

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA

**Estudio de los cambios morfológicos del epitelio
corneal en un modelo animal de ojo seco**

GEMMA JULIO MORÁN

1.INTRODUCCIÓN

1.1. El epitelio corneal

A lo largo de este subapartado se realizará una revisión histórica de los trabajos publicados por otros autores, en lo referente a la descripción del epitelio corneal y su regeneración, poniendo especial hincapié en aquellos aspectos que atañen a su capa más superficial, también llamada estrato escamoso.

Aunque existe consenso en ciertos aspectos, el epitelio plantea, aún hoy en día, algunos interrogantes y discrepancias entre autores, como se verá a lo largo de este capítulo.

Los primeros estudios realizados sobre la morfología del epitelio corneal (Calmettes et al. 1956) indicaron que el epitelio presentaba las mismas características morfológicas generales en todas las especies estudiadas. Si bien, mostraba algunas diferencias en lo referente al número de capas celulares, o al espesor.

En esta misma línea, Ehlers (1970) indicó que el número de capas del epitelio corneal variaba en las diferentes especies, aunque, la diferencia era mínima, máxime si se tiene en cuenta el diferente tamaño del animal (ratón, mandril, buey, cerdo, gato, foca, marsopa o ballena azul).

En general, el número de capas citadas en las diferentes especies más utilizadas en investigación gira en torno a las 6 ó 7. Prince et al. (1970) encontraron entre 6 y 8 capas en la córnea del cerdo, y Ehlers (1970) coincidió en este resultado. Calmettes et al. (1956) citaron de 6 a 8 capas celulares en el epitelio corneal del conejo, y de 5 a 6 en la rata y en el cobaya. Por su parte, Shively y Epling (1970) hablaron de entre 6 y 7 capas en el epitelio corneal del perro.

Gilbard et al (1984) y Bergmanson y Wilson (1989) indicaron que el epitelio corneal en el hombre y en el conejo estaba formado por entre 6 y 8 capas de células. No obstante, Duane y Jaeger (1990) tan sólo citaron entre 5 y 6 capas

en el epitelio corneal humano, y las distribuyeron en tres estratos, como ya se había propuesto en estudios clásicos como los de Duke-Elder (1958).

De este modo, el epitelio anterior de la cornea se define como un epitelio pavimentoso y estratificado cuyas células se diferencian en tres estratos: el más profundo formado por una capa de células columnares o basales, un estrato intermedio con 2 o 3 capas de células intermedias o aladas (llamadas así por su forma irregular con proyecciones) y el estrato más superficial con 2 o 3 capas de células planas, llamadas superficiales o escamosas, que están en contacto con la película lagrimal.

Actualmente se sigue admitiendo esta visión estratigráfica del epitelio corneal y, se asume que es así, probablemente, porque se ha establecido en humanos y en animales de experimentación. Puede, no obstante, ser poco válida en especies con epitelios extremadamente gruesos, como es el caso de la ballena, o extremadamente delgados, como en el ratón.

En ocasiones, se han encontrado células difíciles de agrupar dentro de estos tres estratos. Estas células suelen aparecer con mayor frecuencia en el estrato basal o entre el basal y el intermedio. Entre otras, se han observado células oscuras más basófilas y con citoplasma poco denso. Estas células ya habían sido descritas como células errantes por Ranvier (1881) (citado por Ehlers, 1970), como células dendríticas homólogas de las células de Langerhans por Egurow (1934), como un tipo de células de Schwann relacionadas con las fibras nerviosas del epitelio, por Pau y Conrads (1957), como células basales modificadas por Whitear (1962), o como células secretoras según Teng (1961). Segewa (1962) las denominó melanocitos y Sügiura et al (1962) las llamaron células amelanocíticas.

La realidad es que, en los últimos años, ningún autor ha vuelto a hacer referencia a estas tipologías celulares, lo que lleva a pensar que se tratara de artefactos generados durante los procesos de preparación de las muestras, como algunos autores ya habían apuntado (Calmettes 1956).

A continuación, y una vez definido el epitelio, es necesario profundizar más sobre las características morfológicas y morfométricas de su estrato más superficial, ya que este es el objetivo de estudio en la presente tesis doctoral. Para ello se expondrán los trabajos y las hipótesis que sobre el estrato escamoso han emitido diferentes autores las cuales, como ya se ha apuntado al inicio de este capítulo, son a veces controvertidas.

Es un hecho que, las células superficiales del epitelio corneal han despertado un gran interés en los últimos años, probablemente debido al auge de la cirugía refractiva, o, a los cada vez más frecuentes casos de sequedad ocular. En cualquier caso y, ya desde hace más de 50 años, se están utilizando técnicas diversas que permiten analizar la capa más superficial de la córnea, cuyas células son las más diferenciadas de todo el epitelio corneal (como se verá más adelante al hablar de la renovación epitelial).

