

Objetivo específico II

- a. Realizar estudios complementarios de la superficie ocular del cobayo.**

INTRODUCCIÓN

El cobayo doméstico, o *cavia porcellus*, es un roedor pequeño sin cola, usado como mascota en el mundo entero. Estos animales, utilizados en distintos modelos experimentales para estudiar enfermedades humanas (134), se están empleando cada vez más como animal de experimentación para profundizar el conocimiento de diferentes anormalidades oculares (miopía, cataratas, enfermedades de la retina y cicatrización corneal) (135-138).

Nuestro grupo describió hace algunos años, las características estructurales y ultraestructurales de la córnea de cobayos normales, utilizando diferentes técnicas de microscopía (microscopía óptica-MO, microscopía confocal-MC, y microscopía electrónica-ME) las cuales son similares a las características de las córneas humanas, a pesar de tener la mitad de espesor. Se demostró que, tanto la córnea de cobayos pigmentados, como de cobayos albinos, es un tejido compuesto por varias estructuras: un epitelio estratificado, membrana basal, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y una monocapa endotelial que está en contacto con el humor acuoso (9).

En la actualidad, existe escasa bibliografía disponible que describa la anatomía, fisiología y superficie ocular de los cobayos. Algunos libros de oftalmología veterinaria incluyen una descripción anatómica del ojo del cobayo, y unos pocos, dedicados exclusivamente a la anatomía general de este roedor, ofrecen una descripción detallada del ojo y anexos oculares. El análisis histológico de las estructuras oculares es aun más escaso. Gasser y col. estudiaron recientemente la distribución y densidad de las células caliciformes dentro del saco conjuntival y las características anatómicas y microscópicas de las glándulas que contribuyen a la producción lagrimal (139). Además del trabajo de Cafaro y col. (9), donde se describe detalladamente la estructura de la córnea y algunos estudios funcionales de la superficie ocular, como el tiempo de ruptura de la película lagrimal precorneal (TRP) y tinción con fluoresceína (TF), otros estudios han definido, además de estos parámetros, la FP, la producción de lágrima y la sensibilidad corneal (140-141). Es relevante mencionar que existen ciertas discrepancias en algunos de los resultados publicados en estos trabajos científicos.

La lágrima forma una película lagrimal sobre la córnea y la conjuntiva del ojo que tiene varias funciones importantes tales como: mantener la humedad de la superficie ocular, barrer contaminantes, proteger la superficie ocular contra patógenos, lubricar la interface cornea-párpado durante el parpadeo y el sueño, nutrir las células epiteliales de la córnea y mejorar las propiedades ópticas modificando el índice refractivo de la córnea. (142-143). La lágrima se acumula principalmente en el saco conjuntival inferior, en consecuencia, la altura del menisco lagrimal se

considera un parámetro indicativo del volumen lagrimal (entre 75-90% del volumen lagrimal total está contenido en éste lugar (144). Este parámetro de la superficie ocular, se usa en conjunto con otros como el test de Schirmer (TS), TRP y TF, para descartar síndromes de la superficie ocular como, por ejemplo, ojo seco.

Wolff realizó hace ya muchos años la descripción, ahora clásica, del film lagrimal como una estructura de tres capas: una capa anterior lípídica, una capa intermedia acuosa, y una capa profunda compuesta de mucinas, en contacto con el epitelio corneal (**figura 17**) (119, 145). La capa lípídica, ubicada en la interface aire-agua, estabiliza el film lagrimal reduciendo la tensión superficial y controlando la evaporación del agua de la supercie; también forma un “sello” cuando los párpados están cerrados (143). Esta capa está compuesta de lípidos polares tales como fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), en contacto con la capa acuosa, y lípidos no polares tales como triacilglicerol (TG) y esteroles, entre otros. Se sabe que los lípidos no polares son aportados por las glándulas de Meibomio, pero la fuente de lípidos polares es aún desconocida (146-147). Hasta lo que sabemos, aún no hay estudios describiendo la composición y concentración de lípidos de la película lagrimal en cobayos.

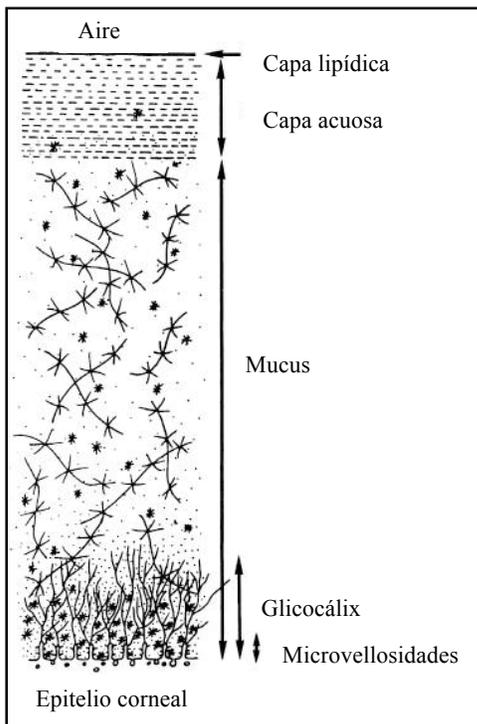


Figura 17: Esquema transversal de la película lagrimal descrita en humanos, donde se detallan las tres capas que la componen. (extraído de Bron y col. 2004)

La superficie ocular (película lagrimal, conjuntiva y córnea) es vulnerable a distintas agresiones provenientes del ambiente que la rodea, tales como patógenos, irritación física o daño por la radiación ultravioleta (RUV) proveniente del sol. La córnea absorbe toda la RUV-C y la mayor parte

de la RUV-B que recibe. La exposición de los tejidos oculares a estas radiaciones de alta energía puede causar daños mediados por reacciones fotoquímicas que inducen estrés oxidativo a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs)(148). Las ERO pueden actuar sobre macromoléculas tales como proteínas, ADN y lípidos, causando modificación de proteínas, daño al ADN y peroxidación lipídica (149). La córnea está provista de potentes sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos. Entre los primeros encontramos a las enzimas catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa y aldehído deshidrogenasa (ALDH) 3A1. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen al glutatión, tocoferol, NAD(P)H y ácido ascórbico (AA) (150). Los cobayos carecen de la enzima L-gulonolactona oxidasa, por lo cual, al igual que los humanos, deben incorporar AA con la dieta, el cual luego se concentrará en la córnea para protegerla del estrés oxidativo (151).

La familia de enzimas ALDH exhiben gran variedad de actividades biológicas y ALDH3A1 y la ALDH clase 1. En la mayoría de los mamíferos se expresan en la córnea y el cristalino, respectivamente, donde cumplen su función de cristalinas (152-157). Por primera vez, nuestro grupo caracterizó la ALDH3A1 en córnea de cobayos (158). Sin embargo, aún no se han realizado trabajos que investiguen la existencia de ALDH1A1 en la córnea de estos roedores.

El objetivo de este capítulo de la tesis fue realizar estudios complementarios de la superficie ocular del cobayo mediante la realización de diferentes tests fisiológicos tales como TS, TRP, medición de sacos conjuntivales y altura del menisco lagrimal, frecuencia y tipo de parpadeo, y estudios de la dinámica del sueño, entre otros. Además, investigamos mediante MO las características histológicas de los anexos oculares, y mediante otras metodologías la existencia y características de ALDH1A1. También caracterizamos la composición lipídica de la película lagrimal. Todos estos resultados permitieron incrementar los conocimientos sobre la superficie ocular del cobayo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 15 cobayos hembras (8 pigmentados cepa Americana y 7 albinos cepa Ssi:Al), provenientes del bioterio del Instituto Biológico Argentino S.A.I.C, Buenos Aires, Argentina, de entre 3 y 5 meses de edad.

