

**Objetivo específico III:**

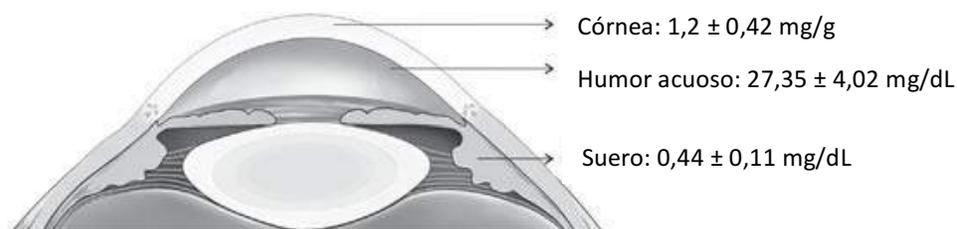
**Estudiar los efectos de condiciones ambientales desfavorables (erosiones corneales, exposición a RUV-B y dieta deficiente en ácido ascórbico (AA)), durante un período prolongado de tiempo (30 meses) en córneas de cobayos.**

## INTRODUCCIÓN

Cierto número de especies, como algunos peces, aves paseriformes, murciélagos, primates, humanos y cobayos, han perdido su capacidad de sintetizar vitamina C o AA debido a la ausencia de la enzima L-gulono- $\gamma$ -lactona oxidasa, resultado de mutaciones en su gen (230). Consecuentemente, esta vitamina debe ser incorporada con la dieta para que estos animales puedan sobrevivir.

La córnea tiene altas concentraciones de AA. Esto es debido a un mecanismo de transporte activo desde el plasma al humor acuoso a través del cuerpo ciliar. Subsecuentemente, el AA es activamente acumulado en el endotelio a más altas concentraciones que en el humor acuoso, para finalmente alcanzar el estroma y epitelio (2).

La concentración de este poderoso agente antioxidante en el epitelio corneal humano es extremadamente alto (**figura 40**). Esto es debido probablemente a que altos niveles de AA protegen a la capas más profundas de la córnea y a las estructuras oculares posteriores de los efectos deletéreos de la radiación ultravioleta (RUV). Además de su rol antioxidante, el AA es un cofactor en la síntesis de colágeno, ya que es necesario para la hidroxilación de prolina y lisina, los cuales permiten la formación de fibrillas de colágeno más estables y su asociación con glicosaminoglicanos específicos. Bajos niveles de AA comprometen seriamente las funciones y ultraestructura de diferentes componentes corneales (2).



**Figura 40:** Distribución de ácido ascórbico (AA) en los diferentes compartimentos del segmento anterior de ojo bovino. (Figura extraída de: Serra y col., Vitamin C functions in the cornea: Ultra-structural features in ascorbate deficiency. Chapter 31. In: PReedy VR (ed.). *The Handbook of Nutrition, Diet and the Eye*. London, RU: Elsevier Inc., 2014)

Es conocido que la RUV alcanza distintos componentes oculares (231). La córnea absorbe la RUV diferencialmente, basada en la longitud de onda incidente. Más del 90% de la RUV-C y RUV-B son absorbidas por esta estructura ocular, además de un 60% de RUV-A (232), mientras que el resto de RUV-A es absorbida por el cristalino de modo tal que menos del 1% llega a la retina (155).

La absorción de la RUV tiene el potencial de oxidar a las especies absorbentes en presencia de oxígeno molecular a través de procesos de foto-ionización, los que frecuentemente se mencionan

como foto-oxidación directa (o tipo I). Además, reacciones de foto-oxidación indirecta (tipo II) pueden ocurrir y llevar a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que dañan el ADN celular, proteínas y lípidos (233-234). La RUV-B es la responsable de la mayoría de los daños resultantes de la absorción directa de la luz UV por las estructuras celulares (235, 237). Las proteínas absorben luz UV primariamente a través de transiciones electrónicas del enlace peptídico (190-220 nm) y de los motivos aromáticos de residuos triptófano, tirosina y fenilalanina (250-300nm). Estos residuos, enlaces disulfuro y algunos cromóforos (por ejemplo: NADH/NADPH) también absorben en el rango de UV. Las consecuencias de las modificaciones inducidas por la RUV en las proteínas incluyen: inactivación de enzimas, plegado parcial y agregación no nativa (238). Tales modificaciones pueden ser responsables parcialmente, por ejemplo, del agregado de proteínas en el cristalino y por consiguiente de la formación de cataratas (239).

El ADN es uno de los mayores blancos del estrés oxidativo inducido por RUV, y el ADN modificado puede resultar en mutaciones genéticas o muerte celular (240). Cáncer primario de córnea es un tipo de cáncer raro, confinado a la región limbar conteniendo las células troncales, sugiriendo que la córnea tiene mecanismos efectivos para minimizar el daño a esta macromolécula (155).

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena mediada por radicales libres que una vez iniciada, resulta en el deterioro oxidativo de los lípidos poliinsaturados. Los blancos más comunes son los componentes de las membranas biológicas (241). La peroxidación de lípidos puede alterar la conformación de las membranas, produciendo cambios en la fluidez y permeabilidad, alteraciones de transporte de iones e inhibición de procesos metabólicos. Este proceso está implicado en una amplia variedad de enfermedades tales como la aterogénesis, cataratogénesis, enfermedades neurodegenerativas y retinopatía (242-245). La RUV induce la peroxidación lipídica en muchos tipos celulares incluyendo las células epiteliales de la córnea humana (246). La RUV conduce a la producción de ERO, los cuales inician la peroxidación lipídica, generando eventualmente acumulación de aldehídos tóxicos y reactivos (186). A diferencia de las ERO, los aldehídos son compuestos que tienen, generalmente, larga vida (187). Se han asociado más de 200 especies de aldehídos tóxicos a la peroxidación celular, entre ellos se destacan el 4-hidroxinonal (4-HNE) y malondialdehído (MDA) (247). MDA, un aldehído de bajo peso molecular compuesto de 3 átomos de carbono, es uno de los productos secundarios de la peroxidación lipídica más conocido y se puede utilizar como marcador de injuria de la membrana celular (248). La peroxidación lipídica también puede medirse mediante el estudio de dienos conjugados, gases etano y pentano,

isoprostanos y 4-HNE. Otra forma de medir daño oxidativo es mediante modificaciones en el ADN y proteínas, pero estos marcadores muchas veces pueden ser formados por otras vías, además de la mediada por radicales libres. Por lo tanto, MDA es el indicador de daño oxidativo a células y tejidos por excelencia (248).

El organismo dispone de mecanismos protectores contra el ataque de estos radicales generados, entre los que podemos mencionar a la aldehído deshidrogenasa (ALDH), glutatión peroxidasa y a tres vitaminas: AA, vitamina E y vitamina A.

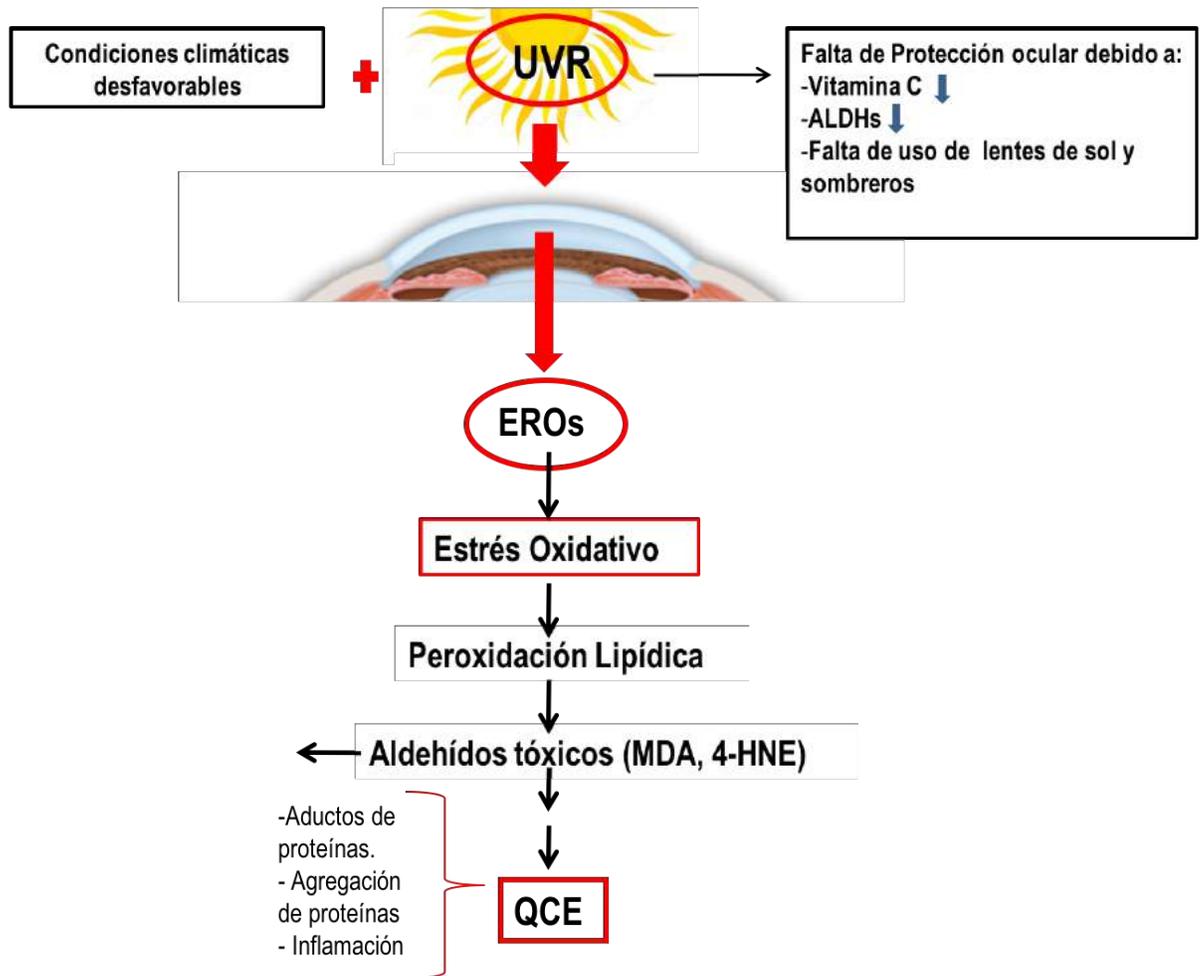
Formando parte de la cámara anterior del ojo, el cristalino y la córnea son estructuras transparentes, avasculares y capaces de refractar la luz hacia la retina, permitiendo enfocar y formar la imagen, además de constituir una barrera protectora. Ambas estructuras están compuestas en más del 50% por proteínas solubles en agua llamadas cristalinas, absorbinas, o transparentinas. Las aldehído-dehidrogenasas (ALDHs) son en parte responsables de las propiedades ópticas en córnea y cristalino en vertebrados e invertebrados, las cuales son diversas y diferentes entre las especies (proteínas taxón-específicas).