Bajo microscopía óptica, las células superficiales del epitelio aparecen como células alargadas y aplanadas de 40 μm de largas por 4 μm de espesor (Rigal 1993). Según Jongebloed et al. (1986), se disponen en dos o tres capas, en las que las células más profundas presentan un núcleo alargado según el eje mayor de la célula (25 μm). Para estos autores, las más superficiales, serían células más maduras que se van a descamar y que han experimentado cambios morfológicos en su membrana para garantizar su papel de barrera. En estas células, el núcleo, o ha desaparecido o se mantiene en forma de condensaciones de cromatina.

Con microscopía electrónica de transmisión (TEM: Transmission electron microscopy) Hassel et al (1980) y Waring (1984) determinaron la existencia de tres estructuras características del citoplasma de estas células: proteínas contráctiles, gránulos de glucógeno y un aparato de Golgi muy bien desarrollado, asociado a numerosas vesículas. Los autores indicaron que las vesículas aparecían distribuidas por todo el citoplasma celular, pero que las más voluminosas se concentraban en el citoplasma de las células más superficiales.

Por su parte, la microscopía electrónica de barrido (SEM: scanning electron microscopy) ha permitido observar con detalle las membranas apicales de las células más superficiales. Bajo esta técnica el epitelio corneal aparece constituido por un mosaico de células aplanadas, poligonales de talla irregular y luminosidad variable cuya superficie está cubierta por numerosas microproyecciones citoplasmáticas en forma de microvilli y/o micropliegues según Hoffman (1972), Pfister (1973), Burstein (1980a,b), Fowler (1980), Lohmann et al (1982), Dormas y Van Logton (1982), Nichols et al (1983), Renard et al (1983), Rodríguez-Caballero et al (1983), Molon y Duprat (1987), Haskjold y Nicolaissen 1988, Kerm et al (1988), Doughty (1990a,b,c), Doughty (1991) y Chaudieu et al (1991) en diferentes mamíferos (entre los que se incluyen roedores, perros, gatos, conejos, humanos y otros primates)

Análogamente, bajo técnicas de microscopía especular de gran aumento también puede observarse el epitelio como un mosaico de células poligonales de diferentes tonos aunque presentan una inversión respecto de las imágenes al SEM (Dilly 1988) (Rigal 1993) De este modo las células que se observan más claras bajo microscopía electrónica de barrido se han identificado como las más oscuras en microscopía especular.

Una vez expuestas las características del epitelio bajo diferentes técnicas, es el momento de ampliar su descripción con microscopía electrónica de barrido, ya que esta es la técnica empleada en la presente tesis doctoral.

Clásicamente, las células superficiales del epitelio corneal observadas al SEM se han clasificado en función de su luminosidad, o sea, del reflejo a los electrones, que presentan a bajos aumentos (200X o 500X). De este modo se han establecido tres tipos celulares: las células claras que aparecen más claras y brillantes que el resto, las células intermedias con diferentes tonos de gris y las células oscuras cuyo tono está más cerca del negro. Los tres tipos celulares parecen distribuidos al azar en toda la superficie corneal (Jongebloed et al. 1986, Ringvold 1983) excepto en el limbo donde algunos autores, (Chuma et al. 1982) (Aitken et al 1988) (Doughty 1990a), han descrito

numerosas células claras mientras que Paterakis et al (1987) observaron una mayoría de células oscuras.

Además, se acepta que las células claras son las más pequeñas mientras que las células oscuras poseen la talla mayor. En cuanto a las células intermedias parece existir más dispersión ya que algunos autores las consideran de talla media mientras que otros concluyen que poseen una talla similar a las oscuras (Rigal 1993).

Lo cierto es que la morfometría del epitelio corneal ha sido poco trabajada, hasta la fecha y que, M.J. Doughty parece ser el autor más interesado en el tema. No obstante, otros autores hicieron, antes que el, pequeñas aportaciones calculando el diámetro mayor de las células. En este sentido Levenson (1973) estableció que el tamaño de las células del epitelio de conejo variaba entre 40 y 50 μm , Lohman et al (1982), también en conejo, proponen tamaños de entre 20 y 75 μm de diámetro mayor. Por su parte, Rodríguez Caballero et al (1983) citaron tamaños de entre 3 y 35 μm en epitelios humanos. Mientras que Lemp y Gold (1986), con microscopía especular en humanos hablaron de tamaños de entre 12 y 66 μm , in vivo.

Por su parte, Doughty (1990a,b,c) (1991) ha realizado diferentes y elaborados estudios sobre el área y la forma de las células superficiales del epitelio corneal de conejo. Para establecer el área celular dicho autor se basa en la longitud mayor y la menor de cada célula, obtenidas con diferentes cálculos geométricos según la forma celular.

A su vez, obtiene la forma de una célula a partir del número de aristas, las cuales vienen definidas por las células colindantes. Por ejemplo, si una célula tiene tres células vecinas se le asignaría una forma triangular.

En cuanto a los resultados de sus trabajos, reflejan la heterogeneidad y complejidad del mosaico celular, con una distribución no gaussiana de las

áreas celulares y una baja resolución de los tres tipos celulares (células claras, intermedias y oscuras) a través del tamaño celular.

