

Participación de componentes inmunológicos en la etiopatogenia de la queratopatía climática esferoidea

Involvement of immune components in the etiopathogenia of climatic droplet keratopathy

Horacio M. Serra, Thamara A. Cafaro, María F. Suárez, Juan O. Croxatto, Pablo A. Moro, Julio A. Urrets-Zavalía
Trabajo ganador del Premio AAAeIC - XXXIV Congreso Anual de la Asociación Argentina de Alergia e Inmunología Clínica

ARCHIVOS DE ALERGI A E INMUNOLOGÍA CLÍNICA 2011;42(2):49-57

Resumen

Objetivo. Investigar si componentes de la inmunidad innata están involucrados en la iniciación/perpetuación de las anomalías estructurales observadas en la capa de Bowman y el estroma superficial de la córnea de pacientes con queratopatía climática esferoidea (QCE).

Materiales y métodos. En el estudio participaron 8 pacientes con QCE y 12 individuos sanos del Departamento El Cuy, Provincia de Río Negro, y 10 individuos sanos de la ciudad de Córdoba. Todos ellos, luego de firmar el consentimiento informado, recibieron un examen oftalmológico completo y se recolectaron muestras de lágrima para estudiar las concentraciones de diferentes citocinas, niveles y formas de metaloproteinasas de matriz (MMPs), y el inhibidor natural de MMPs (TIMP-1). Se realizó microscopía confocal in vivo (MCF) en algunos pacientes y controles. Biopsias de córneas provenientes de pacientes que fueron tratados con queratoplastia penetrante también fueron estudiadas mediante inmunohistoquímica (IHQ).

Resultados. Los resultados de MCF indicaron claramente una progresión en la cantidad de depósitos a nivel subepitelial, a medida que la enfermedad avanza. El daño progresivo de las fibras nerviosas sub basales y estromales en los estadios 2 y 3 se correlaciona con pérdida de la sensibilidad corneal. Además de estas alteraciones, observamos que el número de células dendríticas (CD) en el limbo corneal aumentó significativamente a medida que la QCE progresa.

En lágrimas de pacientes con QCE se detectaron concentraciones significativamente superiores de citocinas proinflamatorias (IL-1 β e IL-8) que en individuos controles ($p < 0,005$). No se halló IL-2, IL-17, IL-4, IL-13 ni IL-10 en pacientes y ni controles. Las actividades de gelatinasas (MMP-9 y -2) fueron significativamente mayores en QCE que en los controles ($p < 0,001$), mientras que los niveles de TIMP-1 fueron significativamente menores en los pacientes ($p < 0,05$). La concentración de MMP-8 fue mayor en controles pero los niveles de esta colagenasa-2 fueron 30 veces superiores, tanto en QCE como controles, con respecto a los valores de los individuos de un centro urbano.

Mediante IHC observamos reactividad para MMP-9 en la mayoría de las células epiteliales, solamente en córneas con QCE.

Conclusión. Demostramos un rol protagónico del eje citocinas proinflamatorias - gelatinasas en el desarrollo de la QCE. Los altos niveles de IL-1 β e IL-8 en lágrimas de pacientes facilitan la producción de MMP-8 y gelatinasas, y los efectos de las mismas se exacerban, ya que los pacientes tienen bajos niveles de sus inhibidores naturales (TIMP-1). La MMP-9, además de degradar componentes de la matriz extracelular, cataliza la activación postranscripcional de IL-1 β , potenciando el proceso inflamatorio. Estos resultados son los primeros en explicar mecanismos inmunológicos involucrados en la etiopatogénesis de la QCE y aportan nuevas alternativas para el desarrollo de terapias preventivas utilizando inhibidores de IL-1 β y/o gelatinasas.

Palabras claves: alergia, queratopatía, citocinas, células dendríticas.

Abstract

Objective. To investigate whether components of innate immunity are involved in the initiation / perpetuation of the structural abnormalities observed in Bowman's layer and superficial stroma of the cornea of patients with Climatic droplet keratopathy (CDK).

Materials and Methods. The study included 8 CDK patients and 12 healthy individuals from Department El Cuy, Province of Río Negro, and 10 healthy subjects from the city of Córdoba. All of them, after signing informed consent, received a thorough eye exam and tear samples were collected to study the concentrations of different cytokines, and levels and forms of matrix metalloproteinases (MMPs) and their natural inhibitor (TIMP-1). In vivo confocal microscopy (CFM) was performed in some patients and controls. Corneal biopsies from CDK patients treated with penetrating keratoplasty were also studied by immunohistochemistry (IHC).

Results. CFM results clearly indicated a progression in the amount of deposits at corneal sub epithelial level as the disease progresses. The progressive damage in the nerve plexus in stages 2 and 3 correlated with a loss of corneal sensitivity. In addition to these alterations, we observed that the number of dendritic cells (DC) in the limbus increased significantly as the disease progresses.

In tears of patients with CDK we detected significantly higher concentrations of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-8) than in control subjects ($p < 0.005$). We found no IL-2, IL-17, IL-4, IL-13 and IL-10 in patients and controls. The activities of gelatinases (MMP-9 and -2) were significantly higher in CDK than in controls ($p < 0.001$), while TIMP-1 levels were significantly lower in patients ($p < 0.05$). The concentration of MMP-8 was higher in controls, but levels of this collagenase-2 were 30 times higher, both in CDK and controls, with respect to MMP-8 values of individuals inhabiting an urban area.

By IHC we observed reactivity for MMP-9 in most epithelial cells only in CDK corneas.

Conclusion. We demonstrated a key role of the axis pro-inflammatory cytokines – gelatinases in the development of CDK. High levels of IL-1 β and IL-8 in tears of patients facilitate the production of MMP-8 and gelatinases, and the effects of these molecules are exacerbated because patients have low levels of their natural inhibitors (TIMP-1). Since MMP-9 besides degrading extracellular matrix components, catalyzes the post translational activation of IL-1 β , the inflammatory process is fuelled. These results are the first to explain immunological mechanisms involved in the pathogenesis of the QCE and provide new alternatives for the development of preventive therapies using inhibitors of IL-1 β and / or gelatinases.