ALDH3A1, constituyente de este grupo de cristalinas, es una enzima que se encuentra abundantemente expresada en la córnea humana. En la córnea de mamíferos, la ALDH3A1 desempeña múltiples funciones jugando un papel crítico en la protección contra el estrés oxidativo inducido por la RUV. En esta tesis, previamente describimos por primera vez la presencia de esta enzima en los tres principales compartimentos corneales de cobayo. Como se mencionó anteriormente la ALDH3A1 corneal protege contra estrés oxidativo inducido por la RUV, a través de una variedad de funciones biológicas tales como el metabolismo de los aldehídos tóxicos producidos durante la peroxidación de los lípidos celulares, la generación de los antioxidantes (NADPH), la absorción directa de la RUV y la compactación de las ERO. Además de ser considerada una cristalina, la ALDH3A1 contribuye a las propiedades ópticas de la córnea (155).

Otra importante enzima de la familia ALDH es la ALDH1A1, recientemente descrita también por nosotros en epitelio, estroma y endotelio de la córnea de cobayos, con importantes funciones en la detoxificación de aldehídos tóxicos.

En esta parte del trabajo de tesis nos propusimos como objetivo específico investigar los efectos producidos a largo plazo sobre la córnea de cobayos, por algunos factores ambientales agresivos (erosiones corneales repetidas, exposición a RUV-B, y deficiencia en AA) que previamente demostramos predisponen al desarrollo de QCE en humanos (**figura 41**). Mediante la realización de

estudios *in vivo* e *in vitro*, investigamos durante 2,5 años características estructurales y funcionales de la córnea de dichos animales.



**Figura 41:** Participación de componentes ambientales desfavorables en la formulación de la hipótesis de la etiopatogenia de queratopatía climática esferoide (QCE). UVR= radiación ultravioleta; EROs (especies reactivas del oxígeno)

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Veintiséis cobayos hembras, cepa Ssi:AL, provenientes del Bioterio del Instituto Biológico Argentino S.A.I.C, Buenos Aires, Argentina, de aproximadamente 9 meses de edad fueron utilizados en esta parte de la investigación.

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.

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).

### **Grupos Experimentales**

Todos los animales fueron distribuidos en 2 grupos (2 corrales diferentes) dependiendo de la dosis de AA en sus dietas (dieta alta en AA o dieta deficiente en AA, respectivamente) y ambos grupos fueron expuestos a iguales dosis de RUV-B (**figura 42**).

- Grupo con RUV-B y alta dosis de AA (**HAA-UV**)
- Grupo con RUV-B y baja dosis de AA (**LAA-UV**)

La dosis alta de AA fue de 2mg/100gr de peso/ día y la baja de 0,80mg/100gr de peso/ día, suministrada a cada animal por vía oral con una micro-pipeta.

La dosis de RUV-B recibida a diario fue de **0.247 J/cm<sup>2</sup>**, comenzando con 20 minutos diarios, 6 días a la semana, utilizando lámparas UV-B (UVB-313EL, Q-Lab, Westlake, OH, EE.UU.). El tiempo de irradiación se fue ajustando hasta llegar a 60 minutos diarios hacia el final del tratamiento (dos años y medio después), a los fines de contrarrestar el decaimiento de la potencia de las lámparas debido al tiempo de uso, determinada con un radiómetro USB2000+ Fiber Optic Spectrometer (Ocean Optics, Dunedin, FL, EE.UU.).



**Figura 42:** Disposición de los cobayos en dos corrales de acuerdo al tratamiento que reciben (dieta normal o dieta deficiente en ácido ascórbico)

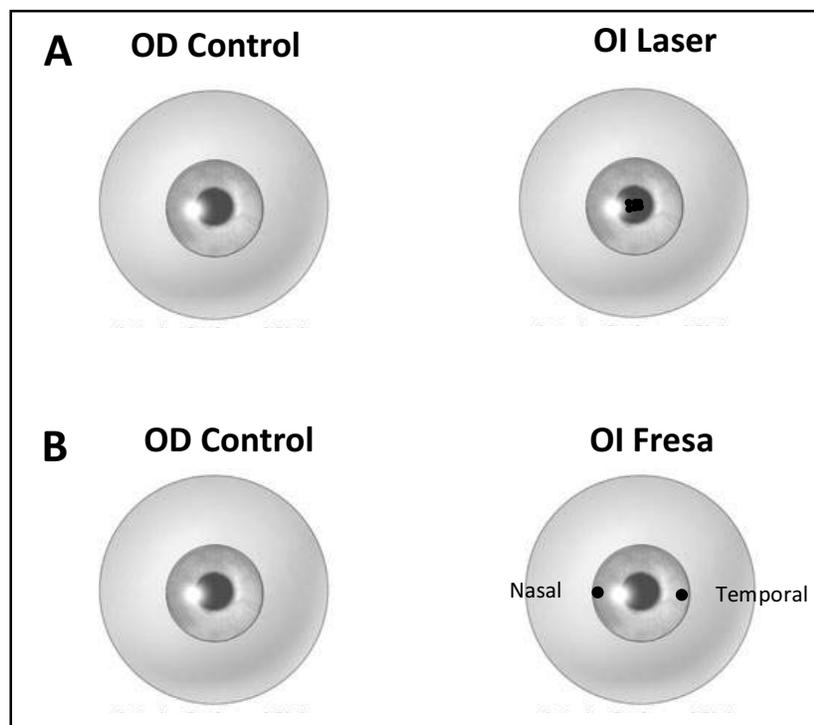
Cada grupo fue subdividido en 2 subgrupos teniendo en cuenta el tipo de erosión corneal que se utilizó (**figura 43**):

1. La córnea del ojo izquierdo (OI) de un subgrupo de animales fue erosionado 1 vez al mes con láser Argón de uso oftalmológico, utilizado con su montaje en lámpara de hendidura (Novus 2000, Coherent, Palo Alto, CA, EE.UU.). La configuración de la aplicación del láser fue la siguiente:
  - 350 mW de potencia;
  - 0,3 segundos de exposición;
  - 50  $\mu\text{m}$  de diámetro cada disparo;
  - 20 disparos centrales.

Dicho ojo fue anestesiado con clorhidrato de proparacaína 0,5% (Anestalcon, Alcon Laboratorios, Buenos Aires, Argentina) tópica previo a la erosión con láser (**figura 43 A**)

2. El OI de otro subgrupo de animales fue erosionado 1 vez a la semana con fresa de 500 micras de diámetro mediante el fresador Algerbrush II (Accutome Inc, Malvern, PA, EE.UU.), también de uso oftalmológico, previa anestesia tópica (Clorhidrato de Proparacaína 0,5%). Las erosiones se realizaron en la zona limbo corneal nasal o temporal de manera puntual, alternando por semana el lugar de la erosión.

La córnea del ojo derecho (OD) fue utilizada como control (**figura 43 B**).