En concreto, las células claras, que representan un $29,5 \pm 7\%$ del total de células corneales, presentan una tendencia a las pequeñas dimensiones (áreas que varían entre $4,2$ y $221,3 \mu\text{m}^2$). Las células intermedias, que son el subgrupo más frecuente ($41,1 \pm 5,6\%$), poseen superficies que oscilan entre $31,5$ y $1109 \mu\text{m}^2$. En cuanto a las células oscuras ($29,4 \pm 3,6\%$ del total) poseen superficies que varían entre $70,8$ y $1582 \mu\text{m}^2$.

Doughty observó, también, que las células mayores eran las que mostraban mayor número de bordes celulares, o sea, más células colindantes. (Definió contornos poligonales con hasta 16 aristas aunque, en general, en las corneas estudiadas predominaban las células con 5 ó 6 aristas). De este modo, las células grandes aparecen más redondeadas mientras que las más pequeñas poseen unos vértices más marcados y formas más alargadas.

Recientemente, Doughty (2004) determinó que en el epitelio de bovinos el área celular oscilaba entre 58 y $6444 \mu\text{m}^2$. Esta área era mayor y se redondeaba a medida que aumentaba el número de caras de la célula, igual que lo observado en el epitelio de conejo. De acuerdo con Owaribe et al (1991), Merindano (1994) y con Kato et al (2000) indicó que el estrato superficial del epitelio corneal de los bovinos presentaba mayor número de capas que el del conejo o el hombre.

Doughty es, también, el autor que más hincapié ha puesto en la sistematización del método de preparación de la muestra (1990a) ya que los procesos técnicos necesarios para la observación de las córneas con el microscopio electrónico de barrido SEM pueden alterar las características del epitelio (ver apartado de material y métodos) y, en consecuencia, proporcionar resultados erróneos, además de impedir la necesaria comparación entre los trabajos de diferentes autores.

Retomando la descripción morfológica del epitelio corneal, en las células epiteliales de algunos mamíferos (Pfister y Renner en 1977, Francois et al en 1977 y 1980, Dormans y Van Logton en 1982 y Doughty (1990a,b,c) en el conejo), (Hazlett et al en 1980 en el ratón), (Doughty en 2004 en bovinos) y (Jongebloed et al (1986) y Sellheyer y Spitznas (1988) en el hombre) se han observado unas estructuras redondeadas a las que se ha llamado “holes”, o cráteres. Dichas estructuras no perforantes son descritas por Doughty como pequeños puntos más oscuros que el resto de la superficie celular, pudiendo presentar, a veces, una especie de collar blanco alrededor.

No existe consenso a cerca del origen de estos cráteres. Para Pfister (1973) estas estructuras participarían en el fenómeno de descamación celular, hipótesis que no comparten Renard et al (1983) quienes creen que son, solamente, el resultado de una disposición particular de las microproyecciones, sea en círculo cerrado o abierto. Por su parte, Doughty (2003) ha demostrado que en los conejos los cráteres no son artefactos de la capa mucosa.

Más recientemente, Collins y Collins (2000b) observaron estructuras semejantes a los “holes” en el epitelio corneal de ciertos peces. Como hipótesis los autores han propuesto que estas estructuras podrían ser poros externos de células caliciformes porque se hallan, normalmente en la zona de unión de tres o cuatro células.

Con respecto a las características morfológicas, morfométricas y funcionales de las microproyecciones, son muchos los autores que han aportado sus conocimientos y sus hipótesis y, todavía existen discrepancias al respecto.

Estas estructuras han sido descritas, como ya se ha comentado anteriormente, en varias especies de mamíferos, también en algunos peces (Harding et al 1974) (Collin y Collin 2000b) y en aves y reptiles (Collin y Collin 2000a).

Aunque la morfología y la morfometría de las microproyecciones son características de cada especie, en el estudio de la cornea de diferentes vertebrados llevado a cabo por Collins y Collins (2000a) (2005) se ha

observado cierta analogía en los aspectos morfológicos generales de las especies más cercanas filogenéticamente. En base a las imágenes obtenidas con SEM, dichos autores concluyen que los animales marinos poseen micropliegues y los terrestres microvilli dispuestos al azar.

Esta clara diferenciación se pierde al analizar los trabajos que sobre este tema se han realizado, sólo, en mamíferos (Hoffman (1972), Pfister (1973), Burstein (1980a,b), Fowler (1980), Lohmann et al (1982), Dormas y Van Logton (1982), Nichols et al (1983), Renard et al (1983), Rodríguez-Caballero et al (1983), Molon y Duprat (1987), Haskjold y Nicolaissen 1988, Kerm et al (1988), Doughty (1990b,c), Doughty (1991) y Chaudieu et al (1991)) donde se han descrito tanto microvilli como micropliegues, incluso dentro de una misma especie, como es el caso del conejo.