Key words: allergy, keratopathy, cytokines, dendritic cells.

Introducción

La queratopatía climática esferoidea (QCE) es una enfermedad bilateral degenerativa de la córnea humana, caracterizada por la aparición de un velamiento progresivo de sus capas más anteriores. En sus etapas iniciales (*grado 1*) se observan formaciones tipo gotas múltiples, diminutas y translúcidas, principalmente en el espacio subepitelial de las zonas limbocorneoscleral nasal y/o temporal. La opalescencia se extiende lentamente a lo largo del área interpalpebral, hacia el centro de la córnea, en forma de banda (*grado 2*), dando a la córnea una apariencia empañada. En esta fase, la agudeza visual puede estar moderada o severamente disminuida. Áreas pequeñas, ovaladas, o geográficamente bien delimitadas pueden observarse dentro de las zonas comprometidas. Con el avance de la enfermedad, varias gotas amarillentas grandes o vesículas aparecen en las áreas afectadas, algunas de ellas destacándose bajo el epitelio de la córnea (*grado 3*). En este estadio avanzado comienza a observarse la opacificación y fibrosis del estroma subyacente, apareciendo en algunos casos neo formación de vasos corneales [1-10]. Es de destacar que, en esta enfermedad, en la córnea queda una zona no afectada, ubicada desde el limbo hacia la conjuntiva.

La QCE ha sido denominada también *queratopatía de Labrador* [2], *degeneración esferoidea de la córnea* [6], *distrofia nodular de Bietti*, *distrofia nodular en banda de la córnea* [11], *degeneración queratinoide de la córnea* [12], entre otros, de acuerdo con sus características anatomopatológicas, presumible etiología, apariencia clínica, y ubicación geográfica.

Las causas son desconocidas hasta el momento, pero esta enfermedad afecta fundamentalmente a personas mayores de 40 años, que trabajan a la intemperie en medios rurales [13]. Esta enfermedad ha sido descripta utilizando

biomicroscopía y, en algunos pocos trabajos, mediante estudios histológicos de biopsias de córnea, en regiones de África y Asia [3,9], Medio Oriente [3,7], Australia [2], península del Labrador en Canadá [14], Arkansas y Arizona en los Estados Unidos de América [5]. Ciertas similitudes se observan entre estas regiones, como aridez del suelo, poca nubosidad y falta de sombra por la escasez de vegetación arbórea, alta exposición a radiaciones solares ultravioletas, y vientos constantes que vehiculizan partículas de polvo, arena o hielo [1–3; 14–17]. Nuestro grupo de investigación describió una alta incidencia de QCE en el Departamento El Cuy, Provincia de Río Negro, República Argentina e investigó las alteraciones oculares de estos pacientes [18,19]. La naturaleza proteica de los depósitos corneales fue sugerida inicialmente por estudios histopatológicos [20] y estudios de vesículas grandes disecadas de pacientes, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida [21]. Kaji y cols. detectaron productos de glicosilación avanzados, utilizando anticuerpos contra n-carboximetil-L-lisina, en biopsias de córnea de pacientes con QCE [22]. Más recientemente, nuestro grupo utilizó espectrometría de masa para investigar especímenes parcialmente enriquecidos en depósitos proteicos anormales de córneas con QCE, y logramos identificar 105 proteínas, varias de las cuales tienen potencial para la formación de agregados, y un conjunto de ellas fue detectado en los depósitos mediante inmunohistoquímica [23].

A pesar de los muchos años transcurridos desde el descubrimiento de la QCE, todavía no se conocen los mecanismos moleculares involucrados en esta enfermedad de la córnea humana. Por tal motivo decidimos realizar este trabajo, para investigar si se trata de una enfermedad alérgica y definir la participación de diferentes componentes inmunológicos en la inducción y/o mantenimiento de esta enfermedad.

Materiales y métodos

Individuos

Este estudio de investigación fue aprobado por el Consejo de Revisión Institucional de la Universidad Católica de Córdoba y el Comité Institucional de Ética en Investigación de Salud del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, Argentina. El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Se examinaron individuos con QCE (n=8) y controles sanos (n=12) de poblados del Departamento El Cuy en la provincia de Río Negro, e individuos sanos de la ciudad de Córdoba (n=10), en Argentina. Todos estos individuos fueron evaluados clínicamente (examen físico y anamnesis) y no tenían otras patologías oculares ni generales.

Exámenes oftalmológicos

A todos los participantes del estudio se les explicó el trabajo de investigación, y aquellos que decidieron participar en él procedieron a firmar el consentimiento informado. Luego se les realizó los siguientes exámenes: refracción, biomicroscopía, sensibilidad corneal, tonometría y oftalmoscopia binocular indirecta del fondo de los ojos, como se ha descrito anteriormente [19]. El segmento anterior de pacientes portadores de QCE y controles fue fotografiado con un fotobiomicroscopio (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), y película fotográfica Fujichrome Sensia de 100 ASA.

Microscopía confocal in vivo (MCF)

Las capas superficiales de la córnea de algunos pacientes y controles fueron estudiadas utilizando MCF, prestando especial atención a las células dendríticas (CD), a los depósitos proteicos anormales y a los plexos nerviosos. Las córneas fueron investigadas con esta metodología como hemos descrito anteriormente (Tesis doctoral Tamara Cafaro, *Mecanismos moleculares involucrados en la etiopatogenia de la queratopatía climática esferoidea*, 2011).

Muestra biológica

De todos los individuos se obtuvo lágrima (20 µl), utilizando un microcapilar descartable, sin estimulación química o física. Estas muestras fueron inmediatamente congeladas a -80 °C hasta el momento de su utilización para realizar diferentes estudios.