**Figura 43:** Esquema de las erosiones corneales que recibieron los animales durante el desarrollo del modelo experimental. **A)** Córneas tratadas con láser en ojo izquierdo (OI) y **B)** córneas erosionadas con fresa. Los ojos derechos (OD) de ambos grupos no recibieron ninguna erosión y fueron utilizados con control.

A todos los animales antes de comenzar con el trabajo experimental, se les realizó un análisis detallado del segmento anterior con lámpara de hendidura (Led Slitlamp XL-1, Shin Nipón, Ohira Co., Niigata, Japón) que incluyó el examen del borde palpebral, la conjuntiva bulbar y tarsal, la córnea, la cámara anterior y el iris; y se los calificó libres de enfermedades oftalmológicas de la superficie corneal. Durante el desarrollo de este modelo experimental, que duró dos años y medio, se realizaron los siguientes estudios:

### **Estudios *in vivo*.**

#### Evaluación de la superficie ocular.

La superficie ocular fue evaluada con lámpara de hendidura con luz blanca, y además se efectuó tinción con fluoresceína sódica 0,5% (Laboratorios Poen, Buenos Aires, Argentina) en cada ojo, a los fines de evaluar ulceraciones corneales y daños en la conjuntiva bulbar nasal y temporal. La tinción obtenida se calificó en una escala de 0 a 3 unidades arbitrarias (UA), en donde 0 equivale a

no tinción; 1, tinción leve; 2, tinción moderada; 3, tinción severa. Se asume que el tipo de tinción es equivalente al grado de lesión corneal.

Este tipo de evaluación de la superficie de la superficie corneal se realizó una vez por semana durante todo el tiempo que duró este modelo experimental.

#### Evaluación de la sensibilidad corneal.

La sensibilidad de la córnea fue evaluada al inicio del estudio, y luego a los 18 y a los 30 meses, mediante el estesiómetro de Cochet-Bonnet (Luneau, Paris, Francia). La sensibilidad corneal fue cuantificada en una escala de 0-6 (graduada en el estesiómetro, siendo 0 una longitud del monofilamento inferior a 1 cm, y 6 una longitud máxima de 6 cm). Mediciones obtenidas entre 0 y 2 fueron consideradas severa hipoestesia, 3 y 4 moderada hipoestesia, y 5 y 6 sensibilidad corneal normal.

#### Paquimetría.

Consiste en la medición del espesor corneal, y para ello se utilizó el paquímetro a ultrasonido portátil (SP-100, Tomey Corporation, Nagoya, Japón) para medir el espesor corneal (central), instilando previamente en cada ojo una gota de anestésico (clorhidrato de proparacaína 0,5%; Anestalcon®, Alcon laboratorios, Buenos Aires, Argentina). El espesor corneal se midió a los 18 meses y luego a los 30 meses de comenzado el tratamiento.

#### Microscopía confocal.

Para la examinación de la estructura corneal se utilizó el microscopio de barrido confocal (Tomógrafo de Retina Heidelberg II / Rostock Modulo Córnea, Heidelberg Engineering Heidelberg, Alemania). Las imágenes oblicuas y frontales de la córnea se tomaron usando los módulos automáticos y manuales de la cámara. Las imágenes de  $384 \times 384$  pixeles cubrían un área de  $400 \times 400 \mu\text{m}$ , con una resolución óptica transversal de aproximadamente  $1 \mu\text{m}/\text{pixel}$  y un tiempo de adquisición de 0,024 s (Heidelberg Engineering). Previo a la examinación, los animales fueron anestesiados con una dosis (30 mg/kg) intramuscular de Ketamina (FADA Pharma, Buenos Aires, Argentina), y una gota de lágrima en gel (0,2% ácido poly-acrílico, Acrylarm, Laboratorios Poen, Buenos Aires, Argentina) fue aplicada en la superficie corneal, para facilitar el contacto por

inmersión con el objetivo. Los animales fueron ubicados en una plataforma especial de manera tal que el objetivo quedara perpendicular a la superficie de la córnea.

## **Estudios *in vitro***

### Microscopía óptica

Para realizar la MO se procedió de la misma manera que la descrita en el **objetivo II-a** de esta tesis.

### Determinación de los niveles de MMP-9 en epitelio corneal mediante WB.

Se procedió de acuerdo a la metodología descrita en el **objetivo II-b** de esta tesis.

### Actividad de ALDH3A1 en epitelio corneal

La evaluación de la actividad hacia el sustrato fue estudiada mediante espectrometría, utilizando una solución sustrato (0,1M TRIS HCl pH: 8,5, 1mM NADP (Sigma), 10mM del sustrato Benzaldehído) a la cual se le agregó 10µl de la muestra (homogenato epitelial de cada grupo de animales). A 340 nm, y durante 5 minutos, se evaluó la capacidad de reducir NADP<sup>+</sup> a NADPH por acción de la ALDH. La actividad se expresó como nkat/mg proteína pudiéndose definir un nanokatal como la cantidad de enzima requerida para incrementar la velocidad de la reacción en 1 nmol/seg bajo las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se determinó por triplicado para cada muestra.

### Determinación de MDA

Cuantificamos los niveles de MDA mediante la técnica de cromatografía líquida de alta performance (acrónimo del inglés HPLC) (249). Brevemente, las proteínas de los homogenatos de epitelio corneal fueron determinadas por el método de Bradford, y precipitadas con 5% de ácido tricloroacético (TCA). Las muestras fueron tratadas con 0,25 % de ácido tiobarbitúrico (TBA) en 0,5 M de ácido clorhídrico (HCl), por 45 minutos a 90°, luego enfriadas en hielo y analizadas por HPLC en un columna C18 con detección por UV (532 nm). La fase móvil utilizada fue 50 mM de KH<sub>2</sub>PO (pH=6): metanol (65:35), a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Los niveles de MDA fueron calculados a partir de la curva de calibración basada en la hidrólisis ácida de 1,1, 3, 3 –

tetraetoxipropano (TEP, 97%, Sigma Aldrich) con TBA. Los resultados fueron expresados como nmol MDA/mg de proteína (250).

### Análisis estadístico

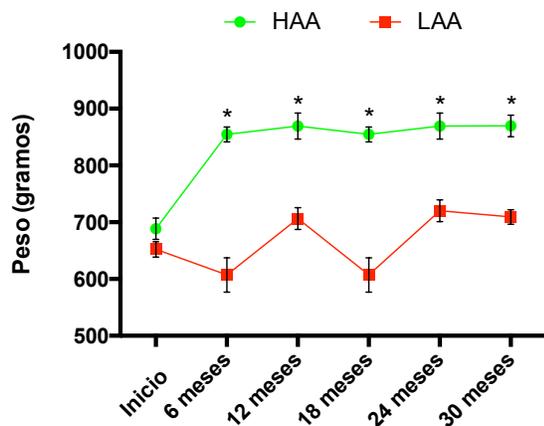
En algunos estudios (sensibilidad y espesor corneal) se calculó por separado la media y la DE para cada ojo (OD y OI), y luego, si la diferencia no era significativa teniendo en cuenta una  $p < 0,05$ , se calculó una nueva media y DE de ambos ojos.

Los resultados expresados como previos y posteriores al tratamiento fueron comparados utilizando el test *t* de Student.

Los resultados fueron comparados utilizando el test ANOVA para comparar entre los grupos, considerando diferencia significativa un valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

El peso de los animales se controló periódicamente, con el objeto de monitorear que la dosis de AA suministrada al grupo LAA fuese lo suficientemente baja para tener una dieta parcialmente deficiente en este micronutriente (como se observa en nuestros pacientes con queratopatía climática esferoidea), pero no tan baja como para producir escorbuto y muerte de los animales. Los cobayos del grupo de dieta baja en AA mostraron una reducción de ~22% de peso con respecto al grupo de dieta alta en AA (**figura 44**), pero no manifestaron síntomas de escorbuto, sólo alteraciones en el pelaje y mínima debilidad muscular.



