoshi Y., Michigami T., & Ozono K. (2003) A blocking peptide for transforming growth factor-beta1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo. *J. Hepatol.* 39: 742-748.
- Kria L., Ohira A., & Amemiya T. (1996) Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium. *Acta Histochem.* 98: 195-201.
- Kumagai N., Yamamoto K., Fukuda K., Nakamura Y., Fujitsu Y., Nuno Y., & Nishida T. (2002) Active matrix metalloproteinases in the tear fluid of individuals with vernal keratoconjunctivitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110: 489-491.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lam H., Bleiden L., de Paiva C. S., Farley W., Stern M. E., & Pflugfelder S. C. (2009) Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am.J.Ophthalmol.* 147: 198-205.
- Laping N. J., Grygielko E., Mathur A., Butter S., Bomberger J., Tweed C., Martin W., Fornwald J., Lehr R., Harling J., Gaster L., Callahan J. F., & Olson B. A. (2002) Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol. Pharmacol.* 62: 58-64.
- Leaman D. W., Pisharody S., Flickinger T. W., Commane M. A., Schlessinger J., Kerr I. M., Levy D. E., & Stark G. R. (1996) Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* 16: 369-375.
- Lee D. B., Huang E., & Ward H. J. (2006a) Tight junction biology and kidney dysfunction. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 290: F20-F34.
- Lee J. M., Dedhar S., Kalluri R., & Thompson E. W. (2006b) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 172: 973-981.
- Leonardi A. (2002) Vernal keratoconjunctivitis: pathogenesis and treatment. *Prog. Retin. Eye Res.* 21: 319-339.
- Leonardi A., Brun P., Tavolato M., Abatangelo G., Plebani M., & Secchi A. G. (2000) Growth factors and collagen distribution in vernal keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 4175-4181.
- Leonardi A., Brun P., Tavolato M., Plebani M., Abatangelo G., & Secchi A. G. (2003) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Eur.J.Ophthalmol.* 13: 606-610.
- Leonardi A., De D. C., & Motterle L. (2007) Immunopathogenesis of ocular allergy: a schematic approach to different clinical entities. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 7: 429-435.

- Leonardi A., Di S. A., Motterle L., Zavan B., Abatangelo G., & Brun P. (2011) Transforming growth factor-beta/Smad - signalling pathway and conjunctival remodelling in vernal keratoconjunctivitis. *Clin.Exp.Allergy* 41: 52-60.
- Leonardi A., Fregona I. A., Plebani M., Secchi A. G., & Calder V. L. (2006) Th1- and Th2-type cytokines in chronic ocular allergy. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 244: 1240-1245.
- Leonardi A., Sathe S., Bortolotti M., Beaton A., & Sack R. (2009) Cytokines, matrix metalloproteases, angiogenic and growth factors in tears of normal subjects and vernal keratoconjunctivitis patients. *Allergy* 64: 710-717.
- Li D. Q. & Pflugfelder S. C. (2005) Matrix metalloproteinases in corneal inflammation. *Ocul.Surf.* 3: S198-S202.
- Liu S., Liang Y., Huang H., Wang L., Li Y., Li J., Li X., & Wang H. (2005) ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes. *Cell Physiol Biochem.* 16: 207-216.
- Liu Y. J., Soumelis V., Watanabe N., Ito T., Wang Y. H., Malefyt R. W., Omori M., Zhou B., & Ziegler S. F. (2007) TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu.Rev.Immunol.* 25: 193-219.
- Luger D., Silver P. B., Tang J., Cua D., Chen Z., Iwakura Y., Bowman E. P., Sgambellone N. M., Chan C. C., & Caspi R. R. (2008) Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J.Exp.Med.* 205: 799-810.
- Lui W. Y., Lee W. M., & Cheng C. Y. (2001) Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. *Endocrinology* 142: 1865-1877.
- Luo B. L., Niu R. C., Feng J. T., Hu C. P., Xie X. Y., & Ma L. J. (2008) Downregulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor in chronic obstructive lung disease: the role of TGF-beta/Smads signaling pathways. *Arch.Med.Res.* 39: 388-396.
- Ma P., Bian F., Wang Z., Zheng X., Chotikavanich S., Pflugfelder S. C., & Li D. Q. (2009) Human corneal epithelium-derived thymic stromal lymphopoietin links the innate and adaptive immune responses via TLRs and Th2 cytokines. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 50: 2702-2709.
- Maertzdorf J., Osterhaus A. D., & Verjans G. M. (2002) IL-17 expression in human herpetic stromal keratitis: modulatory effects on chemokine production by corneal fibroblasts. *J.Immunol.* 169: 5897-5903.
- Malek T. R. (2008) The biology of interleukin-2. *Annu.Rev.Immunol.* 26: 453-479.
- Manel N., Unutmaz D., & Littman D. R. (2008) The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat.Immunol.* 9: 641-649.