Pfister (1973) mediante la observación de las células epiteliales de conejo, a muy altos aumentos y desde diferentes ángulos, mostraba imágenes en las que sólo aparecían microvilli y postulaba que los micropliegues podrían ser microvilli estirados sobre la superficie corneal bajo el peso de la mucina. (El autor empleo acetilcisteína para eliminar la mucina del epitelio)

Por su parte, Blümcke y Morgenroth (1967) (según Rigal 1993) trataron de establecer cuantitativamente las diferencias entre microvilli y micropliegue en el conejo e indicaron que, los microvilli tenían entre 0.5 y 1 μ m de altura y 0,5 μ m de espesor, mientras que los micropliegues tenían 0,5 μ m de espesor por una altura de 0,5 μ m y una longitud de entre 1 y 3 μ m. Aunque también encontraron microvilli en disposición paralela, semejando una arruga (según Pfister 1973). Para Doughty (1990a) la complejidad de la disposición de las microproyecciones impide medir de forma fiable su anchura o la separación entre ellas, incluso a 5000 aumentos, magnificación en la que se observan nítidamente al SEM.

En cualquier caso, todavía hoy no está clara cual es la diferencia entre estas dos estructuras, y tampoco se ha acabado de establecer el papel exacto que

desempeñan en la córnea. Si bien, es aceptado por toda la comunidad científica que en los mamíferos aumentan la superficie de las células y permiten el anclaje de la película lagrimal sobre la córnea Pfister (1973) Harding et al (1974). Según Gipson y Anderson (1977) en estudios con microscopía electrónica de transmisión, tanto los microvilli como los micropliegues se mantienen erectos debido a la presencia de filamentos de actina facilitando, así, dicho anclaje.

Beuerman y Pedroza (1996) sostienen que las microproyecciones, además de las acciones anteriormente citadas, facilitan la absorción de oxígeno y colaboran en el movimiento de partículas a través de la membrana, afirmación que también comparten Lemp et al. (1970) y Collin y Collin (2000a) (2005).

Por su parte, Ojeda et al (2001), estudiaron mediante microdissección mecánica las células más profundas del estrato escamoso del epitelio corneal de conejos y humanos observando que mostraban numerosos micropliegues y que, según una observación visual, eran más amplios y más elaborados que los encontrados en las células claras de la superficie. En ese mismo sentido, Lluch (2003) bajo microscopía electrónica de transmisión observó células con microproyecciones en las capas subyacentes del epitelio.

La presencia de micropliegues que no están en contacto con la película lagrimal apoya, según Ojeda et al (2001), la idea de que las estructuras de membrana poseen una función en el incremento de la superficie y el transporte de moléculas a través del epitelio.

Para Collin y Collin (2000a) (2005) las diferentes microproyecciones observadas en vertebrados podrían estar relacionadas con el medio ecológico (marino, terrestre o aéreo) ocupado por cada una de las especies estudiadas y, por lo tanto, ejercerían diferentes funciones, adaptándose a las necesidades de cada medio. Por ejemplo en las aves, los microvilli observados evitarían de forma efectiva la importante evaporación de lágrima producida en las largas horas de vuelo mientras que los micropliegues de los peces marinos serían más eficaces protegiendo el medio ocular de la hiperosmolaridad del agua de

mar. Como ejemplo extremo, los teleósteos, peces cuyos ojos están desprovistos de párpados, poseen inequívocos micropliegues que se disponen ordenadamente siguiendo un patrón constante (Harding et al 1974).

La interpretación de los diferentes tonos celulares observados en el epitelio corneal bajo microscopía electrónica de barrido es otro de los puntos controvertidos en el conocimiento de esta estructura ocular.

En general, se asume que la luminosidad celular, o tono, depende de las características de las microproyecciones, básicamente de su densidad y la morfología de toda su longitud (Dormans y van Logton 1982) Lohman et al (1982) (Doughty 1990a) (Collin y Collin 2000a).

Para Pfister (1973) la superficie de las células oscuras tienen más del doble de microvilli por micrómetro cuadrado que las células claras (28 microvilli/ μm^2 en las células oscuras y tan sólo 13 en las claras) pero estos son más cortos (0,25 μm oscuras/ 0,6 μm claras). En general, en todos los mamíferos estudiados por este autor la densidad de microproyecciones determinaba el tono claro u oscuro de las células.

Por el contrario, otros autores (Hazlett 1980) (Doughty 1990a) (Doughty 1996) en estudios posteriores a los realizados por Pfister muestran que las microproyecciones son más abundantes en las células claras que sobre las sombreadas. De hecho, no existe ningún trabajo en el que se haya realizado un detallado análisis cuantitativo de la organización de las microproyecciones (Pfister no indicó el método utilizado para obtener las medidas en base a sus imágenes del epitelio al SEM).

Algunos autores opinan que la mucina lágrimal, más que la diferente densidad de microproyecciones, es la que determina el tono celular. (Waggone y Philip en 1981) (Renard et al en 1983) Hazlett (1984). Proponen que las células oscuras presentarían microproyecciones menos visibles porque estarían cubiertas de mucina que oscurecería la superficie celular. Las células claras,

por el contrario, no tendrían la misma afinidad por la mucina por lo que sus microproyecciones serían más visibles.