Ensayos

Citocinas lagrimales

Las citocinas IL-1β, IL-8, IL-2, IL-17, IL-4, IL-13 e IL-10 fueron cuantificadas mediante un equipo comercial basado en ELISA (Bio-rad, Países Bajos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de proteínas y de niveles/actividades de MMP-2, -9, -8 y TIMP-1

Las concentraciones de proteínas totales se midieron en muestras de lágrima realizando una curva de calibración con albúmina sérica bovina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) como estándar. Los volúmenes de las muestras de lágrima se ajustaron para obtener la misma cantidad de proteínas para todos los ensayos. Las MMPs y TIMP-1 fueron medidos en las muestras de lágrimas mediante zimografía y *Western blot* como previamente ha sido descrito (Tesis doctoral Julio Urrets-Zavalía, *Queratopatía Climática en Argentina*, 2008).

Inmunohistoquímica (IHQ)

Botones corneales de dos pacientes con QCE y de un individuo sano provenientes de un banco de órganos fueron fijados en formalina, embebidos en parafina, cortados en secciones de 5 µm y montadas en portaobjetos. Las secciones fueron empapadas por primera vez en xileno para quitar la parafina, rehidratadas en alcoholes (100, 90, 80, y 70%), y tratadas durante 12 minutos a 37 °C con pepsina (0,5% peso/vol), que contiene 0,1 M de HCl para recuperar la antigenicidad. Las muestras se lavaron con 10 ml de tampón fosfato 150 mM de solución salina, pH 7,4 (PBS), peroxidasa endógena fue bloqueada con 0,3% de H₂O₂ en metanol durante 22 min, seguido de un lavado en PBS y bloqueo con solución de albúmina sérica bovina al 0,1% en PBS durante 40 min. Las muestras se incubaron en una atmósfera húmeda, a 4 °C durante toda la noche, con antisueros de cabra anti-MMP-2, -9 humanas (R & D Systems, Minneapolis, MN). Esto fue seguido por incubación por una hora con IgG porcina anti-IgG de cabra marcada con biotina, y finalmente complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) por 45 min de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vectastain, Burlingame, CA). El color fue desarrollado utilizando sustrato H₂O₂ y el cromógeno diaminobencidina 3,3-durante 3 min. IgG normal de cabra con una especificidad irrelevante se utilizó como control. La contratinción se realizó mediante hematoxilina durante 1 min, seguido por deshidratación de etanol y montaje. Los cortes fueron examinados usando un microscopio óptico (Nikon ACT-2U, AG Heinze, Tokio, Japón) con un aumento de 40x y 100x por dos investigadores en forma independiente y a ciegas, expresando los resultados como: (-), tinción negativa; (+), algunas áreas teñidas positivamente; (++), muchas regiones teñidas positivamente. Se tomaron imágenes con una cámara digital (Nikon vista DS-U, AG Heinze Inc., Tokio, Japón).

Análisis estadístico

Los valores de citocinas y los valores densitométricos correspondientes a los geles de zimografías y membranas de los *Western blots* fueron sometidos a la prueba de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de p < 0,05.

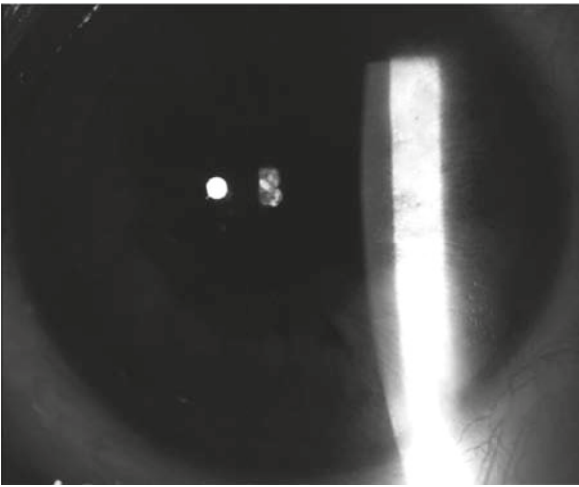


Figura 1. Imagen biomicroscópica de la córnea de un paciente con QCE grado 1.

Tabla 1: Niveles de citocinas en lágrimas (pg/ml/ng) cuantificados mediante la técnica de ELISA.

	QCE	Controles	p
IL-1	87,98±64,4	14,33±5,84	0,0027
IL-8	4.427±1574	1.882±1283	0,0007
IL-10	0	0	
IL-2	0	0	
IL-4	0	0	
IL-13	0	0	
IL-17	0	0	

Resultados

Demografía

Las edades media±DE de los individuos de este estudio fueron, para pacientes y controles del Departamento El Cuy, 69,88±8,838 años y 62,31±8,014 años, respectivamente. Las correspondientes a los controles de la ciudad de Córdoba, 67,4±5,6 años.

Identificación de anomalías subepiteliales y recuento de células dendríticas in vivo.

La **Figura 1** es un ejemplo representativo de una imagen de biomicroscopía de la córnea de un paciente con QCE grado 1 en donde se observan microgotas con turbidez temporal con la franja límbica no afectada y clara. La MCF mostró, además de los depósitos proteicos y anomalías en los plexos nerviosos sub basales, que el número de células dendríticas (CD) en el limbo corneal aumenta significativamente a medida que la enfermedad progresa (**Figura 2**). Como se puede observar en la **Figura 3**, la densidad de CD en la QCE grado 1 fue de 87±7 células/mm²; mientras que en los estadios moderado y avanzado (grados 2 y 3) las CD aumentaron a 101±7 células/mm² y 237±8 células/mm², respectivamente.