- Mangan P. R., Harrington L. E., O'Quinn D. B., Helms W. S., Bullard D. C., Elson C. O., Hatton R. D., Wahl S. M., Schoeb T. R., & Weaver C. T. (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441: 231-234.
- Marshak-Rothstein A. (2006) Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat.Rev.Immunol.* 6: 823-835.
- Massague J. (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu.Rev.Cell Biol.* 6: 597-641.
- Massague J. (1992) Receptors for the TGF-beta family. *Cell* 69: 1067-1070.
- Massague J. (1996) TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 85: 947-950.
- Massague J., Cheifetz S., Ignatz R. A., & Boyd F. T. (1987) Multiple type-beta transforming growth factors and their receptors. *J.Cell Physiol Suppl* 5: 43-47.
- McCormick L. L., Zhang Y., Tootell E., & Gilliam A. C. (1999) Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J.Immunol.* 163: 5693-5699.
- McInnes I. B. & Schett G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat.Rev.Immunol.* 7: 429-442.
- Meyer-Hoffert U., Lezcano-Meza D., Bartels J., Montes-Vizuet A. R., Schroder J. M., & Teran L. M. (2003) Th2- and to a lesser extent Th1-type cytokines upregulate the production of both CXC (IL-8 and gro-alpha) and CC (RANTES, eotaxin, eotaxin-2, MCP-3 and MCP-4) chemokines in human airway epithelial cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 131: 264-271.
- Meyer-Ter-Vehn T., Grehn F., & Schlunck G. (2008) Localization of TGF-beta type II receptor and ED-A fibronectin in normal conjunctiva and failed filtering blebs. *Mol.Vis.* 14: 136-141.
- Miettinen P. J., Ebner R., Lopez A. R., & Derynck R. (1994) TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J.Cell Biol.* 127: 2021-2036.
- Miljanovic B., Dana R., Sullivan D. A., & Schaumberg D. A. (2007) Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. *Am.J.Ophthalmol.* 143: 409-415.
- Min B., Prout M., Hu-Li J., Zhu J., Jankovic D., Morgan E. S., Urban J. F., Jr., Dvorak A. M., Finkelman F. D., LeGros G., & Paul W. E. (2004) Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J.Exp.Med.* 200: 507-517.
- Min S. H., Lee T. I., Chung Y. S., & Kim H. K. (2006) Transforming growth factor-beta levels in human aqueous humor of glaucomatous, diabetic and uveitic eyes. *Korean J.Ophthalmol.* 20: 162-165.
- Mitsias D. I., Kapsogeorgou E. K., & Moutsopoulos H. M. (2006) The role of epithelial cells in the initiation and perpetuation of autoimmune lesions: lessons from Sjogren's syndrome (autoimmune epithelitis). *Lupus* 15: 255-261.