**Figura 44:** Variación del peso de los animales en gramos en función del tiempo, medido cada seis meses, desde el inicio del tratamiento hasta el final del mismo, 2 años y medio después. HAA= dieta alta en ácido ascórbico; LAA= dieta baja en ácido ascórbico

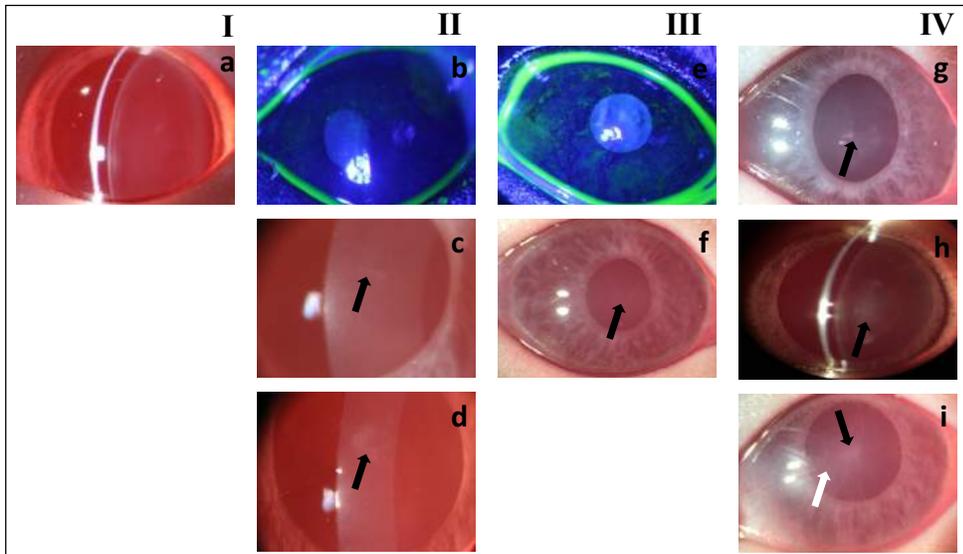
## Estudios *in vivo*.

### Evaluación de la superficie ocular

Al inicio del tratamiento, ambos ojos de todos los animales no presentaron edema, congestión u otra anomalía. El iris, la cámara anterior, el cristalino y el vítreo anterior tampoco mostraron ninguna alteración. Las córneas de todos los animales presentaron leves erosiones epiteliales superficiales (0,5 en la escala arbitraria de 0-3) evidenciadas con la tinción de fluoresceína (**figura 45**).

A los 18 meses post tratamiento, los OD de todos los grupos experimentales no presentaron ninguna anomalía, sólo erosiones epiteliales superficiales leves (1 UA). Tampoco encontramos variaciones muy marcadas en OI de los cobayos de ambos grupos (HAA y LAA) cuyas córneas fueron erosionadas con láser o fresa. Todos los OI presentaron leucomas entre el epitelio y el tercio anterior del estroma (**figura 45**).

A los 30 meses post tratamiento, en OD (control) de todos los animales (OD HAA y OD LAA) fueron frecuentes las opacidades corticales en el cristalino (cataratas); algunos animales presentaron también opacidades corneales sub epiteliales. Con respecto a los OI de los cobayos de ambos grupos (OI HAA y OI LAA) se encontraron a nivel sub epitelial y/o sub epitelial-estromal, opacidades de diferentes formas (radiadas, redondas, ahusadas) y algunas cataratas, la mayoría en OI LAA erosionados con fresa. Los OI de los cobayos del grupo LAA erosionados con fresa presentaron, además, neo-vascularización corneal (**figura 45**).

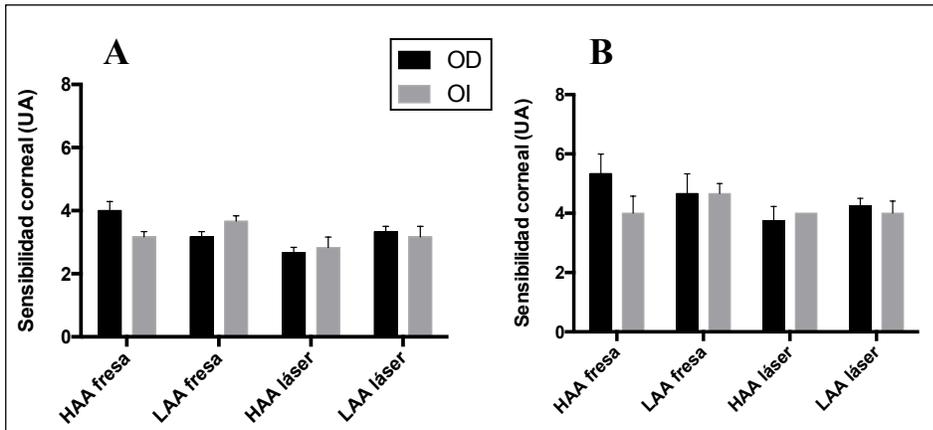


**Figura 45:** Evaluación de la superficie corneal mediante biomicroscopía. **I.a)** al inicio del tratamiento; **II)** 18 meses pos tratamiento, **b)** ojo derecho (OD) con mínimas erosiones, **c)** ojo izquierdo (OI) ácido ascórbico bajo (LAA) láser

y **d)** OI LAA fresa con leucomas (flechas). **III y IV)** 30 meses pos tratamiento, **e)** OD con erosiones epiteliales superficiales y **f)** opacidad corneal (flecha). **g)** opacidades corneales subepiteliales, **h)** cataratas, **i)** opacidad corneal subepitelial-estromal (flecha negra), y neovascularización (flecha blanca).

### Evaluación de la sensibilidad corneal

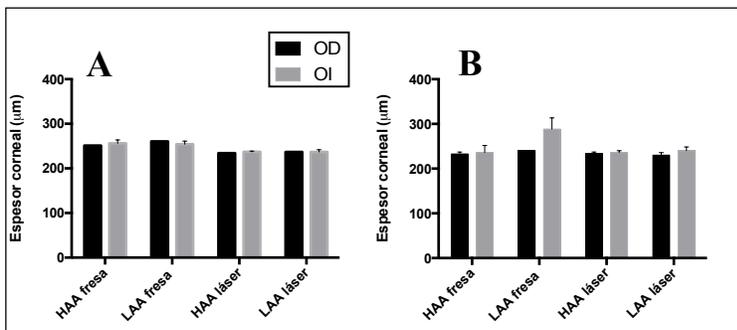
La sensibilidad corneal aumentó a los 30 meses con respecto a los 18 meses post-tratamiento en todos los grupos, aunque no con significancia estadística. Este aumento fue mayor en el grupo tratado con fresa, con respecto al erosionado con láser (**figura 46**).



**Figura 46:** evaluación de la sensibilidad corneal mediante estesiometría **A)** a los 18 meses y **B)** a los 30 meses post-tratamiento. UA= unidades arbitrarias; OD= ojo derecho; OI= ojo izquierdo; HAA= dieta alta en ácido ascórbico; LAA= dieta baja en ácido ascórbico.

### Paquimetría

No hubo cambios significativos en el espesor corneal en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas (**figura 47**).



**Figura 47:** El espesor corneal en **A)** a los 18 meses, o **B)** a los 30 meses pos tratamiento.

## Microscopía confocal

Al inicio del modelo experimental, las córneas de todos los animales presentaron epitelio, estroma superficial y profundo, y endotelio con características normales.

Como se puede observar en la **figura 48**, a los 18 meses post- tratamiento el OD de los animales expuestos a RUV-B del grupo HAA presentaron un epitelio regular, con segmentos circunscriptos aislados de hiperreflectividad superficial. El estroma sub epitelial se observó con aumento de reflectividad y desorganización; se observaron algunos queratocitos activados; resto del tejido normal.

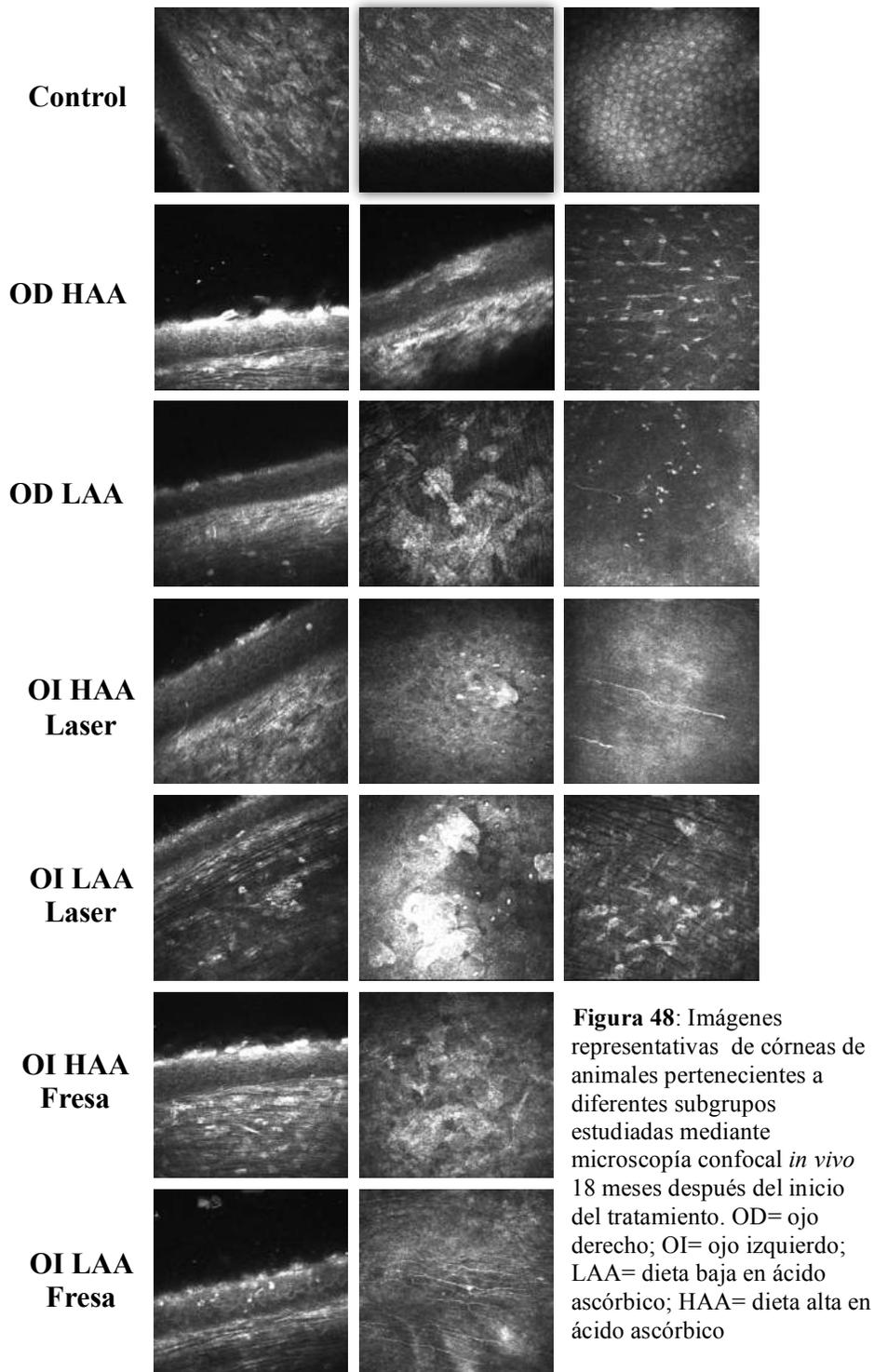
El OD de grupo RUV-B y LAA presentó un epitelio con focos reflectivos superficiales y células inflamatorias. El estroma medio se observó con hiperreflectividad que incluye depósitos lineales y agrupación de queratocitos; el resto de la córnea presentaba un aspecto normal (**figura 48**).