Los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, y se los distribuyó en corrales con el piso cubierto de aserrín. Fueron alimentados diariamente (5% del peso del animal) con alimento Conejo Casero, Cargill, Pilar,

Córdoba, Argentina. La temperatura de la habitación fue mantenida a 22°C y se programaron ciclos de 12 hrs de luz (tubos fluorescentes de 36W) y de 12 hrs de oscuridad. Sólo se incluyeron animales libres de patologías oculares (**figura 18**).

El protocolo de experimentación fue aprobado por la comisión de evaluación de protocolos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Resolución del Honorable Consejo Directivo 122/08), y los animales fueron tratados de acuerdo a lo establecido en los estatutos de Uso de Animales Para la Investigación en Visión y Oftalmología de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), EE.UU.



Figura 18: Cobayos albinos utilizados para este trabajo, dispuestos en corrales.

Estudios *in vivo*

Todos los animales fueron examinados detalladamente con lámpara de hendidura de mano (XL-1, Shin Nipon, Ohira Co., Niigata, Japan) para descartar la presencia de patologías de la superficie ocular.

Los estudios que se detallan a continuación se realizaron en ambos ojos de cada cobayo.

Evaluación de la superficie ocular

Frecuencia y tipo de parpadeo:

Para este estudio se utilizaron 4 cobayos. Éstos se dispusieron, de a uno, dentro de una caja de contención especialmente diseñada para realizar video - grabaciones y en un ambiente de tranquilidad, para evitar cualquier estímulo externo que indujera el parpadeo reflejo.

Las imágenes fueron adquiridas, estudiadas y clasificadas mediante un programa de edición de videos (Filmora Video Editor, WondershareTM).

Luego los cobayos fueron sometidos a estímulos sensitivos para evaluar la respuesta palpebral a los mismos:

- Estimulación cutánea al dolor: pequeños pinchazos en la parte trasera del animal mediante aguja 25 G.
- Estímulos auditivos: tono de voz alto, chasquido de dedos.
- Estímulos provocados por soplos fuertes o soplos suaves.

Dinámica del sueño:

Los animales fueron grabados en su hábitat natural (sala del bioterio) durante el período de oscuridad con el objeto de estudiar el grado de apertura de los párpados (abiertos, entreabiertos, cerrados), tiempo de duración entre parpadeos, y los hábitos de sueño. Los registros se realizaron mediante una cámara GoPro Hero 4 (GoPro Inc, San Mateo, CA, EE.UU.), en el período comprendido entre las 22 h y las 2 h. Posteriormente se obtuvieron fotografías a partir de los videos grabados.

Medición de sacos conjuntivales

Para realizar estas mediciones se utilizaron 3 cobayos. Se introdujo en el fondo de saco conjuntival superior e inferior tiras milimetradas estériles habitualmente empleadas en el STT y se midieron las distancias en mm desde el borde palpebral hasta el fondo de ambos sacos conjuntivales.

Medición de la altura del menisco lagrimal

Se emplearon 4 cobayos, los cuales fueron ligeramente sedados con una dosis de 30 mg de ketamina /kg de peso, por vía intramuscular (IM), y un gota de clorhidrato de proparacaína (Anestalcon[®], Laboratorios Alcon, Buenos Aires) como anestésico tópico, con el fin de poder colocar al animal en la posición adecuada y evitar su movimiento al momento de adquirir las imágenes en el equipo.

Luego se procedió a adquirir imágenes de la superficie ocular mediante un equipo de tomografía de coherencia óptica (OCT, por sus siglas en inglés) Visante (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) en modo de alta resolución. Con el software del equipo (Visante Tech software version 3.0.1.8) se realizaron las determinaciones de altura del menisco lagrimal inferior.

Evaluación de la secreción lagrimal

Se realizó mediante el test de Schirmer II (TS-II). La producción de lágrima basal se evaluó con tiras comerciales (Tear test Strips, Haag-Streit, UK), previa instilación del anestésico tópico.

Se introdujo un extremo doblado de la cinta de 5 mm de ancho x 30 mm de largo, en el fondo de saco conjuntival inferior dejando que se impregne de lágrima durante 5 minutos. Pasado ese tiempo se retiró y se midió la longitud de la tira humedecida con la lágrima utilizando una regla graduada en milímetros (mm).

Evaluación del TRP

Se instiló una gota de fluoresceína sódica al 0,5% (Laboratorios Poen, Buenos Aires, Argentina) en saco conjuntival inferior. Luego de inducir un parpadeo con el fin de lograr la adecuada dispersión sobre la superficie corneal de la película lagrimal teñida con fluoresceína (tiempo cero), 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. Se grabó un video y mediante un programa de edición (Filmora Video Editor, Wondershare™, EE.UU.), se obtuvieron las imágenes correspondientes.

Evaluación del TRP luego de la aplicación de agentes detergentes

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de la película lagrimal luego del agregado de agentes detergentes, se realizó el mismo procedimiento que se describió arriba, pero esta vez se instiló una gota de solución jabonosa (shampoo Johnson's® diluído 1:10) inmediatamente después del agregado de la fluoresceína sódica. Las imágenes fueron registradas de la misma manera que se detalló anteriormente.

Estudios *in vitro*

Estudio de los anexos oculares

Se sacrificaron 6 cobayos (tres pigmentados y tres albinos) utilizando una sobredosis de ketamina (> 200 mg/ kg de peso, IM; FADA Pharma, Buenos Aires, Argentina). Se extrajeron y procesaron párpados, glándulas lagrimales y cigomáticas, conjuntiva y carúncula para realizar estudios de MO.

Microscopía óptica

Los distintos tejidos fueron fijados en formol al 10% v/v en buffer fosfato salino (PBS) por 24 horas, deshidratadas

y embebidas en tacos de parafina. Se obtuvieron cortes de 6 μm y se montaron en vidrios, dejándose secar toda la noche a 37°C y luego se tiñeron con Hematoxilina Eosina (HE) de acuerdo a la técnica descrita por Pearse (159).

Se tomaron fotos de los cortes histológicos teñidos con HE de cada uno de los tejidos mencionados con un microscopio Nikon Eclipse TE-2000U (Nikon, Tokio, Japón).

Estudios de la composición lipídica en lágrimas

Recolección de las muestras

Se realizó bajo campana previamente desinfectada con solución de 10% de hipoclorito de sodio y luego etanol al 70%. Los cobayos se colocaron en cajas para traslado de animales limpias, con aserrín autoclavado; sus ojos y párpados fueron lavados con solución fisiológica estéril. Luego del lavado, se esperó 15 minutos antes de la toma de muestra, y fueron ligeramente sedados con ketamina 30 mg/kg IM. Las lágrimas se recolectaron con tubos estériles micro-capilares de vidrio de 10 μL de capacidad (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, EE.UU.) desde el saco conjuntival inferior y se colocaron en tubos Eppendorf limpios y autoclavados. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su uso.

La relevancia de la limpieza, desinfección y manipulación antes, durante y luego de extraer las muestras, tanto de los animales como del material que se utiliza, es necesaria para evitar la contaminación de las lágrimas extraídas con lípidos no provenientes de las mismas.

Cromatografía en capa delgada

Se empleó un volumen de aproximadamente 110 μl de lágrimas. Los lípidos fueron extraídos empleando una mezcla de cloroformo/metanol en una proporción de 2:1. El sistema final bifásico fue centrifugado y la fase inferior recolectada en un vial de vidrio limpio (fase lipídica); el solvente se secó utilizando N_2 . Los lípidos fueron resuspendidos en 20 μl de cloroformo/metanol 2:1 y éstos fueron empleados para el fraccionamiento en placas de sílica gel 60 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las muestras fueron corridas para lípidos polares y no polares. La composición del eluyente para lípidos polares fue: cloroformo/metanol/agua 65:25:2. Para lípidos no polares se utilizó hexano/éter etílico/ácido fórmico en proporción 70:30:3. Luego de la separación, las placas fueron

reveladas con vapores de yodo. Los lípidos fueron detectados por inspección visual, e identificados con el uso de estándares lipídicos apropiados: PC y PE para lípidos polares y ácido graso (ácido oleico), 1,2 y 1,3 diacilglicerol (1,2 y 1,3 DAG) y triacilglicerol (TAG) para lípidos no polares (todos de Avanti Polar lipids, Alabaster, AL).