Cuantificación de citocinas en lágrimas

Se utilizó ELISA para estudiar un panel de citocinas representativas de la inmunidad innata y de los distintos tipos de inmunidad adaptativa, analizando si estas proteínas estaban presentes en el fluido lagrimal de pacientes y controles. Como se puede observar en la **Tabla 1**, no se detectó IL-2, IL-17, IL-4, IL-13 ni IL-10 en QCE ni controles; sin embargo, los niveles de citocinas proinflamatorias IL-1β e IL-8 estuvieron significativamente aumentados en pacientes (p<0,005).

Caracterización y cuantificación de gelatinasas (MMP-2 y -9) en lágrimas

Bandas gelatinolíticas de pro-MMP-9 y pro-MMP-2 (92 y 72 kDa, respectivamente) fueron detectadas en ambos grupos (**Figura 4A**). Las actividades de MMP-9 y de MMP-2 fueron significativamente mayores en pacientes con QCE en relación con los controles no afectados (ambos p<0,001, **Figura 5**).

Caracterización y cuantificación del inhibidor de MMPs (TIMP-1) en lágrimas

Los *Western blots* mostraron la presencia de una banda intensa, de aproximadamente 28 kDa, correspondiente a TIMP-1 (**Figura 4B**). El valor medio de TIMP-1 libre fue menos de la mitad en los pacientes con respecto a los controles, p<0,05 (**Figura 5**).

Caracterización y cuantificación de MMP-8 en lágrimas

En la **Figura 4C** se pueden observar las dos bandas inmunorreactivas de las formas pro- y activa de MMP-8 (75 y 60 kDa, respectivamente), en muestras de lágrimas de ambos grupos. Ambas formas resultaron estar significativamente aumentadas en los sujetos controles en comparación con los pacientes (p<0,001, **Figura 5**). Además, los niveles de esta colagenasa-2 fueron 30 veces superiores, tanto en QCE como en controles, con respecto a los valores hallados en individuos sanos de un centro urbano (dato no mostrado).

Inmunohistoquímica de MMP-9 y -2 en córneas

En córneas normales, no se detectó tinción corneal para MMP-9 (**Figura 6A**). Sin embargo, en las muestras de QCE la mayoría de las células epiteliales de la córnea fueron positivas para MMP-9 (**Figura 6B**). Ni los depósitos ni sus bordes mostraron inmunorreactividad para MMP-9. MMP-2 se expresó en niveles bajos a través del epitelio corneal, tanto en muestras de QCE como en las de los controles (datos no mostrados). En QCE los bordes de muchos depósitos se tiñeron positivamente con anti-MMP-2 (**Figura 6C**), pero no se observó ninguna tinción dentro de ellos.

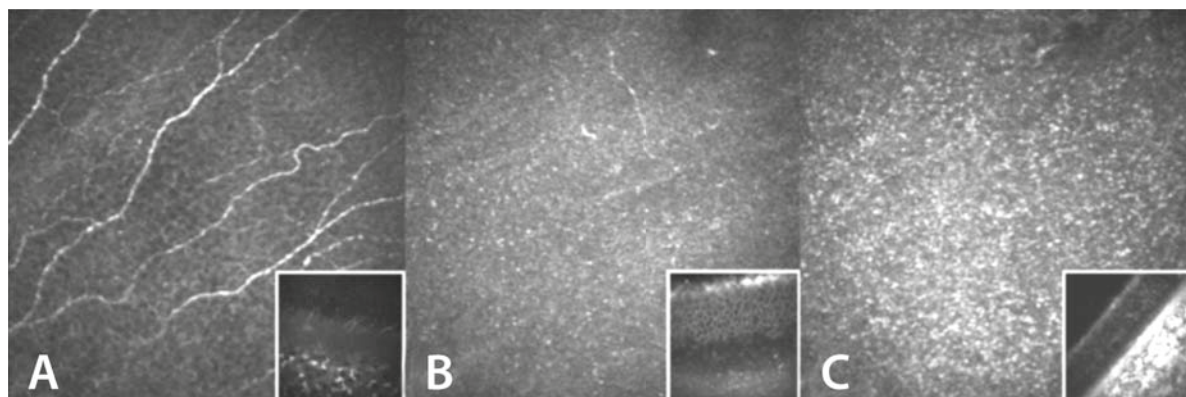


Figura 2. Imagen de MCF de la membrana basal y la capa de Bowman. **A.** Córnea normal (recuadro: sección oblicua). **B.** Grado I de QCE: depósitos puntiformes hiper-reflectivos (recuadro: sección oblicua). **C.** Grado 2 de QCE: incremento en la densidad de los depósitos subepiteliales (recuadro: sección oblicua).

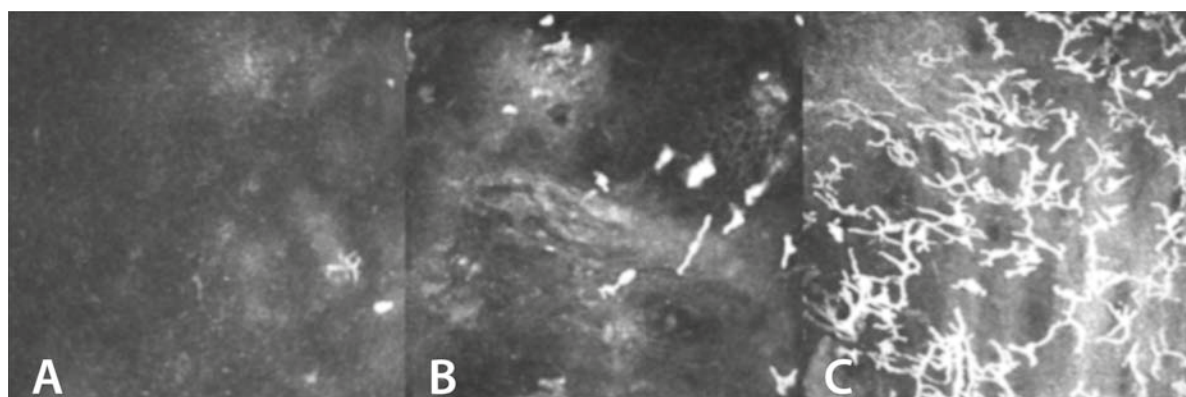


Figura 3. Imagen de MCF de células dendríticas. **A.** Córnea normal. **B.** Grado I de QCE. **C.** Estadio avanzado (grado 3).