Renard et al (1983) después de estudiar el epitelio con SEM realizaron un conteo de las microproyecciones de las células epiteliales vistas al TEM para, así, diferenciar los tipos celulares (claras, intermedias y oscuras). Sin embargo constataron que no había diferencias significativas entre unas células y otras. Los autores concluyen que las células poseen más o menos la misma densidad de microvilli o micropliegues y que es la mayor o menor cantidad de mucina lagrimal la que produce los tonos celulares diferentes.

Sin embargo, Basu et al (1984) si que encontraron una marcada variación en la densidad de las microproyecciones de una córnea a otra en imágenes de SEM a 5000x pero los tipos celulares no se identificaron.

Actualmente, todavía no se ha resuelto este interrogante ya que a pesar de que se han utilizado varias sustancias (entre otras: lavados con suero salino o con acetilcisteína) para eliminar la capa mucínica de la lágrima esta no parece eliminarse totalmente (Renard et al en 1983) (Doughty 1990a)

Por otro lado, la capa mucínica no se puede observar de forma obvia siguiendo una fijación convencional ni con TEM (Leuenberger 1978) (Beuerman y Pedroza 1996) ni con SEM (Doughty 1990a) (Collin y Collin 2000a) (Doughty 2002). Para que dicha capa sea evidente es necesario tratar las córneas con sustancias policationicas o utilizar la criofijación.

Si la sustancia policationica (por ejemplo el rojo de rutenio) se emplea después de la fijación la mucina aparece como una capa densa a los electrones que cubre irregularmente el epitelio (Nichols et al 1983).

Por el contrario, si el polication se añade conjuntamente con el fijador (Nichols et al 1985) (Hazlett et al 1986), o la cornea se congela instantáneamente para criopreservarla (Nichols et al (1985) (Chen et al 1997) la capa mucínica se

observa más gruesa de aspecto gelificado y con algunas hebras. Chen et al (1997) fracturaron la muestra después de la criofijación ("freeze fracture") y la mucina aparecía como una capa reticulada, evidenciando, así, una fina microestructura. En conclusión, esta capa de la lágrima, íntimamente ligada al epitelio corneal, posee características físico-químicas complejas cuyo completo conocimiento necesita de posteriores investigaciones.

El estudio de los diferentes tonos de las células escamosas se ve, además, dificultado por la influencia de ciertos aspectos técnicos como por ejemplo el ángulo de incidencia de los electrones sobre la muestra (Renard et al 1983) (Doughy 1990a). Según dicho ángulo la riqueza de tonos celulares puede aumentar o disminuir hasta observarse un epitelio de color gris uniforme. Otros factores metodológicos que influyen sobre el tono de las células epiteliales son la consistencia del baño de oro, las condiciones de contraste y profundidad en las que se observa la muestra y la reciente historia de la película lagrimal (Doughy 1990a)

Aunque la descripción exacta de los diferentes tipos celulares del epitelio corneal no este completamente resuelta, los diferentes autores también se han planteado el origen de dicha heterogeneidad y han expuesto varias teorías.

Para Bulow y Ehlers (1968) las diferentes características celulares son consecuencia de un proceso madurativo en el que las tres tipologías, clara intermedia y oscura, se corresponderían con tres estado diferentes del ciclo vital, es decir, que habría células jóvenes, maduras, e hiper maduras. Poco tiempo antes, Blumcke y Morgenroth (1967) ya habían sugerido que, las células pequeñas situadas entre las grandes, podrían ser células jóvenes en su proceso de ascensión hacia la superficie.

Los estudios de la exfoliación celular en ratas (Hazlett et al 1980) apoyaban esta hipótesis que ha sido adoptada por varios autores. Pero las opiniones son contradictorias a la hora de asignar la edad a cada tono celular.

De este modo, hay autores que consideran que las células claras son las más jóvenes (Pfister (1973), Thoft y Friend (1983), mientras que las oscuras representan un estado hipermaduro de la vida celular.

En el extremo contrario se hallan Waggoner y Philip (1981) i Renard et al (1983) quienes consideran que las células claras son las viejas y están a punto de descamarse. Estos últimos autores argumentaban que puesto que las células oscuras parecían ser menos superficiales que las claras podría pensarse que eran las más jóvenes ya que la renovación del epitelio tiene un sentido ascendente (como se verá más adelante con detalle).

Por su parte Doughty (1996) apuesta por la idea de que los tres tipos celulares son tres poblaciones celulares diferentes y no diferentes estadios de maduración de una única población. El autor se basa en la heterogenicidad encontrada en el grupo de células claras para afirmar que las más redondas y grandes son el fenotipo terminal de dicho grupo, justo antes de la descamación.

Para apoyar esta hipótesis están los trabajos de Sokol JL et al. (1990) en los que se demuestra que las capas internas del epitelio corneal, puestas al descubierto por la acción de un surfactante, presentaban igualmente los tres tipos celulares. De este modo, las células claras no serían las más recientemente expuestas al medio externo ni las oscuras las que lo han resistido más tiempo.

