

OBJETIVO GENERAL

Investigar alteraciones corneales inducidas por diversos factores ambientales desfavorables en seres humanos y en animales de experimentación.

Objetivos específicos

- 1. a) Profundizar estudios sobre la etiología de Queratopatía climática esferoidea (QCE),**
 - b) Realizar estudios epidemiológicos de prevalencia y asociación entre QCE, pterigion y pingüecula en individuos expuestos a condiciones ambientales desfavorables.**
- 2. a) Realizar estudios complementarios de la superficie ocular del cobayo.**
 - b) Desarrollar nuevos modelos de erosiones corneales en cobayos y estudiar el proceso de recuperación, con el objetivo de utilizarlos como uno de los factores ambientales desfavorables en un modelo crónico.**
- 3. Estudiar los efectos de condiciones ambientales desfavorables (erosiones corneales, exposición a RUV-B y dieta deficiente en ácido ascórbico (AA)), durante un período prolongado de tiempo (30 meses) en córneas de cobayos.**

Objetivo específico I

- I) a. Profundizar estudios sobre la etiología de QCE y**
- b. Realizar estudios epidemiológicos de prevalencias y asociaciones entre QCE, pterigion y pingüecula en individuos expuestos a condiciones ambientales desfavorables.**

INTRODUCCIÓN

Queratopatía climática esferoidea fue descrita desde hace mucho tiempo en distintas partes del mundo (41-54, 56- 57, 70-82) y más recientemente en Argentina (55). La severidad de esta enfermedad puede clasificarse en tres estados, de acuerdo a la porción de la córnea involucrada y los aspectos clínicos (**figura 1**):

Grado 1: está caracterizado por múltiples y pequeños depósitos traslúcidos subepiteliales, localizados cerca del limbo temporal y/o nasal, que se pueden apreciar mejor con retroiluminación con lámpara de hendidura y alta magnificación. También es frecuente observar una franja de córnea clara. En esta etapa, la agudeza visual no está comprometida.

Grado 2: la opacidad se extiende sobre los dos tercios medios inferiores de la córnea, dando una apariencia de “empañado”. La indemnidad de la córnea superior, protegida por el párpado, sugiere como factor etiológico contribuyente, a la exposición crónica de la córnea a la RUV y otros tipos de estrés. En este estadio de la enfermedad la visión puede estar moderada o severamente comprometida.

Grado 3: está caracterizado por la presencia de agrupamientos de gotitas de distinto tamaño (hasta de 1 mm de diámetro) y de color ambarino, a nivel sub-epitelial, que van cubriendo la córnea a medida que la enfermedad progresa. En casos avanzados se pueden ver áreas del estroma anterior con vascularización, opacificación o fibrosis. En general, la agudeza visual está severamente afectada en esta etapa.



Figura 1: Imágenes de biomicroscopía de los distintos grados de queratopatía climática esferoidea (QCE).

Además de los hallazgos relacionados a la córnea, la radiación solar que crónicamente alcanza las partes más expuestas y también las más profundas del iris podrían jugar un rol importante en la inducción de depigmentación y atrofia de las capas superficiales, como se observó previamente hasta en un 30% de pacientes con QCE (83).

Aunque los depósitos globulares en las capas anteriores de las córneas con QCE fueron descritas hace muchos años usando microscopía óptica y electrónica (84-85), más recientemente, estas anomalías han sido caracterizadas por microscopía confocal *in vivo* (MCIV) (86).

A pesar de que algunos componentes en los depósitos corneales han sido identificados (55-56), la composición exacta todavía permanece desconocida. Hace algunos años Fujii y col. prepararon y caracterizaron un anticuerpo policlonal contra péptidos conteniendo D-b-Asp (87-88) y los mismos autores luego mostraron que muestras de QCE y pinguécula fueron inmunorreactivas para péptidos conteniendo D-b-Asp y productos de glicosilación avanzada (89-90).

Las lágrimas contienen muchas proteínas identificables (91), con la variación en su composición definiendo posibles biomarcadores que podrían llevar a un mejor entendimiento de la patología (92). Como QCE es una patología de la superficie ocular y el análisis de proteínas de lágrimas podría resultar en un mejor entendimiento de esta enfermedad, nuestro grupo estudió glicoproteínas en lágrimas de pacientes con QCE usando técnicas de captura de glicopéptidos y proteómica. Los resultados sugieren que la glicosilación enzimática podría estar involucrada en la formación de depósitos en QCE, dado que alterados niveles de N-glicosilación de ciertas proteínas fue observado en lágrimas de estos pacientes (93).

También investigamos metaloproteinasas de matriz (MMP) y sus inhibidores (TIMP), en pacientes con QCE, debido a que estas moléculas controlan la degradación del epitelio corneal y el estroma. Demostramos que hay niveles aumentados de gelatinasas y citoquinas proinflamatorias, así como disminución de la expresión de TIMP-1 en lágrimas y biopsias de pacientes con QCE. Similares resultados se obtuvieron cuando células epiteliales corneales fueron expuestas a RUV *in vitro* (94-95). Esto sugiere que la patogénesis de esta enfermedad está parcialmente conducida por una significativa respuesta inflamatoria con un pobre

“escudo” antiproteólisis haciendo a la córnea más vulnerable a los aumentados niveles de MMP.

En esta primera parte de mi trabajo de tesis investigamos la existencia o ausencia de QCE en diferentes regiones de nuestro país. Además de estudiar una cohorte nueva de individuos en una región patagónica en donde ya habíamos descripto esta enfermedad, investigamos en individuos de otras 4 regiones de Argentina en búsqueda de la existencia de oftalmoheliosis de la superficie ocular (QCE, pterigion y pinguécula). También estudiamos: la importancia de la nutrición, la actividad laboral, y la protección ocular a la radiación solar en la génesis de QCE; la composición y concentración de lípidos en distintas zonas del epitelio corneal de pacientes con QCE; y realizamos diferentes estudios de la superficie ocular (funcionales y estructurales) en animales ovinos e individuos que viven en la misma región donde hallamos QCE, y en una región donde no encontramos casos de esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y participantes

El tipo de muestreo seleccionado para el estudio en individuos de las 5 regiones de Argentina fue no probabilístico consecutivo. Pacientes mayores de 20 años, que vivieron toda su vida en el departamento Santa Catalina (Jujuy , n= 89, **Región 1**), departamento Quebrachos (Santiago del Estero, n= 134, **Región 2**), departamento El Cuy (Río Negro, n= 125, **Región 3**), departamento General Roca (Río Negro, n= 113, **Región 4**) y departamento Capital (Córdoba, n= 102, **Región 5**) habían leído un resumen del estudio, estuvieron de acuerdo en formar parte de esta investigación y firmaron el consentimiento informado.

Por otra parte, ovejas hembra de la raza merino argentino de entre 5 y 7 años de edad, de las regiones 3 y 5 (descriptas más adelante), también fueron incluidas en este estudio. Noventa animales que pastan en la región 3 y 80 animales en la región 5. En cada región, estudiamos ovejas que pastan en dos lugares diferentes.

El protocolo de estudios realizados en pacientes fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Salud (CIEIS) de la Clínica Universitaria Reina Fabiola (Universidad Católica de Córdoba) y el Consejo de Evaluación Ética de la Investigación en Salud (CoEIS) del gobierno de la provincia de Córdoba, y registrado en RePIS (Registro

Provincial de Investigaciones en Salud, provincia de Córdoba). Todos los estudios fueron realizados de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki.

Por otro lado, todos los procedimientos realizados en ovejas merino argentino incluidas en esta parte del estudio, estuvieron de acuerdo con la declaración para el uso de animales en investigación en visión y oftalmología de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO), EE.UU.

Características geográficas y climáticas de las regiones estudiadas

La figura 2 muestra las diferentes regiones estudiadas.

Región 1: departamento de Santa Catalina, en la provincia de Jujuy, está localizada en la región del Altiplano en la Puna, a una altura promedio de 3700 metros sobre el nivel del mar, entre 65° longitud oeste y 21°47'–22°15' latitud sur. Está localizada a aproximadamente 2250 km del océano Atlántico siendo su límite norte Bolivia. Esta región tiene un clima árido-frío (Bwk; clasificación climática de Köppen, ver World Map of Köppen-Geiger climate classification direction insert: <http://koeppeengeiger.vu-wien.ac.at/shifts.htm> (acceso 9 de enero de 2015). El suelo es arcilloso-arenoso cubierto de arbustos o vegetación de estepa. Presenta un alto rango de temperatura diurna, con una temperatura promedio de 18°C, con bajos niveles de precipitaciones anuales (100-200 mm) y escasas nubes. Esta región sufre de la acción de constantes y fuertes vientos al igual que en la Patagonia.

Región 2: departamento Quebrachos, en el sur de la provincia de Santiago del Estero, está localizada entre 200 y 500 metros sobre el nivel del mar, entre 63°13'–63°28' longitud oeste y 28° 59'–29°45' latitud sur. La región tiene un clima subtropical (Csa/Csb; clasificación climática de Köppen) con una temperatura promedio anual de 21.5 °C y variaciones extremas de hasta un máximo de 45 °. Las precipitaciones son mayores durante los meses de verano, con un máximo de 500 mm y un mínimo de 300 mm. Los vientos más fuertes se presentan en invierno con una velocidad media de aproximadamente 75 km/h. La vegetación es típica del Chaco/Santiagueño con presencia de quebracho, algarrobo, mistol, chañar, entre otros.

Región 3: el departamento El Cuy está localizado en el centro/ oeste de la provincia de Río Negro, a 750 metros sobre el nivel del mar, entre 67° 54' -69°04' longitud oeste y 38°56' -40°25' latitud sur. Está ubicado a 280 km del límite con Chile y a 300 km del océano Atlántico.

Esta región tiene un clima semiárido frío (Bsk, clasificación climática de Köppen) con niveles de precipitaciones anuales menores a los 190 mm y una humedad relativa muy baja. La región experimenta veranos muy secos y cálidos (con frecuencia excepcionalmente cálidos) e inviernos muy fríos, con grandes variaciones diurnas de la temperatura.

Región 4: el departamento General Roca está localizado en el norte de la provincia de Río Negro. Esta región se encuentra entre 66°56' -68°00' longitud oeste y 38°56' - 39°07' latitud sur, a 370 metros sobre el nivel del mar; a 400 km del océano Atlántico y 340 km desde el límite con Chile. Tiene un clima semiárido frío (Bsk, clasificación climática de Köppen) pero debido a la intervención del hombre y la provisión de agua por canales de irrigación es un valle verde con numerosas granjas. Está protegido de los vientos por los bordes de la meseta, que actúan como muros.