Discusión

La córnea tiene dos características muy importantes: protege al globo ocular y, por ser transparente, permite el paso de la luz para que llegue a la retina. La radiación ultravioleta B (RUV-B) impacta en la córnea y otros componentes oculares [24] y es capaz de dañar diversos tejidos, por: a) fragmentación de proteínas y ADN; b) generación de radicales libres y c) peroxidación lipídica [25]. Los humanos disponemos de diferentes posibilidades para protegernos contra estos daños: Uso de lentes y sombreros para evitar la RUV sobre la córnea, e ingesta de alimentos ricos en vitamina C o AA, vitamina E y vitamina A.

El AA es sintetizado en el organismo de algunos animales a partir de la glucosa, mediante un proceso enzimático que involucra a la enzima l-gulonolactona oxidasa. Sin embargo esta enzima está ausente en la especie humana, el cobayo y algunas variedades de murciélagos y pájaros, por lo que todos estos animales necesitan ingerir AA para no tener déficit del mismo. El AA es transferido desde el plasma al humor acuoso y posteriormente al tejido corneal utilizando mecanismos de transporte y concentra-

ción muy sofisticados [26]. Los animales de hábitos diurnos tienen una concentración de AA en el epitelio corneal significativamente mayor que los animales de vida nocturna; por lo tanto, la concentración de AA en el epitelio corneal está íntimamente relacionada con la exposición a RUV [27,28]. La película lagrimal es capaz de proteger al ojo de diferentes maneras [29], y el AA es uno de los responsables de estos mecanismos. El AA en lágrima proviene de las glándulas lagrimales y también de células epiteliales corneales que son dañadas y lo liberan al medio [30]. Nuestro grupo ha descrito que la QCE es una enfermedad rural, con una incidencia del 12% en el Departamento El Cuy en la Provincia de Río Negro, que afecta a individuos cuya ocupación principal es el cuidado de ganado ovino a campo abierto durante gran parte del día y durante todo el año [18,19]. Esta región patagónica se caracteriza por un clima seco, ventoso, árido y suelo arenoso escasamente cubierto por arbustos pequeños. La carne de estos animales ha sido, casi exclusivamente, su principal fuente de alimento, lo que ha condicionado una deficiencia nutritiva parcial de ácido ascórbico (AA) durante toda la vida (manuscrito en preparación). Es de destacar que no

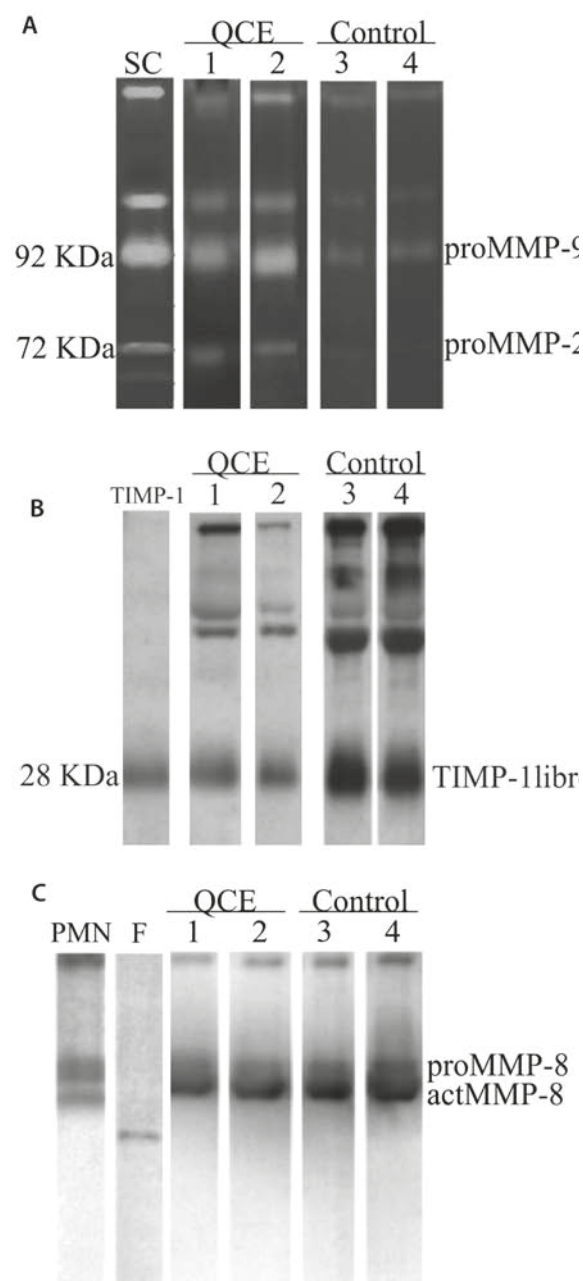


Figura 4. Geles representativos de gelatinasas, TIMP-1 y collagenasa-2 de lágrimas de pacientes con QCE y controles. **A.** Zimografía de MMP9 y MMP2 de muestras de lágrima provenientes de pacientes con QCE y controles; SC: sangre capilar (control positivo de gelatinasas); bandas gelatinolíticas de 92 y 72 kDa corresponden a pro-MMP-9 y pro-MMP-2, respectivamente. **B.** Western immunoblots de TIMP-1 en muestras de lágrima provenientes de pacientes con QCE y controles. TIMP-1 (Proteína recombinante) usada como control positivo. **C.** Western immunoblots de MMP-8 en muestras de lágrima provenientes de pacientes con QCE y controles; PMN y F representan sobrenadantes de cultivo de neutrófilos y fibroblastos de sinovia inflamada (controles positivos de las diferentes isoformas de MMP-8).