Dentro de este contexto, Doughty (1996) propone que las células claras sufren un ciclo completo desde su emergencia a la superficie corneal hasta su eventual descamación y se presupone que lo mismo ocurriría con las intermedias y las oscuras.

Que las diferencias entre las células del epitelio sean debidas al estadio dentro del proceso de maduración o los tipos celulares sean tres poblaciones distintas es, todavía hoy, otro de los dilemas del epitelio corneal que quedan por resolver.

Una vez descrito el epitelio desde un punto de vista morfológico y morfométrico es esencial, teniendo en cuenta los objetivos de esta tesis doctoral, conocer algunos aspectos de su fisiología relacionados con la renovación epitelial.

El epitelio corneal, como la epidermis, es un epitelio estratificado en el que la capa superficial constituye el elemento protector del tejido. En el caso de la epidermis, la queratinización superficial refuerza el papel de barrera del tejido, protegiéndolo eficazmente. Pero a nivel de las células del epitelio corneal la queratinización no existe puesto que restaría transparencia.

La transparencia es una característica esencial para la córnea ya que una visión normal depende, entre otros aspectos, de la habilidad de la córnea, al igual que del cristalino, para permanecer transparente permitiendo, así, una adecuada refracción de la luz en la retina.

La ausencia de queratinización del epitelio corneal se compensa con la presencia de la película lagrimal que tapiza la superficie de la córnea y constituye el elemento indispensable para que las células recubiertas aumenten su resistencia (Rigal 1993)

Sean queratinizadas o no, todas las células superficiales son células hiperdiferenciadas al final del ciclo celular. A nivel del epitelio corneal esta diferenciación está basada en las modificaciones morfológicas que sufre la capa epitelial más externa para poder llevar a cabo con éxito su función de barrera.

A grandes rasgos dichas modificaciones son: la presencia de uniones estrechas, que confieren una gran cohesión y permiten aislar los espacios extracelulares del medio exterior, el aplanamiento celular y las microproyecciones apicales que permiten un correcto anclaje de la película lagrimal con la capa superficial externa.

Además, estas células superficiales poseen unas características nucleocitoplasmáticas (núcleo ausente o muy condensado y muy pocas mitocondrias)

por las que se consideran células en fase de regresión metabólica, o lo que es lo mismo, son células cuya vida será corta. Este hecho explicaría la necesidad de un reemplazo permanente de la capa más superficial del epitelio corneal.

La complejidad de una renovación constante se basa en la premisa de que la masa celular epitelial debe ser estable por lo que es indispensable que se establezca un equilibrio entre la división, la maduración, la muerte y la descamación celular. Este balance altamente integrado entre los diferentes procesos celulares supone la existencia de múltiples mecanismos de coordinación, que están regulados por la acción crítica de una miríada de citoquinas (Luo et al 2001), como se verá más adelante.

Por otro lado, para que el epitelio corneal se renueve correctamente son necesarias ciertas condiciones metabólicas basadas en los altos requerimientos que un proceso de renovación constante requiere. Principalmente, el tejido realiza una rápida síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas estructurales (30% de la síntesis de proteínas de la célula) y de proteínas de adhesión. La fuente de estos constituyentes principales no es única. Por ejemplo, según trabajos de Trinkaus-Randall et al (1988) se sabe que el epitelio utiliza algunos de los componentes de la membrana basal (colageno IV, fibronectina, laminina, etc.)

La síntesis proteica intensa, concomitante a la multiplicación y diferenciación celular, necesita de grandes cantidades de aminoácidos. Los aminoácidos se obtienen, básicamente, a través del humor acuoso vía endotelio y estroma. Por su parte, la lágrima contiene pocos aminoácidos y la barrera epitelial, con sus uniones estrechas, es impermeable al paso de dichas sustancias (Rigal 1993)

En cuanto a la energía necesaria para el proceso de síntesis y en general para la proliferación y migración del epitelio corneal, se obtiene, principalmente, de la glucosa del humor acuoso y de los depósitos de glucógeno epiteliales (Luo et al 2001) por la vía aeróbica clásica a partir del oxígeno atmosférico que, disuelto en la lágrima, difunde hacia el epitelio (Fatt y Bieber 1968 según Rigal 1993)

Según estudios previos el epitelio utiliza el oxígeno 10 veces más rápido que el estroma (Rigal 1993). El hecho es que, aunque el estroma represente el 89% de la masa corneal, la demanda de oxígeno es muchísimo más pequeña debido a su baja densidad celular.

Clásicamente, la renovación del epitelio corneal se había enfocado bajo una perspectiva unitaria, considerándola idéntica a la que sufren todos los epitelios estratificados. De este modo, se planteó como un proceso vertical en el cual las células superficiales descamadas son reemplazadas continuamente por las células basales.

Esta teoría clásica, que es adecuada para casi todos los epitelios estratificados, como por ejemplo la epidermis, no es del todo aplicable a la renovación del epitelio corneal porque no explica la diferente actividad mitótica según la zona corneal considerada ni el carácter centrípeto de los movimientos celulares.