Región 5: el departamento Capital de la provincia de Córdoba, a 450 metros sobre el nivel del mar, 64°11' - 64°82' longitud oeste y 31°18' - 31°34' latitud sur. Tiene un clima semi húmedo (Cwa, clasificación climática de Köppen); con un promedio anual de lluvias de 500 mm. Los veranos tienen días cálidos y noches frescas; los inviernos son generalmente secos, no demasiado fríos. La temperatura promedio está entre 16 y 17 °C, y la amplitud anual es de 14 a 15°C. Los vientos con sentido este u oeste son raros; en primavera soplan fuertes vientos desde el norte. En verano son muy frecuentes las tormentas.

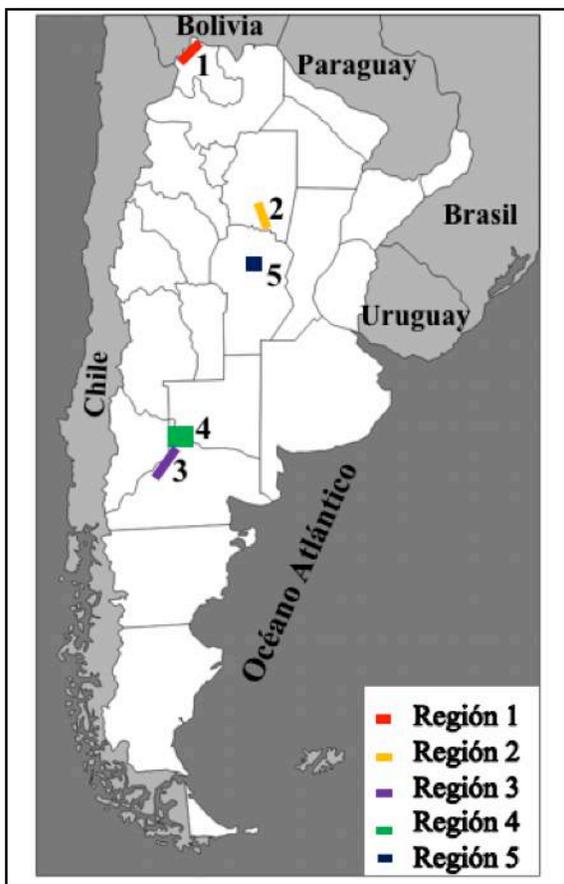


Figura 2: Las cinco regiones incluidas en este estudio. **Región 1:** Departamento Santa Catalina, Jujuy. **Región 2:** Departamento Quebrachos, Santiago del Estero. **Región 3:** Departamento El Cuy, Río Negro, **Región 4:** Departamento General Roca, Río Negro y **Región 5:** Departamento Capital, Córdoba.

Determinación de la densidad de la capa de ozono:

La concentración media total de la columna de O_3 se obtuvo usando valores de ozono desde el sitio web de la Agencia Aeroespacial Nacional de Estados Unidos (NASA, USA: Total Ozone Mapping Spectrometer (TOMS-NASA, <http://ozoneaq.gsfc.nasa.gov/tools/ozonemap/>); para cada región en un período de diez años. Para cada año, se obtuvieron cuatro mediciones en las siguientes fechas: 21 de marzo, 21 de junio, 21 de septiembre y 21 de diciembre, para determinar el promedio anual. La densidad de la capa de ozono se mide en unidades Dobson (uD) y los valores varían dependiendo de la altitud y la latitud, considerándose valores normales el rango entre 230-300 uD. Se habla de agujero de la capa de ozono cuando la densidad de la capa en una determinada región, se halla por debajo de 200 uD.

Estudios realizados y muestras biológicas obtenidas en humanos

Estilo de vida:

Todos los pacientes completaron un cuestionario relacionado a la dieta, actividad laboral, y el uso de protección ocular (lentes de sol, sombreros) durante toda su vida.

Examen oftalmológico:

Todos los pacientes recibieron un examen oftalmológico completo que incluyó examen de la agudeza visual con tabla de optotipos de Snellen, y anillos de Landolt o la E para individuos iletrados; refracción objetiva mediante autorrefractómetro (RK1, Canon Inc., Tokyo, Japan); biomicroscopía detallada del segmento anterior con lámpara de hendidura (Slit-Lamp 100/16, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany; AO Slit Lamp 11665, American Optical Co., Buffalo, USA; Led Slit Lamp XL-1, Shin-nippon, Ohira Co., Niigata, Japan).

A un subgrupo de 20 pacientes de la Región 3 que presentaban QCE, y 20 individuos de la Región 5 seleccionados aleatoriamente; se les realizaron estudios complementarios de la superficie ocular: en primer lugar se determinó la **frecuencia de parpadeo** (FP) durante un minuto.

El segundo test complementario fue el de **tinción con fluoresceína** para evaluar la integridad del epitelio. La tinción obtenida se calificó en una escala de 0 a 3, donde 0 equivale a no tinción; 1 tinción leve; 2 tinción moderada; 3 tinción severa. Se considera normal una tinción de 0-1 unidades arbitrarias (UA). La observación se realizó con lámpara de hendidura.

Luego se determinó el **tiempo de ruptura de la película lagrimal** (TRP). Para su evaluación, se instiló en el fondo de saco conjuntival inferior una gota de fluoresceína al 0,5% en cada ojo del paciente a examinar. Luego de indicarle al paciente la realización de un parpadeo, con el fin de lograr la adecuada dispersión sobre la superficie corneal de la película lagrimal teñida con fluoresceína, se le indicó no parpadear. Desde ese momento se midió el tiempo (en segundos) que demoró en comenzar a fragmentarse dicha película. La observación fue realizada mediante lámpara de hendidura, e iluminación con luz de cobalto. El TRP se consideró fuera del rango normal cuando fue igual o inferior a 10 segundos.

Finalmente se evaluó la secreción lagrimal mediante el **test de Schirmer II** (TS-II). Previa anestesia tópica con clorhidrato de proparacaína al 0,5% (Anestalcón®, Alcon Laboratories, Fortworth, USA) instilada en el fondo de saco conjuntival inferior (1 gota en cada ojo del paciente cada 10 segundos hasta completar 3 gotas), se evaluó con cinta de papel de filtro

Whatman n° 2 de 5 mm de ancho por 30 mm de largo. Se introdujo en el fondo de saco conjuntival inferior un extremo doblado de 5 mm de largo de esta cinta de papel, debiendo permanecer el paciente con la mirada al frente y parpadeando normalmente. A los 5 minutos de introducida la cinta se la retiró, y con una regla graduada en mm se midió la longitud de la superficie de cinta mojada, contando desde el doblado de la cinta. Se consideró un STT normal cuando se obtuvo una medición de 10 o más mm, moderada hiposecreción lagrimal entre 5 y 9 mm, y severa hiposecreción inferior a 5 mm.

Microscopía confocal (MC):

Tres casos representativos de pacientes con diferentes grados de QCE (Región 3) también fueron estudiados mediante **MCIV**. Para la examinación de la estructura corneal, se utilizó el microscopio de barrido confocal (Tomógrafo de Retina Heidelberg II / Rostock Modulo Cornea, Heidelberg Engineering Heidelberg, Alemania). El láser utilizado fue un láser Diodo de una longitud de onda de 670 nm, el objetivo del microscopio (Olympus, Hamburgo, Alemania) con una magnificación del lente de inmersión de 63X, con una apertura numérica de 0,90, cubierto con un capuchón de polimetil metacrilato.

Las imágenes oblicuas y frontales de la córnea se tomaron usando los módulos automáticos y manuales de la cámara, las imágenes de 384 × 384 pixeles cubrían un área de 400 × 400 μm, con una resolución óptica transversal de aproximadamente 1 μm/pixel y un tiempo de adquisición de 0,024 s (Heidelberg Engineering). Previo a la examinación, se instiló una gota de un colirio lubricante en gel (0,2% ácido poliacrílico, Acrylarm, Laboratorios Poen, Buenos Aires, Argentina) en la superficie corneal, logrando el contacto por inmersión con el objetivo. El ojo del paciente fue ubicado de manera tal que el objetivo quedara perpendicular a la superficie de la córnea.

Recolección de sangre

A 20 participantes del estudio provenientes de cada una de las regiones y seleccionados aleatoriamente, se les extrajo una muestra de sangre periférica. Las muestras fueron centrifugadas para la obtención de sueros y los mismos fueron conservados a -80°C hasta el momento de su uso.

Ácido Ascórbico en suero (AAs):

Los niveles de AAs fueron estudiados en 20 individuos seleccionados aleatoriamente entre los participantes de cada región (edad y género coincidentes) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna LC-18 (25 cm de alto por 4,6 mm de diámetro con un tamaño de partícula de 5 μm) como se ha descrito previamente (96).

Microscopía óptica de alta resolución (MOAR):

Tejido corneal de un paciente con QCE y de un individuo normal de banco fueron fijadas por inmersión en el fijador de Karnovsky conteniendo glutaraldehído 1,5% v/v y paraformaldehído 4% w/v en solución cacodilato 0,1 M; luego fueron post fijadas en tetróxido de osmio 1%, deshidratadas y embebidas en Araldita. Secciones de 1 μm de espesor fueron cortadas con un ultra micrótomo con cuchillas de diamante Porter-Blu, MT2, teñidas con Alcian Blue y observadas con microscopio óptico (Nikon ACT-2U, A.G. Heinze) usando una magnificación de 40X y 100X.

Recolección de epitelio corneal

En 3 pacientes con grados avanzados de QCE que iban a ser sometidos a cirugía de catarata, se obtuvieron muestras de cornea. Previo a la cirugía de cataratas y bajo anestesia tópica local se procedió a escarificar mediante micro bisturí tipo crescent un área de 1 mm^2 en áreas afectadas por QCE (zona interparpebral de la córnea) y como control se obtuvieron muestras en áreas no afectadas por esta patología (zonas de epitelio corneal cubierto por los párpados). Se escarificó hasta la membrana basal de la cornea y las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento de su uso.

Identificación de lípidos mediante espectrometría de masa.