- Molesworth-Kenyon S. J., Yin R., Oakes J. E., & Lausch R. N. (2008) IL-17 receptor signaling influences virus-induced corneal inflammation. *J.Leukoc.Biol.* 83: 401-408.
- Moseley T. A., Haudenschild D. R., Rose L., & Reddi A. H. (2003) Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 155-174.
- Mosmann T. R. & Coffman R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* 7: 145-173.
- Mou H. B., Lin M. F., Cen H., Yu J., & Meng X. J. (2004) TGF-beta1 treated murine dendritic cells are maturation resistant and down-regulate Toll-like receptor 4 expression. *J.Zhejiang.Univ.Sci.* 5: 1239-1244.
- Moustakas A. & Heldin C. H. (2005) Non-Smad TGF-beta signals. *J.Cell.Sci.* 118: 3573-3584.
- Nakao A., Afrakhte M., Moren A., Nakayama T., Christian J. L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N. E., Heldin C. H., & ten D. P. (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389: 631-635.
- Nakashima K., Yanagisawa M., Arakawa H., Kimura N., Hisatsune T., Kawabata M., Miyazono K., & Taga T. (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284: 479-482.
- Nickel R., Beck L. A., Stellato C., & Schleimer R. P. (1999) Chemokines and allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104: 723-742.
- Nishida K., Kinoshita S., Yokoi N., Kaneda M., Hashimoto K., & Yamamoto S. (1994) Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 latency-associated peptide in human cornea. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 35: 3289-3294.
- Nishida K., Sotozono C., Adachi W., Yamamoto S., Yokoi N., & Kinoshita S. (1995) Transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 mRNA expression in human cornea. *Curr.Eye Res.* 14: 235-241.
- Nowak E. C., Weaver C. T., Turner H., Begum-Haque S., Becher B., Schreiner B., Coyle A. J., Kasper L. H., & Noelle R. J. (2009) IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J.Exp.Med.* 206: 1653-1660.
- Nukiwa T., Suzuki T., Fukuhara T., & Kikuchi T. (2008) Secretory leukocyte peptidase inhibitor and lung cancer. *Cancer Sci.* 99: 849-855.
- Numasaki M., Tomioka Y., Takahashi H., & Sasaki H. (2004) IL-17 and IL-17F modulate GM-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha. *Immunol.Lett.* 95: 175-184.
- Obata H., Kaburaki T., Kato M., & Yamashita H. (1996) Expression of TGF-beta type I and type II receptors in rat eyes. *Curr.Eye Res.* 15: 335-340.
- Ogawa Y., Dogru M., Uchino M., Tatematsu Y., Kamoi M., Yamamoto Y., Ogawa J., Ishida R., Kaido M., Hara S., Matsumoto Y., Kawakita T., Okamoto S., & Tsubota K. (2010) Topical tranilast for treatment of the early stage of mild dry eye associated with chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 45: 565-569.

Ogawa Y., Yamazaki K., Kuwana M., Mashima Y., Nakamura Y., Ishida S., Toda I., Oguchi Y., Tsubota K., Okamoto S., & Kawakami Y. (2001) A significant role of stromal fibroblasts in rapidly progressive dry eye in patients with chronic GVHD. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 42: 111-119.

Ohtomo K., Ebihara N., Matsuda A., Tokura T., Funaki T., & Murakami A. (2010) Role of TGF-beta in tissue eosinophilia associated with vernal keratoconjunctivitis. *Experimental Eye Research* 91: 748-754.

Ollivier F. J., Gilger B. C., Barrie K. P., Kallberg M. E., Plummer C. E., O'Reilly S., Gelatt K. N., & Brooks D. E. (2007) Proteinases of the cornea and precorneal tear film. *Vet.Ophthalmol.* 10: 199-206.

Ouyang W., Kolls J. K., & Zheng Y. (2008) The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 28: 454-467.

Pease J. E. & Williams T. J. (2006) Chemokines and their receptors in allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118: 305-318.

Pellinen P., Huhtala A., Tolonen A., Lökkilä J., Maenpää J., & Uusitalo H. (2012) The cytotoxic effects of preserved and preservative-free prostaglandin analogs on human corneal and conjunctival epithelium in vitro and the distribution of benzalkonium chloride homologs in ocular surface tissues in vivo. *Curr.Eye Res.* 37: 145-154.

Peralta-Zaragoza O., Lagunas-Martinez A., & Madrid-Marina V. (2001) [Transforming growth factor beta-1: structure, function, and regulation mechanisms in cancer]. *Salud Publica Mex.* 43: 340-351.

Pessah M., Marais J., Prunier C., Ferrand N., Lallemand F., Mauviel A., & Atfi A. (2002) c-Jun associates with the oncoprotein Ski and suppresses Smad2 transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry* 277: 29094-29100.

Pflugfelder S. C. (2003) Anti-inflammatory therapy of dry eye. *Ocul.Surf.* 1: 31-36.

Pflugfelder S. C., Farley W., Luo L., Chen L. Z., de Paiva C. S., Olmos L. C., Li D. Q., & Fini M. E. (2005) Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye. *Am.J.Pathol.* 166: 61-71.

Pflugfelder S. C., Jones D., Ji Z., Afonso A., & Monroy D. (1999) Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr.Eye Res.* 19: 201-211.