Gracias a los estudios de Shapiro, Friend y Thoft en 1981 y más tarde Thoft y Friend en 1983 se estableció una nueva teoría que explicaba la renovación del epitelio corneal. Esta teoría, llamada de transdiferenciación, hipotetizaba que la renovación se realiza gracias a la migración de células epiteliales de la conjuntiva hacia la córnea. Dichas células sufrirían una diferenciación transversal perdiendo sus características típicas conjuntivales y adquirirían las de una célula corneal. La pérdida celular por descamación estaría compensada por la aparición de nuevas células que, migrando desde la periferia, proliferarían en la capa basal corneal. Estos autores resumían la conservación permanente del equilibrio por la igualdad $X+Y=Z$ donde X representa la proliferación de las células epiteliales basales, Y el movimiento centrípeto de las células y Z la pérdida celular en la superficie corneal.

Esta teoría fue contestada por Kruse et al en 1990 quienes provocaban la ablación del epitelio conjuntival y corneal respetando las células basales límbicas y observaban como el epitelio se regeneraba. Por el contrario, dichos autores demostraron que si se eliminan de la córnea todas las células límbicas la reepitelización de la superficie corneal se realiza a partir de la

conjuntiva pero se acompañaba de una vascularización corneal, erosiones recurrentes e irregularidades. El nuevo epitelio presenta siempre un persistente carácter conjuntival. En este sentido también trabajaron otros autores como Dua y Forrester (1990) que aportaron argumentos suplementarios en contra de la transdiferenciación.

Actualmente, la teoría que se acepta como válida es la propuesta por Schermer Galvin y Sun en 1986. Esta teoría habla de un modelo de maduración del epitelio corneal en el cual las células madre situadas en la capa basal del limbo serían la fuente original del resto de células del epitelio corneal.

Esta hipótesis está apoyada por diferentes observaciones clínicas, histológicas, estudios radiográficos, histoinmunológicos y por cultivos celulares (Rigal 1993) que demuestran que el potencial proliferativo del epitelio límbico es mayor que el del epitelio corneal, que existe una migración centrípeta de las células epiteliales corneales y que las células basales limbares están en un estado menos diferenciado respecto de las otras células del epitelio corneal. De este modo, la renovación del epitelio corneal se confirma como un proceso que parte de células madre indiferenciadas, situadas en la capa basal límbica, con una vida de larga duración.

Después de algunas divisiones las células madre dan origen a unas células hijas, descritas por primera vez por Tseng en 1989 (según Boulton y Albon 2004). Estas células hijas o células amplificadas transitorias son células epiteliales que empiezan a diferenciarse y migran desde el limbo hacia el centro de la córnea, horizontalmente. Ellas constituyen el soporte epitelial basal, en el que la actividad mitótica es bastante intensa. Bruschke et al (1943) establecieron que la mitosis ocurre en grupos celulares de tres a seis células.

Además, las células basales sufren una migración vertical que las transforma en células intermediarias cuya actividad mitótica se pierde al tiempo que progresan, verticalmente, hacia la superficie.

Se ha descubierto, también, (Luo et al 2001) que las células hijas de las células amplificadoras de transición comigran ascendentemente por parejas cuando inician su diferenciación terminal. Al final del proceso se habrán convertido en células superficiales hiperdiferenciadas, incapaces de dividirse, que acaban muriendo y descamándose.

En caso de grandes lesiones existe cierta actividad mitótica no sólo en el stock de células limbares proliferativas sino también en las células del epitelio corneal que están migrando, probablemente como signo de la excesiva demanda de nuevas células epiteliales (Ratkay-Traub et al 2001)

La teoría de las células madre límbicas permite comprender mejor el carácter perpetuo de la renovación del epitelio corneal pero quedan muchas cuestiones por resolver. Por ejemplo, no se conoce el mecanismo que origina la migración centrípeta de las células epiteliales corneales. A este respecto, algunos trabajos antiguos mostraban como las mitosis eran más frecuentes en la periferia que en el centro corneal (Rigal 1993). Una sobrepoblación del epitelio corneal periférico, engendrada por una más elevada proliferación, forzaría a las células a migrar hacia el centro de la córnea y generaría la migración centrípeta.

Pero trabajos más recientes (Rigal 1993) establecen un índice mitótico equivalente en la córnea periférica y central o un mayor índice en la córnea central cualquiera que sea el momento del ritmo circadiano (ver más adelante).

