



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Departamento de Histología y Biología Celular

Máster en Investigación Biomédica (2018/2019)

EFFECTOS DEL PDGF SOBRE LA CICATRIZACIÓN CORNEAL POSTERIOR A QUEMADURA CON ÁLCALI

*Presentada por **JULIANA RAMOS DO CARMO** para optar al grado de Máster por la Universidad de Valladolid, Valladolid, julio de 2019.*

Dirigida por
Dra. M.^a Del Carmen Martínez García

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora Dra. Carmen Martínez García por toda paciencia, incentivo y transmisión de un poco de su gigantesco conocimiento. Gracias por haberme aceptado para colaborar en este proyecto. Agradezco también a Dra. Patricia Gallego, las predoctorandas Elvira y Gisele, el técnico de laboratorio Ivan y a todas aquellas personas que han colaborado directa o indirectamente, instruyéndome y ayudándome a concluir este trabajo.

Por último, y no por ello menos importante, a toda mi familia (mis padres Joelson y Cristiane, mi hermana Yorrana y mis ti@s) que me apoyaron y me ayudaron a llegar hasta aquí y a Dios por la vida que me he dado permitiéndome alcanzar sueños impensables.

*Hay caminos que nos llevan a otros caminos.
¡Disfrute de la caminada!*

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
La córnea y sus estructuras	4
Quemaduras oculares	6
Proceso de cicatrización	6
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Córneas de conejo	10
Realización de las heridas	10
Tratamientos	10
Curso clínico	10
Procesamiento de tejidos	10
Medida del espesor de las diferentes capas de la córnea	11
Contaje celular	11
Estudio de la proliferación celular	11
Estudio de la diferenciación a miofibroblastos	12
Estudio de la muerte celular: Ensayo de TUNEL	12
Análisis estadístico	12
RESULTADOS	13
Evaluación Clínica	13
Ulceración	13
Opacidad corneal	14
Morfología Corneal	15
Secciones de hematoxilina-eosina	15
Espesor corneal	16
Células totales	17
Proliferación celular	18
Diferenciación celular	20
Muerte celular	21
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS	25

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico/Deoxyribonucleic acid.

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina/5-bromo-2'-deoxyuridine.

B+: Células BrdU positivas.

CKs: Citocinas/Cytokins.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro/4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride.

GFs: Factores de crecimiento/Growth Factors.

HCl: Ácido clorhídrico/ Hydrochloric acid.

HE: Hematoxilina-eosina/Hematoxylin-eosin.

IL-1: Interleuquina 1/Interleukin 1.

MB: Membrana basal.

MEC: Matriz extracelular/Extracellular matrix.

NaCl: Cloruro sódico/Sodium chloride.

NaOH: Hidróxido de sodio/Sodium hydroxide.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos/Phosphate buffered saline.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas/Platelet derived growth factor.

PGs: Proteoglicanos/Proteoglycans.

TNF: Factor de necrosis tumoral/Tumor necrosis factor.

TBS: Solución amortiguadora tris/Tris-buffered saline.

TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta/Transforming growth factor beta.

TdT: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase.

α-SMA: Alfa actina de músculo liso/Alpha smooth muscle actin.

RESUMEN

EFFECTOS DEL PDGF SOBRE LA CICATRIZACIÓN CORNEAL POSTERIOR A QUEMADURA CON ÁLCALI.

Introducción: La aplicación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) durante el proceso de curación de córneas quemadas, puede llevar a los queratocitos “in vivo” a proliferar, diferenciarse y migrar de forma similar a la respuesta que se produce “in vitro”, favoreciendo el cierre de la herida.

Objetivo: Estudiar cómo afecta el PDGF en la cicatrización de córneas de conejo tras quemadura con álcali.

Métodos: Las córneas izquierdas de treinta conejos de *New Zealand* fueron quemadas durante 60 segundos con papel filtro de 8 mm empapado en solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.5N y tratadas con PDGF (20 ng/ml en phosphate buffered saline [PBS] estéril). Las córneas derechas se utilizaron como control. El seguimiento clínico incluyó tinción con fluoresceína y medición de opacidad. Después de la eutanasia se enuclearán los ojos en los días 2, 7, 15 y 30, se fijaron en paraformaldehído e incluyeron en parafina. Mediante secciones teñidas con hematoxilina-eosina (HE) se evaluó el efecto del PDGF sobre proliferación celular (inmunofluorescencia de bromodioxiuridina [5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU]), diferenciación a miofibroblastos (inmunohistoquímica de α -actina de músculo liso [Alpha Smooth Muscle Actin, α -SMA]) y muerte celular (ensayo de TUNEL).

Resultados: Córneas con tratamiento cerraron antes, si bien posteriormente reabrieron en mayor porcentaje. La opacidad fue semejante, aunque el menor grado de opacidad persistió en el grupo tratado con 3 gotas de PDGF. La opacidad observada con el tratamiento con 2 gotas de PDGF es compatible con la diferenciación miofibroblástica, que fue mayor a partir del día 15. La muerte celular de queratocitos es mayor en la zona de lesión en la primera semana. A pesar de las variaciones estadísticas encontradas entre las córneas heridas sin tratar y tratadas, se observó una mejor proliferación celular en las córneas tratadas.

Conclusiones: El PDGF estimuló niveles más altos de proliferación celular en relación a las córneas no tratadas. Las células α -SMA positivas que se observaron a los 30 días en la zona de la herida es compatible con el mayor grado de opacidad observado “in vivo” en la clínica. La muerte celular fue mayor entre los días 2 y 7, desde este momento la cantidad de células apoptóticas comenzó a disminuir.

ABSTRACT

PDGF EFFECTS ON CORNEAL CICATRIZATION AFTER BURNING WITH ALCALI.

Introduction: The application of platelet-derived growth factor (PDGF) during the healing process of burned corneas can lead the keratocytes "in vivo" to proliferate, differentiate and migrate in a similar way to the response that occurs "in vitro", favoring the closure of the wound.

Objective: To study how PDGF affects the healing of rabbit corneas after alkali burn.

Methods: The left corneas of thirty New Zealand rabbits were burned for 60 seconds with 8 mm filter paper soaked in 0.5N sodium hydroxide solution (NaOH) and treated with PDGF (20 ng/ml in phosphate buffered saline [PBS], sterile). The right corneas were used as control. Clinical follow-up included fluorescein staining and opacity measurement. After euthanasia, the eyes were enucleated on days 2, 7, 15 and 30, fixed in paraformaldehyde and included in paraffin. Using sections stained with hematoxylin-eosin (HE), the effect of PDGF on cell proliferation (bromodioxuryridine immunofluorescence [5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU]), differentiation to myofibroblasts (immunohistochemistry of smooth muscle α -actin [Alpha] Smooth Muscle Actin, α -SMA) and cell death (TUNEL assay) was evaluated.

Results: Results: Corneas with treatment closed earlier, although subsequently reopened in greater percentage. The opacity was similar, although the lower degree of opacity persisted in the group treated with 3 drops of PDGF. The opacity observed with treatment with 2 drops of PDGF is compatible with myofibroblastic differentiation, which was greater from day 15. The cell death of keratocytes is greater in the lesion zone in the first week. Despite the statistical variations found between untreated and treated wound corneas, better cell proliferation was observed in treated corneas.

Conclusions: PDGF stimulated higher levels of cell proliferation in relation to untreated corneas. The α -SMA positive cells that were observed at 30 days in the wound area are compatible with the highest degree of opacity observed "in vivo" in the clinic. Cell death was greater between days 2 and 7, from this moment the amount of apoptotic cells began to decrease.

INTRODUCCIÓN

LA CÓRNEA Y SUS ESTRUCTURAS

Básicamente el ojo está constituido por tres capas. La mayor es la capa externa, constituida por la esclerótica que evita la deformación del globo ocular y es la estructura sobre la que se insertan los músculos extraoculares. En la parte anterior la esclerótica es reemplazada por la córnea y la unión entre la córnea y la esclerótica se denomina limbo. La capa media, incluye las coroides y hacia la zona anterior se engrosa para formar el cuerpo ciliar y el iris. La capa interna se llama retina, en la que se encuentran las células sensibles a la luz (los bastones y los conos), y una lámina externa de células epiteliales cúbicas que contienen melanina (1,2).

La córnea de conejo ocupa aproximadamente 30 % del globo ocular y tiene un aspecto elíptico, mide 15 mm y 14 mm, horizontal y vertical respectivamente (3). Es la parte convexa más externa de la capa exterior del ojo y tiene una estructura transparente que consiste en una lente con alto poder refractivo de 43 dioptrías (4). Además, es un tejido avascular. Sin embargo, para suplir esta ausencia, la película lacrimal capta el oxígeno del ambiente externo y lo suministra a la córnea. La córnea y su película lagrimal son esenciales en la protección del ojo funcionando de barrera frente a las agresiones externas y dispone de elementos que permiten una cicatrización avascular (5,6). La estructura corneal y su función dependen desde el punto de vista biomecánico de la densidad de las fibras de colágeno, el número de ellas y su diámetro (2).

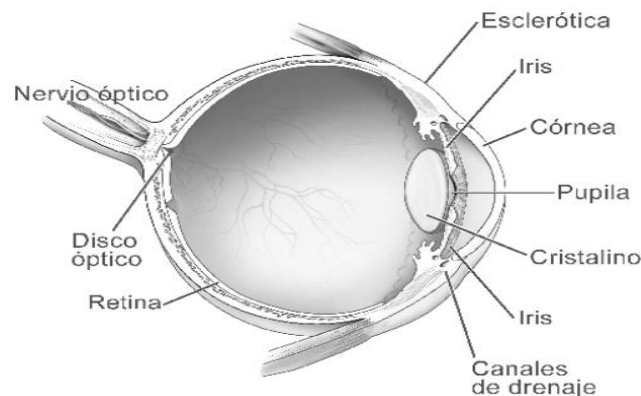


Figura 1: Anatomía del ojo.