Identificación y cuantificación de lípidos mediante espectrometría de masa:

La extracción de lípidos, espectrometría de masas y cuantificación se realizaron de la misma manera que la descrita previamente en el capítulo I. Los estándares utilizados en este caso fueron: 1,2-ditridecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PC), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PE) y 1,3 di-(6 z -octadecenoil)-2-(9 z -octadecenoil)-*sn*-glicerol (TAG).

Caracterización de ALDH

Extractos corneales

Se sacrificaron 10 animales utilizando una sobredosis de ketamina (ver más arriba), las córneas fueron extraídas y, en el caso correspondiente, las células epiteliales, así como las células endoteliales, se obtuvieron por raspado con bisturí estéril. Las células epiteliales o endoteliales que pudieron haber quedado fueron removidas usando un hisopo de algodón embebido en etanol al 20%, seguido de un lavado con PBS 1X. La pureza de las células epiteliales o endoteliales y del estroma fue confirmado por estudios histológicos. Córnea total, así como células epiteliales, células endoteliales y trozos de estroma, fueron homogenizados manualmente en 500 μ l (córnea total) o 200 μ l (epitelio, estroma, endotelio) de buffer de lisis conteniendo 25 mM Tris, 0,25M sucrosa (pH 7,4), 0,5 μ g/ml leupeptina, 0,5 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml pepstatina, 100 μ g/ml fenilmetanosulfonil fluoruro (Sigma, St. Luis, MO, EE.UU.) y Triton X-100 (Anedra, Buenos Aires, Argentina). Los lisados fueron sonicados por 5 s en hielo (Labsonic 1510 B-Braun, Melsungen, Alemania), luego enfriados en hielo por 5 s; este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente los lisados fueron centrifugados a 12.000 g durante 10 min a 4°C y las fracciones sobrenadantes fueron usadas inmediatamente o de lo contrario se almacenaron a -80°C hasta su uso. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford empleando albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés) como estándar.

SDS-PAGE y Western blot (WB)

Para investigar la presencia de ALDH3A1 y ALDH1A1 en córnea total, así como en los extractos

de los distintos compartimientos corneales, 30 µg de proteínas de los homogenatos de epitelio o estroma, y 60 µg de proteínas de homogenato de células endoteliales sin agentes reductores fueron sujetos a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida 12,5% y luego teñido con Azul brillante Coomassie R-250 para obtener el perfil de proteínas corneales o procesado para WB. Se incluyeron marcadores de peso molecular en cada procedimiento (Bio-Rad, Richmond, EE.UU.).

Para el análisis por WB, luego de la corrida electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue subsecuentemente incubada con buffer de bloqueo (50 mM Tris/150 NaCl, pH 7,5, conteniendo 0.1 % Tween-20 y 5 % leche descremada) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron las membranas con anticuerpo (Ac) policlonal de pollo anti ALDH3A1 de ratón (obsequio del Dr. Vasilis Vasiliou, Departamento de Ciencias de la Salud y Medio Ambiente, Yale School of Public Health, New Haven, CT, EE.UU.) a una dilución de 1:2.500 o Ac policlonal de conejo anti ALDH1A1 (ab23375, Abcam Inc., MA, EUU.) a una dilución de 1:2.000, como Ac primarios durante toda la noche. Las proteínas ALDH3A1 y ALDH1A1 fueron visualizadas usando Ac secundarios (conejo anti pollo, o carnero anti conejo, respectivamente) conjugados con peroxidasa (a una dilución de 1:5.000 cada uno) durante 1 h. Finalmente la presencia de ALDHs fue detectada por quimioluminiscencia (Pierce ECL, Thermo Fischer Scientific, IL, EE.UU.). Se usó actina como control, y un Ac policlonal de conejo anti actina conjugado con peroxidasa se utilizó para detectarla (1:5.000, Santa Cruz Co., CA, EE.UU.). El valor de densidad óptica (DO) de cada banda de proteína fue determinado luego de que las bandas fueron escaneadas y digitalizadas usando el software Gel Pro Analyzer 3.2.

Inmunofluorescencia (IF)

Se realizaron estudios de IF en secciones congeladas de 8 µm de espesor de córnea de cobayo, las cuales fueron inicialmente fijadas con paraformaldehído 2% (en PBS), luego enjuagadas y permeabilizadas con acetona fría. Los tejidos fueron rehidratados e incubados con 1% de BSA en PBS durante 30 min. Las secciones fueron incubadas durante una hora con Ac policlonal de conejo anti ALDH3A1 o Ac policlonal de conejo anti ALDH1A1 (ab76976, o ab23375 de Abcam Inc., MA, EE.UU., respectivamente), ambos diluidos 1:100 en PBS. Luego los tejidos fueron lavados y teñidos con Ac de carnero anti conejo IgG (H+L) marcado con Alexa Fluor®488 (Molecular Probes®, Life Technologies, NY, EE.UU.), seguido de co-tinción con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para identificar los núcleos. Las secciones de tejido fueron evaluadas usando un microscopio confocal Olympus FluoView™ FV1000, (Olympus America Inc., Center Valley, PA, EE.UU.).

Determinación de la presencia de isoformas para ALDH3A1 y ALDH1A1

Las isoformas de las enzimas fueron determinadas mediante el uso de geles para isoelectroenfocado con gradiente de pH de 3-10 (Bio-Rad, CA, EE.UU.). La visualización de la actividad de ALDH3A1 se realizó por incubación del gel en una solución conteniendo benzaldehído y NADP⁺ como cofactor enzimático. La reducción de NADP⁺ a NADPH por la acción de la enzima se observó como bandas azules (producto de reacción formazán) (160). La visualización de ALDH1A1 se realizó mediante WB, como se describió previamente.

Análisis estadístico

Se calculó por separado la media y la DE de los resultados de los distintos test, para cada ojo (ojo derecho (OD) y ojo izquierdo (OI)) y si la diferencia entre OI y OD no era significativa, teniendo en cuenta una $p < 0,05$, se calculó una nueva media y DE para ambos ojos.

Los datos de los diferentes tests fueron analizados mediante el test *t* de Student apareado. El nivel de significancia establecido fue de una $p \leq 0,05$ para todos los ensayos.

RESULTADOS

Estudios *in vivo*

Debido a que en estos estudios no se observó diferencias significativas entre cepas, y OD u OI de los animales empleados, los resultados se presentan como la media \pm DE de todos los ojos estudiados.

Evaluación de la superficie ocular

El estudio de **frecuencia y tipo de parpadeo** indicó que los cobayos parpadean tanto de forma completa como parcial, siendo más frecuente esta última modalidad. La frecuencia y tipo de parpadeos por minuto (parpadeos/min) fueron:

Parpadeos totales = $2,35 \pm 0,87$ parpadeos/min.

Parpadeos completos = $0,68 \pm 0,43$ parpadeos/min.

Parpadeos parciales = $1,49 \pm 0,75$ parpadeos/min.

La FP de estos animales es 5 veces menor que en humanos (**tabla 6**).

La respuesta palpebral frente a diferentes estímulos sensoriales fue escasa. Frente a la estimulación cutánea dolorosa, no se observaron parpadeos. Frente a los estímulos auditivos fuertes

(voz viva) la respuesta fue de parpadeos completos. En el caso de estímulos auditivos suaves (chasquido de dedos) la respuesta de los párpados fue parcial. En cuanto al estímulo del soplido directo, cuando se realizó de forma enérgica, la respuesta fue parcial, y cuando se realizó en forma suave la respuesta fue completa.