Las células del epitelio corneal fueron sujetos a extracción de lípidos usando el método de Bligh y Dyer ligeramente modificado. (97) La fase orgánica con los lípidos extraídos fue secada en vacío (Speed-Vac Model 7810014; Labconco, Kansas City, MO). Los tubos que contienen las muestras fueron insuflados con gas argón para prevenir la oxidación. La concentración de proteínas contenidas en la fase acuosa se determinó empleando el método de Bradford usando los reactivos comercialmente disponibles (Bio-Rad, Hercules, CA) con BSA purificado como estándar. Todas las extracciones y subsecuente manipulación de las muestras

se realizó usando viales de vidrio; recipientes de polivinilo se evitaron por completo para prevenir contaminación con impurezas. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Las muestras de lípidos fueron resuspendidas en Acetonitrilo-Isopropanol (1:1) grado LC-MS, y luego fueron inyectadas a una velocidad de flujo de $5\mu\text{l}/\text{min}$ usando Triversa Nanomate (Advion Inc., Ithaca, NY), una máquina de ionización por electrospray con chip controlada con el software Chipsoft versión 8.3.3

Para el análisis de lípidos se empleó un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (TSQ Quantum Access Max; Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), en modo infusión, empleando el software TSQ Tune que es parte del paquete de software Xcalibur 2.3. Las muestras se analizaron por 2 minutos con barridos de 0,5 segundos. Los barridos fueron desde 200 a 1000 m/z. El ancho de pico se fijó a 0,7 y la presión del gas de colisión se establece en 1 mTorr.

El flujo de gas nitrógeno se fijó a 20 unidades arbitrarias. Gas auxiliar (argón) se estableció en 5 unidades arbitrarias. Para el análisis de fosfatidilcolina la atomización se realiza en modo ion positivo; mientras que para fosfatidilserina se hizo en modo ion negativo. Los demás parámetros de análisis tales como energía de colisión, voltaje del spray y el tipo de barrido (o scan) correspondiente se fijaron basados en estudios previos (98) La adición de 0,1% de ácido fórmico es usada para el análisis de lípidos en el modo ion positivo solamente.

Lípidos clase-específicos se cuantificaron usando estándares lipídicos específicos: 1,2-ditridecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (fosfatidilcolina) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (fosfatidilserina). Los estándares fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA.

Aproximadamente 5 barridos espectrales con y sin estándar interno (usualmente en el rango de 0,1-10 pmol) se realizaron por cada muestra. La cuantificación se llevó a cabo usando el programa MZmine 2.9. La concentración de lípidos fue normalizada a la cantidad de proteína determinada en la correspondiente fase acuosa como se describió previamente.

Espectros representativos de cada muestra fueron cuidadosa y manualmente inspeccionados y seleccionados por dos observadores independientes de entre los 5 espectros que se colectaron para cada muestra con y sin el estándar interno (10 espectros en total) y usados para posterior análisis. Los espectros fueron convertidos a archivos netCDF desde archivos Thermo RAW usando el software Xcalibur 2.3 y posteriormente importados a MZmine 2.9. La identificación se llevó a cabo contra una base de datos creada a partir de la Base de Datos de LipidMaps

(<http://www.lipidmaps.org/>). Los lípidos identificados fueron sujetos a un posterior análisis para la determinación de especies únicas y comunes mediante un archivo macro de Excel diseñado para este fin. Definimos Único a una dada especie lipídica que es encontrada solamente en uno de los grupos de estudio (Control o Zona afectada). Las especies Comunes son aquellas que se encuentran en ambos grupos con una frecuencia (la frecuencia de una dada especie lipídica en la población en estudio) de 2 en cada grupo. Mientras que consideraremos especies únicas a aquellas que ocurren con una frecuencia de 1, consideraremos todas las especies comunes como aquellas que ocurren con una frecuencia de al menos 2 en cada grupo.

Estudios realizados y muestras biológicas obtenidas en ovejas

Examen oftalmológico:

A un subgrupo de animales de la región 3 (n=20) y de la región 5 (n=20), se les realizó un examen detallado del segmento anterior con lámpara de hendidura (Led Slit Lamp XL-1, Shin Nipón, Ohira Co., Niigata, Japón) que incluyó el examen del borde parpebral, la conjuntiva bulbar y tarsal, la córnea, la cámara anterior y el iris. Los estudios fueron realizados en ambos ojos en el siguiente orden:

- **FP**
- **tinción con fluoresceína**
- **TRP**

Estos estudios se llevaron a cabo utilizando el mismo procedimiento previamente descrito para humanos.

- Evaluación de la secreción lagrimal mediante **TS- I**: se realizó sin previa anestesia tópica. El resto del procedimiento es similar al realizado en humanos.

Recolección de sangre y determinación de AAs

A 20 animales de cada región, seleccionados de manera aleatoria, se les extrajo una muestra de sangre, las cuales fueron centrifugadas para la obtención de sueros que fueron conservados a -80°C hasta el momento de realizar la cuantificación de AAs como fue previamente descrito.

Microscopía óptica de alta resolución y microscopía confocal *ex vivo*

Tres ovejas de la región 3 y 3 ovejas de la región 5 fueron sacrificadas y el globo ocular y la córnea del otro ojo de cada animal fueron extraídos y conservados adecuadamente para realizar estudios de MC *ex vivo*, y MOAR como fue previamente descrito.

Análisis estadístico

Debido a que no encontramos diferencia significativa en las mediciones entre ojo izquierdo y derecho para los estudios realizados, los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Los valores de los tests de superficie ocular fueron comparados usando test *t* de Student. El nivel de significancia estadística se fijó a $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Estudio de componentes ambientales y prevalencia de oftalmoheliosis en las cinco regiones:

La **tabla 1** presenta los datos de edad promedio, distribución de géneros y prevalencia de QCE en los individuos que viven en las cinco regiones de Argentina que estudiamos. Como se puede ver, QCE sólo se observó en la Región 3, en 25 individuos (8 mujeres y 17 hombres), con una prevalencia del 20%. Grado 1 fue observado en 15 individuos (60%), grado 2 en 7 individuos (28%), y grado 3 en 3 pacientes (12%). No se encontró ningún caso en individuos menores a los 38 años de edad.

Cuando se analizó la concentración total de la columna de O₃ (unidades Dobson) medida el 21 de marzo, 21 de junio, 21 de septiembre y 21 de diciembre de cada año durante los últimos diez años para cada región, no se encontraron diferencias significativas en el promedio anual de estas medidas (datos no mostrados). Cuando agregamos todos los valores correspondientes a los últimos diez años, obtuvimos los siguientes resultados para la media \pm SEM de la concentración total de la columna de O₃ para las regiones 1, 2, 3 y 4: 252, 6 \pm 14,5 uD; 272, 4 \pm 16,7 uD; 288,3 \pm 10,2 uD y 273,7 \pm 5,8 uD; respectivamente. Estos resultados no indican adelgazamiento de la capa de ozono para ninguna región.

	Región 1 (n= 89)	Región 2 (n=134)	Región 3 (n=125)	Región 4 (n=113)	Región 5 (n=102)
Edad (Media ± SEM)	45.38± 17.24	55.88 ± 18.34	54.83 ± 13.93	65.16 ± 11.15	53 ± 11
(rango)	(20-88)	(48-86)	(20-88)	(41-87)	(31-81)
Sexo (F/M)	(39/50)	(48/86)	(52/73)	(36/76)	(41/61)
Prevalencia					
QCE	0%	0%	20 %	0%	0%
n (F/M)	0	0	25 (8/17)	0	0

Tabla1: Datos demográficos y prevalencia de queratopatía climática esferoidea (QCE) en las 5 regiones de Argentina. F=femenino. M=masculino.

La principal ocupación de los pobladores de la región 1 es la cría de ganado ovino y camélidos domésticos, mientras que para la región 2 es la cría de ganado caprino, explotación forestal, y producción de carbón. Los individuos que viven en la región 3 están dedicados principalmente a la cría y esquila de ovejas, y en algunos casos, manufactura de lana, mientras que en la región 4 las actividades están relacionadas al cultivo, cosecha y empaquetado de peras, manzanas y ciruelas. Las actividades económicas de la región 5 son más variadas, y la gran mayoría se desarrolla a puertas cerradas (fábricas, locales comerciales, instituciones, etc). La principal actividad laboral para las diferentes regiones está resumida en la **tabla 2**.

Los principales hábitos dietarios de los individuos de la región 1 incluyen el consumo de carne, quínoa, maíz y papas; en la región 3 carne ovina es ingerida dos o tres veces por día, con pequeñas cantidades de leche consumidas esporádicamente. Los vegetales y frutas son excepcionales en la dieta de los habitantes de estas dos regiones. La dieta de los individuos en la región 2 consiste en algunos vegetales (papas, zapallitos), algo de carne, y pequeñas cantidades de fruta. En contraste, individuos que habitan en la región 4, al igual que la región 5, tienen una dieta balanceada (carne, vegetales, cereales y frutas) (**tabla 2**). En todas las regiones, los individuos manifestaron que beben mate.

Deficiencia dietaria en alimentos ricos en AA se reflejó en los bajos niveles de AAs encontrados en individuos que viven en las regiones 1, 2 y 3; estos valores difieren significativamente de los valores encontrados en individuos en regiones 4 y 5 ($p < 0.0001$, **figura 3**)

Como se puede observar también en la **tabla 2**, más del 80% de los individuos en la región 1 usan sombreros alados, mientras que en la región 2 lentes de sol. En la región 3, la mayoría de los individuos no usan lentes o sombreros, mientras que en las regiones 4 y 5 la mayoría de las personas entrevistadas usan sombreros y lentes de sol.

Los 25 pacientes con QCE manifestaron que trabajaron a la intemperie en la cría de ovejas, nunca usaron protección ocular, tuvieron una dieta muy restringida durante toda su vida, y tienen las concentraciones más bajas de AAs.

	Región 1	Región 2	Región 3	Región 4	Región 5
Actividad laboral	Cría de ganado ovino y camélidos	Cría de ganado caprino, deforestación, producción de carbón	Cría de ganado ovino y esquila	Recolectores de frutas	Variadas, principalmente en el interior
	72/89 (80.9%)	104/134 (77,6%)	117/125 (93,6%)	80/113 (70,8%)	83/102 (81,4%)
Nutrición	Carne, quinoa, maíz, papas y un poco de leche	Carnes, papa, zucchini, y un poco de fruta.	Carne de oveja y un poco de leche.	Carne, vegetales, cereales y frutas.	Carne, vegetales, cereales, frutas, leche.
	100%	100%	100%	100%	100%
Protección ocular	Sombreros alados	Lentes de sol	Protección casi nula	Sombreros y lentes de sol	Sombreros, gorras, lentes de sol
	74/89 (83.1%)	110/134 (82.1%)	113/125 (90.4%)	88/113 (77.9%)	90/102 (88,2%)

Tabla 2: Principal actividad laboral, nutrición y protección ocular en las regiones estudiadas.