Microscópicamente la córnea de conejo consiste en tres capas celulares y una membrana acelular, formadas por:

El epitelio: es la capa exterior y más anterior de la córnea, tiene un grosor de 30 a 40 μm^3 , 10 % del grosor total de la córnea y actúa como estabilizador de la lágrima a través de las microvellosidades digitiformes, manteniendo la transparencia y la refracción de la córnea, además, es una barrera que resiste a la abrasión y con capacidad de degeneración. Es un epitelio estratificado plano, no queratinizado, formado que se subdivide entre 3 a 4 capas de células que se compone de tres tipos (células basales

columnares, alares poligonales y superficiales planas) superpuestas sobre una membrana basal fina con un grosor de 40-60 nm formada principalmente por lamininas, fibronectina, proteoglicanos (PGs) y colágeno (tipo IV y VII). Las capas celulares y el grosor aumentan hacia la periferia corneal (7,8,9).

La vida media de una célula epitelial es de aproximadamente siete días. Éste es el tiempo que tarda una célula de base en reproducirse y pasar a las capas superficiales, el que permite que el epitelio se cure rápidamente si está dañado. Las células basales componen la única capa de células columnares que descansa sobre la membrana basal, son las células menos diferenciadas y tiene un papel muy importante en la adherencia del epitelio al resto de la córnea (4,7). Se trata de células mitóticamente activas, y las células hijas producidas desde el limbo esclerocorneal se desplazan anteriormente para transformarse en células alares que conforman las capas intermedias de la córnea y las células apicales la superficie corneal (7,10).

El estroma: es la capa media y más gruesa, ocupando aproximadamente el 90 % del grosor de la córnea con mismo grosor del humano (450-550 μm). Tiene una densidad alta de fibras de colágeno, con pequeñas cantidades de tipo III, V y VI, siendo el colágeno de tipo I la mayor macromolécula constituyente del estroma corneal. Las fibras de colágeno se organizan en láminas llamadas lamellae, con grosor de pocas micras, siendo el espacio entre las fibrillas de colágeno ocupado por PGs. El mantenimiento y renovación de estas fibras de colágeno y PGs es realizado por los queratocitos (8,9).

Los queratocitos son las principales células presentes en condiciones normales en el estroma corneal, elaboran el colágeno y la matriz extracelular (MEC) del estroma. Asimismo, la transparencia corneal depende de los queratocitos, que determinan la estructura y la orientación de las láminas de colágeno, así como de la funcionalidad de la membrana de Descemet (9,11).

Membrana de Descemet: capa homogénea y fina, tiene un espesor que varía constantemente con el paso del tiempo entre 7 y 15 (en conejos adultos) μm de grosor (8), y está compuesta de colágenos de tipo IV y VIII, laminina y fibronectina que da soporte a las células endoteliales (4,9). La membrana de Descemet es la membrana basal del endotelio corneal y provee la integridad, dando soporte y adhesión a las células del endotelio (8).

El endotelio: es la capa posterior de la córnea, con un grosor que varía según las especies (entre 4 y 20 μm) y posee una monocapa única de células hexagonales con localización posterior a la membrana de Descemet. Tiene como función, mantener el nivel de hidratación estromal adecuado para su transparencia (2,4). La densidad celular, semejante al de los humanos va disminuyendo con la edad, en conejos de 1 y 2 meses es de aproximadamente 41,000 células/ mm^2 de valor promedio y con 2 años decrece para 2000 células/ mm^2 (8).

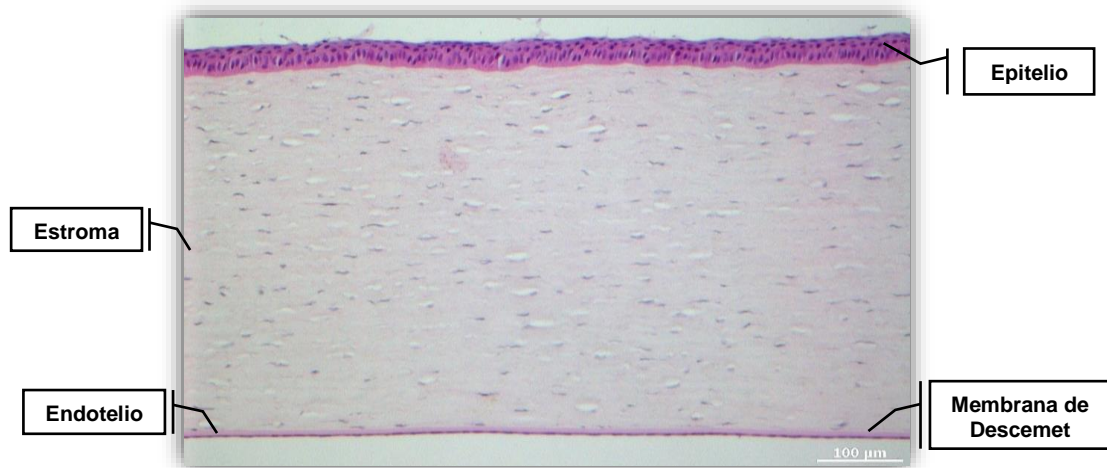


Figura 2: Capas de la córnea de conejo normal, teñida con hematoxilina-eosina (x10).

QUEMADURAS OCULARES

Para hacer referencia a quemaduras oculares, primeramente, debe tenerse en cuenta que el pH en la superficie ocular normal es de 7.4, y cuando está en contacto con una sustancia ajena se verá alterada (12). Las quemaduras oculares son lesiones provocadas por agentes químicos como ácido o álcali, o físicos por radiación solar, eléctricas y térmicas. La severidad de la lesión ocular por agentes químicos va a depender del tipo de sustancia (ácido o álcali), la concentración de la solución, la superficie de contacto, la duración de exposición y el grado de penetración. En general, los álcalis poseen mayor capacidad de penetración en el ojo que los ácidos. Así, la quemadura corneal por álcali representa una de las lesiones más devastadoras del ojo, generando daños severos en la córnea por el cambio del pH, debido a que las sustancias básicas saponifican los lípidos de las membranas celulares, lo cual conduce a la destrucción celular y penetración rápida al ojo. Los ácidos suelen generar menor daño, pues al afectar la superficie ocular generalmente se detienen al combinarse con las proteínas de la córnea, aunque en ciertas ocasiones de prolongada exposición el daño puede ser indistinguible al generado por álcali (13,14).

Un modelo animal bastante utilizado para experimentación son los conejos, pues su anatomía ocular a pesar de no poseer la membrana de Bowman se asemeja a la de los humanos, tanto en sus capas corneales, como en el espesor del estroma, entretanto, el daño corneal y la cicatrización se producen de forma más rápida en estos animales (15).

PROCESO DE CICATRIZACIÓN

Cuando hay pérdida de la integridad ocular, ocurre de forma secuencial y ordenada una serie de procesos biológicos que promueven la cicatrización. El proceso cicatricial es dependiente de proteínas solubles, como las citocinas (CKs) y los GFs, y también células que actúan en la proliferación celular para la recuperación del tejido lesionado. Una lesión corneal provocada por un agente químico genera un estado inflamatorio inicial con liberación de CK proinflamatorias y GF desde el epitelio hacia el estroma (16,17). En las primeras horas tras el daño, las células madre situadas en el

limbo corneal migran de forma centrípeta y se multiplican para cubrir el defecto (6). Al mismo tiempo, el sistema del ligando Fas-Fas media la apoptosis de los queratocitos ya que es estimulado por las CK secretadas por las células epiteliales junto con el factor de necrosis tumoral [Tumor Necrosis Factor, TNF], en cuanto la interleuquina 1 [IL-1] estimula la expresión de GF tanto en el epitelio como en el estroma. Además, el proceso apoptótico y sobre todo la liberación de factores de crecimiento promueve la activación de los queratocitos quiescentes adyacentes al área dañada, que se multiplican y adquieren fenotipo fibroblástico capaz de sintetizar colágeno y otros componentes de la MEC (9), sin embargo, sólo cuando el defecto epitelial está cubierto por nuevo epitelio comienza la remodelación estromal (18). También, se produce la nueva síntesis de los PGs los cuales cumplen una función estructural, al absorber agua y llenar los espacios entre las fibras de colágeno, de hecho, se espera que restaure el estroma normal y, por tanto, la transparencia en algunas zonas de la lesión (15,19).

Durante las primeras 24 horas, los fibroblastos migran hacia la zona acelular que se ha producido tras la apoptosis inicial y a las 48 horas alcanzan el margen de la herida y empiezan a proliferar. El daño provocado en el estroma, media la liberación de factores quimiotácticos que reclutan células inflamatorias que eliminan restos apoptóticos y liberan PDGF, que interviene en el proceso de cicatrización (20,21). El PDGF actúa a través de sus efectos mitogénicos y quimiotácticos, estimulando la migración de células epiteliales y aumentando la proliferación y diferenciación fibroblástica junto al factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$). El $TGF\beta$ tiene actividad bifuncional ya que es capaz de estimular la proliferación de queratocitos al mismo tiempo que inhibe la proliferación de células epiteliales. También actúa de manera sinérgica con el PDGF promoviendo la transformación de los queratocitos en miofibroblastos que se caracterizan por la expresión de α -SMA que aporta propiedades contráctiles a la célula, contribuyendo para los procesos de aproximación de los bordes de la herida y también producen altos niveles de colágeno tipo III, considerado como uno de los principales marcadores de nueva matriz observado tras un daño (10,21).

Aproximadamente 7 días después de que se haya producido el daño, se reepiteliza lo que permite visualizar tejido epitelial desde la semana posterior a la quemadura (16). Al cierre del defecto epitelial, se eliminan las células inflamatorias y los miofibroblastos deben volver a diferenciarse en fibroblastos para continuar su labor de remodelación y mantenimiento del estroma normal (9,21). Durante la remodelación se elimina el tejido cicatricial y el epitelio recupera su espesor normal (4).

HIPÓTESIS

En heridas graves, como la quemadura por álcali, el PDGF debe o puede tener los mismos efectos que los demostrados en piel y en estudios de cicatrización estromal “in vitro” previamente realizados.