Test	Cobayos	Humanos
Medida de la profundidad de saco conjuntival inferior	3,33 ± 0,52 mm	8 mm
Altura menisco lagrimal inferior	0,206 ± 0,059 mm	0,277 ± 0,033 mm
FP	2,35 ± 0,87 parpadeos/min	15 parpadeos / min
STT	8,14 ± 1,86 mm/ 5 min	11,9 ± 6,79 mm / 5 min
TRP	2 – 3 min	10 - 15 seg

Tabla 6: Resultados comparativos en cobayos y humanos de los tests utilizados para evaluar la superficie ocular.

Cuando se evaluó la *dinámica del sueño*, se comprobó que los cobayos no poseen hábitos nocturnos como muchos roedores, y duermen por períodos cortos. A menudo no cierran completamente los ojos, a menos que se sientan muy relajados (aún entonces no es muy frecuente) (**figura 19**).



Figura 19: Estudio de la dinámica del sueño. Entre la hora 22 y la hora 24, algunos cobayos se mantienen activos (círculo rojo), mientras que otros están durmiendo (círculo amarillo) (A). Pasadas la hora 24, la mayoría de los cobayos se encuentran durmiendo, con los párpados semi o completamente cerrados (B).

La **medición de la profundidad de fondo de sacos conjuntivales** dio los siguientes resultados: fondo de saco superior = 5,00 mm \pm 0,82 mm. Fondo de saco inferior = 3,33mm \pm 0,52mm. Así mismo, **la medición del menisco lagrimal inferior** (mediante OCT Visante), el cual se considera un parámetro indicativo del volumen lagrimal que se acumula principalmente en el saco conjuntival inferior, dio como resultado = 0.206 mm \pm 0.059 mm; 1,3 veces menor que la del humano (ver **tabla 6**).

Se evaluó la **secreción lagrimal** mediante el TS- II y el valor obtenido fue de 8,14mm \pm 1,86mm/5 min, y en humanos fue de 11.9 \pm 6.79 mm /5 min (**tabla 6**)

El **TRP** fue de 2-3 min, mientras que en humanos fue de 10-15 seg (**tabla 6**). Luego del agregado de solución detergente se observó una desaparición del patrón habitual de tinción con fluoresceína, lo que indicaría que la composición lipídica de la película lagrimal tendría un rol muy importante en la estabilidad de la misma (película lagrimal) (**figura 20**).

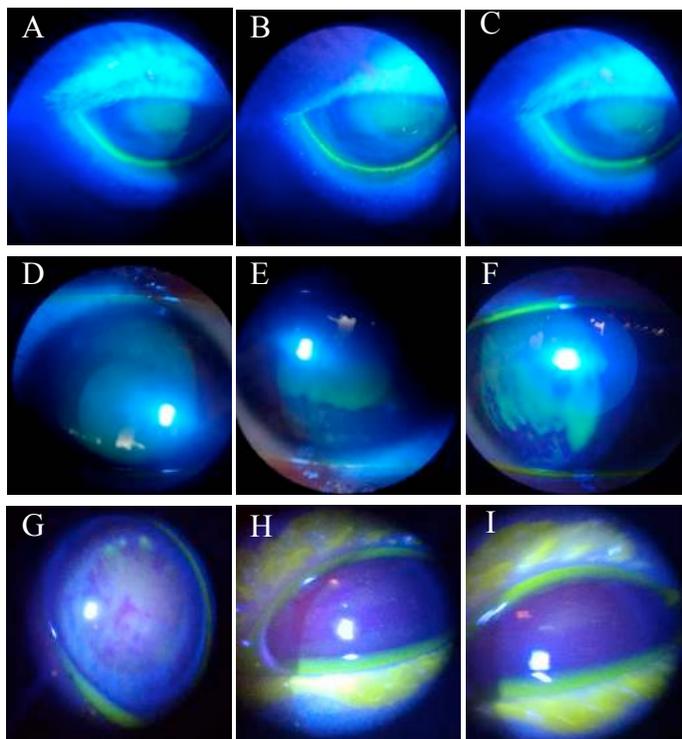


Figura 20: TRP en cobayos y humanos. **A)** TRP en cobayos al inicio del test, en **B)** a los 2 min y en **C)** a los 3 min posteriores a la instilación de fluoresceína. No se observó disrupción de la película lagrimal. En humanos (**D**), al segundo de agregada la fluoresceína), **E)** a los 2 s y **F)** a los 3 s; se observó una rápida ruptura de la película lagrimal. TRP con el agregado de solución detergente, en cobayos. En **G)** al momento de iniciar la medición, **H)** luego del agregado del detergente se observa una rápida desaparición de la película lagrimal teñida, en **I)** 1s después.

Estudios *in vitro*

Estudio histológico de los anexos oculares

Como se muestra en la **figura 21**, por MO se observó que los párpados (tanto superior como

inferior) están compuestos de piel que presenta anexos pilosebáceos (**figura 21 B #**). Los bordes palpebrales internos presentan células de tipo caliciforme (**insert figura 21 A**). También se observan glándulas cilíndricas simples o glándulas de Meibomio, con áreas pseudoestratificadas (**figura 21 A***).

La conjuntiva que tapiza los párpados (conjuntiva palpebral) presenta un epitelio plano estratificado sin capa córnea, con glándulas cilíndricas. Se observa un ganglio linfático (**figura 21 C**). La conjuntiva bulbar está constituida por epitelio plano estratificado y cilíndrico pseudoestratificado, y también se aprecian células de tipo caliciformes (**insert figura 21 D**).

La carúncula, pequeña protuberancia rojiza que ocupa el espacio triangular que forman los bordes internos de los párpados superior e inferior, presenta un tejido plano estratificado sin capa córnea, y tejido linfoide (foliculo linfoide) (**figura 22 A*, B**).

Rodeando al globo ocular y en contacto con la órbita ósea, se encuentra la glándula lagrimal (**figura 22 C**). Se puede dividir de acuerdo a su posición alrededor de ésta, en glándula lagrimal superior, inferior y profunda. Histológicamente presenta acinos glandulares, conductos excretores intralobulillares y tejido conectivo interpuesto (**figura 22 D**).

Alrededor del globo ocular se encontró una glándula que no está presente en humanos, denominada glándula salival cigomática (**figura 22 E**). Al microscopio óptico presenta estructuras glandulares de tipo exócrino y glándulas de tipo mucinoso (glándula mixta) (**figura 22 F**). Sus secreciones son vertidas al sistema digestivo del animal.