Philipp K., Riedel F., Germann G., Hormann K., & Sauerbier M. (2005) TGF-beta antisense oligonucleotides reduce mRNA expression of matrix metalloproteinases in cultured wound-healing-related cells. *Int.J.Mol.Med.* 15: 299-303.

Piek E., Moustakas A., Kurisaki A., Heldin C. H., & ten D. P. (1999) TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J.Cell Sci.* 112 ( Pt 24): 4557-4568.



- Pierucci-Alves F., Yi S., & Schultz B. D. (2012) Transforming Growth Factor Beta 1 Induces Tight Junction Disruptions and Loss of Transepithelial Resistance Across Porcine Vas Deferens Epithelial Cells. *Biol.Reprod.* 86(2): 36.
- Pohlers D., Brenmoehl J., Loffler I., Muller C. K., Leipner C., Schultze-Mosgau S., Stallmach A., Kinne R. W., & Wolf G. (2009) TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim.Biophys.Acta* 1792: 746-756.
- Prasad S., Mingrino R., Kaukinen K., Hayes K. L., Powell R. M., MacDonald T. T., & Collins J. E. (2005) Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest* 85: 1139-1162.
- Randolph D. A., Stephens R., Carruthers C. J., & Chaplin D. D. (1999) Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J.Clin.Invest* 104: 1021-1029.
- Razzaque M. S., Foster C. S., & Ahmed A. R. (2003) Role of collagen-binding heat shock protein 47 and transforming growth factor-beta1 in conjunctival scarring in ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44: 1616-1621.
- Recalde S., Zarranz-Ventura J., Fernandez-Robredo P., Garcia-Gomez P. J., Salinas-Alaman A., Borrás-Cuesta F., Dotor J., & Garcia-Layana A. (2011) Transforming growth factor-beta inhibition decreases diode laser-induced choroidal neovascularization development in rats: P17 & P144 peptides. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 52(10):7090-7097.
- Reneker L. W., Bloch A., Xie L., Overbeek P. A., & Ash J. D. (2010) Induction of corneal myofibroblasts by lens-derived transforming growth factor beta1 (TGFbeta1): a transgenic mouse model. *Brain Res.Bull.* 81: 287-296.
- Richter A., Puddicombe S. M., Lordan J. L., Bucchieri F., Wilson S. J., Djukanovic R., Dent G., Holgate S. T., & Davies D. E. (2001) The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 25: 385-391.
- Rimoldi M., Chieppa M., Salucci V., Avogadri F., Sonzogni A., Sampietro G. M., Nespoli A., Viale G., Allavena P., & Rescigno M. (2005) Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat.Immunol.* 6: 507-514.
- Roberts A. B. (1999) TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes.Infect.* 1: 1265-1273.
- Ruiz-de-Erenchun R., Dotor de las H. J., & Hontanilla B. (2005) Use of the transforming growth factor-beta1 inhibitor peptide in periprosthetic capsular fibrosis: experimental model with tetraglycerol dipalmitate. *Plast.Reconstr.Surg.* 116: 1370-1378.
- Sack R., Conradi L., Beaton A., Sathe S., McNamara N., & Leonardi A. (2007) Antibody array characterization of inflammatory mediators in allergic and normal tears in the open and closed eye environments. *Experimental Eye Research* 85: 528-538.
- Saika S. (2006) TGFbeta pathobiology in the eye. *Lab Invest* 86: 106-115.