OBJETIVOS

- 1.** Seguir y comparar la evolución clínica de una córnea herida con quemadura por álcali y tratada con PDGF y comparar con los que no han sido tratados.
- 2.** Comparar desde el punto de vista histológico, el espesor de epitelio y el estroma de la córnea de conejos heridas y tratadas con PDGF en diferentes dosis para relacionarlas entre sí.
- 3.** Determinar la cantidad de células totales presentes en distintos tiempos en córneas heridas, córneas heridas tratadas con 2 gotas de PDGF y córneas controles.
- 4.** Evaluar la influencia del PDGF sobre la proliferación celular y su localización durante el cierre de la herida.
- 5.** Estudiar la diferenciación fenotípica de los queratocitos sobre la influencia del PDGF.
- 6.** Detectar la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) asociada con la apoptosis en diferentes tiempos en córneas tratadas con PDGF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Córneas de conejo

Para la obtención de las córneas, un centro que figura en el registro oficial como proveedor de animales de laboratorio (Granja San Francisco, Navarra, España) suministró treinta conejos hembras albinos adultos de *New Zealand*, que pesaban entre 2,5 y 3 kg. El Comité de Ética Animal de la Universidad de Valladolid aprobó estos estudios en animales. Los animales fueron cuidados siguiendo las pautas de la Declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftalmológica y de la visión.

Realización de las heridas

Las córneas fueron lesionadas durante 60 segundos mediante un papel filtro de 8 mm empapado en solución de NaOH 0.5N. Para el estudio, la herida fue hecha en el ojo izquierdo y el ojo derecho fue utilizado como control.

Tratamientos

Los tratamientos se realizaron de manera tentativa en tiempo y dosis para ver si lo observado "in vitro" se ponía de manifiesto "in vivo". Los conejos fueron separados en cuatro grupos: heridos, heridos tratados con 2 gotas de PDGF (20 ng/ml en PBS estéril) durante 15 días, heridos tratados con 3 gotas de PDGF durante 7 días y controles tratados con 2 gotas de PDGF.

Curso clínico

Las córneas se evaluaron con un microscopio quirúrgico (Leica M220 F12; Leica Microsystems, Nussloch, Alemania) antes y después del tratamiento, en los días 2, 7, 15 y 30 anterior a la eutanasia. Para evaluar el cierre de la herida, el epitelio se tiñó con fluoresceína sódica (Fluotest; Alcon, Cusi, Barcelona) todos los días hasta que el cierre epitelial se detectó por la falta de fluorescencia de la fluoresceína.

Se evaluó el "haze" (niebla) siguiendo la escala de Fantes et al. (22), donde: el grado 0 representa una córnea completamente clara; el grado 1 representa una ligera opacidad con margen pupilar e iris visible; el grado 2 representa una moderada opacidad con margen pupilar parcialmente visible; el grado 3 representa una opacidad significativa que oculta el iris y el cristalino, pero con la cámara anterior visible; y el grado 4 es la opacificación completa del estroma en el área de color blanquecino. La clasificación de la opacidad se realizó de manera ciega (conociendo el número del animal, no el tratamiento).

Procesamiento de tejidos

Los animales se sacrificaron en los días 2, 7, 15 y 30 después de los tratamientos mediante inyección intracardíaca de pentobarbital sódico (Dolethal 0737-ESP; Vetoquinol, Madrid, España) bajo anestesia general.

Los ojos se enuclearon y luego se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% durante 24 horas y se incluyeron en parafina. Se realizarán secciones a 5 µm de espesor y se tiñeron con HE para los siguientes estudios:

Medida del espesor de las diferentes capas de la córnea.

El espesor corneal fue examinado en microscopio de luz Olympus BX41 (Olympus Life Science, Hamburg, Germany) sobre los cortes teñidos con HE. Se obtuvieron fotografías mediante el software Cell A (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Alemania) a través de la cámara digital Olympus DP20 acoplada al microscopio. El grosor fue mensurado sobre las fotos con una magnificación de 10x usando la herramienta Arbitrary Distance del software. Las medidas (en μm) obtenidas en cada sección de tejido se usaron para calcular el valor promedio del grosor epitelial y estromal.

Contaje celular

Usando la función Area/Perimeter del software Cell A se delimitó en el centro de la herida en la región estromal un área de aproximadamente $200000 \mu\text{m}^2$ y con la función Touch Count se contó el número de células totales presente en el área. Se calculó la relación de las células totales por su área y para el resultado final fue hecho el promedio. El área fue convertida para mm^2 . Las células fueron contadas usando las mismas secciones de cortes y los mismos pasos descritos en el espesor corneal.

Estudio de la proliferación celular

La técnica de inmunofluorescencia de la BrdU fue aplicada sobre cortes de córneas desparafinadas para evaluar cuando y donde se produce la proliferación celular, teniendo en cuenta que la BrdU (10 mg/mL, 5 mL/kg) se inyectó una hora antes del sacrificio de los conejos. Las secciones se desparafinaron y se lavaron con Tris Buffered Saline (TBS) de pH 7,6, luego fueron sometidos a digestión con tripsina (dilución 1:3 con trypsin enzymatic pretreatment) durante 10 minutos a 37°C para permeabilizar las membranas plasmática y nuclear. Se trataron con ácido clorhídrico (HCl) 2 M a 37°C por 1 hora para desnaturalizar el ADN. Para la neutralización se utilizó Tris Borato 0,2 M de pH 8,5 durante 10 minutos. Para bloquear antígenos no específicos se usó suero de cabra al 2% en TBS por 20 minutos. Se incubaron con mouse anti-BrdU (dilución 1:15 en TBS) toda la noche a 4°C . El anticuerpo primario fue detectado con el anticuerpo secundario anti-mouse Alexa Fluor 488 (dilución 1:100 en TBS) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las células BrdU positivas (B+) fueron contadas en tres zonas distintas (limbo, márgenes de la herida y herida) por separado el epitelio y estroma, como muestra en la figura 3. Las células fueron contadas adoptando los mismos pasos del conteo de células totales, pero en el epitelio si considero un área de aproximadamente $10000 \mu\text{m}^2$.

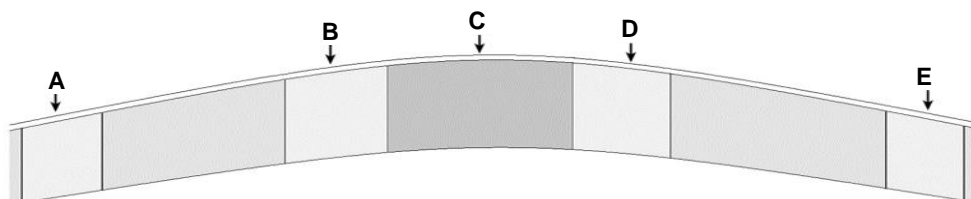


Figura 3: Tres áreas son representadas: limbo (A, E), márgenes de la herida (B, D) y zona de la herida (C).

Estudio de la diferenciación a miofibroblastos

Para determinar el efecto del PDGF sobre la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos, se empleó la técnica de inmunofluorescencia para la detección de α -SMA debido a que la característica fundamental de estas células es la aparición de dichos microfilamentos en su citoplasma.

Para la detección de los miofibroblastos los cortes fueran tratados con suero de cabra diluido al 2% (para bloquear antígenos no específicos) e incubados con el anticuerpo primario anti- α -SMA toda la noche. En seguida, los cortes fueran aclarados e incubados con anticuerpo secundario goat anti-mouse Alexa Fluor 488 con FICT (dilución 1:100) durante 2 horas. Diez minutos antes de cumplir las 2 horas se añadió 4',6-diamidina-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) para marcar los núcleos.

Estudio de la muerte celular: Ensayo de TUNEL

Con el fin de detectar la fragmentación del ADN asociada con la apoptosis, se realizaron ensayos de marcaje de extremo de la uridina terminal (TUNEL) en secciones desparafinadas siguiendo las instrucciones del fabricante (TUNEL, G3250; Promega Corp., Madison, WI, EE.UU).

Las secciones fueron incubadas con cloruro sódico (NaCl) a 0,88% durante 5 minutos, luego se lavó y se aplicó proteinasa K 20 μ g/ml entre 10-15 minutos a temperatura ambiente. En seguida, se aplicó el buffer de equilibrio durante 5 minutos, se retiró el exceso de líquido y se aplicó solución enzimática (1 μ l de enzima Terminal deoxynucleotidyl Transferase [TdT] + 5 μ l de mezcla de nucleótidos unidos a un fluorocromo + 45 μ l de buffer) durante 1 hora a 37 ° C en cámara húmeda y oscuridad. Las muestras fueran incubadas durante 15 minutos con SSC 20x (dilución 1:10 en agua destilada) en oscuridad y temperatura ambiente para parar la reacción. Los cortes fueran teñidos con DAPI.

Las secciones de inmunofluorescencia (de BrdU, α -SMA y TUNEL) se examinarán en microscopio de fluorescencia Axiophot (Zeiss Axiophot, HBO-50; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) y las fotografías se tomarán a través del software Axiovision release 4.8.1 (Carl Zeiss) a una magnificación de 10x con la camera digital AxionCam HRc acoplada al microscopio.

Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas de los datos se analizaron utilizando medias y errores estándar calculadas a través del software Windows Microsoft Excel. Para determinar el grado de significación estadística se asumió un nivel de significación general de $p \leq 0.05$ para todas las comparaciones mediante una prueba *t* de Student. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar.

RESULTADOS

Evaluación Clínica

Ulceración

Las córneas lesionadas con NaOH 0.5N se teñirán con fluoresceína a los 2 días. De ellas más de un 50% presentaron áreas de fluoresceína positiva (áreas desepitelizadas). A los 7 días hay un leve aumento de córneas fluoresceína positivas que se reducen al tanto por ciento a los 15 días y se mantiene hasta el día 30 examinado.

A los 2 días se detectó un aumento equivalente de fluoresceína positiva en córneas tratadas con 2 y 3 gotas de PDGF, pero, significativo en relación a las córneas heridas sin tratamiento ($p \leq 0,05$). A los 7 días al contrario de las córneas heridas sin tratar, la fluorescencia se reduce ($p \leq 0,05$) con ambos tratamientos, sobre todo, con 3 gotas de PDGF. Reiteradamente, aumenta significativamente ($p \leq 0,05$) a los 15 días con una pequeña reducción a los 30 días.