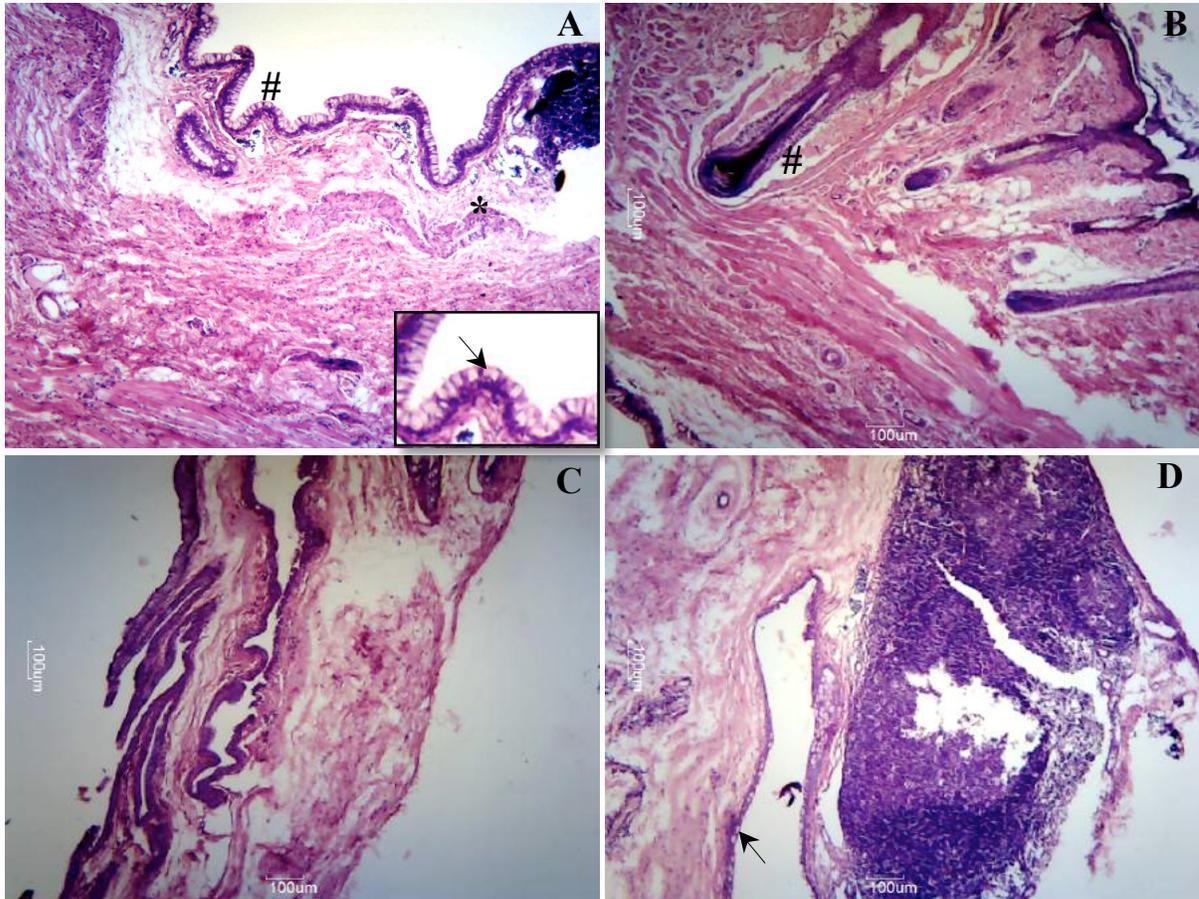


Figura 21: MO con tinción de HE de anexos oculares de cobayos. Corte transversal de párpado donde se observa un glándula de meibomio (A*), la presencia de células caliciformes en el epitelio del borde palpebral (**inserto en A de #, flecha**), y anexos pilosebáceos (B#). Conjuntiva (C y D), con presencia de células linfoides y células caliciformes (**flecha**). Magnificación: 40X, excepto C: 10X

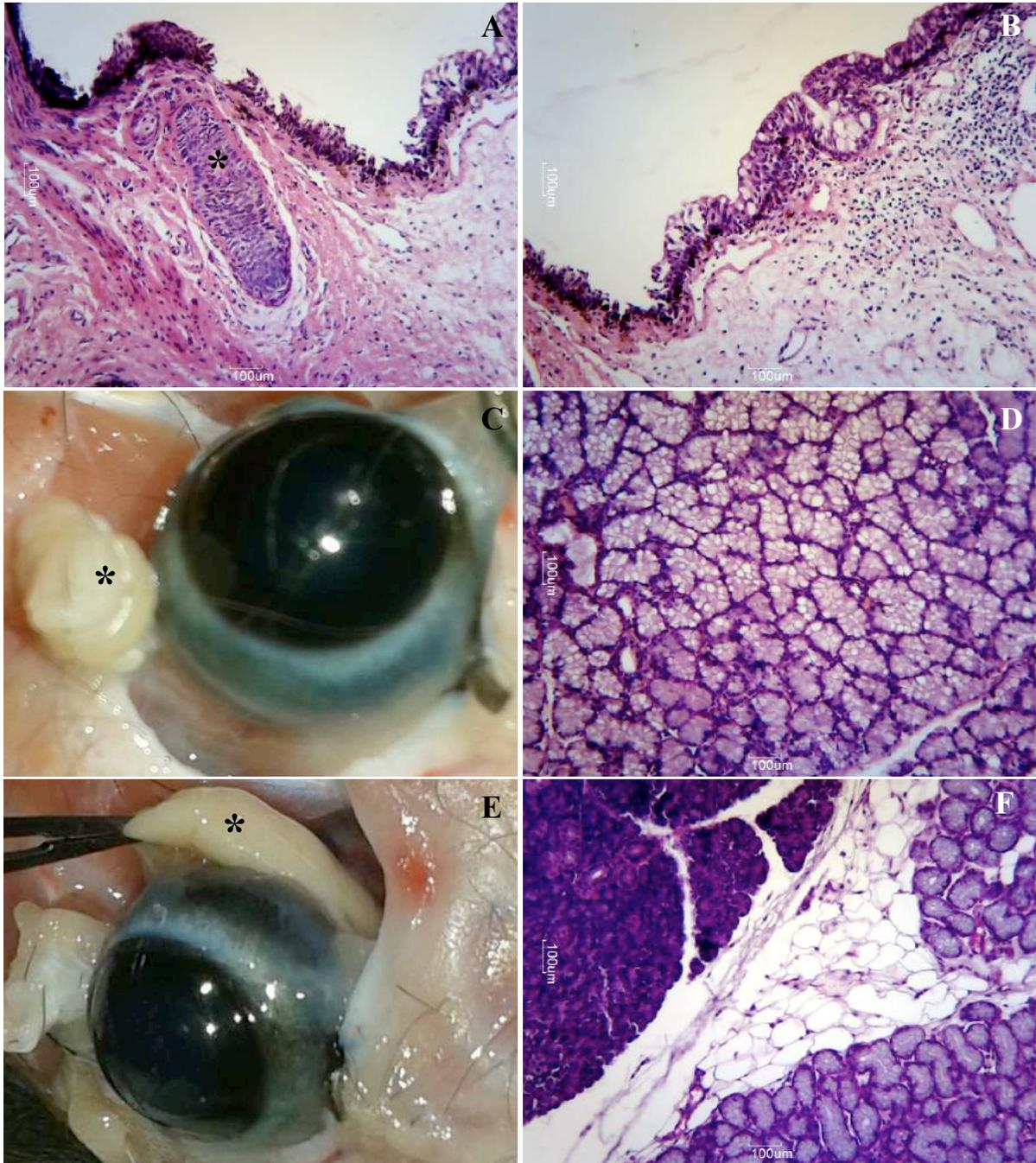


Figura 22: MO con tinción de HE de anexos oculares de cobayos. Carúncula (A y B), presenta tejido linfoide (A*). Glándula lagrimal inferior (C*) e histología de la misma donde se observan los acinos glandulares y conductos excretores intralobulillares (D). Glándula salival cigomática (E), y su estructura histológica de glándula mixta (F).

Estudios de la composición lipídica en lágrimas

Cromatografía en capa delgada

Para obtener una primera aproximación acerca de la composición lipídica en lágrima de cobayo, se realizó cromatografía en capa delgada. Se realizaron dos conjuntos de cromatografías: una para lípidos polares y otra para no polares. En el caso de los lípidos polares se observó una banda, bien marcada, que correspondería a fosfatidilcolina. El análisis de los lípidos polares mostró bandas que migran de manera compatible a ácido graso (ácido oleico), 1,2 y 1,3 DAG y TAG, ésta última banda más fuerte que el resto (**figura 23 A**).