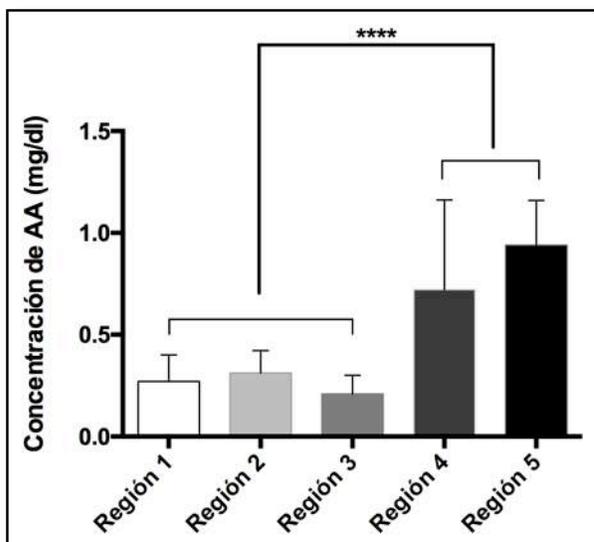


Figura 3: Concentración de ácido ascórbico (AA) sérico en individuos de las cinco regiones estudiadas. Entre las regiones 1, 2 y 3 no se observa diferencia significativa en los niveles de AAs; al igual que entre las regiones 4 y 5 entre sí. Entre las primeras tres regiones y las regiones 4 y 5 se observa una diferencia significativa en los niveles de este antioxidante ($p < 0,0001$).

El número de pacientes estudiados y el porcentaje de los mismos afectados con pterigion y pinguécula, las otras oftalmoheliosis estudiadas en estas regiones, están resumidos en la **tabla 3**. La prevalencia de pinguécula fue significativamente más alta que pterigion para las regiones 1, 2 y 3 pero no para la región 4 ($p < 0,0005$). Cuando comparamos la prevalencia de pterigion en las cuatro regiones, no hubo diferencia significativa ($p = 0,2457$), mientras que la prevalencia de pinguécula fue significativamente distinta ($p < 0,0001$). En la misma región donde encontramos QCE hubo también la más alta prevalencia de estas otras dos enfermedades. La prevalencia de pterigion y pinguécula fue significativamente más alta en la región 3 sólo cuando se compara con los valores obtenidos en la región 4 ($p = 0,0688$ y $p < 0,0001$ respectivamente).

	Region 1 (n=89)	Region 2 (n=134)	Region 3 (n=125)	Region 4 (n=113)	Region 5 ?
Pterygion					
(+/-)	(12/77) ^a	(21/113)	(21/104)^c	(10/103)	N/R
(%)	(13.48)	(15.7%)	(16.44%)	(8.8)	
Pinguécula					
(+/-)	(54/35) ^b	(47/87)	(81/44)^d	(15/98)	N/R
(%)	(60.67)	(35,1%)	(64.75%)	(13.3)	

Tabla 3: Presencia de pterigion y pinguécula. NR= no realizado

^a para las regiones 1, 2 y 3 la prevalencia de pterigion fue significativamente más baja que pinguécula ($p < 0,0005$). ^b La prevalencia de pinguécula en las cuatro regiones fue significativamente distinta ($p < 0,0001$). ^c La prevalencia de pterigion fue significativamente más alta en la región 3 vs región 4 ($p = 0,0688$). ^d la prevalencia de pinguécula fue significativamente más alta en la región 3 vs la región 4 ($p < 0,0001$).

Córneas de ovejas de la misma región donde encontramos una prevalencia de 20% para QCE (región 3) fueron transparentes y ninguna de ellas mostró opacidades subepiteliales, o signos similares a QCE. Además, ninguna anomalía se encontró en córneas de pacientes o de ovejas que habitan en la región 5 (región control).

Los estudios de superficie ocular llevados a cabo en los participantes seleccionados aleatoriamente de las regiones 3 y 5 (n=20 de cada región) no mostraron diferencias significativas entre ojo izquierdo u ojo derecho para los estudios realizados.

Cada test de superficie ocular de las dos poblaciones, humanos y ovejas, fueron comparados y analizados separadamente. Todos los participantes mostraron un puntaje para TF > 0 con erosiones superficiales puntiformes o lineales, pero los valores medios fueron significativamente altos para personas y ovejas de la región 3 ($p < 0,001$). La **tabla 4** resume los datos de los otros tests de superficie ocular realizados en ambos grupos de participantes (humanos y ovejas de las regiones 3 y 5).

GRUPOS	TESTS	FP	TRP	TS
		(parpadeo/min)	(segundos)	(mm)
Ovejas región 3 n=20 (Media ± SEM) (rango)		10.7 ± 0.3 ^a (8-15)	8.2 ± 0.2 ^b (6-10)	22.3 ± 0.6 ^c (15-30)
Ovejas región 5 n=20 (Media ± SEM) (rango)		9.3 ± 0.2 (7-14)	8.4 ± 0.2 (6-12)	20.4 ± 0.5 (16-27)
Individuos región 3 (QCE) n=20 (Media ± SEM) (rango)		NR	9.2 ± 0.7 ^e (6-14)	10.1 ± 0.4 ^f (8-14)
Individuos región 5 n=20 (Media ± SEM) (rango)		NR	10.3 ± 0.5 (7-15)	11.6 ± 0.6 (8-17)

Tabla 4: Estudios complementarios de la superficie ocular. NR= no realizado. Ovejas región 3 vs. ovejas región 5. ^a: p= 0,04; ^b: p= 0,60; ^c: p= 0,27. Individuos región 3 (QCE) vs. individuos región 5. ^e: p= 0,33; ^f: p= 0,15.

QCE= queratopatía climática esferoidea; FP= frecuencia de parpadeo; TRP= tiempo de ruptura de la película lagrimal precorneal; TS= test de Schirmer; mm= milímetros; N/R= no realizado.

La media para FP fue también significativamente más alta en animales de la región 3 (p=0,04). Los valores medios para TRP y TS-I no mostraron diferencias significativas entre

ambos grupos de animales ($p=0,60$ y $p=0,27$, respectivamente); y entre pacientes con QCE y personas habitando la región 5 ($p=0,33$ y $p=0,15$, respectivamente).

La **figura 4** muestra imágenes oblicuas representativas de MC de córneas de ovejas de ambas regiones (3 y 5), y de tres pacientes representativos control y con diferentes grados de QCE. Se observan diferencias en el epitelio corneal entre ambos grupos de ovejas. Las capas de células basales e intermedias de la córnea de ovejas que pastan en el región 5 (**figura 4A**) no muestran ninguna anomalía, mientras que pequeños puntos hiperreflectivos se pueden apreciar en la misma zona de la córnea de animales de la región 3 (**figura 4B**). Se encontraron depósitos en la capa de Bowman y estroma superficial en córneas de pacientes con QCE, pero no en animales de las dos regiones, ni en individuos de la región 5 (**figura 4C, 4D, 4E, 4F**). Tampoco se observaron diferencias en el estroma o endotelio de participantes de ambos grupos (datos no mostrados).

Mediante estudios de MOAR realizados en córneas de ovejas de ambas regiones, no se observaron depósitos anormales debajo del epitelio, como si se pueden apreciar en córneas de pacientes con QCE. (**figura 5**).

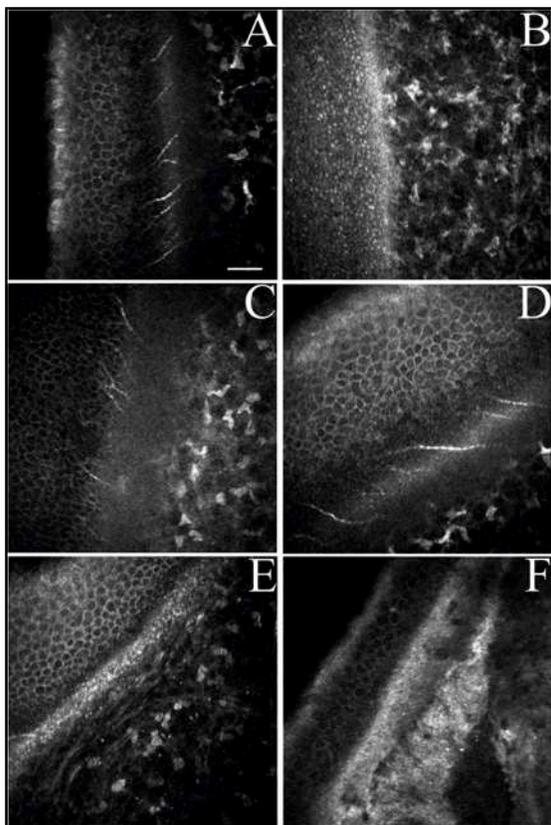


Figura 4: Imágenes representativas de microscopía confocal de secciones oblicuas de córnea de ovejas y córneas humanas mostrando epitelio, capa de Bowman y estroma anterior. Apariencia normal del área subepitelial en ovejas que pastan en la región 5 (A); numerosos puntos hiperreflectivos en el epitelio de córneas de ovejas provenientes de la región 3 (B); córnea humana normal (región 5) que muestra la ausencia de depósitos hiperreflectivos (C); queratopatía climática esferoidea (QCE) grado 1 exhibe depósitos puntiformes e hiperreflectivos a nivel de la capa de Bowman (D); QCE grado 2 muestra un aumento en la densidad de los depósitos puntiformes en la capa de Bowman y estroma anterior (E); QCE grado 3 muestra condensación de los depósitos puntiformes hiperreflectivos y grandes depósitos globulares no reflectivos en la capa de Bowman y estroma superficial. (D, E y F) son imágenes representativas de pacientes con QCE de la región 3. Magnificación original (400x400 μm) Barras = 50 μm .