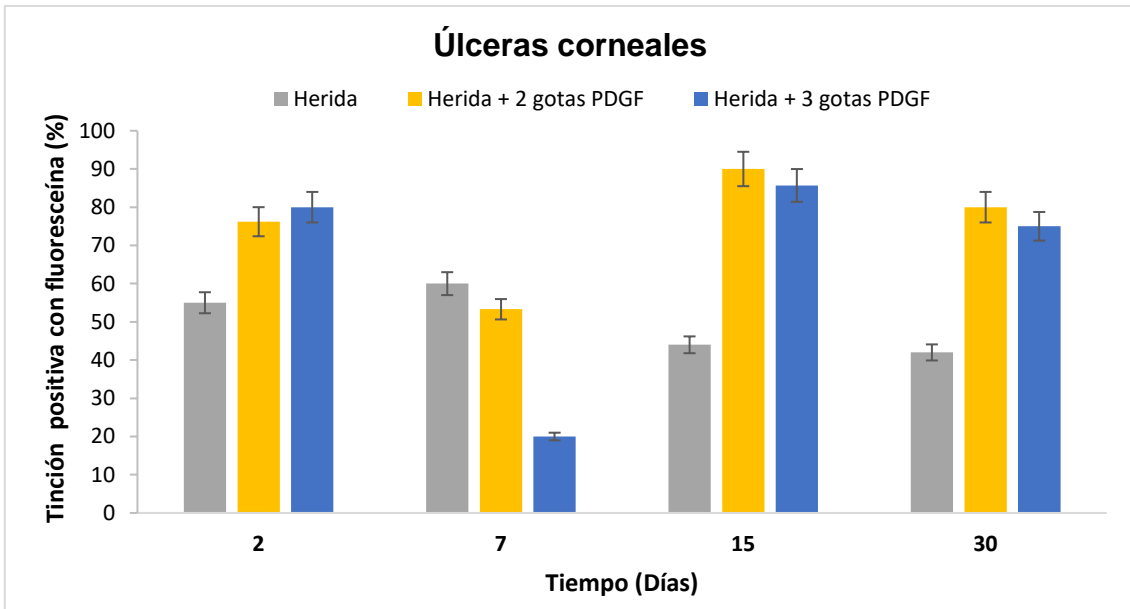


Gráfico 1: Reepitelización corneal según la evaluación de la fluoresceína.

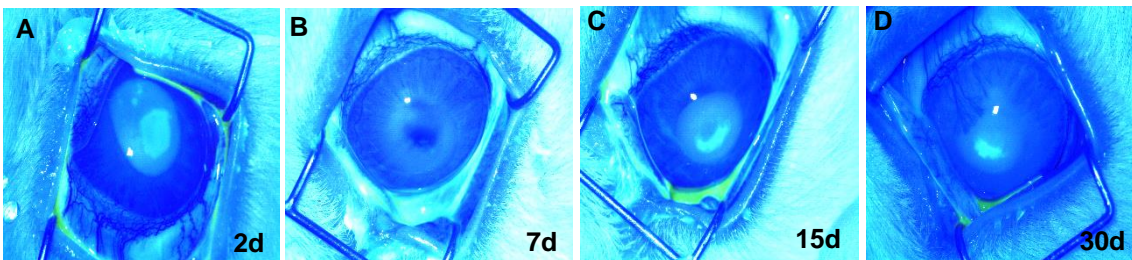


Figura 4: Fotografías de córneas teñidas con fluoresceína 2, 7, 15 y 30 días después del tratamiento con PDGF. (A) En el día 2, se detectó fluoresceína en córneas tratadas con PDGF, (B) mientras que en el día 7 en algunas córneas el epitelio estaba prácticamente cerrado. (C) A los 15 días la presencia de fluoresceína aumentó (D) y a los 30 días hubo una leve reducción.

Opacidad corneal

En el día 2 las córneas heridas sin tratamiento exhiben una opacificación estromal completa (grado 4) en la zona de la herida, con una opacidad moderada (grado 3) en las márgenes de la lesión, mientras las córneas heridas sometidas a tratamiento con 2 y 3 gotas de PDGF presentan una menor ($p \leq 0.05$) opacidad en la zona de la herida como en las márgenes de la lesión tratada. A los 7 días la córnea recupera la transparencia en las márgenes de todos los grupos y la mantiene hasta el día 30 evaluado y reduce la opacidad en la zona de la herida, especialmente con ambos tratamientos. A los 15 días la opacidad vuelve a aumentar, siendo esta similar entre las córneas heridas y tratadas con 2 gotas de PDGF y estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) entre el grupo tratado con 3 gotas de PDGF habiendo una menor opacidad a los 15 y 30 días en la zona de la herida en este último grupo.

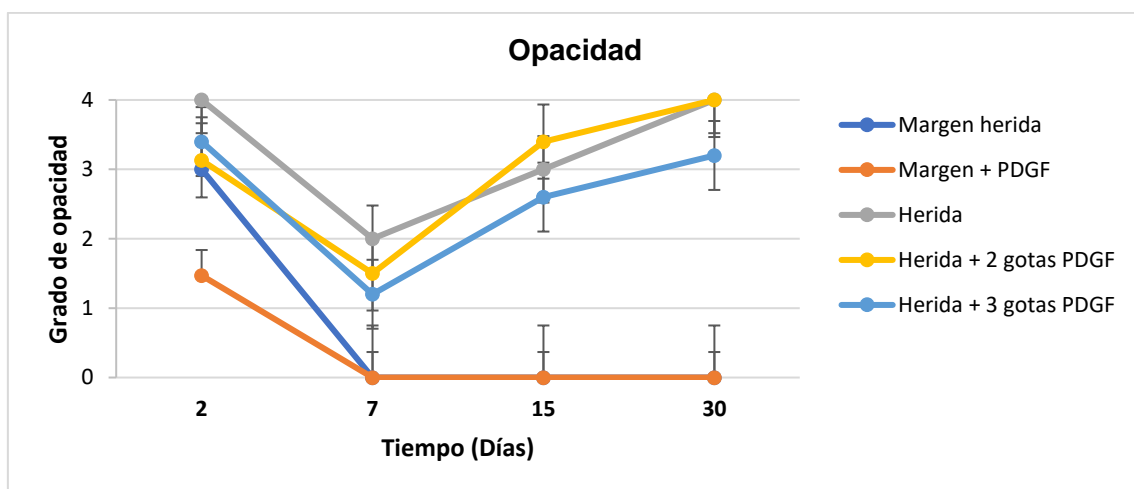


Gráfico 2: Grados de opacidad corneal en las márgenes y en la zona de la herida en distintos tiempos, utilizando la escala desarrollada por Fantes et al. (22).

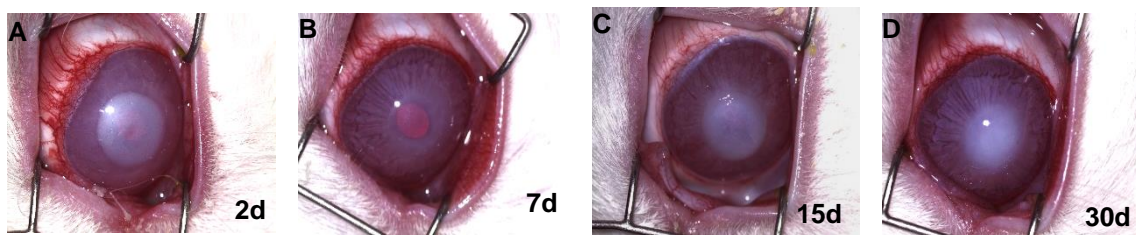


Figura 5: Fotografías de opacidad corneal en los días 2, 7, 15 y 30 días posteriores al tratamiento con PDGF. La opacidad se evaluó utilizando la escala desarrollada por Fantes et al. (22). (A) En el día 2, exhibe una neblina subepitelial (grado 3) fácilmente visible en la iluminación focal directa. (B) En el día 7, la niebla disminuyó (grado 1) mostrando un color rosado en la superficie de la córnea. (C, D) La severidad de la opacidad aumento desde el grado 3 en el grupo tratado con 2 gotas de PDGF y 2 en el grupo tratado 3 gotas de PDGF en 15 días hasta 4 y 3, respectivamente, en el día 30.

Los datos clínicos de los animales controles son provenientes de un trabajo de la alumna predoctoral Elvira Lorenzo-Martín que todavía no han sido publicados.

Morfología Corneal

Secciones de hematoxilina-eosina

La morfología corneal se muestra análoga con tratamiento con 2 y 3 gotas de PDGF. Después de la lesión a los 2 días el epitelio corneal no cubrió totalmente el estroma que mostró un área desprovista de queratocitos y un aumento del espesor debido al edema que fue mayor con el tratamiento (figs. 6B, 6C). A los 7 días con el tratamiento se observa una recuperación epitelial en algunas córneas, entre tanto con un epitelio más fino, con pocas capas celulares ya en el estroma se observa una reducción del espesor por la disminución del edema debido al cierre del epitelio y una leve presencia de queratocitos sobre todo en las córneas tratadas (figs. 6E, 6F). Las secciones de córneas tratadas con PDGF a los 15 días mostraron un aumento celular estromal con formación de MEC, llevando al aumento del espesor y con un epitelio que se despega fácilmente. En el mismo tiempo, las córneas heridas sin tratar presentan características similares (figs. 6H, 6I). A los 30 días, el epitelio se despega en ambos grupos tratados y heridos, debido a una mala adhesión a la membrana basal que sostiene el epitelio y el estroma parecía repoblarse con células con una intensa formación de MEC, lo que aumenta aún más el espesor (figs. 6K, 6L).