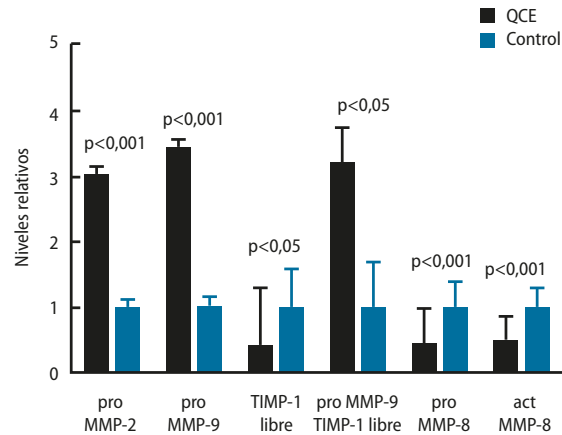


Figura 5. Análisis densitométrico de MMPs y TIMP-1 libre en lágrimas. Los niveles de MMPs y TIMP-1 libre en controles (barras blancas) fueron fijados en 1 y luego la diferencia relativa fue calculada dividiendo los niveles de dichas moléculas en los pacientes con QCE (barras negras) sobre los niveles de los controles.

hemos encontrado QCE en habitantes de otras regiones de Argentina con condiciones ambientales similares, pero que se protegen los ojos adecuadamente y sus dietas, al ser más variadas, contienen cantidades óptimas de AA (manuscrito en preparación).

Basándonos en nuestras investigaciones elaboramos la siguiente hipótesis sobre la etiopatogenia de QCE. En ciertos individuos genéticamente susceptibles (Schurr TG, Dulik MC, Cafaro TA, Urrets-Zavalía JA, Serra HM. Genetic background and climatic droplet keratopathy incidence in a population from Argentina. BMC Ophthalmology, Submitted February 2011) se produce una reacción de hipersensibilidad en la córnea a antígenos ambientales aún no definidos, en donde inicialmente participan componentes de la inmunidad innata y posteriormente ocurre extravasación de diferentes elementos celulares y moleculares desde los vasos limbares. Debido a que estas personas viven y trabajan en condiciones ambientales desfavorables para la superficie corneal (clima seco y ventoso responsable de la existencia de gran cantidad de partículas en el aire; ausencia de vegetación/sombra), y que tienen disminuidos los mecanismos protectores contra la radiación ultravioleta (RUV) (no utilizan lentes de sol ni sombrero, y tienen una disminución significativa de AA en la córnea), se produce la degradación de proteínas extravasadas desde los vasos limbares y la acumulación progresiva en capa de Bowman y estroma superficial.

En algunos trabajos experimentales donde se investigó la respuesta de córnea de animales a diferentes agresiones se observó la participación de diferentes citocinas y factores de crecimiento en una compleja red de células inmunes, epiteliales, y estromales [31-33].

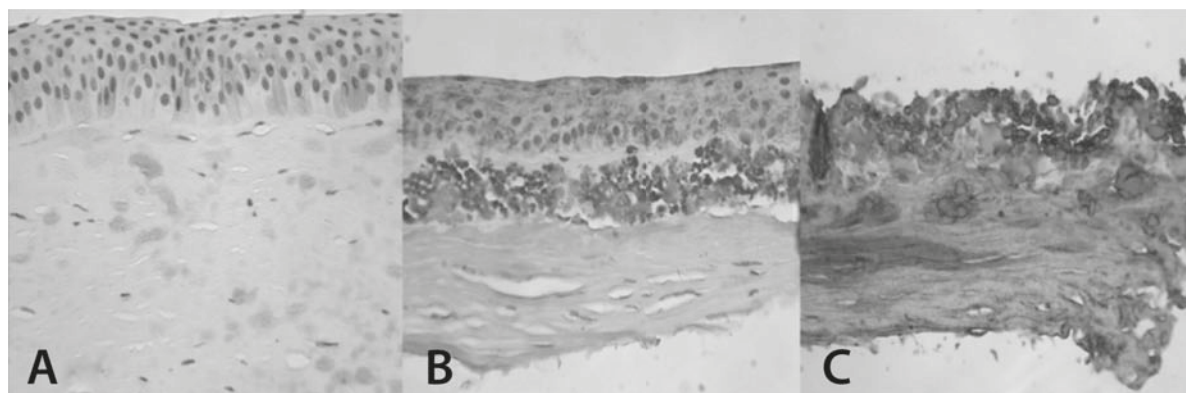


Figura 6. Inmunohistoquímica de MMP-9 y -2 en córneas. **A.** Córnea normal inmunomarcada con anticuerpo para MMP-9. **B.** Córnea con QCE inmunomarcada con anticuerpo para MMP-9. **C.** Zona con depósitos corneales inmunomarcada con anticuerpo para MMP-2.

Debido a que hasta ahora no se conocen las causas de esta enfermedad, consideramos importante investigar la participación de la inmunidad innata en la génesis de esta reacción de hipersensibilidad que observamos en algunos de los individuos de esta área de la Patagonia argentina. Además, decidimos estudiar MMPs debido a que dichas enzimas controlan procesos de degradación/reparación en la córnea y a que su producción está selectivamente controlada por citocinas proinflamatorias como IL-1 beta y TNF alfa, y por el inhibidor natural TIMP-1.