El OI del grupo de animales erosionado con laser (RUV-B y HAA) presentó un epitelio con descamación irregular, aumento del número de queratocitos en el estroma e irregularidad de la matriz extracelular; disminución de nervios del plexo nervioso sub epitelial y sus recorridos acortados. En el caso del grupo LAA, (OI RUV-B y láser) el epitelio se observó normal. En el estroma superficial se presentaron algunos nervios con terminaciones truncas. Se observó un aumento de la reflectividad estromal (**figura 48**).

Para el grupo de animales cuyo OI fue erosionado con fresa, el grupo HAA presentó un epitelio con ciertas zonas de descamación; estroma con aumento de reflectividad y desorganización; el resto del tejido se observó normal. Para los animales con dieta LAA (de OI erosionado con fresa) sólo se observó hiperreflectividad del epitelio superficial. El resto de la córnea se vió normal (**figura 48**).

En la **figura 49** se observa que a los 30 meses post tratamiento, en OD de todos los animales (OD HAA y OD LAA) presentan un epitelio y estroma superficial con focos de hiperreflectividad superficial y agrupación de queratocitos.

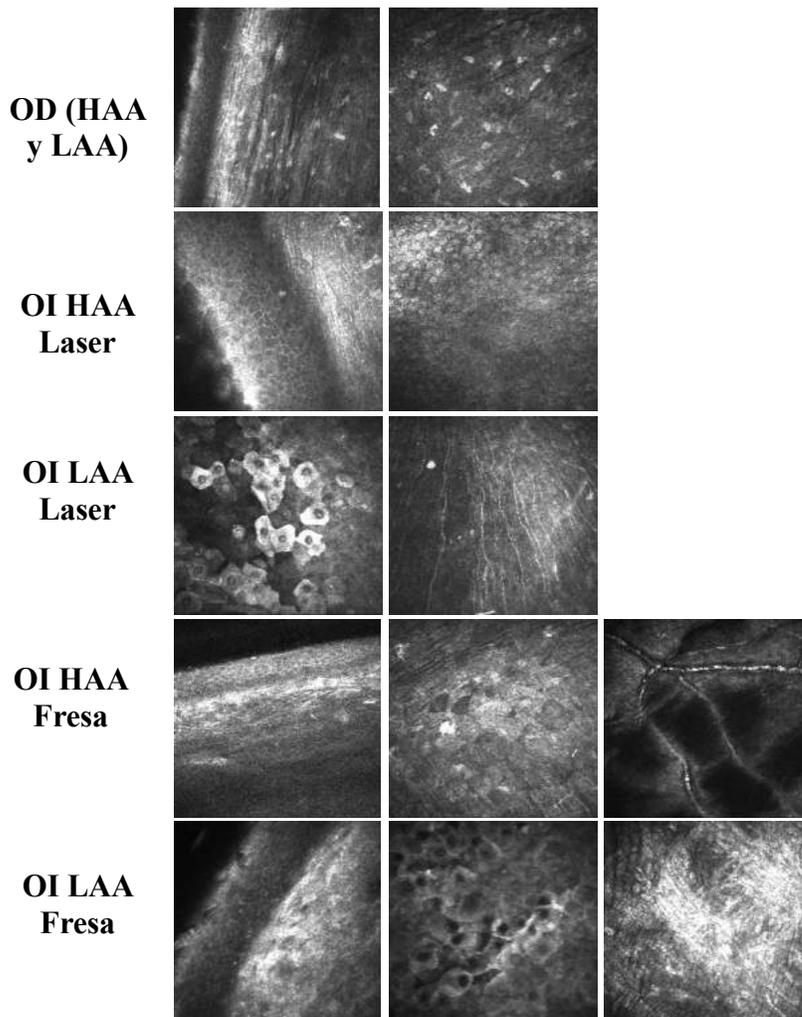
En OI de animales erosionados con láser (RUV-B y HAA ) se observa epitelio y estroma superficial con trayectos paralelos de nervios de plexos sub-epiteliales. En el estroma se ven depósitos puntiformes y guiones hiperreflectivos aislados y agrupados. El endotelio no mostró alteraciones. En cambio, los OI del grupo LAA presentan descamación superficial en epitelio. El estroma se muestra reflectivo y con estructuras lineales reflectivas de colágeno reparativo. El endotelio se observó normal (**figura 49**).



La córnea de los OI de animales erosionados con fresa (RUV-B y HAA) presentaron, entre el epitelio y el estroma, una banda hiperreflectiva que podría estar relacionada con el tratamiento. Visto

de frente, se observaron distintas irregularidades en el estroma cubiertas por los queratocitos de configuración aleatoria. También se distinguió en estroma profundo una delicada arborización de capilares conteniendo eritrocitos. El endotelio es de aspecto normal (**figura 49**).

En OI del grupo LAA (fresa) se observó el epitelio con descamación de la superficie ocular; por debajo hay una agrupación de queratocitos que originan reflectividad. La misma área en un plano frontal revela las células descamadas. En profundidad se observan depósitos y cruzamientos de colágeno provocando reflectividad y opacidades que simulan tejido de cicatrización (**figura 49**).



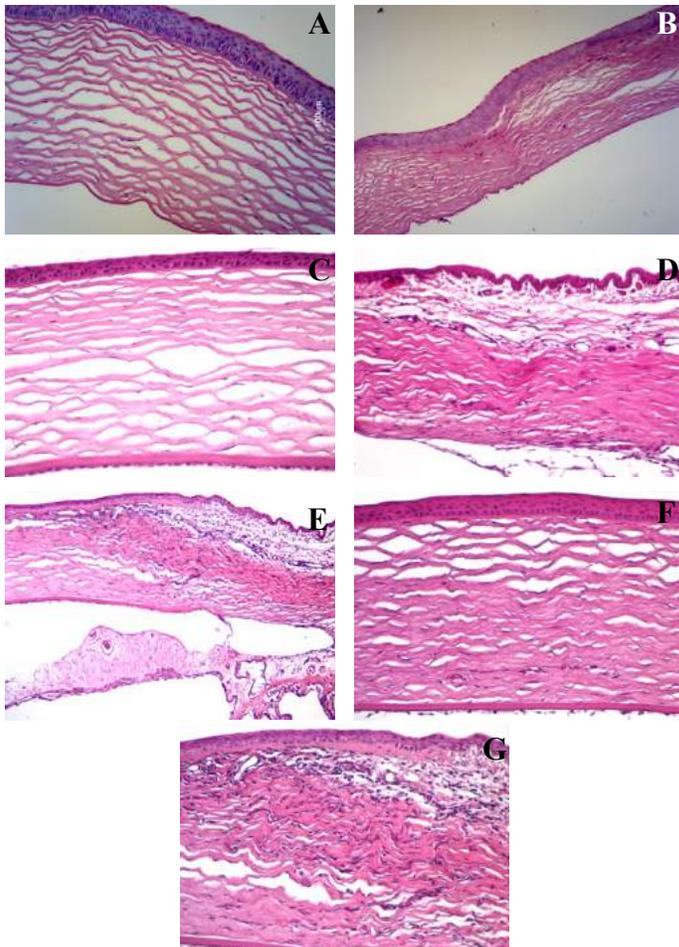
**Figura 49:** Imágenes representativas de córneas de cobayos pertenecientes a diferentes subgrupos, estudiadas mediante microscopía confocal *in vivo* 30 meses después del inicio del tratamiento.