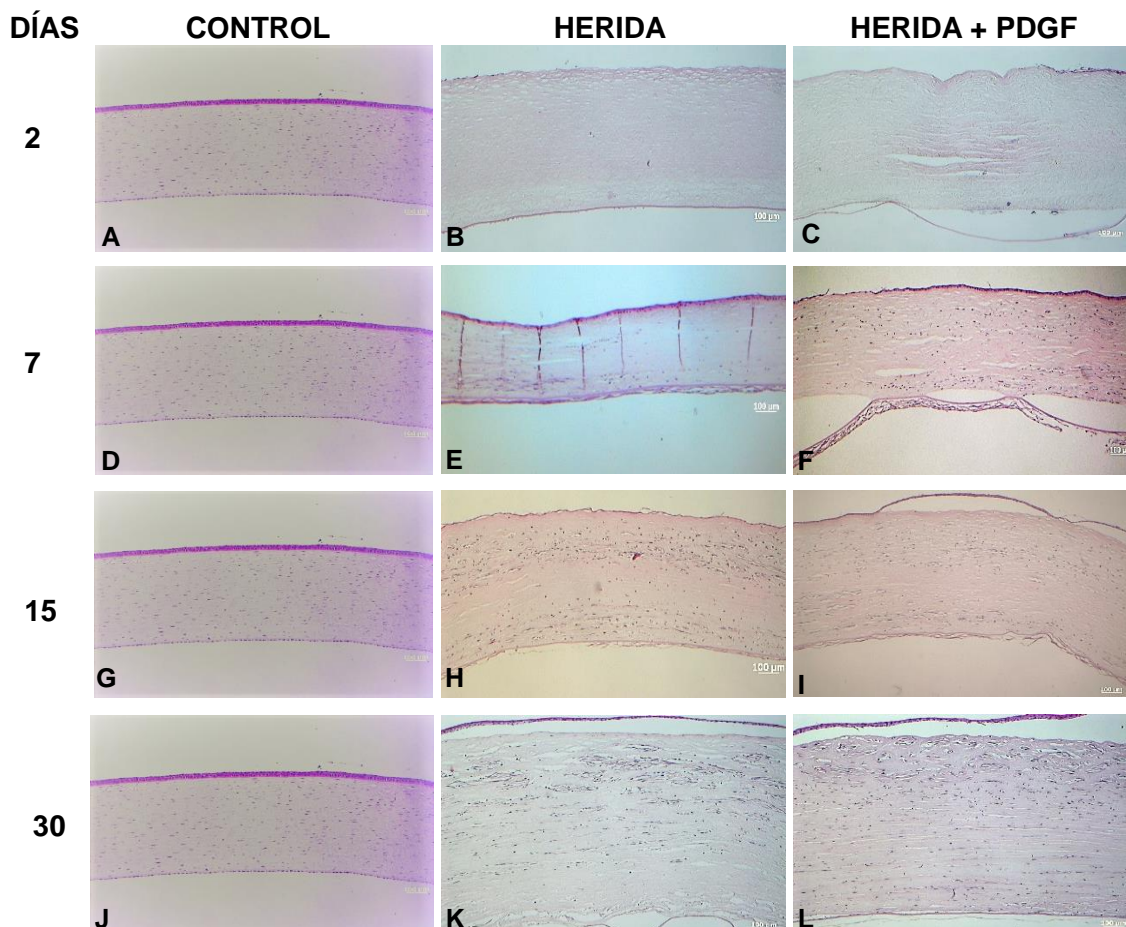


Figura 6: Secciones teñidas con hematoxilina-eosina de córneas control no tratadas (A-J), córneas heridas sin tratamiento (B-K) y córneas heridas tratadas con PDGF (C-L). Amplificación x 50; Barra de escala: 100 µm.

Espesor corneal

Córneas controles tratadas con 2 gotas de PDGF presentan un grosor epitelial y estromal similar a las córneas controles sin tratar. Los animales tratados solo con PDGF no se sacrificaron el día 2 porque no se esperaba la aparición de muerte celular ni la proliferación estimulada en ese corto periodo de tratamiento (gráfs. 3, 4).

En las córneas heridas sin tratamiento a los 2 días hay una reducción ($p \leq 0.05$) del espesor epitelial en comparación con la córnea control, que reduce todavía más a los 7 días y luego empieza a aumentar, alcanzado un grosor equivalente al control a los 30 días. Las córneas heridas tratadas con 2 gotas de PDGF presentan al día 2 la mayor disminución ($p \leq 0.05$) del grosor en relación a los grupos y en secuencia mantiene un aumento constante del grosor. Las córneas heridas tratadas con 3 gotas de PDGF presentan valores similares a las córneas heridas sin tratar hasta el día 15 y un espesor análogo a las córneas tratadas con 2 gotas de PDGF a los 30 días (gráf. 3).

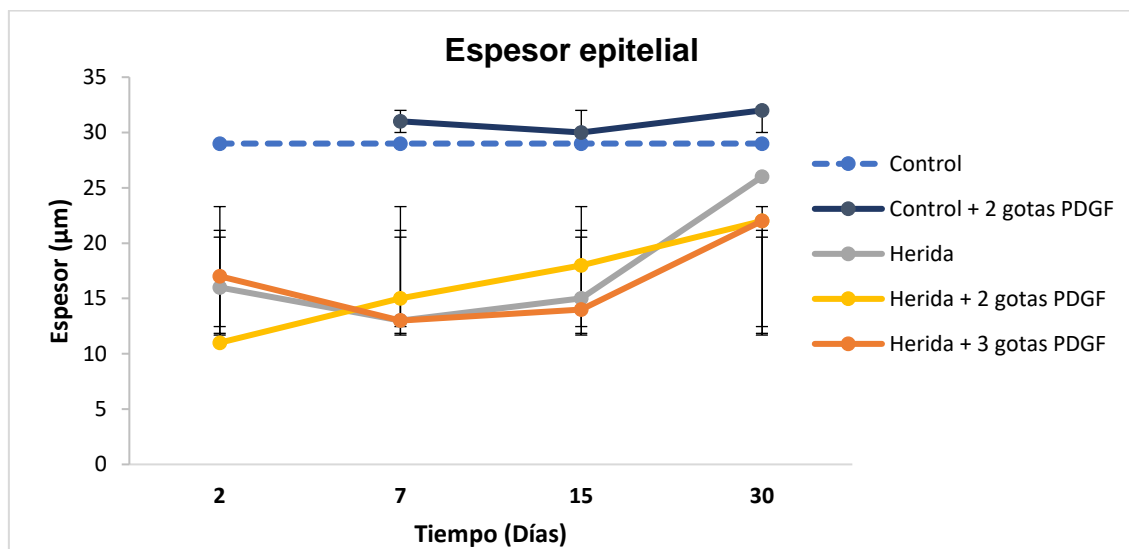


Gráfico 3: Espesor epitelial.

El estroma corneal a los 2 días en córneas heridas sin tratamiento muestra un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en relación a las córneas control y a los 7 días presenta la mayor reducción ($p \leq 0.05$) entre los grupos que luego aumenta ($p \leq 0.05$) significativamente con el pasar de los días.

A los 2 días, el estroma tratado con 2 y 3 gotas de PDGF presenta un aumento semejante en relación a las córneas controles, sin embargo, a partir de los 7 días podemos observar diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los grupos tratados. Con 2 gotas de tratamiento con PDGF a los 7 días hay una reducción del grosor que alcanza el valor control, luego mantiene un aumento continuo hasta los 30 días analizados. Córneas tratadas con 3 gotas de PDGF, mantiene constante un aumento del grosor estromal hasta el día 15 y exhibe el mayor espesor entre los grupos en el día 30 (gráf.4).

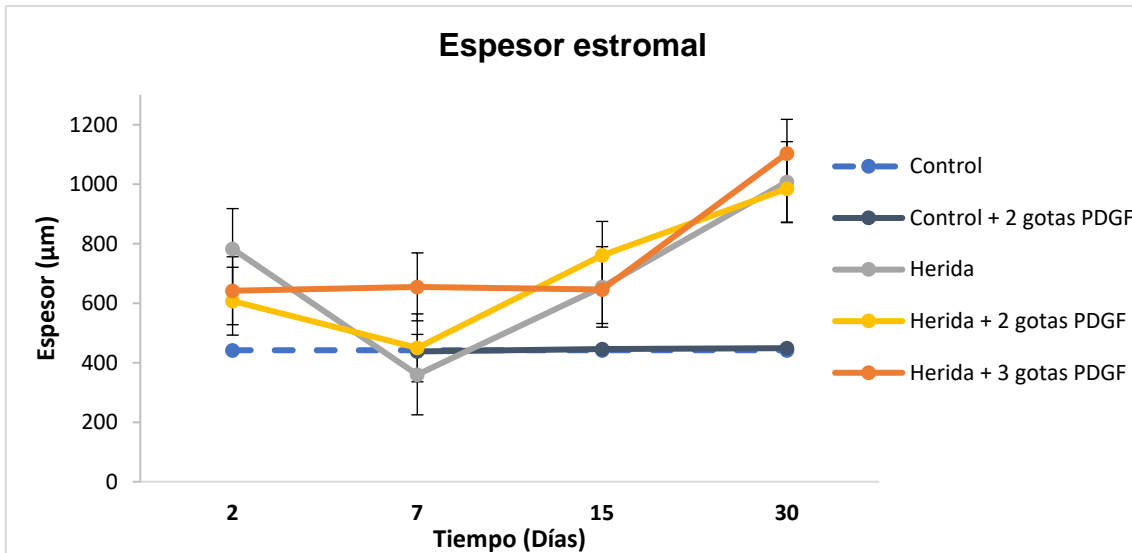


Gráfico 4: Espesor estromal.

Células totales

Basado en el mejor resultado en la recuperación del grosor epitelial y parecido estromal, así como el tratamiento más prolongado con 2 gotas de PDGF durante 15 días, evaluamos la proliferación general de células estromales en comparación con córneas heridas sin tratar y córneas controles tratadas con 2 gotas de PDGF.

Las córneas controles tratadas con 2 gotas de PDGF durante 15 días presentó un aumento ($p \leq 0.05$) en todos los tiempos del número de células totales en relación al control sin tratamiento, con una mayor cantidad a los 15 días de tratamiento como se puede observar en el gráfico 5.

En ambos casos, las córneas heridas sin tratamiento y tratadas con PDGF a los 2 días no presentan células. A los 7 días hay una pequeña presencia celular, pero, significativa ($p \leq 0.05$) en las corneas tratadas y un gran aumento celular sobre todo en las córneas heridas sin tratar a los 15 días y una reducción equivalente en las córneas heridas y tratadas a los 30 días.