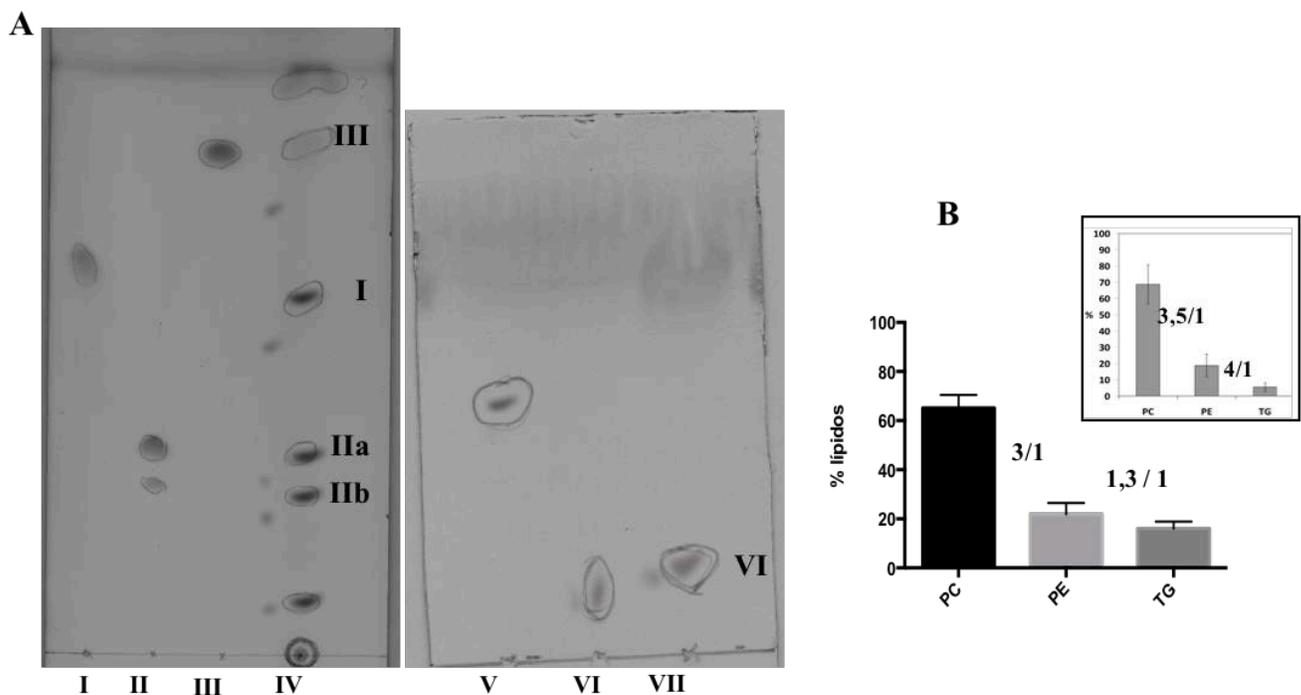


Figura 23: Imagen representativa de cromatografía en capa delgada para lípidos no polares y polares, respectivamente (**A**) y porcentaje de la composición lipídica del film lagrimal en cobayos (**B**). El inserto en **B** muestra la composición de lípidos de lágrima en humanos (extraído de Holopainen y col, 2011). **I:** ácido graso (ác. oleico); **II:** 1,2 y 1,3 DAG; **IIa:** 1,3 DAG; **II b:** 1,2 DAG; **III:** TAG; **IV:** muestra. **V:** PE; **VI:**PC; **VII:** muestra.

Identificación y cuantificación de lípidos mediante espectrometría de masa

La **figura 23 B** muestra la composición porcentual de los lípidos más abundantes encontrados en lágrima de cobayo. Los lípidos polares representan casi el 100% de los lípidos identificados (~65%

para PC y ~25% para PE) mientras que TAG constituye ~ 16% de la composición lipídica de la lágrima.

Caracterización de ALDH

La **figura 24** muestra los perfiles de proteínas correspondientes a un extracto de córnea de cobayo y a un extracto de córnea de ratón utilizado como control, cuando se realizó una corrida electroforética en SDS-PAGE. Aunque el perfil de proteínas es distinto, se observó una banda de aproximadamente 54 kDa en ambas especies. El estudio de WB mostró la presencia de ALDH3A1 y ALDH1A1 en córnea de cobayo, identificando y describiendo por primera vez la presencia de ambas enzimas en la córnea de estos animales. Las enzimas tienen un peso molecular de ~ 54kDa (**fig 24**). La **figura 25A** muestra un ensayo de WB representativo en donde se observa la presencia de ambas enzimas en epitelio, estroma y endotelio de córneas de cobayos.

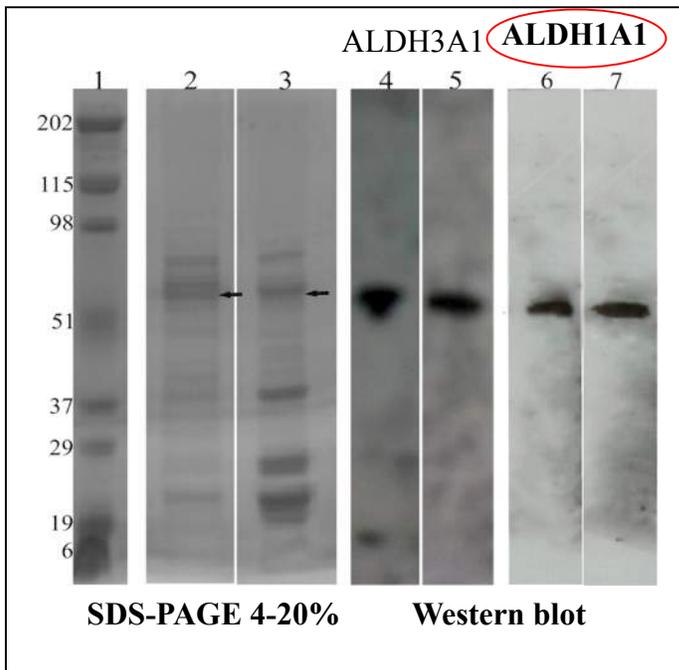


Figura 24: Las proteínas de los extractos corneales fueron separadas mediante SDS-PAGE (4-20%) y teñidas con azul brillante Coomassie. Línea 1: marcador de peso molecular (los valores en kDa se indican a la izquierda); línea 2: proteínas de córnea de ratón; línea 3: proteínas de córnea de cobayo. Una banda de 54 kDa se observó en ambas especies (flechas). Análisis de los extractos corneales mediante WB, de ratón, (línea 4); de cobayo (línea 5) usando Ac. de pollo anti ALDH3A1 como anticuerpo primario y nuevamente de ratón (línea 6) y cobayo (línea 7) usando Ac. de conejo anti-ALDH1A1 como anticuerpo primario.