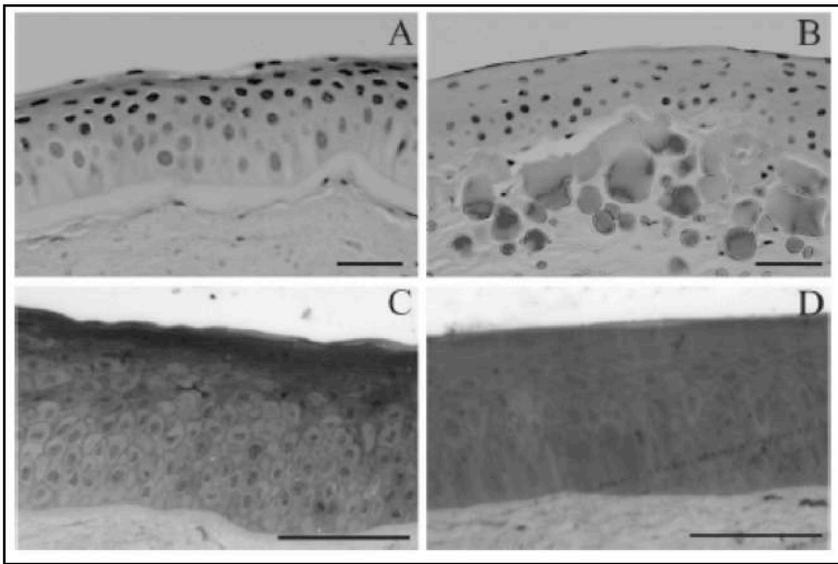


Figura 5: Imágenes de microscopía óptica del epitelio corneal y estroma anterior de: córnea humana normal (A); queratopatía climática esferoidea (QCE) (B); oveja de la región 3 (C); oveja de la región 5 (D). Barras= 30 μm (A y B), 100 μm (C y D).

No hubo diferencias significativas en los niveles de AAs encontrados en ovejas que pastan en la región 3 y región 5 (0,64 mg/dl +/- 0,12 y 0,72 +/- 0,15 respectivamente). Estas cantidades de AAs son similares a las concentraciones encontradas en individuos que viven en la región 5 (figura 6).

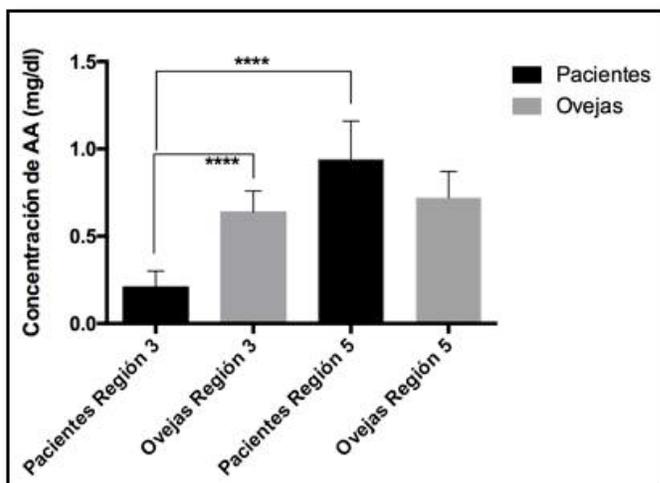


Figura 6: Concentración de ácido ascórbico sérico (AAs) para pacientes y ovejas de las regiones 3 y 5. Existe una diferencia significativa entre los niveles de AAs en pacientes y ovejas de la región 3, al igual que entre pacientes de la región 3 y la región 5. La diferencia en los niveles de esta vitamina entre animales de ambos grupos no es significativa.

Estudios de lipidómica

Obtuvimos el perfil lipídico para dos clases de glicerofosfolípidos: fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilserina (PS) en epitelio corneal de 3 pacientes con QCE (en zona afectada y en zona sin alteraciones o control). La **figura 7** muestra un espectro representativo de PC sin estándar (**figura 7A**) y con estándar raciométrico (**figura 7B**) para una muestra control. Usando macros de Excel (diseñados especialmente para este fin) todos los datos obtenidos para ambas clases de lípidos fueron analizados para determinar la presencia de especies lipídicas únicas y comunes en muestras de zona sana y zonas con QCE. Se consideró especie única cuando sólo está presente en uno de ambos grupos con una frecuencia ≥ 2 . Para especies comunes, su presencia en al menos un grupo es ≥ 2 , aun si la frecuencia en el otro grupo es solamente de 1.

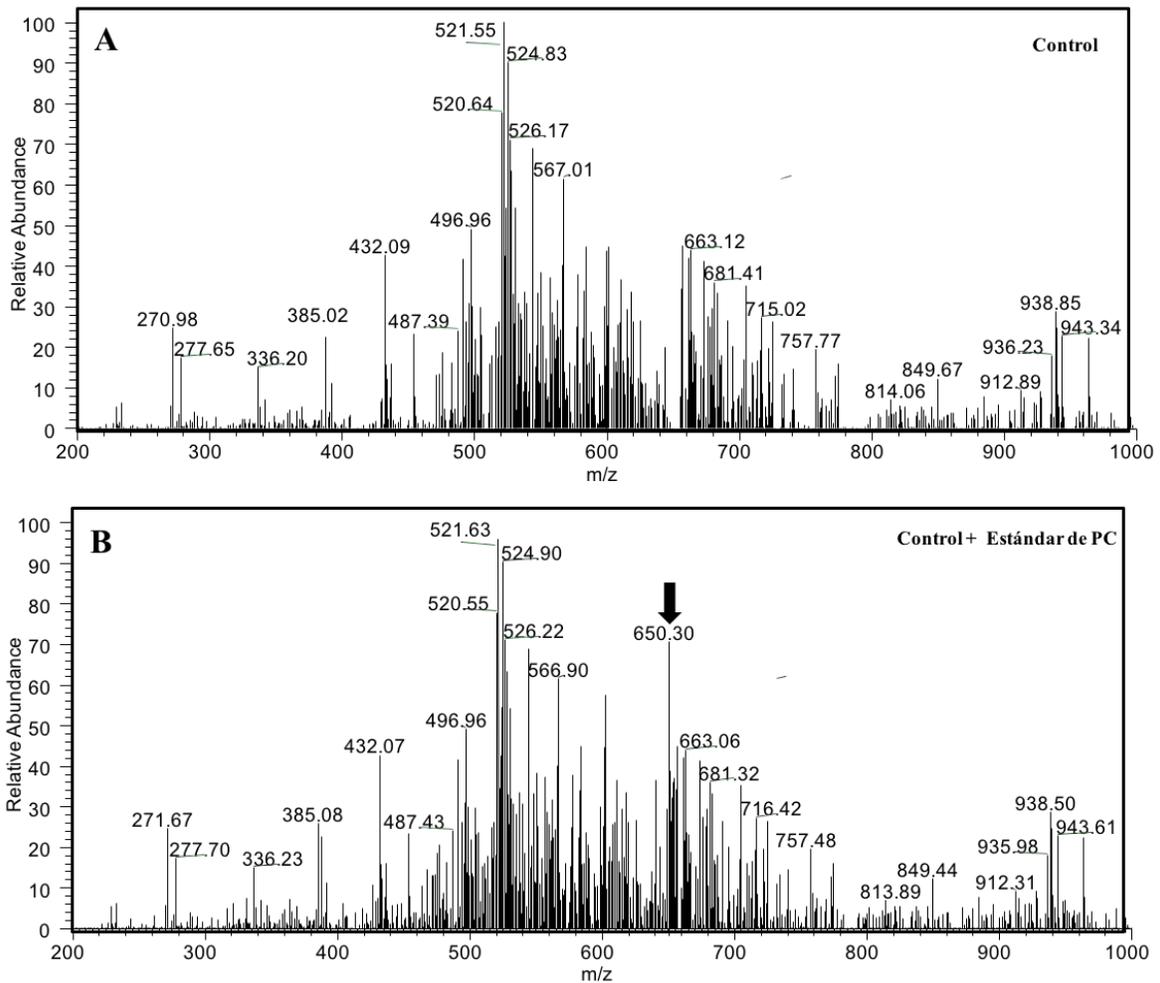


Figura 7: Espectro de masas representativo de una muestra Control para QCE, corrida en modo ion + para fosfatidilcolina: sin el agregado de estándar (A); y con el agregado de 10 pmol de estándar (B)

La cantidad de fosfolípidos totales (PC+PS) de las muestras estudiadas (zonas afectadas por la patología, n=3; y zonas sin alteraciones, n=3) normalizados a la cantidad total de proteínas en la correspondiente fase acuosa, se muestra en la **figura 8A**. En general, observamos una disminución de la concentración de fosfolípidos totales en zonas afectadas por QCE con respecto a zonas sin alteraciones (15 veces menos). La misma tendencia se observa al cuantificar PCs (4,3 veces menor en zonas afectadas) y PSs (25,3 veces menor) por separado (**figura 8B y C**).

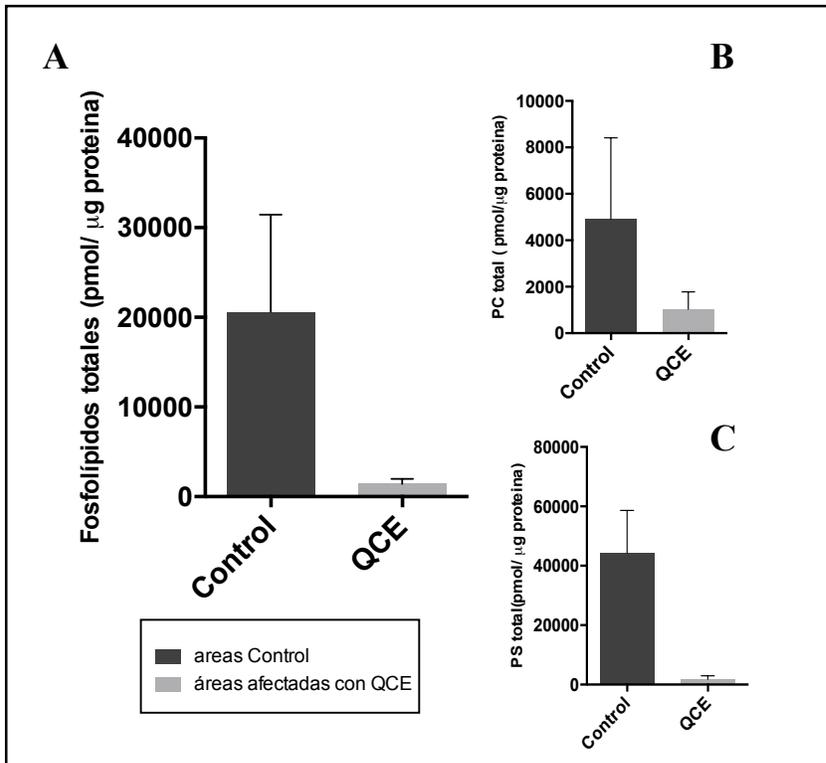


Figura 8: Concentración total de lípidos en pmol/μg de proteínas en células epiteliales corneales para áreas control y áreas afectadas con QCE (A). Concentración de fosfatidilcolina (B) y de fosfatidilserina (C) en pmol / μg de proteínas en zonas afectadas por QCE y áreas control. ($p > 0,05$).