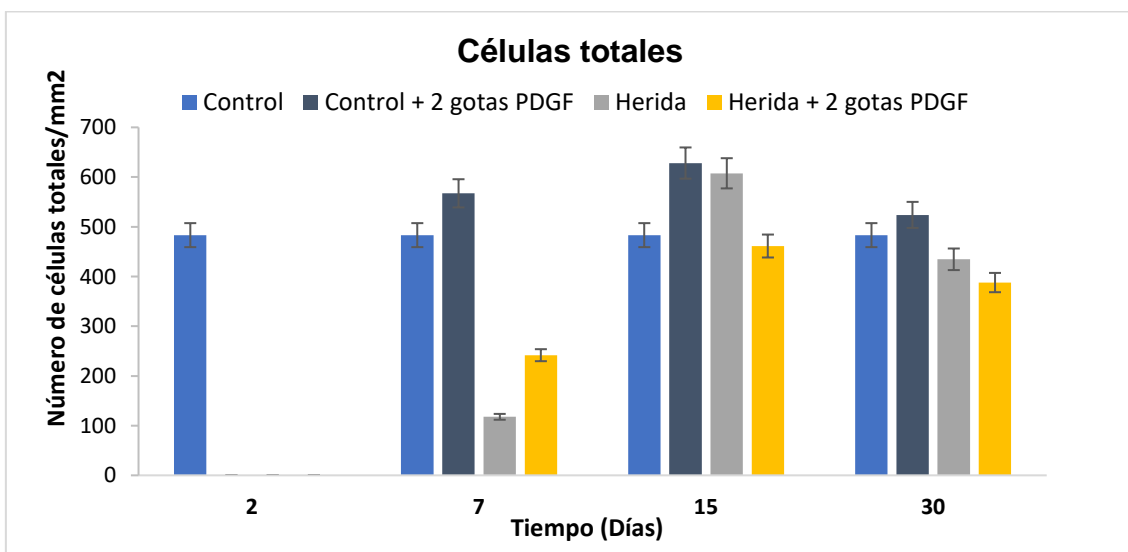
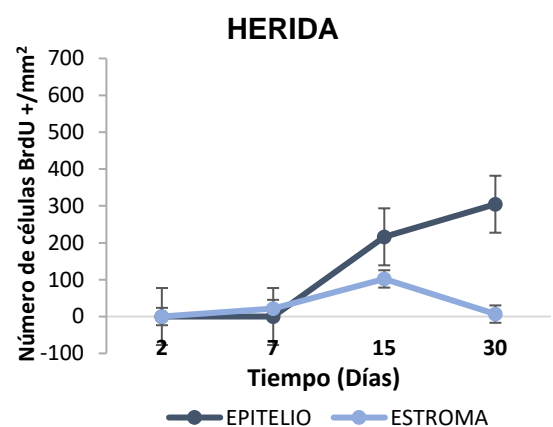
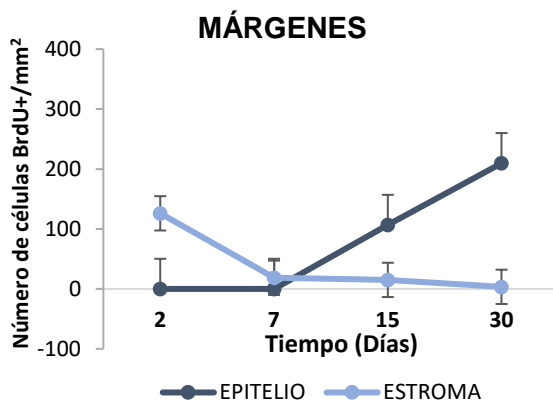
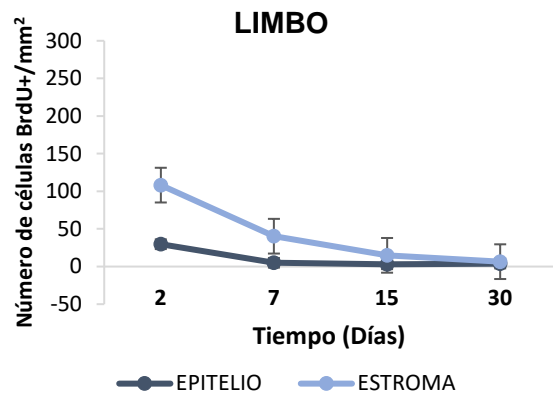


Gráfico 5: Número de células estromales totales en el centro de la córnea.

Proliferación celular

A

Herida sin tratamiento



B

Herida tratada con 2 gotas PDGF

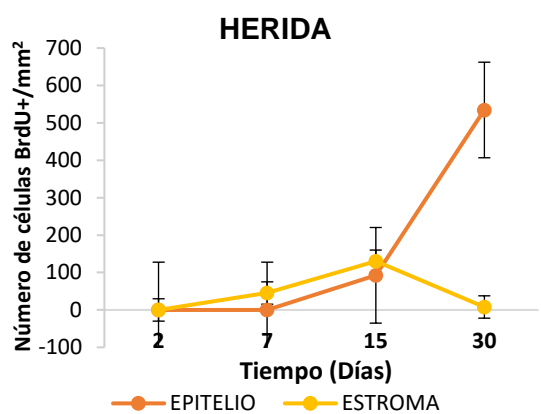
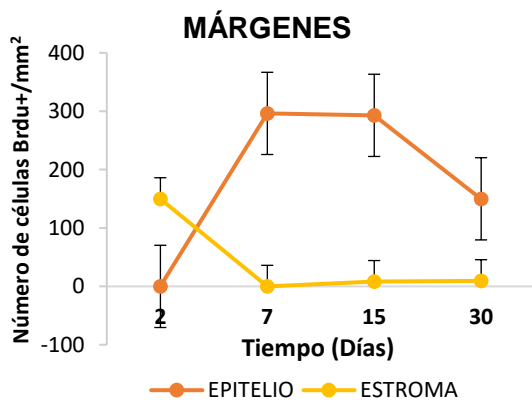
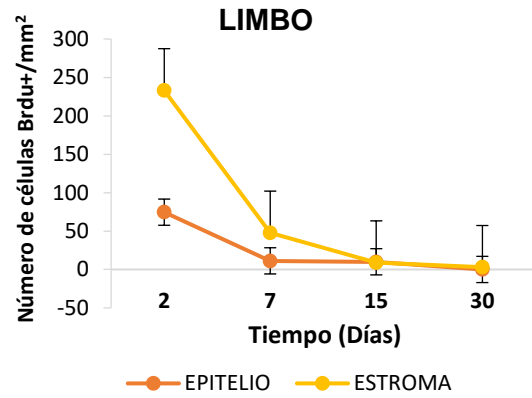


Figura 7: Número de células B+ detectada por inmunohistoquímica en distintas áreas y tiempos, en córneas heridas sin tratamiento (A) y córneas heridas tratadas con 2 gotas de PDGF (B).

Después de la quemadura, a los 2 días, en las córneas sin y con tratamiento en la zona preservada del limbo (figs. 8C 9C) empieza una proliferación de las células madre epiteliales y estromales que migran en

dirección a las márgenes, pero, que no alcanzan el epitelio de las márgenes (figs. 8B, 9B) en este tiempo, encontrándose, la zona de la herida vacía (figs. 8A, 9A). Con el pasar de los días las células B+ limbal van disminuyendo hasta quedarse prácticamente despoblada a los 30 días en ambos grupos (figs. 8L, 9L).

En el día 7 todavía no hay presencia de células B+ en las márgenes epitelial de las córneas heridas sin tratamiento (fig. 8E) en cuanto en las córneas tratadas (fig. 9E) hay un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en las márgenes epiteliales en relación a la córnea sin tratar. En el estroma de las márgenes hay una reducción de las células B+ en las córneas heridas sin tratamiento, el cual se ve vacío en las córneas tratadas. En este mismo tiempo comienza a presentar células B+ estromales en la zona de la herida en ambos grupos (figs. 8D, 9D).

A partir de 15 días en los márgenes, las células B+ epiteliales se muestran en las córneas sin tratamiento y reduce ligeramente en las tratadas, presentando diferencias significativas entre ambos grupos ($p \leq 0.05$). En la misma zona, en el estroma de las córneas sin tratamiento (fig. 8H) exhibe una leve presencia al igual que en las corneas tratadas (fig. 9H) hasta el día 30.

En la zona de la herida de córneas heridas y tratadas (figs. 8G, 9G) hay un aumento de células B+ en el epitelio a los 15 días que aumenta sobre todo a los 30 días en córneas tratadas. En el estroma, al igual que en el epitelio, ocurre un aumento de células B+ a los 15 días, que es casi nulo a los 30 días.