- Saika S., Yamanaka O., Okada Y., Tanaka S., Miyamoto T., Sumioka T., Kitano A., Shirai K., & Ikeda K. (2009) TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye. *Front Biosci.(Schol.Ed)* 1: 376-390.
- Saika S., Yamanaka O., Sumioka T., Miyamoto T., Miyazaki K., Okada Y., Kitano A., Shirai K., Tanaka S., & Ikeda K. (2008) Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. *Prog.Retin.Eye Res.* 27: 177-196.
- Sakaguchi S. (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101: 455-458.
- Sakata M., Houjyo M., Higa K., & Tsubota K. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (Slpi) in Conjunctiva of Human. *Cornea* 16[6], S119. 2000.
- sano-Kato N., Fukagawa K., Okada N., Kawakita T., Takano Y., Dogru M., Tsubota K., & Fujishima H. (2005) TGF-beta1, IL-1beta, and Th2 cytokines stimulate vascular endothelial growth factor production from conjunctival fibroblasts. *Experimental Eye Research* 80: 555-560.
- Santiago B., Gutierrez-Canas I., Dotor J., Palao G., Lasarte J. J., Ruiz J., Prieto J., Borrás-Cuesta F., & Pablos J. L. (2005) Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis. *J.Invest Dermatol.* 125: 450-455.
- Santibanez J. F., Guerrero J., Quintanilla M., Fabra A., & Martinez J. (2002) Transforming growth factor-beta1 modulates matrix metalloproteinase-9 production through the Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 296: 267-273.
- Sathe S., Sakata M., Beaton A. R., & Sack R. A. (1998) Identification, origins and the diurnal role of the principal serine protease inhibitors in human tear fluid. *Curr.Eye Res.* 17: 348-362.
- Satici A., Guzey M., Dogan Z., & Kilic A. (2003) Relationship between Tear TNF-alpha, TGF-beta1, and EGF levels and severity of conjunctival cicatrization in patients with inactive trachoma. *Ophthalmic Res.* 35: 301-305.
- Saxena V., Lienesch D. W., Zhou M., Bommireddy R., Azhar M., Doetschman T., & Singh R. R. (2008) Dual roles of immunoregulatory cytokine TGF-beta in the pathogenesis of autoimmunity-mediated organ damage. *J.Immunol.* 180: 1903-1912.
- Scharton T. M. & Scott P. (1993) Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice. *J.Exp.Med.* 178: 567-577.
- Schaumberg D. A., Sullivan D. A., Buring J. E., & Dana M. R. (2003) Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am.J.Ophthalmol.* 136: 318-326.
- Schein O. D., Munoz B., Tielsch J. M., Bandeen-Roche K., & West S. (1997) Prevalence of dry eye among the elderly. *Am.J.Ophthalmol.* 124: 723-728.
- Schleimer R. P., Kato A., Kern R., Kuperman D., & Avila P. C. (2007) Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120: 1279-1284.

- Seet L. F., Tong L., Su R., & Wong T. T. (2012) Involvement of SPARC and MMP-3 in the pathogenesis of human pterygium. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 53: 587-595.
- Serrati S., Margheri F., Pucci M., Cantelmo A. R., Cammarota R., Dotor J., Borrás-Cuesta F., Fibbi G., Albinì A., & Del R. M. (2009) TGFbeta1 antagonistic peptides inhibit TGFbeta1-dependent angiogenesis. *Biochem.Pharmacol.* 77: 813-825.
- Shinkai K., Mohrs M., & Locksley R. M. (2002) Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature* 420: 825-829.
- Siemasko K. F., Gao J., Enriquez-de-Salamanca A., Diebold Y., Calder V. L., Calonge M., & Stern M. E. Inflammatory cytokine effects on co-stimulatory molecule and chemokine expression in the human conjunctival epithelial cell line IOBA-NHC. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 46 : E-Abstract 2687. 2005.
- Smit E. E., Sra S. K., Grabowski L. R., Ward S. L., & Trocme S. D. (2003) Modulation of IL-8 and RANTES release in human conjunctival epithelial cells: primary cells and cell line compared and contrasted. *Cornea* 22: 332-337.
- Song P. I., Abraham T. A., Park Y., Zivony A. S., Harten B., Edelhauser H. F., Ward S. L., Armstrong C. A., & Ansel J. C. (2001) The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and toll-like receptor 4 in human corneal cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 42: 2867-2877.
- Soumelis V., Reche P. A., Kanzler H., Yuan W., Edward G., Homey B., Gilliet M., Ho S., Antonenko S., Lauerma A., Smith K., Gorman D., Zurawski S., Abrams J., Menon S., McClanahan T., de Waal-Malefyt R. R., Bazan F., Kastelein R. A., & Liu Y. J. (2002) Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat.Immunol.* 3: 673-680.
- Soussi-Gounni A., Kontolemos M., & Hamid Q. (2001) Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107: 575-582.
- Sporn M. B. (2006) The early history of TGF-beta, and a brief glimpse of its future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17: 3-7.
- Sporn M. B. & Roberts A. B. (1992) Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J.Cell Biol.* 119: 1017-1021.
- Stahl J. L., Cook E. B., Graziano F. M., & Barney N. P. (2003) Differential and cooperative effects of TNFalpha, IL-1beta, and IFNgamma on human conjunctival epithelial cell receptor expression and chemokine release. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44: 2010-2015.
- Stern M. E., Beuerman R. W., Fox R. I., Gao J., Mircheff A. K., & Pflugfelder S. C. (1998) The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 17: 584-589.
- Stern M. E., Gao J., Siemasko K. F., Beuerman R. W., & Pflugfelder S. C. (2004) The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Experimental Eye Research* 78: 409-416.