Identificamos 3 especies de PC únicamente enriquecidos en zonas afectadas (QCE), y 5 en zonas sin alteraciones (tabla 5, figura 10); 58 especies comunes a ambas zonas. Para PS encontramos 2 especies únicas en zonas afectadas (QCE) y 7 en zonas sin alteraciones (tabla 5, figura 10); 51 especies comunes a ambas zonas. Las figuras 9A y 9B y figura 10 muestran las especies comunes para PC y PS y la cantidad, encontradas en ambas zonas (áreas sin alteraciones y zonas afectadas). En general, todos los lípidos comunes (tanto para PC como para PS) se encuentran disminuidos en áreas patológicas, con respecto a zonas control, pero entre las especies de PC encontramos que el lípido PC[22:1(13E)/22:1(13E)] se encuentra ~28.000 veces aumentado en áreas afectadas con la patología estudiada (figura 9A). En el caso de especies comunes de PS, encontramos que tres de ellas están aumentadas en zonas con QCE: PS[13:0/22:0] (~0,99 veces aumentada), PS[18:1(9Z)/0:0] (~1.1 veces aumentada) y PS[14:0/0:0] (~2.1 veces aumentada) (figura 9B).

		Lípidos únicos	Frecuencia			
		Cantidad, pmol				HMDB
		por especies/ µg proteína				Número de Acceso
	m/z*			LIPIDMAPS ID	PUBCHEM ID	
Fosfatidilcolina						
Control						
PC(18:0/18:2(10Z,12Z))	794.5673	0.6076	2	LMGP01010764	24778826	-
PC(20:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	871.1918	0.2917	2	LMGP01011028	24779053	HMDB08288
PC(20:0/24:1(15Z))	909.6363	0.0013	2	LMGP01011032	24779057	HMDB08290
PC(20:1(11Z)/22:2(13Z,16Z))	877.1337	0.0039	2	LMGP01011832	52923143	-
PC(22:1(11Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	896.0149	0.0004	2	LMGP01012034	52923545	-
QCE						
PC(13:0/20:3(8Z,11Z,14Z))	749.9200	11.0140	2	LMGP01011355	52922192	-
PC(16:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	788.3267	20.3572	2	LMGP01010633	24778723	HMDB07984
PC(18:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	845.4000	2.8272	2	LMGP01010816	24778871	HMDB08055

Fosfatidilserina						
Control						
PS(12:0/22:2(13Z,16Z))	755.4290	761.3711	2	LMGP03010066	52925176	-
PS(14:1(9Z)/14:1(9Z))	671.4229	5516.5028	2	LMGP03010919	52926026	-
PS(15:0/0:0)	487.1273	2026.6640	2	LMGP03050031	447388	-
PS(17:0/21:0)	823.8856	2319.4460	2	LMGP03010243	52925353	-
PS(17:0/22:1(11Z))	826.9627	282.8321	2	LMGP03010245	52925355	-
PS(19:0/22:2(13Z,16Z))	853.6003	42498.7289	2	LMGP03010477	52925587	-
PS(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0)	576.4477	5648.8443	2	LMGP03050014	52926282	-
QCE						
PS(13:0/17:1(9Z))	710.0900	0.0275	2	LMGP03010074	52925184	-
PS(18:2(9Z,12Z)/0:0)	517.1746	44.5183	2	LMGP03050011	52926279	-

Tabla 5: Especies fosfolipídicas únicas identificadas en muestras control y muestras con queratopatía climática esferoidea (QCE). *cociente representativo de relación m/z (relación masa/carga, corregidos a partir de los espectros obtenidos mediante el software MZmine 2.9). La identificación de los lípidos está basada en la base de datos Lipidmaps. Los identificadores HMDB aportan detalles de los lípidos identificados tales como localización, componente de membrana o membrana extracelular, integridad de la membrana, señalización celular, fuente y/o almacenamiento de energía.

A

Fosfatidilcolina	Cambio
PC(2:0/0:0)	-0,92495735
PC(0:0/3:1(2E))	-0,00804182
PC(0:0/4:0)	-0,05970317
PC(2:0/2:0)	-0,87196725
PC(6:0/0:0)	-0,90095939
PC(3:0/3:0)	-0,98323277
PC(8:0/0:0)	-0,91197537
PC(O-10:1(9E)/0:0)	-0,91895318
PC(10:0/0:0)	-0,88572636
PC(5:0/5:0)	-0,8871428
PC(12:0/0:0)	0,05737289
PC(6:2(2E,4E)/6:2(2E,4E))	0,32186109
PC(O-11:1(10E)/2:0)	-0,99201744
PC(14:1(9Z)/0:0)	-0,65557019
PC(15:1(9Z)/0:0)	-0,9933159
PC(16:1(9Z)/0:0)	-0,98120362
PC(8:2(2E,4E)/8:2(2E,4E))	-0,76799902
PC(17:1(9Z)/0:0)	11,2411782
PC(18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0)	-0,66017651
PC(19:3(10Z,13Z,16Z)/0:0)	0,49833939
PC(16:1(9Z)/2:0)	-0,98251239
PC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	-0,97366231
PC(6:2(3E,5E)/14:2(11E,13E))	2,9947341
PC(18:1(9E)/2:0)	-0,99997041
PC(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0)	3,53835826
PC(18:1(9Z)/4:0)	-0,72159536
PC(24:0/0:0)	0,67666964

Fosfatidilcolina	Cambio
PC(12:0/12:0)	-0,95831327
PC(12:0/13:0)	-0,29729276
PC(12:0/15:1(9Z))	12,7605493
PC(10:0/18:2(9Z,12Z))	-0,91508792
PC(10:0/18:0)	0,37025453
PC(12:0/17:2(9Z,12Z))	-0,35684979
PC(12:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	98,6445052
PC(13:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	55,4982957
PC(13:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	600,236542
PC(12:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	191,080767
PC(15:1(9Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	1575,23763
PC(17:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	-0,85871828
PC(16:0/22:6(4E,7E,10E,13E,16E,19E))	30,8598321
PC(18:0/20:3(5Z,11Z,14Z))	149,051093
PC(17:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	-0,59320633
PC(16:0/24:1(15Z))	1,72524008
PC(18:0/24:1(15Z))	13,7230588
PC(21:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	-0,40406721
PC(22:1(13E)/22:1(13E))	28213,429
PC(23:1(9Z)/23:1(9Z))	154,263889
PC(20:0/26:0)	23,0808886
PC(24:1(15Z)/24:1(15Z))	648,254714
PC(22:0/26:0)	353,90665
PC(34:0/16:0)	11,4117283



B

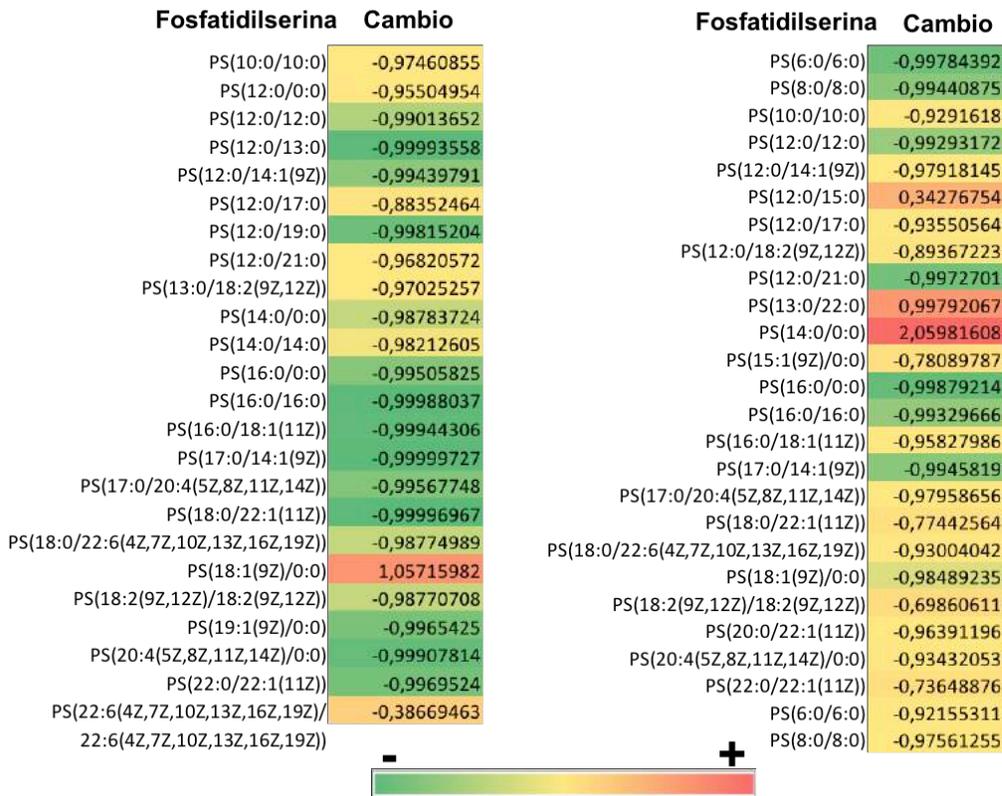


Figura 9: Heat- map para especies comunes de PC (A) y PS (B) entre zonas controles y zonas con queratopatía climática esferoidea (QCE) de epitelio corneal de pacientes. Se expresa la formula molecular de la especie y las veces que cambio normalizado (pmol/μg de proteína). El cambio es el cociente relativo al control. Un signo negativo indica que el denominador es más alto, indicando que hay más alta cantidad de esa especie lipídica en el control con respecto a la zona afectada por QCE.