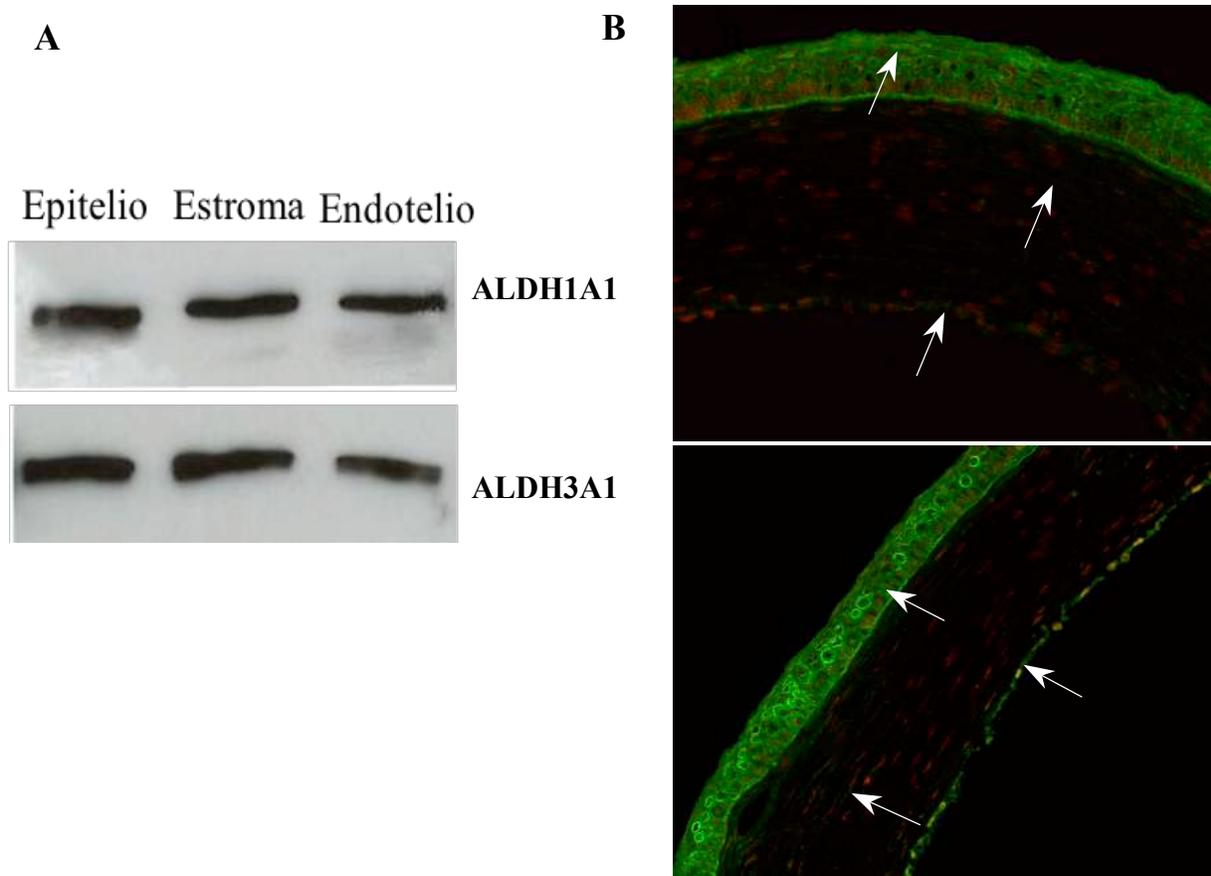


Figura 25: Análisis mediante WB de compartimentos corneales de cobayo: epitelio, estroma y endotelio usando Ac. de pollo anti-ALDH3A1 (línea superior) o Ac. de conejo anti-ALDH1A1 (línea de abajo, como anticuerpos primarios (A). Localización de ALDH3A1 y ALDH1A1 en cornea de cobayo (B). Inmunofluorescencia para ALDH3A1 (verde) en secciones de cornea de cobayo (8 μ m), mostrando tinción positiva para esta enzima en epitelio, estroma y endotelio (flechas, fotografía superior) y tinción inmunofluorescente para ALDH1A1 (verde), siendo positiva también en los tres principales compartimentos corneales (flechas, fotografía inferior). Las secciones fueron co-teñidas con DAPI (rojo) para identificar los núcleos. Magnificación: 200X.

El patrón de expresión de ALDH3A1 y ALDH1A1 en los distintos compartimientos de la córnea de cobayos fue estudiado mediante inmunofluorescencia, y como se aprecia en la **figura 25B**, ambas enzimas fueron detectadas en las células de epitelio, estroma y en la monocapa de células endoteliales.

Los estudios realizados mediante isoelectroenfocado detectaron dos isoenzimas para ALDH3A1, con valores de punto isoeléctrico (pI) de \sim 10, y una sola especie para ALDH1A1 con un pI de \sim 9 (**figura 26**).

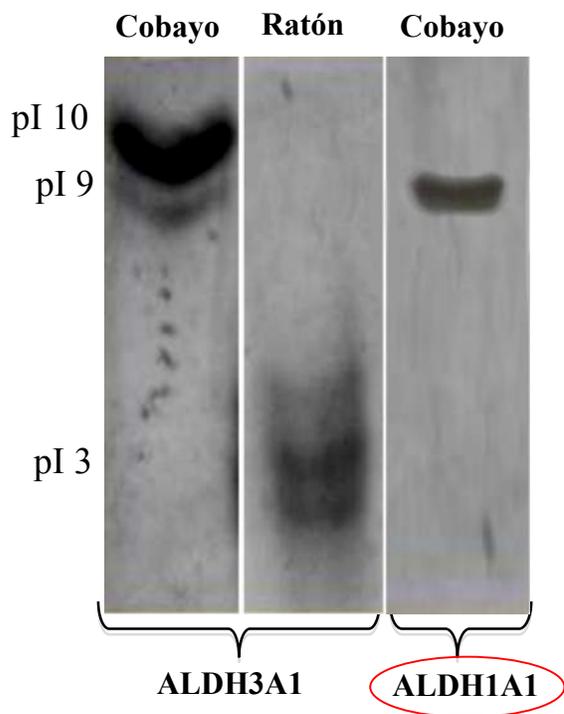


Figura 26: Isoformas obtenidos para las enzimas ALDH3A1 y ALDH1A1, mediante isoelectroenfocado de extractos corneales. Línea 1: ALDH3A1 mostró dos isoenzimas a un pI de 10. Línea 2: en ratón, la misma enzima presenta tres bandas a un pI de 3. Línea 3: ALDH1A1 mostró una isoforma en córnea de cobayo, a un pI de 9.

DISCUSION

El mecanismo de parpadeo protege a la superficie ocular contra estímulos nocivos externos, y permite la distribución de la lágrima sobre la superficie ocular manteniendo el espesor fisiológico de la película pre-corneal. El parpadeo juega un rol importante en el mantenimiento de la integridad de la superficie ocular mediante el mantenimiento de la humedad, drenaje de las lágrimas, secreción de lípidos de las glándulas de Meibomio y la distribución de éstos sobre la película lagrimal (161-162). En humanos, se considera una FP normal aquella comprendida entre 10-16 parpadeos/minuto (163). Como mencionamos en la discusión del capítulo I, la FP informada en algunas especies es la siguiente: en perros es de 3-5 veces/min; en gatos: 1-5 veces/min; caballos: 5-25 veces/min; vacas: 5 veces/min; y en cerdos 10 veces/min (164). Nosotros informamos que en ovejas la FP es de 7-15 veces/min, y que ovejas expuestas a condiciones ambientales extremas parpadean más que aquellas que pastan en regiones con clima más favorable (165). En el caso de cobayos, el único registro de FP es el de las mediciones realizadas por Trost y col., quienes encontraron que estos roedores parpadean entre 2-5 veces cada 20 min (141). Nuestras mediciones mostraron que la FP en cobayos es de 0-5 parpadeos/minuto. De éstos parpadeos, un tercio fueron parpadeos completos y dos tercios fueron parpadeos parciales. Existen tres tipos de parpadeo: espontáneo endógeno, el reflejo (ambos

involuntarios), y el parpadeo voluntario. El parpadeo reflejo representa una respuesta a diferentes estímulos: trigeminal, visual y acústico; y el parpadeo espontáneo ocurre inconscientemente en ausencia de estímulo evidente (166). En nuestro trabajo, cuando enfrentamos a los cobayos a estímulos auditivos o sensitivos, éstos respondieron escasamente, con algunos parpadeos parciales y prácticamente ningún parpadeo total. En humanos, la FP aumenta frente a ansiedad, fatiga visual, privación del sueño, entre otras (167). Una disminución en el parpadeo se observa durante la lectura, o cuando los ojos están concentrados en un texto o video; mientras más difícil sea la actividad realizada por el ojo, mayor es la inhibición del parpadeo (168). Nosotros creemos que en el caso de los cobayos, la escasa frecuencia de parpadeo observada en todas las condiciones, se debería, en principio, a la baja sensibilidad corneal que poseen (141), teniendo en cuenta que se postula que este parámetro juega un rol importante en el disparo del parpadeo involuntario (169), sumado esto a un estado de concentración o alerta frente a estímulos externos. Cuando estudiamos la dinámica del sueño observamos que, a diferencia de otros roedores, los cobayos no poseen hábitos nocturnos convencionales, sino que duermen por grupos, durante lapsos de tiempo cortos, cerrando parcialmente los párpados. Esto se correlacionaría con el estado de alerta que dejó en evidencia la baja frecuencia de parpadeo que poseen.