- Stern M. E., Siemasko K., Gao J., Duong A., Beaugard C., Calder V., & Niederkorn J. Y. (2005a) Role of interferon-gamma in a mouse model of allergic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 3239-3246.
- Stern M. E., Siemasko K. F., & Niederkorn J. Y. (2005b) The Th1/Th2 paradigm in ocular allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5: 446-450.
- Takeda K., Tanaka T., Shi W., Matsumoto M., Minami M., Kashiwamura S., Nakanishi K., Yoshida N., Kishimoto T., & Akira S. (1996) Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380: 627-630.
- Taylor A., Akdis M., Joss A., Akkoc T., Wenig R., Colonna M., Daigle I., Flory E., Blaser K., & Akdis C. A. (2007) IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120: 76-83.
- Thiery J. P. & Sleeman J. P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 131-142.
- Tong L., Diebold Y., Calonge M., Gao J., Stern M. E., & Beuerman R. W. (2009) Comparison of gene expression profiles of conjunctival cell lines with primary cultured conjunctival epithelial cells and human conjunctival tissue. *Gene Expr.* 14: 265-278.
- Tsai Y. Y., Chiang C. C., Yeh K. T., Lee H., & Cheng Y. W. (2010) Effect of TIMP-1 and MMP in pterygium invasion. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 3462-3467.
- Tuft S. J., Kemeny D. M., Dart J. K., & Buckley R. J. (1991) Clinical features of atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 98: 150-158.
- Uchio E., Ono S. Y., Ikezawa Z., & Ohno S. (2000) Tear levels of interferon-gamma, interleukin (IL) -2, IL-4 and IL-5 in patients with vernal keratoconjunctivitis, atopic keratoconjunctivitis and allergic conjunctivitis. *Clin. Exp. Allergy* 30: 103-109.
- Ueta M., Nochi T., Jang M. H., Park E. J., Igarashi O., Hino A., Kawasaki S., Shikina T., Hiroi T., Kinoshita S., & Kiyono H. (2004) Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J. Immunol.* 173: 3337-3347.
- Ulloa L., Doody J., & Massague J. (1999) Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397: 710-713.
- van den B. A., Kuiper M., Snoek M., Timens W., Postma D. S., Jansen H. M., & Lutter R. (2005) Interleukin-17 induces hyperresponsive interleukin-8 and interleukin-6 production to tumor necrosis factor-alpha in structural lung cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33: 97-104.
- Veldhoen M., Hocking R. J., Atkins C. J., Locksley R. M., & Stockinger B. (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24: 179-189.
- Vignola A. M., Chanez P., Chiappara G., Merendino A., Pace E., Rizzo A., la Rocca A. M., Bellia V., Bonsignore G., & Bousquet J. (1997) Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 156: 591-599.