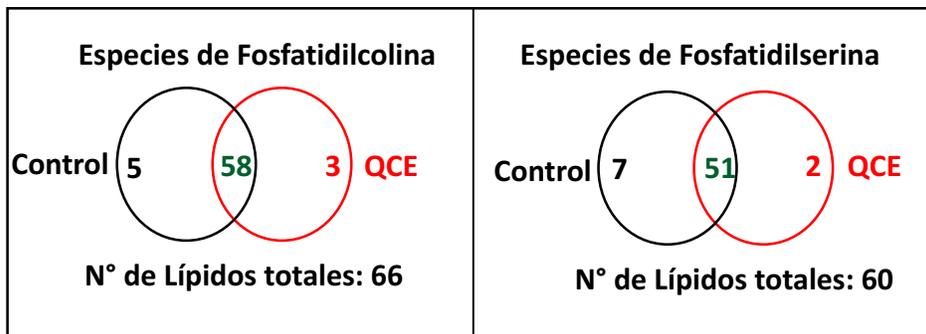


Figura 10: Esquema representando la cantidad de especies de PC únicas encontradas en áreas control (en negro) y en áreas afectadas con QCE (en color rojo) en epitelio corneal de pacientes con QCE, en la intersección se encuentra el número de especies lipídicas comunes a ambas zonas (color verde; **panel izquierdo**). En el **panel derecho** se muestra el número especies únicas de PS para zonas control

(negro) y zonas afectadas con QCE (rojo). La intersección del diagrama muestra la cantidad de especies lipídicas comunes a ambas zonas (verde).

DISCUSION

La queratopatía climática esferoidea ha sido definida como una enfermedad rural en la cual la presentación clínica y severidad de las lesiones corneales puede variar significativamente dependiendo de la región y su clima. Formas más severas de QCE han sido descritas en regiones áridas con altas temperaturas, como las encontradas en las islas Dahlak del Mar Rojo, Eritrea (48, 73), que en regiones frías como la península del Labrador en Canadá y el Círculo Ártico (74).

Aunque QCE es una entidad clínica bien diferenciada, de presentación bilateral y frecuentemente asimétrica, se la debe diferenciar de otras entidades, tales como degeneración secundaria esferoidea, edema corneal, degeneración nodular de Salzmann, degeneración limbal de Vogt's, distrofia corneal superficial y degeneración corneal periférica hipertrófica, entre otras. El examen clínico biomicroscópico es suficiente para el diagnóstico en la inmensa mayoría de los casos (83, 86).

El alto contenido de AA, algunas proteínas y ácidos nucleicos en el epitelio corneal funcionan como un filtro, absorbiendo hasta el 77% de las longitudes de onda de RUV dañinas (59, 99-101). Esta vitamina es sintetizada por diferentes mecanismos presentes tanto en el reino animal como vegetal. De todas maneras, murciélagos, cobayos, y primates antropoides, incluyendo humanos, han perdido la capacidad de sintetizar AA como resultado de mutaciones en los genes que codifican para la L-gulonolactona oxidasa (GLO), y este poderoso antioxidante debe ser incorporado en la dieta de estos animales (2). Las lágrimas, entre diferentes componentes que previenen el estrés oxidativo, también tienen un nivel constante de AA, el cual es mantenido por las glándulas lagrimales y no por la córnea. (100-101) Nuestro grupo, y algunos otros, trabajando con cobayos alimentados con diferentes dosis de AA y expuestos a RUV, hemos demostrado que el daño corneal producido por la radiación está relacionado a la dosis de AA consumido (2, 102-103). En humanos, la opacidad corneal luego de la queratectomía fotorrefractiva solamente ha sido reportada en Noruega, donde el sol es visible por 24 horas/día durante el verano (104), pero la administración de un suplemento dietario con AA durante períodos pre y posoperativos pueden reducir su incidencia (105).

La hipótesis inicial sobre la génesis de QCE fue durante muchos años que la córnea de personas expuestas crónicamente a condiciones climáticas desfavorables durante muchas horas al día y durante años (clima frío/caluroso seco y ventoso), con carencia de vegetación/sombra, está expuesta a radiación ultravioleta-B, la cual puede producir modificaciones en proteínas ricas en cisteína, histidina y metionina, produciéndose agregación de las mismas y su depósito en las capas superficiales de la córnea.

Nosotros hemos observado que estos pacientes presentan erosiones corneales producidas por partículas arrastradas por los vientos cuyo resultado es la generación de reacciones de hipersensibilidad con una importante participación de componentes pro inflamatorios del sistema inmune innato (106).

Aunque el ojo depende de la energía de la radiación visible para llevar a cabo sus procesos fisiológicos fundamentales, también puede ser dañado por esta radiación así como por la RUV. Las enfermedades oculares en las cuales el sol está implicado son conocidas como oftalmoheliosis, las que representan importantes problemas de salud en muchas comunidades alrededor del mundo. Una exposición corneal crónica a la RUV induce alteración de proteínas, fragmentación de ADN, generación de radicales libres, estrés oxidativo y peroxidación lipídica, resultando en el desarrollo de queratopatías. La reducción en la cantidad de glicerofosfolípidos en las zonas afectadas de los pacientes con QCE estudiados en esta tesis, pone en evidencia el estado de estrés oxidativo y como consecuencia de éste, la peroxidación lipídica que está teniendo lugar. Otros estudios han demostrado que la exposición a la RUV es uno de los factores responsable del desarrollo de pterigion y cataratas corticales (107).

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de QCE ha sido asociado a una sobreexposición a la RUV (59). De todos modos, asociación no necesariamente significa causalidad. Para inferir causalidad, es necesario realizar estudios de campo para medir la dosis-respuesta individual a la RUV. Los valores de RUV pueden ser calculados a nivel del suelo usando radiómetros o programas de computadora que manipulan diferentes variables tales como el ozono, latitud, fecha, tiempo y nubosidad, entre otras (108). La estimación de la dosis de RUV que llega a los ojos también es muy importante para poder determinar sus efectos dañinos. De todos modos, obtener estos valores requiere de instalación de equipamiento con evaluación constante por personal calificado, que simultáneamente tiene que registrar los factores climáticos. Dado que QCE es una enfermedad crónica de lenta evolución, estas mediciones deberían realizarse por muchos años consecutivos en las cuatro regiones extremadamente aisladas de nuestro país que hemos estudiado, que por cierto fue una tarea

difícil. Por estas razones, en el presente estudio no calculamos los valores de RUV a nivel del suelo para ninguna de las regiones estudiadas. En cambio, determinamos la concentración de la columna de O₃ total para estas regiones durante 10 años usando el sitio de internet de la Agencia Aeroespacial Nacional (NASA, USA), y todos los valores de O₃ encontrados durante este período de tiempo estuvieron dentro del rango normal, excluyendo la posibilidad de cualquier adelgazamiento de la capa de O₃ en estas regiones de Argentina, las cuales podrían tener un incremento de la cantidad de RUV que alcanza la superficie del suelo y afectar la córnea de los individuos.

Los resultados de esta parte de la tesis nos permitieron llegar a la conclusión del rol que juega la actividad laboral y la apropiada protección de la córnea (uso de sombreros o anteojos apropiados, y una dieta adecuada, no deficiente en AA) en la génesis de QCE. Sólo observamos la presencia de QCE en personas que trabajaron durante toda su vida en la cría de ovejas en la región 3 (caracterizada por un clima seco, soleado, con suelo árido, que sólo permite el desarrollo de especies de plantas altamente adaptadas, tales como pequeños arbustos, que puede ser explotado para la cría de ganado, pero no para el crecimiento de frutas o vegetales). Sorprendentemente, no encontramos QCE en la región 1 o 2 (provincias de Jujuy y Santiago del Estero), las cuales tienen clima y suelos similares y a donde los individuos tienen hábitos dietarios y trabajos similares a aquellos de la región 3.

El cuestionario acerca de los hábitos alimentarios claramente indicó una deficiencia dietaria de alimentos ricos en vitaminas, especialmente AA, en individuos de las regiones 1, 2 y 3. Estas respuestas fueron corroboradas por las bajas concentraciones de AA sérico encontradas en las muestras de sangre. En contraste, los individuos estudiados en la región 4, donde hay actividad agrícola más alta, principalmente cultivo de frutas (esto es posible debido a la intervención humana en esta región árida mediante el uso del agua del Río Negro para irrigación de los cultivos), al igual que los de la región 5, tienen una dieta mucho más balanceada, ya que consumen carne, vegetales y frutas, con una consecuente concentración más alta de AA. Estos resultados son consistentes con otras investigaciones que claramente demuestran la importancia del AA en la protección corneal contra los efectos dañinos de la RUV (2).

Nuestros resultados demuestran la importancia del uso de sombreros alados, gorras o lentes de sol, comúnmente usados por individuos de la región 1, 2, 4 y 5, donde no se encontró QCE, pero no en la región 3, donde encontramos una prevalencia del 20% para esta enfermedad. No

debemos olvidar que las regiones 1, 2 y 3 están caracterizadas por la presencia de extensas áreas desprovistas de sombra.

Basado en estos resultados, los cuales claramente demuestran la existencia de QCE solamente en una de las cinco regiones argentinas estudiadas, sería adecuado considerar que un nombre apropiado para esta patología corneal podría ser “queratopatía ambiental esferoidea” o “degeneración ambiental proteinácea de la córnea”, en lugar de queratopatía climática esferoidea, debido a que su origen no solamente está relacionado al clima sino también a factores ambientales como la alimentación. La prevalencia de esta enfermedad es alta en esta área de la Patagonia argentina, pero muchos individuos viviendo en esta región, a pesar de tener la misma actividad laboral, nutrición y protección ocular, no sufren de QCE. Esto implica que además de las condiciones ambientales y ausencia de protección a los efectos dañinos de la RUV, otros factores podrían estar contribuyendo a la aparición de esta enfermedad. Si bien la mayoría de los individuos que habitan en la región 3 son descendientes de Mapuches y aproximadamente un 12 % de ellos padecen de QCE, no hemos encontrado correlación entre genética ancestral (representada por el sistema genético haploide), ni de alelos HLA-DRB1 con QCE en Argentina (109). Los productos de los genes HLA-DR han sido implicados en la patogénesis de un número cada vez mayor de enfermedades inflamatorias sistémicas y oftalmológicas. Una explicación para esta observación es que las enfermedades asociadas a HLA generalmente se desarrollan en individuos genéticamente susceptibles luego de una exposición a agresiones medioambientales o infecciones. Muchos estudios de HLA basados en la población han sido realizados con respecto a enfermedades inflamatorias oculares con diferentes asociaciones al grupo alélico HLA-DRB1, como lo son la enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada, uveítis en la artritis juvenil idiopática, neuritis óptica, la úlcera de Mooren, neuromielitis óptica, la nefritis túbulo intersticial y síndrome de uveítis, y el glaucoma. No descartamos que alteraciones en otros genes puedan tener alguna incidencia en el desarrollo de QCE.