Nuestros estudios de MCF demostraron que en el estadio inicial de QCE se observan depósitos reflectivos puntiformes en la capa de Bowman que no afectan el plexo nervioso subepitelial, mientras que en grados 2 y 3 de la enfermedad hubo condensación de los depósitos subepiteliales y anomalías en los nervios, lo que podría explicar la importante pérdida en la sensibilidad corneal observada en estos pacientes [19]. El número de CD limbares en QCE fue superior al reportado por otros autores en córneas normales [34,35] y fue aumentando de manera significativa a medida que la enfermedad progresaba de grado 1 a grado 2 y grado 3 (87 ± 7 células/mm², 101 ± 7 células/mm² y 237 ± 8 células/mm², respectivamente). Este incremento en la densidad de CD explicaría la ausencia de depósitos proteicos en la zona límbica, los cuales serían eficientemente removidos por estas excelentes células fagocíticas. Un aumento de CD ha sido reportado en otros tipos de procesos inflamatorios en córneas humanas [36].

Si bien en lágrimas de pacientes y controles no había niveles detectables de IL-2, IL-17, IL-4, IL-13 e IL-10, las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-8 estuvieron significativamente aumentadas en las lágrimas de QCE. Los niveles incrementados de IL-1 β son los responsables del marcado aumento de gelatinasas en los pacientes, mientras que el aumento de IL-8, quimioattractante de neutrófilos, contribuyó a la liberación por dichas células de los elevados niveles de MMP-8 encontrada en estos individuos. Nuestros resultados también muestran

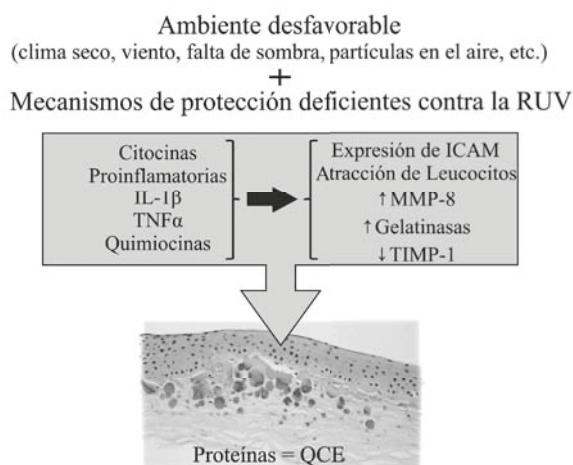


Figura 7. Diagrama representativo del inicio/perpetuación de la QCE.

una disminución significativa de TIMP-1 libre (inhibidor natural de MMPs) en pacientes con QCE lo que potencia de manera manifiesta el accionar de las gelatinasas y colagenasas. En la **Figura 7** se puede observar un diagrama que resume nuestros resultados y explica el inicio / perpetuación de la QCE. En otras enfermedades de la córnea también se ha observado una importante correlación entre citocinas inflamatorias y enzimas degradadoras de la matriz extracelular [37,38].

Muy recientemente en una excelente publicación, Echegaray J y Pérez V revisaron las investigaciones referidas a la interrelación entre componentes inmunológicos y el epitelio corneal y concluyeron que en la capa superficial de la córnea se amalgaman varias vías inmunorreguladoras que eficientemente modulan el microambiente de la mucosa ocular superficie, conjuntamente con estructuras vecinas como la conjuntiva y las glándulas lagrimales [39]. En el año 2001, en la revista *Allergy*, se publicó un *position paper* sobre nomenclatura alérgica, trabajo que fue encargado por European Academy of Allergology and Clinical Immunology

(EAACI) y realizado por un grupo de profesionales [40]. Ese grupo de trabajo de la EAACI tuvo la ambiciosa y difícil tarea de definir enfermedades clínicas sobre la base de conceptos fisiopatológicos. Dicho documento propuso redefinir el término “hipersensibilidad” como síntomas y signos reproducibles, iniciados por la exposición a un definido estímulo, a una dosis tolerada por sujetos normales”. Esta definición abarca fenómenos inmunológicos, así como no inmunológicos. Mientras que el término alergia, debe ser entendido de manera más restrictiva como una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos. En una carta al editor de la revista *Allergy*, el Dr. A.L. de Weck AL [41] manifiestan que estas nuevas definiciones propuestas por EAACI, tanto desde un punto de vista histórico como etimológico, representan precisamente lo contrario de lo que fue propuesto históricamente, ya que la palabra alergia, acuñada en 1905 por von Pirquet [42], hace referencia a una reacción cualitativamente diferente a una respuesta normal, sin estar obligadamente relacionada a procesos inmunológicos.

Teniendo en cuenta que el documento de la EAACI fue solamente una propuesta y no una obligación, nosotros estamos de acuerdo con lo mencionado por el Dr. A.L. de Weck en aquella oportunidad y consideramos que la QCE puede definirse como una enfermedad alérgica que solo se presenta en algunos individuos. Este trabajo de investigación demuestra que en esta enfermedad participan activamente algunos componentes inmunológicos y células del parénquima corneal. Además nuestros resultados proveen nuevas alternativas para el desarrollo de terapias preventivas para esta enfermedad utilizando inhibidores de IL-1 β y/o gelatinasas.