## Estudios *in vitro*

### Microscopía óptica

En la **figura 50** se observan la córnea (**A**) y la zona limbar (**B**) al inicio del estudio de un modelo experimental. Las córneas de todos los animales presentaron epitelio, estroma superficial y profundo, y área limbar con características normales, un epitelio plano estratificado sin capa córnea que se ensancha y presenta algunos vasos en la zona limbar.

A los 30 meses post tratamiento, por microscopía óptica, tanto epitelio y estroma (**C**), como en zona limbar (**D**) de las córneas de OD de animales (tanto de grupo HAA como LAA) se muestran sin alteraciones aparentes.

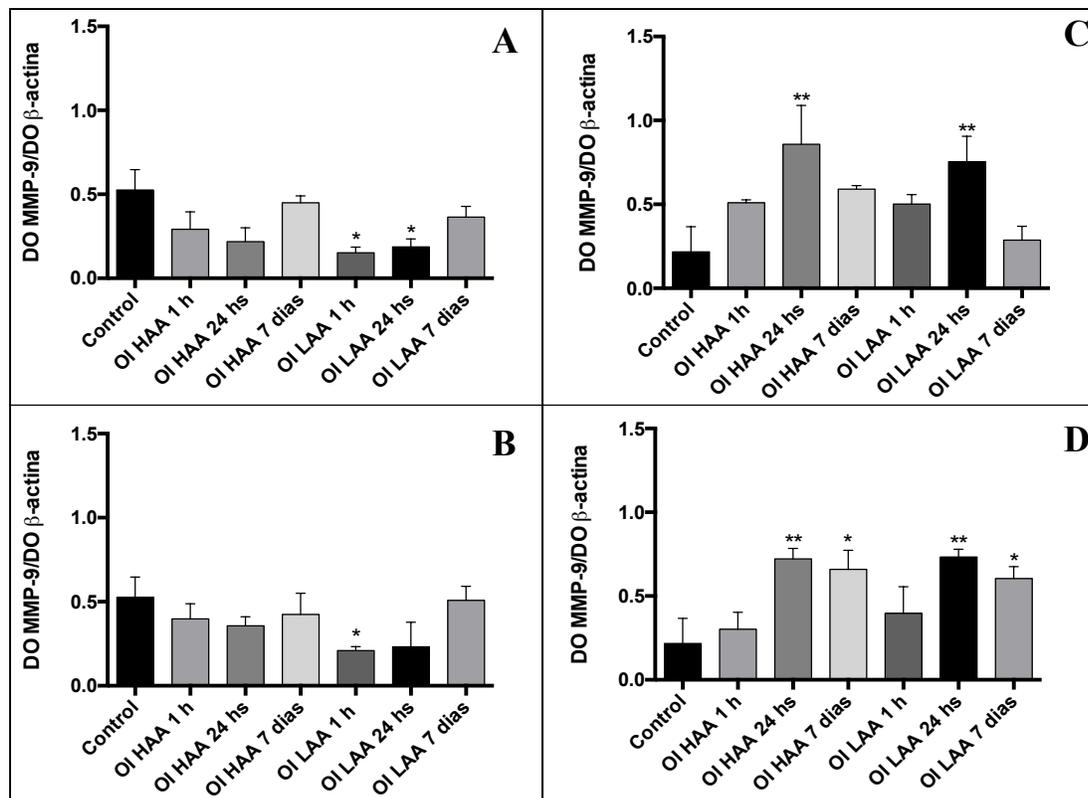


**Figura 50:** Microscopía óptica de corneas de cobayos control (**A** y **B**) y a los 30 meses post tratamiento (**C**, **D**, **E**, **F** y **G**). Hematoxilina Eosina. Magnificación 40 X (**A**, **C**, **D**, **E**, **F** y **G**) y 10 X (**B**).

En la **figura 50 E**, que corresponde a OI erosionado con láser (grupo HAA) se observa una zona limbar inflamada, con moderado infiltrado leucocitario. En OI erosionado con fresa, se observó neovascularización en estroma profundo (**figura 50 F**). En OI de animales pertenecientes al grupo de dieta baja en AA (láser o fresa, LAA), el principal cambio observado con respecto al control fue un abundante infiltrado leucocitario en la zona limbar de las córneas de estos animales (**figura 50 G**).

#### Determinación de los niveles de MMP-9 en epitelio corneal

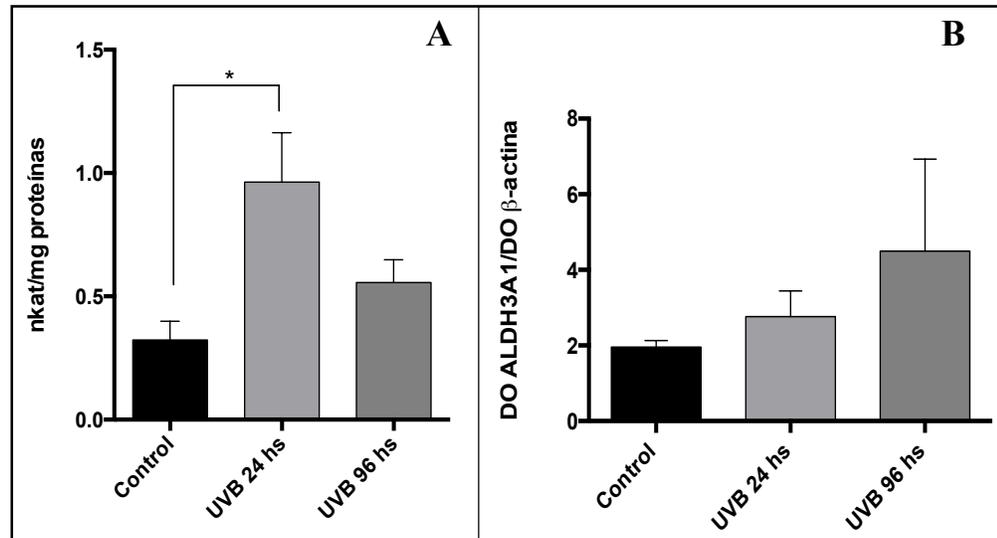
En general, los niveles de expresión de MMP-9 aumentaron hacia las 24 hs posteriores a la realización de las erosiones (para láser y fresa), tanto a los 18 meses como a los 30 meses de iniciado el desarrollo del modelo experimental. Esto sucedió independientemente del tipo de erosión corneal empleado, y también de manera independiente al tipo de dieta (HAA o LAA), poniendo en evidencia la capacidad de la córnea lesionada para reepitelizar el epitelio dañado, manifestado por los niveles de MMP-9, que es la que lidera los bordes de regeneración (**figura 51**).



**Figura 51:** cinética de expresión de MMP-9 a los 18 meses post- tratamiento con láser (A) y fresa (B) y a los 30 meses nuevamente para láser (C) y fresa (D). DO= densidad óptica; OI= ojo izquierdo; HAA= dieta alta en ácido ascórbico; LAA= dieta baja en ácido ascórbico. \*p<0,05; \*\*p<0,005.