Cuando estudiamos ovejas adultas que pastan en la misma región de la Patagonia donde detectamos una alta prevalencia de QCE (por ende estos animales estuvieron expuestos a las mismas condiciones ambientales que los pacientes con esta enfermedad) encontramos que, a pesar de tener abrasiones corneales superficiales, la córnea de los animales no tiene ninguna otra anomalía estructural, tales como acumulación de proteínas a nivel subepitelial como se observa en pacientes con QCE. Vale la pena remarcar que los niveles de AA sérico detectados en ovejas de la región 3 y la región 5, fueron similares a las concentraciones de esta vitamina

encontradas en suero humano control (región 5). Las ovejas son capaces de sintetizar AA a partir de la hierba que comen y el AAs es concentrado en la córnea del animal donde juega un rol crítico y multifacético protegiendo esta porción del ojo del estrés oxidativo, como consecuencia de la prolongada exposición a la RUV. (2)

La microscopía confocal se ha convertido en una herramienta útil durante los últimos años para la examinación de la córnea de humanos, así como de otras especies (110-113). Hasta lo que sabemos, este es el primer estudio de microscopía confocal en córneas de ovejas mostrando diferencias en el epitelio en animales que pastan en un área de condiciones ambientales extremas. Como se puede ver en la **figura 4** solamente las ovejas de la región 3 mostraron pequeños puntos hiperreflectivos. Estas anormalidades coinciden con nuestro hallazgo de mayor cantidad de erosiones en las córneas de los animales de esta región. En contraste a las córneas humanas con QCE (**figura 4**), no encontramos anormalidades en la capa de Bowman y estroma superficial de ovejas de ninguna de las dos regiones, o en córneas humanas de individuos de la región 5 (Córdoba capital, **figura 5**).

También estudiamos diferentes parámetros de la córnea de oveja en busca de diferencias entre estos animales que pastan en regiones con distintas condiciones climáticas (región 3 y 5). Esto también aportó nueva información sobre el segmento anterior del ojo ovino tales como TRP, FP y medición de la producción de lágrima mediante TS-I, debido a que existe escasa información acerca del mismo (110, 115-118).

Nuestros estudios clínicos iniciales mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura, mostraron la presencia de una córnea transparente en todos los animales de ambas regiones. El TRP principalmente evalúa los lípidos y la capa mucosa del film lagrimal (119). La capa lipídica ha sido correlacionada con la estabilidad del film lagrimal con un incrementado TRP lo cual implica una baja velocidad de evaporación (120-121). Nuestros valores de TRP no mostraron ninguna diferencia entre ovejas que viven en la región 3 y 5. Además, no se observó ulceración corneal en ningún grupo de animales, apoyando el hecho de que la oveja tiene eficientes mecanismos protectores tales como membrana nictitante, altas concentraciones de lisozima (122).

La película lagrimal, compuesta de lípidos, mucinas y agua, tiene diferentes roles tales como nutrición, protección y funciones específicas antibacteriales e inmunes (119, 123-124). La actividad de parpadeo mantiene el espesor fisiológico de la superficie pre-ocular distribuyendo homogéneamente el film lagrimal sobre la córnea y superficie de la conjuntiva. La FP en las ovejas en la región 3 es mayor que las de los animales de la región 5 ($p=0,04$). La

tinción con fluoresceína (TF) mostró mayor cantidad de erosiones en córnea de ovejas de la región 3 ($p < 0,001$). Las diferencias significativas en FP y TF podrían ser atribuidas a las duras condiciones ambientales la región 3.

El TS-I ha sido ampliamente usado para la evaluación de la producción de lágrima basal y refleja. Los resultados pueden variar dependiendo de la localización y capacidad absorbente de las tiras y performance individual (125-126). Los valores medios de TS-I obtenidos fueron comparables en ambos grupos de ovejas Merino ($p = 0,27$).

Los resultados de la prevalencia para pinguécula y pterigion (oftalmoheliosis) fueron los siguientes: en personas que viven en la región 4 encontramos el menor número de casos de pinguécula y pterigion de todas las regiones, y la más alta prevalencia en la región 3 (**tabla 3**).

Clásicamente se ha postulado que pterigion es, en parte, el resultado de un proceso inflamatorio de la conjuntiva secundario a una exposición sostenida a la RUV. La alta prevalencia de esta enfermedad en la región 3 puede estar relacionada al hecho de que estos individuos pasan largas horas cada día a la intemperie, estando consecuentemente expuestos a la RUV y fuertes vientos sin protección ocular. Esto es reforzado por los hallazgos de bajos porcentajes de pterigion en las regiones 1, 2 y 4, donde los individuos frecuentemente usan sombreros/ anteojos para protegerse del sol.

Los fosfolípidos son los principales componentes de la bicapa lipídica que permiten crear “límites” celulares permitiendo así mantener la integridad de las células para los procesos vitales. Los fosfolípidos de membrana crean un medioambiente hidrofóbico para la función de las proteínas transmembrana y comunicación. (127-130). Bazan y col. Establecieron hace algunos años que el epitelio corneal tiene un contenido en fosfolípidos mayor y más saturado que el resto de la córnea. Por el contrario, el endotelio corneal tiene un nivel más alto de insaturación, en concordancia con la permeabilidad al agua de esta capa (tres veces mayor que en epitelio) (131).

En este estudio hemos determinado los fosfolípidos PC y PS presentes en áreas no afectadas (control) y áreas afectadas de epitelio corneal de individuos con QCE (que viven en la región 3), usando un espectrómetro de masas triple cuadrupolo y parámetros previamente establecidos en el campo de lípidos y ampliamente usados para tejido ocular en el estudio de enfermedades oftalmológicas (128-129). Como se ve en la **figura 8A**, los fosfolípidos totales están aproximadamente 15 veces menos concentrados en zonas afectadas, con respecto a zonas no afectadas. Cuando cuantificamos de manera separada PC y PS (**fig. 8 B y C** respectivamente), observamos una vez más lo dicho anteriormente, por lo cual podemos decir

que la reducción en fosfolípidos totales en áreas afectadas con QCE se produce a expensas de una disminución de ambas clases de fosfolípidos estudiados, PC y PS. Comparado a lípidos comunes, sólo encontramos un pequeño subconjunto de lípidos únicos en áreas no afectadas, o zonas con QCE (tabla 5).

Cuando analizamos las especies únicamente enriquecidas en zonas control o en zonas afectadas con QCE, encontramos que 4 de las 5 especies de PC halladas en zonas control (PC[18:0/18:2(10Z,12Z)]; PC[20:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]; PC[20:0/24:1(15Z)] y PC[20:1(11Z)/22:2(13Z,16Z)]) y las 3 especies únicamente encontradas en zonas con QCE (PC[13:0/20:3(8Z,11Z,14Z)]; PC[16:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)] y PC[18:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)]), también están presentes en humor acuoso de pacientes con glaucoma y sus respectivos controles, encontrándose aumentadas (aunque no significativamente) en humor acuoso de individuos con glaucoma (129).

La especie PC[20:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)] y PC[20:0/24:1(15Z)] encontradas en zonas control son lípidos de membrana y extracelulares, y la primera de ellas ha sido descrita además en orina en condiciones normales y en condiciones patológicas tales como esofagitis eosinofílica y en reflujo gastroesofágico (<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB08288> y <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB08290>). Las 3 especies encontradas sólo en muestras de epitelio corneal afectado con QCE (ver más arriba) también han sido descritas en humor acuoso normal y de pacientes con glaucoma, encontrándose aumentadas en la condición patológica (129). Además, PC[16:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)] ha sido encontrada en saliva humana normal (132). Las 7 especies de PS únicamente enriquecidas en áreas control y las 2 en áreas con QCE, también fueron halladas aumentadas en humor acuoso de pacientes con glaucoma (129).

Entre los lípidos comunes a zonas control y zonas con QCE, encontramos que la especie (PC[22:1(13E)/22:1(13E)]) está extremadamente aumentada (~ 28000 veces) en zonas patológicas, y 3 especies de PS también estuvieron ligeramente aumentadas en zonas con QCE: (PS[13:0/22:0] ~0,99 veces, PS[18:1(9Z)/0:0] ~1.1 veces y PS[14:0/0:0] ~2.1 veces). Todas ellas también han sido previamente descritas aumentadas en humor acuoso de pacientes con glaucoma (129). Las implicancias que estas especies lipídicas tengan en el comienzo o evolución de estas patologías oculares, glaucoma y particularmente QCE, aun es desconocida, teniendo en cuenta además que la mayoría de ellas aun no han sido descritas en otros tejidos o fluidos biológicos humanos en condiciones normales.

Estrés oxidativo puede causar peroxidación de ácidos nucleicos, bases, proteínas y lípidos, resultando en su daño. El ojo es uno de los principales blancos a ser atacado por las especies reactivas de oxígeno (EROs) debido a su exposición a varios factores ambientales tales como alta presión de oxígeno, luz, RUV, radiación ionizante, polución, microbios, entre otros; que son capaces de cambiar el estado redox de una célula hacia condiciones oxidantes. Hay creciente evidencia que indica que el estrés oxidativo persistente contribuye al desarrollo de muchas enfermedades oculares y la peroxidación lipídica ha sido involucrada en varias enfermedades tales como aterogénesis, enfermedades neurodegenerativas, cataratas y retinopatías (133).

Peroxidación lipídica, como consecuencia del estrés oxidativo, podría tener lugar en las córneas de pacientes con QCE. Esto podría explicar la reducción en la concentración de fosfolípidos que fueron observadas. En resumen, hemos estudiado por primera vez la composición de fosfolípidos en células epiteliales de pacientes con QCE usando lipidómica, y hemos encontrado nuevas evidencias a favor de nuestra hipótesis acerca del origen de QCE. La cantidad total menor de fosfolípidos observados en áreas afectadas comparadas con áreas control es probablemente un indicativo de que un proceso activo de estrés oxidativo está en marcha en córneas con QCE. Además, hemos identificado una composición diferencial entre epitelio corneal sano y aquellas áreas de epitelio afectadas con QCE.