- Viso E., Rodriguez-Ares M. T., & Gude F. (2009) Prevalence of and associated factors for dry eye in a Spanish adult population (the Salnes Eye Study). *Ophthalmic Epidemiol.* 16: 15-21.
- Volpe E., Servant N., Zollinger R., Bogiatzi S. I., Hupe P., Barillot E., & Soumelis V. (2008) A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat.Immunol.* 9: 650-657.
- Wahl S. M. (2007) Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr.Opin.Immunol.* 19: 55-62.
- Wakefield D., Gray P., Chang J., Di G. N., & McCluskey P. (2010) The role of PAMP's and DAMP's in the pathogenesis of acute and recurrent anterior uveitis. *Br.J.Ophthalmol.* 94 (3):271-274.
- Ward P. A. & Lentsch A. B. (2002) Endogenous regulation of the acute inflammatory response. *Mol.Cell Biochem.* 234-235: 225-228.
- Wharton K. & Derynck R. (2009) TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development* 136: 3691-3697.
- Whitman M. (1997) Signal transduction. Feedback from inhibitory SMADs. *Nature* 389: 549-551.
- Woo P. L., Cha H. H., Singer K. L., & Firestone G. L. (1996) Antagonistic regulation of tight junction dynamics by glucocorticoids and transforming growth factor-beta in mouse mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 271: 404-412.
- Wozney J. M., Rosen V., Celeste A. J., Mitscock L. M., Whitters M. J., Kriz R. W., Hewick R. M., & Wang E. A. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534.
- Wrana J. L., Attisano L., Carcamo J., Zentella A., Doody J., Laiho M., Wang X. F., & Massague J. (1992) TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71: 1003-1014.
- Wright J. F., Guo Y., Quazi A., Luxenberg D. P., Bennett F., Ross J. F., Qiu Y., Whitters M. J., Tomkinson K. N., Dunussi-Joannopoulos K., Carreno B. M., Collins M., & Wolfman N. M. (2007) Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *Journal of Biological Chemistry* 282: 13447-13455.
- Yagi Y., Andoh A., Inatomi O., Tsujikawa T., & Fujiyama Y. (2007) Inflammatory responses induced by interleukin-17 family members in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J.Gastroenterol.* 42: 746-753.
- Yang A. H., Chen J. Y., & Lin J. K. (2003) Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int.* 63: 1530-1539.
- Yao Z., Spriggs M. K., Derry J. M., Strockbine L., Park L. S., Vandenbos T., Zappone J. D., Painter S. L., & Armitage R. J. (1997) Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine* 9: 794-800.
- Yoon K. C., Jeong I. Y., Park Y. G., & Yang S. Y. (2007) Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea* 26: 431-437.

- Yoshimura T., Sonoda K. H., Ohguro N., Ohsugi Y., Ishibashi T., Cua D. J., Kobayashi T., Yoshida H., & Yoshimura A. (2009) Involvement of Th17 cells and the effect of anti-IL-6 therapy in autoimmune uveitis. *Rheumatology.(Oxford)* 48: 347-354.
- Yu J. J. & Gaffen S. L. (2008) Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci.* 13: 170-177.
- Yue J. & Mulder K. M. (2000) Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol.Biol.* 142: 125-131.
- Zavadil J., Haley J., Kalluri R., Muthuswamy S. K., & Thompson E. (2008) Epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 68: 9574-9577.
- Zhan H., Towler H. M., & Calder V. L. (2003) The immunomodulatory role of human conjunctival epithelial cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44: 3906-3910.
- Zhang Y. E. (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19: 128-139.
- Zheng X., de Paiva C. S., Li D. Q., Farley W. J., & Pflugfelder S. C. (2010a) Desiccating stress promotion of Th17 differentiation by ocular surface tissues through a dendritic cell-mediated pathway. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 51: 3083-3091.
- Zheng X., de Paiva C. S., Rao K., Li D. Q., Farley W. J., Stern M., & Pflugfelder S. C. (2010b) Evaluation of the transforming growth factor-beta activity in normal and dry eye human tears by CCL-185 cell bioassay. *Cornea* 29: 1048-1054.
- Zheng X., Ma P., de Paiva C. S., Cunningham M. A., Hwang C. S., Pflugfelder S. C., & Li D. Q. (2010c) TSLP and downstream molecules in experimental mouse allergic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 51: 3076-3082.
- Zhou L., Beuerman R. W., Ang L. P., Chan C. M., Li S. F., Chew F. T., & Tan D. T. (2009a) Elevation of human alpha-defensins and S100 calcium-binding proteins A8 and A9 in tear fluid of patients with pterygium. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 50: 2077-2086.
- Zhou L., Beuerman R. W., Chan C. M., Zhao S. Z., Li X. R., Yang H., Tong L., Liu S., Stern M. E., & Tan D. (2009b) Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *J.Proteome.Res.* 8: 4889-4905.
- Zieske J. D., Hutcheon A. E., Guo X., Chung E. H., & Joyce N. C. (2001) TGF-beta receptor types I and II are differentially expressed during corneal epithelial wound repair. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 42: 1465-1471.
- Zwaagstra J. C., Guimond A., & O'Connor-McCourt M. D. (2000) Predominant intracellular localization of the type I transforming growth factor-beta receptor and increased nuclear accumulation after growth arrest. *Exp.Cell Res.* 258: 121-134.
- Zwaagstra J. C., Kassam Z., & O'Connor-McCourt M. D. (1999) Down-regulation of transforming growth factor-beta receptors: cooperativity between the types I, II, and III receptors and modulation at the cell surface. *Exp.Cell Res.* 252: 352-362.