Cuando investigamos la producción lagrimal mediante el TS, no pudimos medir la producción total de lágrima (basal más refleja) mediante el STT-I, debido a la molestia que le produce la tira de papel ubicada en el fondo de saco inferior. Por lo tanto, realizamos el STT-II (con anestesia previa) y obtuvimos un valor de $8,14 \pm 1,86$ mm/5 minutos. En humanos, el STT-II fue de $11,9 \pm 0,79$ mm/5 minutos. Distintos grupos de investigación han reportado diversos valores para este test en cobayos: $0,43 \pm 1,29$ mm/min fue informado por Trost y col., Coster y col. reportaron 4 mm/min, mientras que Wieser y col. (141-142, 170). informaron $10,45 \pm 3,27$ mm/min. Los valores encontrados por nosotros se encuentran entre los valores medidos por estos grupos. Estas diferencias en los valores de STT-II podrían atribuirse a diferencias en el fabricante o el diseño de las tiras, o si éstas fueron elaboradas por el propio investigador, en la capacidad de absorción del papel de filtro empleado en la fabricación, o en cómo se llevaron a cabo y se registraron las mediciones. Sería necesario contar con un método estandarizado para medir STT-II en distintas especies en las que se sospecha baja producción de lágrima (< 2 mm/min).

Con el objetivo de evaluar la integridad de la película lagrimal en cobayos se realizó el TRP, método que brinda información de las capas lipídica y mucosa de la lágrima (119). La capa lipídica

ha sido considerada uno de los componentes más relevantes en la lágrima ya que evita la la evaporación y mantiene la estabilidad de la película lagrimal (120-121). Nosotros encontramos un TRP comprendido entre 2-3 min, significativamente más prolongado que el TRP en humanos (10-15 segundos). Hay reportes previos en los cuales señalan un TRP en cobayos de hasta 20 min, revelando así la increíble estabilidad de la película lagrimal en estos animales. Cuando la capa lipídica es inestable, este hallazgo se correlaciona con la inestabilidad que demuestra la película lagrimal, dado que hay un aumento significativo de la tasa de evaporación y el TRP disminuye (120-121). Por lo tanto, se ha sugerido que la secreción deficiente de lípidos en la película lagrimal, conlleva a la deficiencia en la lágrima acuosa demostrando síntomas de ojo seco (120). Para revelar la importancia de los lípidos en la película lagrimal y su estabilidad, en cobayos, realizamos un TRP seguido luego de unos minutos de la instilación de un pequeño volumen de solución detergente. El patrón del film lagrimal, que permaneció inalterable por un período prolongado, desapareció inmediatamente después del agregado del detergente.

Históricamente, tanto el STT como el TRP aquí realizados, así como otros métodos (tinción con fluoresceína, rosa de bengala o verde lisamina) fueron técnicas ampliamente difundidas y establecidas para medir la película lagrimal y como métodos diagnósticos para ojo seco (171-172). La desventaja de éstos métodos es que algunos de ellos son invasivos y modifican el parámetro a medir (173). Para ello se han desarrollado métodos poco o no invasivos, entre los que podemos mencionar: la mensicometría, método indirecto para medir el volumen lagrimal a través de la medición de la altura del menisco lagrimal (174); interferometría, para medir la capa lipídica del film lagrimal (175) y meibometría, que permite determinar los reservorios de lípidos de Meibomio (176). El advenimiento y el uso creciente de OCT en oftalmología, ha permitido la medición de la altura del menisco lagrimal inferior para diagnosticar ojo seco (145, 177). Se sabe que el volumen del menisco lagrimal disminuye durante el evento de ojo seco, y la altura del menisco lagrimal se considera una medida del volumen lagrimal (178). En este trabajo de tesis aportamos datos, por primera vez, de la altura del menisco lagrimal inferior en cobayos y realizamos mediciones de los fondos de saco conjuntivales, utilizando OCT Visante y los comparamos con los valores conocidos en humanos. Si bien la diferencia en las medidas del saco conjuntival es significativa entre cobayos y humanos, no hay diferencia significativa ($p>0,05$) en la altura del menisco lagrimal entre ambas especies.

En este capítulo además se estudió, mediante MO, las características histológicas de distintos anexos oculares, constituyéndose éste en uno de los pocos, sino el único trabajo, en reunir

información de la histología y fisiología de la superficie ocular del cobayo. Encontramos que tanto la histología de párpados como de conjuntiva es similar a la descrita en humanos. Sin embargo, la conjuntiva de cobayo, a diferencia de la humana, presenta agregados de células linfocíticas. Las glándulas lagrimales también son histológicamente similares en cobayos y humanos. También describimos a la glándula salival cigomática, una estructura grande, que presenta estructuras de glándula mixta (secreción endógena y exógena). Gasser y col. (140) rechazan la idea de que exista tal glándula, aduciendo que encontraron una estructura de menor tamaño, común en la mayoría de los roedores, a la que llaman glándula Harderiana y que es encargada, junto a las glándulas sebáceas de la conjuntiva, de producir lípidos que contribuyen a la formación de la capa lipídica de la película lagrimal (179).

También estudiamos la composición lipídica de la lágrima del cobayo, obteniendo una idea general de la misma mediante la realización de cromatografía en capa delgada. Encontramos que de manera semejante a los humanos (146), la lágrima de estos animales consta de lípidos no polares tales como DAG, TAG, ácidos grasos y lípidos polares (PC). Mediante espectrometría de masas, y con el uso de estándares específicos, pudimos determinar la concentración de PC, PE y TAG. Debido a la mayor sensibilidad de esta técnica, fue posible establecer la presencia de PE entre los lípidos polares. Al igual que en humanos, la lágrima del cobayo consta principalmente de PC (~65%), luego de PE (~25 %) y finalmente de TAG (~16%). Demostramos que los lípidos polares forman la mayor proporción de lípidos (PC y PE) seguido de TAG (lípido no polar). La relación de PC/PE en cobayos y en humanos es de 3/1 y 3,5/1, respectivamente, mientras que la relación existente entre PE/TAG es 1,3/1 en cobayos, en humanos es de 4/1. Los fosfolípidos, muy abundantes en el fluido lagrimal, serían necesarios para proveer una “plataforma de organización” para los lípidos no polares en la interface agua-aire (180). La concentración de TAG en la lágrima de cobayo, daría cuenta de la enorme estabilidad de la película lagrimal en estos animales.

Describimos por primera vez la presencia de ALDH3A1 no solamente en el epitelio, sino también en estroma y endotelio de la córnea de cobayo, usando distintas metodologías. Previamente, nuestro grupo había descrito la presencia de esta enzima pero sólo en epitelio corneal (158). La presencia de esta enzima en la córnea es consistente con el rol catalítico propuesto en la detoxificación de aldehídos tóxicos inducidos por RUV, y con un rol directo en la absorción de RUV-B (152, 155, 181-187). En este estudio observamos dos especies de isoenzimas de ALDH3A1 que migran a un pI de aproximadamente 10. Además, claramente demostramos la expresión no sólo

de ALDH3A1, sino también de ALDH1A1 a niveles similares en los tres compartimientos corneales del cobayo, pero solamente una isoenzima con un pI de aproximadamente 9. Debido a que se sabe bien que, tanto ALDH3A1 como ALDH1A1, protegen la córnea, y por lo tanto las demás estructuras oculares del daño producido por la RUV, nosotros identificamos, caracterizamos molecularmente y mostramos la localización tisular de estas enzimas en cobayos normales para luego estudiar el rol de las mismas en modelos experimentales de exposición a RUV-B, distintas dietas y erosiones corneales.