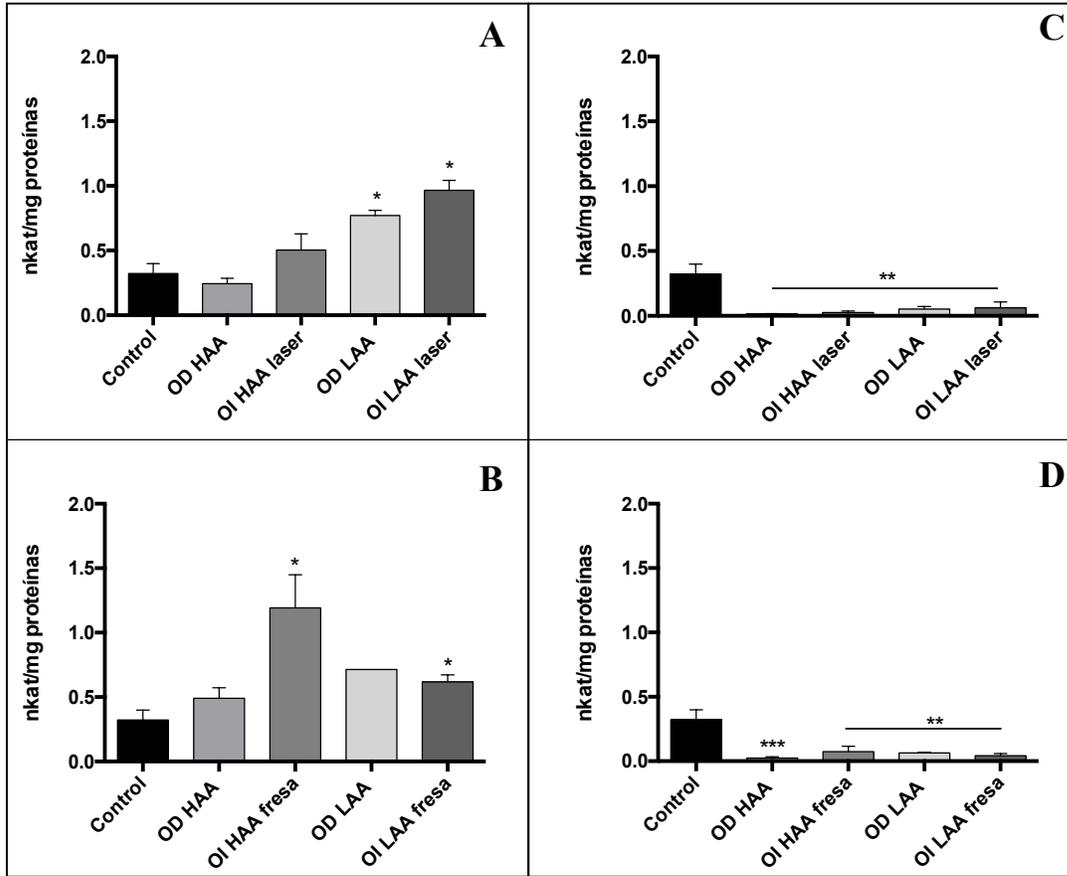
### Actividad de ALDH3A1 en epitelio corneal

Los ojos de cobayos normales expuestos a una **única dosis de RUV-B** durante 25 min, e inmovilizados a 27 cm de distancia de la fuente de RUV-B, resultando así en la exposición a una dosis de 0,2 J/cm<sup>2</sup> de radiación, mostró un incremento de la actividad de la enzima en homogenato de células epiteliales de la córnea a las 24 hs post exposición. La actividad disminuyó posteriormente, a pesar de que la expresión de la enzima, determinada mediante WB, continuó incrementando (**figura 52**).



**Figura 52:** Actividad enzimática y expresión de ALDH3A1. La actividad enzimática (A) aumentó considerablemente 24 hs posteriores a la irradiación aguda con luz UV-B y luego disminuyó a pesar de que la expresión de la enzima continuó incrementado (B). Nkat=nanokatal; UVB= radiación ultravioleta B; DO=densidad óptica; ALDH3A1=aldehído deshidrogenasa 3A1.

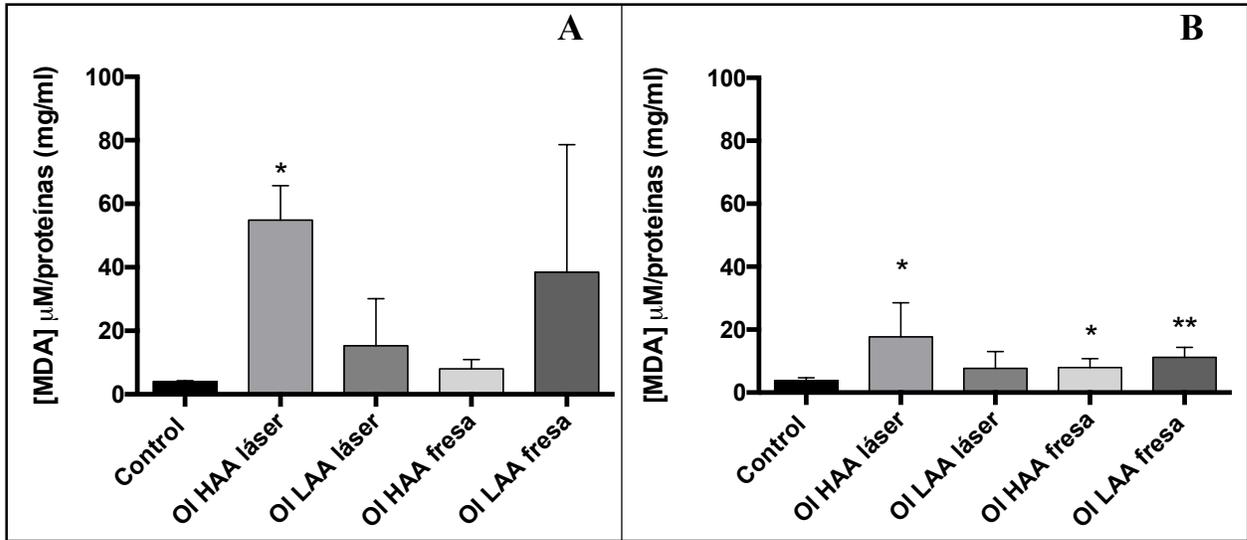
Los animales tratados durante 18 meses con RUV-B, distintas dosis de AA y erosiones (láser y fresa rotativa), mostraron un aumento en la actividad de la enzima. Luego de 30 meses de tratamiento, la actividad de ALDH3A1 se redujo notablemente. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los animales de los distintos subgrupos (HAA y LAA, como tampoco en los tratados con fresa y láser) (**figura 53**).



**Figura 53:** Actividad enzimática de ALDH3A1 medida a los 18 meses luego de comenzado el modelo experimental en láser (A) y fresa (B) y a los 30 meses post-tratamiento nuevamente para láser (C) y fresa (D). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### Determinación de malondialdehído (MDA)

Luego de los 30 meses de iniciado el desarrollo del modelo experimental, la concentración de MDA disminuyó con respecto a los valores medidos al inicio y a los 18 meses de iniciado el tratamiento. Este comportamiento se observó en todos los grupos experimentales, no hubo diferencias significativas entre HAA vs LAA, ni tampoco con respecto a los subgrupos erosionados con distintos métodos ( $p > 0,05$ ). Esto refleja un estado de estrés oxidativo crónico de las córneas tratadas (figura 54).



**Figura 54:** Determinación de los niveles de MDA a los 18 meses (A) y a los 30 meses (B) posteriores al comienzo del tratamiento, para ambos tipos de erosiones. MDA=malondialdehído; OI=ojo izquierdo; HAA=dieta alta en ácido ascórbico; LAA= dieta baja en ácido ascórbico. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ .

## DISCUSION

La QCE es una enfermedad degenerativa de la córnea humana, que si bien fue descrita por primera vez hace más de cien años, en la actualidad no existe un modelo experimental que permita corroborar los resultados obtenidos en pacientes y avanzar en el estudio de ciertos mecanismos que pueden estar involucrados en la etiopatogenia de esta enfermedad para plantear nuevos tratamientos, ya que el único existente en la actualidad es el trasplante de córnea. Como se mencionó anteriormente, nuestras investigaciones revelaron que las córneas de los cobayos son histológicamente similares a las córneas humanas (9). Además, estos animales, al igual que los humanos, carecen de la enzima L-gulonolactona oxidasa que permite sintetizar vitamina C (o AA) a partir de la glucosa, por lo que su dieta tiene que contener AA. Este es luego concentrado en el epitelio corneal para cumplir un rol protector muy importante frente a condiciones de estrés oxidativo. En una publicación reciente se investigaron los efectos de la deficiencia de AA y la exposición a RUV-B durante 3 meses sobre la ultraestructura estromal de la córnea. Mediante estudios de dispersión de rayos X y ME, se observó que las fibrillas de colágeno estaban más empaquetadas en los animales alimentados con una dieta deficiente en AA y expuestos a RUV-B, y además presentaban otras alteraciones en su ultraestructura (103), sugiriendo que el AA tiene un rol vital en la organización del estroma y en la protección contra los efectos de la RUV-B.

En un trabajo reciente, se estudiaron los efectos de factores ambientales desfavorables que predisponen al desarrollo de QCE, sobre la ultraestructura y función corneal: dietas deficientes en AA, exposición a RUV-B, y erosiones corneales superficiales realizadas con una aguja hipodérmica 25 G durante 8 meses (158). Sin embargo, utilizando ese modelo experimental no se observó acumulación de proteínas anómalas en el espacio sub epitelial de las córneas de cobayos, que se asemejaran a las observadas en pacientes con QCE.

La superficie ocular está constantemente expuesta a la RUV, la cual se cree es responsable de causar o agravar muchas patologías oculares. Además, el daño corneal inducido por RUV se correlaciona con la inducción de ERO (251). Se ha reportado que la exposición a RUV-B a una longitud de onda de entre 300-315 nm induce el desarrollo de enfermedades corneales como resultado del daño que provoca en los queratocitos, así como también en las células epiteliales (252-254).