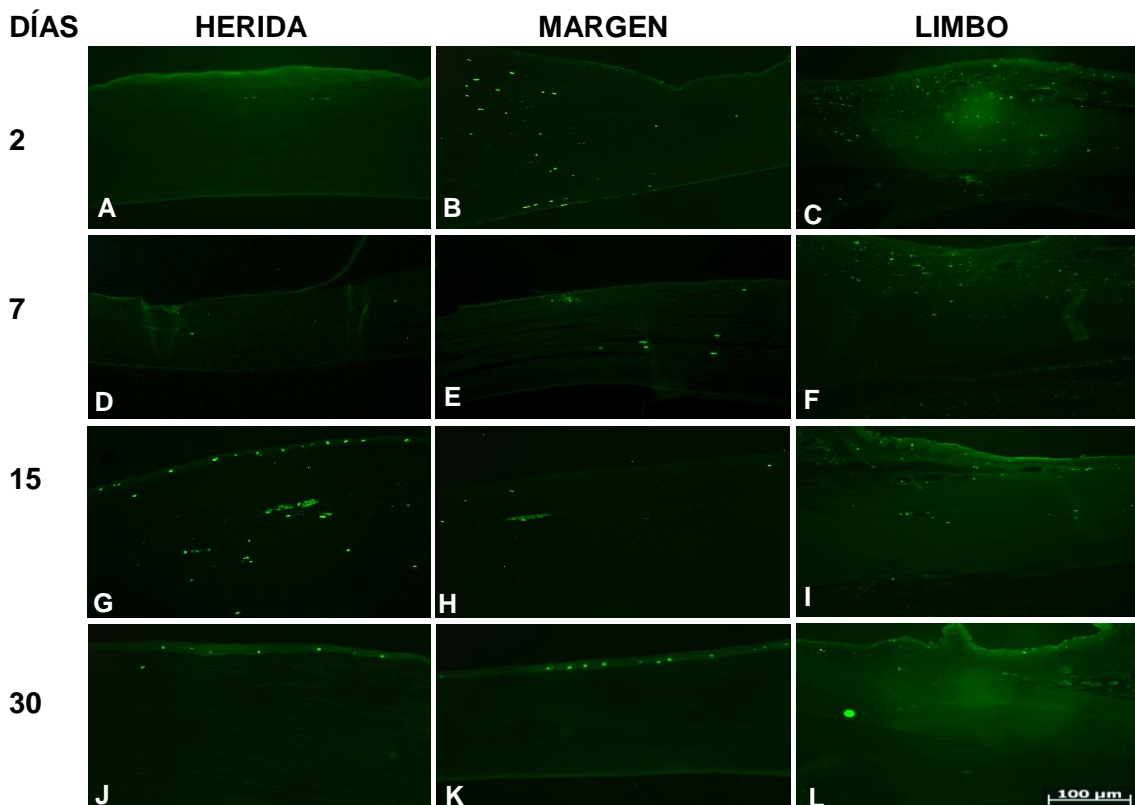


Figura 8: Proliferación celular detectada por inmunohistoquímica con la técnica BrdU en córneas lesionadas sin tratamiento. Se muestran tres áreas en diferentes tiempos: zona de la herida (A-J), márgenes de la herida (B-K) y el limbo (C-L). Magnificación x 50; Barra de escala: 100 µm.

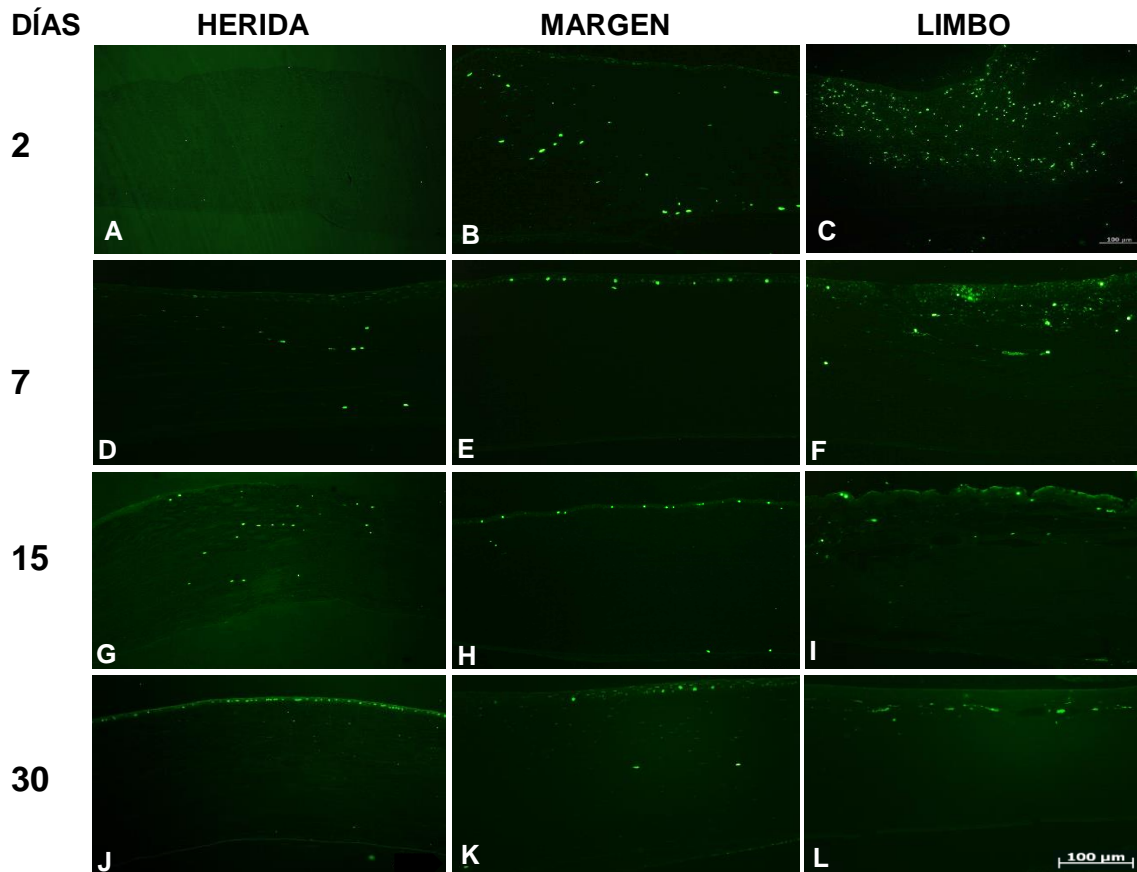


Figura 9: Proliferación celular detectada por inmunohistoquímica con la técnica BrdU tras tratamiento con 2 gotas de PDGF. Se muestran tres áreas en diferentes tiempos: zona de la herida (A-J), márgenes de la herida (B-K) y el limbo (C-L). Magnificación x 50; Barra de escala: 100 μm.

Diferenciación celular

Las secciones sometidas a la técnica de inmunofluorescencia para la detección de α -SMA se evaluaron 7, 15 y 30 días después del tratamiento con 2 gotas de PDGF. La expresión de α -SMA no se detecta en el período inicial posterior a la lesión. En el día 7, se observaron la mayor cantidad de células positivas para α -SMA en los márgenes de la herida (fig. 10A) y pocas en la zona de la herida (fig. 10D). Por el contrario, a los 15 días mostraron una reducción en los márgenes (fig. 10B) y numerosas células α -SMA positivas en la zona de la herida (fig. 10E) que aumentaron mucho más a los 30 días (fig. 10F), mientras los márgenes quedan prácticamente vacíos (fig. 10C).

En el endotelio se produjo una transformación epitelio mesenquimal que no se estudió. La pared de los vasos del limbo se utilizó para validar la efectividad del anticuerpo utilizado.

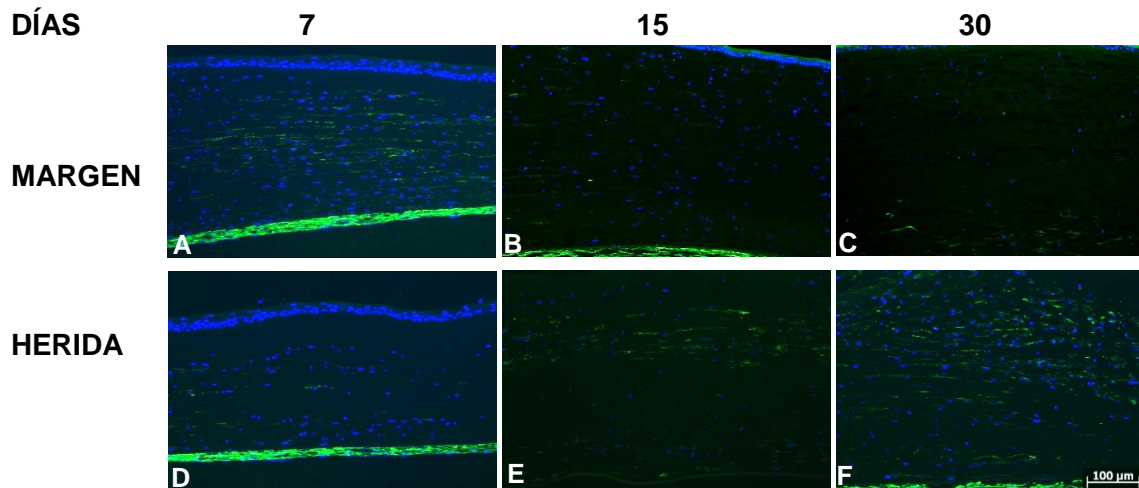


Figura 10: Diferenciación miofibroblástica detectada por la técnica de inmunofluorescencia para la detección de α -SMA después del tratamiento con 2 gotas de PDGF. Se muestran dos áreas en diferentes tiempos: márgenes de la herida (A-C) y zona de la herida (D-F). Magnificación x 100; Barra de escala: 100 μ m.

Muerte celular

Las secciones marcadas con la técnica de TUNEL se evaluaron 2, 7, 15 y 30 días después del tratamiento con 2 gotas de PDGF. En el día 2, se observaron numerosas células TUNEL positivas en el medio del estroma. Por el contrario, las secciones a los 7 días mostraron ausencia de células en el medio del estroma y numerosas células TUNEL positivas en el estroma anterior, y en algunos casos, en el estroma posterior. Entre los días 15 y 30, se mostró pocas células marcadas dispersas en el estroma, especialmente en la zona anterior.

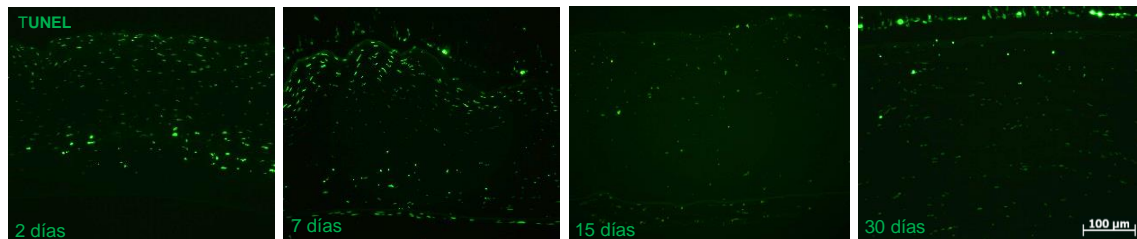


Figura 11: Células apoptóticas detectadas 2, 7, 15 y 30 días por el ensayo TUNEL en corneas tratadas con 2 gotas de PDGF. Se muestra la zona de la herida. Magnificación x 10; Barra de escala: 100 μ m.