Bibliografía

- Young JD, Finlay RD. Primary spheroidal degeneration of the cornea in Labrador and northern Newfoundland. *Am J Ophthalmol* 1975 Jan;79(1):129-134.
- Freedman A. Climatic droplet keratopathy. I. Clinical aspects. *Arch Ophthalmol* 1973 Mar;89(3):193-197.
- Anderson J, Fuglsang H. Droplet degeneration of the cornea in North Cameroon. Prevalence and clinical appearances. *Br J Ophthalmol* 1976 Apr;60(4):256-262.
- Taylor HR. Aetiology of climatic droplet keratopathy and pterygium. *Br J Ophthalmol* 1980 Mar;64(3):154-163.
- Fraunfelder FT, Hanna C. Spheroidal degeneration of cornea and conjunctiva. 3. Incidences, classification, and etiology. *Am J Ophthalmol* 1973 Jul;76(1):41-50.
- Rodger FC. Punctate keratopathy. *Br J Ophthalmol* 1969;53(6):430.
- Gray RH, Johnson GJ, Freedman A. Climatic droplet keratopathy. *Surv Ophthalmol* 1992 Jan;36(4):241-53.
- Singh D, Singh M. Climatic keratopathy. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1978 Apr;98(1):10-13.
- Matta CS, Tabbara KF, Cameron JA, Hidayat AA, al-Rajhi AA. Climatic droplet keratopathy with corneal amyloidosis. *Ophthalmology* 1991 Feb;98(2):192-195.
- Ormerod LD, Dahan E, Hagele JE, Guzek JP. Serious occurrences in the natural history of advanced climatic keratopathy. *Ophthalmology* 1994 Mar;101(3):448-453.
- Etzine S, Kaufmann JC. Band-shaped nodular dystrophy of the cornea. *Am J Ophthalmol* 1964 May;57:760-763.
- Garner A. Keratinoid corneal degeneration. *Br J Ophthalmol* 1970 Dec;54(12):769-780.
- Resnikoff S, Filliard G, Dell'Aquila B. Climatic droplet keratopathy, exfoliation syndrome, and cataract. *Br J Ophthalmol* 1991 Dec;75(12):734-736.
- Hanna C, Fraunfelder FT. Spheroid degeneration of the cornea and conjunctiva. 2. Pathology. *Am J Ophthalmol* 1972;74(5):829-839.
- Taylor HR, West SK, Rosenthal FS, Munoz B, Newland HS, Emmett EA. Corneal changes associated with chronic UV irradiation. *Arch Ophthalmol* 1989 Oct;107(10):1481-1484.
- Bergmanson JP, Sheldon TM. Ultraviolet radiation revisited. *CLAO J* 1997 Jul;23(3):196-204.
- Singh D, Singh M. Climatic keratopathy. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1978 Apr;98(1):10-13.
- Urrets-Zavalía JA, Knoll EG, Maccio JP, Urrets-Zavalía EA, Saad JA, Serra HM. Climatic droplet keratopathy in the Argentine Patagonia. *Am J Ophthalmol* 2006 Apr;141(4):744-746.
- Urrets-Zavalía JA, Maccio JP, Knoll EG, Cafaro T, Urrets-Zavalía EA, Serra HM. Surface alterations, corneal hypoesthesia, and iris atrophy in patients with climatic droplet keratopathy. *Cornea* 2007 Aug;26(7):800-804.
- Tabbara KF. Climatic droplet keratopathy. *Int Ophthalmol Clin* 1986;26(4):63-68.
- Duhaiman AS, Gorban AM, Shoukrey N, Tabbara KF. Biochemical analysis of climatic droplet keratopathy. *Saudi Bull Ophthalmol* 1988;(3):147-149.
- Kaji Y, Nagai R, Amano S, Takazawa Y, Fukayama M, Oshika T. Advanced Glycation End Product Deposits In Climatic Droplet Keratopathy. *Br J Ophthalmol* 2007; 9:85-88.
- Menegay M, Lee D, Tabbara KF, Cafaro TA, Urrets-Zavalía JA, Serra HM, et al. Proteomic analysis of climatic keratopathy droplets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008 Jul;49(7):2829-2837.
- Sliney DH. How light reaches the eye and its components. *Int J Toxicol* 2002 Nov;21(6):501-509.
- Sliney DH. Exposure geometry and spectral environment determine photobiological effects on the human eye. *Photochem Photobiol* 2005 May;81(3):483-489.
- Serra HM, Cafaro T. Acido Ascórbico: Desde La Química Hasta Su Crucial Función Protectora En Ojo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2007; 41(4):525-532.
- Ringvold A, Anderssen E, Kjonniksen I. Ascorbate in the corneal epithelium of diurnal and nocturnal species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998 Dec;39(13):2774-2777.
- Ringvold A, Anderssen E, Kjonniksen I. UV absorption by uric acid in diurnal bird aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 Jul;41(8):2067-2069.
- Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res* 2004 Mar;78(3):347-360.
- Choy CK, Benzie IF, Cho P. Is ascorbate in human tears from corneal leakage or from lacrimal secretion? *Clin Exp Optom* 2004 Jan;87(1):24-27.
- Cytokines and Signaling Pathways Regulating Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Corneal Epithelial Cells. Gabriel M. Gordon, Dolena R. Ledee, William J. Feuer, M. Elizabeth Fini. *J. Cell. Physiol* 2009;221:402-411.
- Stepp MA, Zieske JD. The corneal epithelial stem cell niche. *Ocul Surf* 2005 Jan;3(1):15-26.
- Stepp MA. Corneal integrins and their functions. *Exp Eye Res* 2006 Jul;83(1):3-15.
- Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Yamagami H, Amano S, Ebi-hara N. Distinct populations of dendritic cells in the normal human donor corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005 Dec;46(12):4489-4494.

35. Hamrah P, Dana MR. Corneal antigen-presenting cells. *Chem Immunol Allergy* 2007;92:58-70.
36. Hamrah P, Huq SO, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol*. 2003 Aug;74(2):172-178.
37. Xue ML, Wakefield D, Willcox MD, Lloyd AR, Di Girolamo N, Cole N, Thakur A. Regulation of MMPs and TIMPs by IL-1beta during corneal ulceration and infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 May;44(5):2020-2025.
38. Leonardi A, Brun P, Abatangelo G, et al. Tear levels and activity of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 in vernal keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Jul; 44(7):3052-3058.
39. Echegaray JJ, Pérez VL. Regulation of Ocular Immune Responses by Corneal Epithelium. *Current Immunology Review* 2011 Aug 7(3) en prensa.
40. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wüthrich B; EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. *Allergy* 2001 Sep;56(9):813-24.
41. Letter to the editor, A.L. de Weck. *Allergy* 2002;57:747-750.
42. von Pirquet C. *Allergie*. *Munch Med Wschr* 1906;53:1457