Como dijimos numerosas veces, el AA es un potente antioxidante capaz de neutralizar radicales libres. Este elemento puede absorber eficientemente RUV de entre 280-310 nm (100), y se encuentra 14 veces más concentrado en la córnea que en la cámara anterior (255). Wu y col. llevaron a cabo un estudio en el que analizaron los efectos de RUV-B (al comienzo del estudio realizaron dos sesiones de irradiación por semana de  $0,2 \text{ J/cm}^2$ , prolongando luego el intervalo a una dosis semanal, durante 29 semanas totales) sobre cobayos alimentados con dietas normales y dietas deficientes en AA, no encontrando diferencias en la cantidad de daño corneal en cobayos que tuvieron dietas deficientes en AA con respecto a aquellos que tenían una dieta normal, hipotetizando que las dietas bajas en este elemento contenían suficiente AA para proteger a la cornea de la RUV-B (102). Otro estudio mostró que la administración intravenosa de AA tiene un efecto protector en las córneas de conejos expuestos a una dosis diaria de 17 minutos de  $6,84 \text{ J/cm}^2/7$  días, al evaluar parámetros clínicos y examinación patológica, demostrando que el área central de la córnea presentó los menores cambios, coincidiendo con que ésta zona es la más “rica” en AA (256).

En el presente trabajo cambiamos algunos aspectos del modelo experimental que habíamos desarrollado previamente (158), fundamentalmente en el tipo de lesión que realizamos en la córnea (pasamos de erosiones superficiales a erosiones que comprometen no solamente el epitelio corneal sino también el estroma superficial) y extendimos la duración del estudio en 22 meses (30 meses vs 8 meses). La elección del método de erosión más profunda que utilizamos, fue basada en la investigación que previamente realizamos en este trabajo de tesis sobre el tipo de lesiones y recuperaciones que se producen cuando se aplican distintos tipos de láseres o fresa a diferentes profundidades.

La dosis diaria de radiación que recibieron los cobayos fue similar a la dosis calculada que reciben los pacientes con QCE que viven en la Patagonia argentina (108).

La examinación clínica de las córneas de los cobayos a los 18 meses de tratamiento no mostró cambios significativos con respecto a los controles, ni tampoco con respecto a la dieta de rica en AA. Treinta meses después, los efectos producidos por la cronicidad del tratamiento con RUV-B se manifestó en todas las condiciones experimentales mediante alteraciones sub epiteliales y aparición de modificaciones en el cristalino, compatibles con catarata. Los cambios morfológicos fueron más notables en el grupo de animales alimentados con dosis bajas de AA y erosionados con fresa. En éstos se apreció además neo-vascularización y mayor número de cataratas. Mediante MC *in vivo*, la hiperreflectividad observada tanto en epitelio como en estroma de las córneas de los animales de todos los grupos, coincide con las opacidades sub epiteliales observadas por biomicroscopía. Si bien todas las córneas de los ojos tratados con láser o fresa (OI) presentan cambios notables con respecto a OD, una vez más, los cambios más pronunciados aparecieron en los ojos tratados con fresa y dieta LAA, donde además de descamación en el epitelio, hiperreflectividad y alteraciones en el estroma, se observó neo vascularización en el estroma. Por MO también se pudo apreciar de moderado a abundante infiltrado leucocitario en limbo corneal en OI de ambos grupos sometidos a erosión (HAA y LAA, fresa y láser).

En trabajos previos, nuestro grupo investigó la presencia de MMPs y sus inhibidores en pacientes con QCE, ya que estas moléculas controlan la degradación del epitelio y estroma corneal. Estudios en lágrimas de pacientes mostraron niveles elevados de MMP-2, MMP-9 y disminuídos de TIMP-1 (inhibidor de metaloproteinasas tipo I) (94). Mediante estudios de inmunohistoquímica, encontramos que estas MMPs están aumentadas en córneas de pacientes con QCE, comparados a controles. También estudiamos el efecto de la RUV-B en la producción de MMPs y citoquinas *in vitro*, usando células epiteliales corneales humanas, encontrando que las células expuestas a la radiación aumentan significativamente la secreción de MMPs y citoquinas pro-inflamatorias (95). Esto podría resultar evidente, pero la particularidad de estos resultados es que dejaron en evidencia la participación del epitelio corneal como un factor disparador en la patogénesis de QCE.

En este estudio analizamos los niveles de MMP-9 en homogenato de epitelio corneal de cobayos a los 18 meses y a los 30 meses post tratamiento. La cinética de esta MMP mostró un aumento hacia las 24 hs post erosión, volviendo a su estado basal a los 7 días posteriores a la misma, coincidiendo con el tiempo en que la córnea de los cobayos se restaura luego de inducir la erosión. En la cinética ensayada a los 30 meses, el aumento observado a las 24 hs posteriores a la erosión fue mayor que el medido a los 18 meses, aunque la diferencia no es significativa ( $p>0,05$ ).

También estudiamos la actividad de la enzima ALDH3A1. En una prueba piloto en la que expusimos cobayos normales a una dosis aguda de RUV-B por una única vez con los animales inmovilizados frente y a corta distancia de la fuente de radiación, vimos que los niveles de la enzima seguían aumentando hacia las 96 hs post tratamiento mientras que la actividad decaía, coincidentemente con resultados presentados por Estey y col. (185). Decidimos entonces estudiar la actividad enzimática como un marcador antioxidante presente en la córnea de los animales durante el tratamiento. En el tratamiento crónico vimos que a los 18 meses, la actividad de la enzima aumentó significativamente frente a las condiciones más adversas (RUV-B, erosión corneal, tanto fresa como láser, y dieta deficiente en AA), mientras que a los 30 meses la actividad se redujo notablemente, aunque no se observaron diferencias significativas entre los grupos HAA y LAA. Existe evidencia experimental que apoya la hipótesis de que la absorción directa de la RUV por parte de la ALDH3A1 protege otras proteínas corneales, debido a la abundancia de esta enzima en esta estructura ocular. En ratones C57BL/6J expuestos a RUV-B (302 nm), ésta causó una reducción de la actividad de la enzima en un 85 %, mientras que otras actividades enzimáticas permanecieron intactas (257). De manera similar, un gran exceso de ALDH3A1 *in vitro*, redujo la inactivación inducida por RUV, de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (152). Nosotros observamos, al exponer a los cobayos durante 25 min a RUV-B (en un modelo de exposición aguda, por única vez) a una distancia cercana a la fuente de radiación, que la actividad de esta enzima decaía en el tiempo, mientras que su expresión, determinada mediante WB, continuaba en aumento. La inactivación de ALDH3A1 por la RUV para preservar otros elementos corneales ha sido denominado “respuesta suicida” (155, 258), y se sabe que esta disminución en la actividad enzimática se debe a un cambio conformacional de la enzima, más que a modificaciones en los residuos Cys del sitio activo de la ALDH3A1 (185).

Debido a la complejidad de medir radicales libres *in vivo* por su corto tiempo de vida media, es necesario cuantificar componentes celulares que pueden reaccionar con estos radicales libres, tales como proteínas, ADN y principalmente lípidos (259-261). Los peróxidos lipídicos inestables tienden a descomponerse rápidamente en una variedad de sub-productos. MDA es uno de los principales productos secundarios de la peroxidación lipídica y puede usarse como marcador de daño de la membrana celular, siendo el más popular indicador de daño oxidativo a las células y tejidos (247).

Como un marcador de peroxidación lipídica en epitelio corneal de cobayo, medimos MDA mediante HPLC. Este aldehído tóxico está significativamente aumentado con respecto a los controles, tanto a los 18 como a los 30 meses de tratamiento, si bien a los 30 meses disminuyó su concentración con respecto a la observada a los 18 meses. Esto pone en evidencia un estado de estrés oxidativo crónico de las córneas de estos animales expuestos por 30 meses a RUV-B, erosiones

superficiales con distintos elementos y distintas dietas de AA, si bien no hubo diferencias significativas entre los grupos HAA y LAA.

El hecho de que utilizando un modelo experimental que intentó reproducir QCE exponiendo a los animales a las condiciones muy adversas similares a las que están expuestas las córneas de los pacientes con esta enfermedad que en sus estados avanzados puede llevar a la ceguera por acumulación de proteínas en el subepitelio corneal, no produjo los daños esperados. Esto puede deberse a múltiples factores: que sea una enfermedad que ocurre sólo en la especie humana en la que están involucrados genes particulares; que al ser una enfermedad crónica en humanos (se manifiesta alrededor de los 30 años de edad) sean necesarios más años de exposición de los cobayos a dichas condiciones ambientales; que los cobayos al poseer una película lagrimal más estable (mayor % de lípidos no polares que retardan la evaporación de la lágrima) y que además de ALDH3A1, cuentan con la presencia de ALDH1A1 en epitelio, estroma y endotelio corneal, les ofrezca así un sistema antioxidante más efectivo.

Lo que hemos establecido en esta tesis es que esta enfermedad degenerativa de la córnea humana no es causada únicamente por ciertas condiciones climáticas sino más bien por condiciones ambientales, y es por eso que proponemos que en lugar de llamarse Queratopatía Climática Esferoidea sea llamada Degeneración Ambiental Proteinácea de la Cornea (DAPC).