DISCUSIÓN

La respuesta de la curación de la herida corneal a la lesión epitelial-estromal puede alterar la organización de la matriz extracelular y, junto con los cambios en la densidad celular y el fenotipo, se puede producir una disminución en la transparencia del estroma (9,21). La respuesta celular estromal detectable más temprana a la herida corneal es la desaparición de los queratocitos del estroma por apoptosis (23).

El resultado de este estudio muestra con el ensayo de TUNEL la apoptosis de queratocitos en la zona de lesión, como ya fue confirmado por microscopía electrónica de transmisión por Wilson et al., 1996 y Helena et al., 1998 (17,24). Esta apoptosis tiene lugar desde las 4 horas siguientes a la lesión, por ello el estudio a los 2 días muestra ya grandes zonas despobladas. La apoptosis de las células continúa en el estroma durante una semana o más, como hemos visto, e incluye las células que fracasan en su proliferación y diferenciación, derivadas de la médula ósea que migran hacia el estroma corneal desde los vasos sanguíneos del limbo que son atraídas hacia el estroma después de la lesión (9). Estos queratocitos en proliferación que se encuentran en los márgenes de la herida, repueblan el estroma empobrecido, como también observamos en nuestro estudio con el tratamiento con PDGF e incluso promovió una mayor proliferación celular en relación a córneas heridas sin tratar. Estudios previos sugirieron que la proliferación de queratocitos después de una lesión también genera precursores de los miofibroblastos que se desarrollan y persisten después de lesiones graves. Los miofibroblastos y la matriz extracelular desorganizada producida por estas células son determinantes críticos del nivel y la persistencia de la opacidad del estroma después de la lesión corneal (25,26).

Netto et al., 2006, (27) han demostrado que las interacciones epitelio-estromal son críticas para la generación de miofibroblastos y el desarrollo de la opacidad corneal. El desarrollo de miofibroblastos ocurre cuando los defectos estructurales y funcionales en la membrana basal (BM) epitelial regenerada permiten la penetración del TGF β y el PDGF del epitelio en el estroma a niveles suficientes para conducir el desarrollo (10,27). Tanto el TGF β como PDGF se unen con alta afinidad a las membranas basales debido a su afinidad por el colágeno tipo IV y los proteoglicanos, respectivamente, y estas citoquinas, por lo tanto, probablemente no penetren en el estroma corneal en córneas sin heridas a niveles suficientes para modular el desarrollo de miofibroblastos (19).

La detección inmunohistoquímica de α -SMA es el marcador más común usado para detectar miofibroblastos in vitro e in situ (19) y como ya ha descrito Singh et al., 2014 (10), la expresión de α -SMA no se detecta en el período inicial posterior a la lesión, ya que in situ, los precursores solo comienzan a expresar α -SMA después de aproximadamente una o dos semanas. Con el tratamiento con PDGF comienza a aumentar el número de células α -SMA positivas en la zona de la herida 15 días después de realizar la herida con la mayor expresión observada en el día 30, compatible con la opacidad observada en la clínica. Otros estudios también encontraron que la densidad de miofibroblastos y la opacidad asociada alcanzan su punto máximo un mes

después de la lesión en el conejo, siendo probable que el equilibrio entre la generación de miofibroblastos y la apoptosis en una córnea determine la densidad de miofibroblastos en un momento determinado (19).

Los miofibroblastos son particularmente adecuados para restaurar la integridad de la córnea después de una lesión penetrante debido a su capacidad para contraer heridas, segregar matriz extracelular y generar estructuras de adhesión con el sustrato circundante. Por lo tanto, la generación de miofibroblastos puede ser beneficiosa en la curación corneal (19). Sin embargo, el desarrollo de estas células es perjudicial ya que crea una opacidad del estroma central (25,28). Una vez que se desarrolla la opacidad del estroma asociada con el miofibroblasto, ésta persiste hasta que se regenera la estructura y función normal del BM epitelial, lo que a menudo lleva meses o años en córneas con una opacidad severa (9,21).

Este ensayo de estudio es poco probable que sea clínicamente significativo en base a la inmunohistoquímica proporcionada debido al bajo número de muestras (n=3), aunque mostró a través de métodos histológicos o microscopía que el PDGF tópico (20 ng/ml en PBS estéril) administrado después de la quemadura con 2 gotas durante 15 días, ha normalizado aparentemente la densidad de queratocitos en el estroma, ha aumentado la proliferación celular y está directamente relacionado con la diferenciación miofibroblástica y la opacidad, que fue un poco más alta con este tratamiento, no garantiza la normalidad funcional tardía de las células estromales repoblatas.

Es importante tener en cuenta que el seguimiento ha sido relativamente corto y el número de animales y de muestras en las córneas tratadas muy escaso, por todo ello, es muy difícil realizar conclusiones fiables.

CONCLUSIONES

- Se ha determinado cómo el PDGF intervienen a lo largo de un mes en la proliferación, diferenciación y muerte celular, relacionada con la clínica.
- El PDGF induce una elevada proliferación celular que se inicia en el limbo y márgenes en distintas zonas y posteriormente disminuye durante el cierre de la herida.
- El aumento de la proliferación celular para suplir la apoptosis inicial de los queratocitos debido a la lesión provocada hace con que muchas de estas células fracasen en su proliferación y diferenciación llevando a una apoptosis más tardía.
- El PDGF induce la diferenciación miofibroblástica coherente con las úlceras y el grado de opacidad observado en la clínica, ya que estas células actúan en la contracción de las heridas, contribuyendo al cierre de estas y segregando MEC que provoca un aumento de la opacidad corneal.

REFERENCIAS

1. Cinta MPM. *Óptica Fisiológica. El sistema óptico del ojo y la visión binocular*. Universidad Complutense de Madrid. 2006;11-307.
2. Segarra SL. *Estudios de escalada de dosis sobre los efectos del Cloruro de Benzalconio intracameral en conejos: un modelo animal de enfermedad endotelial corneal*. Universidad Autónoma de Barcelona. 2016;1-160.
3. Andrew SE. *Corneal diseases of rabbits*. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 2002;5(2):341-56.
4. Gallego PM. *Efectos de diferentes factores de crecimiento recombinantes sobre un modelo "in vitro" de cicatrización del estroma corneal humano*. Universidad de Valladolid. 2015;1-217.
5. Bueis, AB. *Neovascularización corneal*. Superf ocul córnea. 2009;3(3):3-4.
6. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Fundamentals, Diagnosis and Management. Cornea. 2011;3(1):1-1825.
7. Ehlers N, Hjortdal J. *The cornea epithelium and stroma*. Advances in Organ Biology. 2006(10):83-111.
8. Rubio, E. A. *Crosslinking corneal: Estudio experimental de la evolución de los cambios morfológicos y topográficos en córnea de conejo*. Universidad Extremadura. 2014;1-113.
9. Torricelli AA, Wilson SE. Cellular and extracellular matrix modulation of corneal stromal opacity. Exp Eye Res. 2014;(129):151-60.
10. Singh V, et al. *TGF β and PDGF-B signaling blockade inhibits myofibroblast development from both bone marrow-derived and keratocyte-derived precursor cells in vivo*. Exp Yes Res. 2014;(121):35-40.
11. Petroll WM, Lakshman N, Ma L. *Experimental models to investigate intraestromal migration of corneal keratocytes, fibroblasts and myofibroblasts*. J Funct Biomater. 2012;3(1):183-98.
12. Barba-Gallardo LF, et al. *Determinación de pH por colorimetría en muestras pequeñas de lágrima. Método simple para medición en enfermedades oftalmológicas de la superficie ocular anterior*. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 2019;27(76): 41-8.
13. Spector J, Fernández WG. *Chemical, thermal and biological ocular exposures*. Emerg Med Clin North Am. 2008;26(1):125-36.
14. González JS. *Manejo de quemaduras oculares por álcalis y ácidos*. Rev med Cos Cent. 2010;67(595):515-7.
15. Chiluale SM. *Medida de la transmitancia en corneas de conejos mediante un espectrofotómetro. Estudio del proceso de cicatrización*.

Universidad de Valladolid. 2016;1-6.

16. Etheredge L; Kane BP & Hassell JR. *The Effect of Growth Factor Signaling on Keratocytes In Vitro and Its Relationship to the Phases of Stromal Wound Repair*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50(7):3128-36.
17. Wilson SE, et al. *Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing*. Exp Eye Res. 1996;(62):325-27.
18. Diez-Feijóo VE. *Síndrome de erosión corneal recidivante: factores de riesgo, nuevas técnicas Diagnósticas y eficacia del tratamiento con micropunciones*. Universidad del País Vasco. 2017;1-162.
19. Wilson SE. *Corneal myofibroblast biology and pathobiology: Generation, persistence, and transparency*. Exp Eye Res. 2012;99(1): 78-88.
20. Valencia CB. *Cicatrización: Proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas*. Investig Andin, 2010;12(20):85-100.
21. Torricelli AA, et al. *The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury*. Exp Eye Res. 2016;(142):110-8.
22. Fantes FE, et al. *Curación de heridas después de queratomileusis con láser de excímero (queratectomía fotorrefractiva) en monos*. Arco Oftalmol. 1990;(108):665-75.
23. Wilson SE. *Everett kinsey lecture. Keratocyte apoptosis in refractive surgery*. CLAO J. 1998;24:181-85.
24. Helena MC, et al. *Keratocyte apoptosis after corneal surgery*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998;(152):321-29.
25. Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. *Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts*. Prog Retin Eye Res. 1999;(18):311-56.
26. Moller-Pedersen T, et al. *Neutralizing antibody to TGFbeta modulates stromal fibrosis but no regression of photoablative effect following PRK*. Curr Eye Res. 1998;(17):736-47.
27. Netto MV et al. *Stroma haze, myofibroblast, and surface irregularity after PRK*. Exp Eye Res. 2006;(82):788-97.
28. Mohan RR, et al. *Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK*. Exp Eye Res. 2003;(76):71-87.