Lavker et al (1991) propusieron que la mayor descamación del centro corneal podría ser el desencadenante de la migración centrípeta de las células epiteliales corneales. También se ha sugerido que la descamación podría ser la fuerza iniciadora de la renovación celular (Lemp y Mathers 1991)

Otro de los interrogantes sobre la renovación epitelial es el mecanismo mediante el cual se realiza la diferenciación. A este respecto se sabe que la queratina 3 y la queratina 12 son los principales marcadores epiteliales de la diferenciación de tipo corneal. (Rigal 1993) (Liu et al 1994) (Ban et al 2003)

Además de la expresión de Keratin 12 las células epiteliales diferenciadas también expresan connexinas 45 ó 43 y integrinas $\alpha_6\beta_4$ que participan en la formación de desmosomas y hemidesmosomas vía interacción con filamentos intermediarios de queratina. Se ha observado que las heridas pueden alterar la expresión de las conexinas y la comunicación celular en epitelios corneales en proceso de curación. (Lou et al 2001)

También se ha descubierto que la presencia o ausencia de colágeno IV parece determinar, respectivamente, el carácter inmaduro o diferenciado de las células corneales (Rigal 1993). Este hecho concuerda con la distribución de dicha sustancia en la córnea ya que el colágeno IV a pesar de ser el principal componente de la mayoría de las membranas basales no aparece en su forma nativa en la membrana basal corneal de los individuos adultos pero si en el limbo y la conjuntiva de las especies estudiadas (hombre, conejo y cobaya).

Por lo tanto, las células epiteliales límbicas basales que están en contacto con el colágeno IV son células inmaduras que no expresan la queratina 3 ni la 12. Por el contrario, a nivel corneal las células epiteliales, que reposan sobre una membrana basal sin colágeno IV, expresan los dos tipos de queratina y son células diferenciadas de tipo corneal.

Los estudios en cultivos celulares (Rigal 1993) también coinciden en la idea de que el colágeno IV parece ser un sustrato que favorece la proliferación epitelial pero hace perder al epitelio regenerado sus características morfológicas de diferenciación, aunque no se conoce el mecanismo por el cual dicha sustancia regula la proliferación y la diferenciación epitelial.

Para completar la descripción de la renovación del epitelio corneal es necesario hablar, ahora de la descamación. El epitelio corneal, gracias a que se halla expuesto al exterior, se deshace de las células muertas de forma completa e instantánea mediante la descamación, sin necesidad de que las células nuevas o los macrófagos las fagociten, como sucede en los tejidos cerrados.

Si se comparan diferentes métodos de recolección, la velocidad de exfoliación espontánea del epitelio corneal in vivo es de 5 a 15 células/minuto/córnea (Ren y Wilson 1996a) (El parpadeo, que normalmente aumenta la exfoliación no estaba presente en los métodos empleados en este estudio comparativo)

La descamación de las células y su muerte en el epitelio corneal se explicó inicialmente como un proceso necrótico con desprendimiento de restos celulares (Teng 1961 según Estil et al 2000 y según Ren H y Wilson 1996b)

Los estudios más recientes (Ren y Wilson 1996b) (Estil et al 2000) demuestran que existe más de un mecanismo que conduce a la descamación de las células de la superficie corneal. Como mínimo, se han descrito tres: la apoptosis clásica, una apoptosis no clásica y la diferenciación terminal, que algunos autores consideran como otra variedad de la apoptosis clásica. (Ren y Wilson 1996b) Por el contrario, estas nuevas teorías descartan la posibilidad de que la necrosis intervenga en la descamación de un epitelio sano, como se verá más adelante.

La apoptosis es una forma controlada de muerte celular que ocurre durante el desarrollo de los tejidos, en la homeostasis, respuesta a infecciones y en la cicatrización de heridas (Luo et al 2001) En el epitelio corneal se ha descrito apoptosis, además de en la descamación, en las lesiones mecánicas, infecciones, exposición al UV, y tratamiento con esteroides (Estil et al 2000) (Ren y Wilson 1996b). También se ha propuesto como un factor indicador de la curación de las heridas (Wilson et al 1996)

La participación de la apoptosis en la descamación fisiológica del epitelio corneal se demuestra gracias al hallazgo de un pequeño número de células apoptóticas en la superficie epitelial y en el hecho de que dicho número aumenta entre las células descamadas (Ren y Wilson 1996b) (Chen et al 2002) (Wilson 1994). No se observan células apoptóticas en la capa de células aladas o en la capa basal de los epitelios corneales normales.

La muerte celular naturalmente inducida (apoptosis) se considera distinta de la muerte celular patológicamente inducida (necrosis) (Kerr et al 1972). La necrosis se caracteriza por el inmediato cese de las funciones celulares mientras la apoptosis es gradual y funciona ordenadamente como un mecanismo de control muy crítico que regula la población celular y el desarrollo tisular.

El termino apoptosis se refiere al proceso de muerte celular en el cual un mecanismo genético programa pasos progresivos por los cuales la célula puede ser desmantelada (Ren y Wilson 1996b). Por lo tanto, la apoptosis elimina células individualmente mientras que con la necrosis mueren grandes grupos de células (Willie et al 1980).

La necrosis epitelial como mecanismo de descamación fisiológica está, en consecuencia, absolutamente descartada porque ello significaría la perdida de parte de la capa epitelial más externa y comportaría una constante disrupción del epitelio (Ren y Wilson 1996b) (Estil et al 2000) Dicho de otro modo, la eliminación ordenada de células individuales o pequeños grupos de células es esencial para el mantenimiento de una superficie epitelial estable.

En términos generales, la apoptosis es reconocida morfológicamente por la retracción celular, la perdida del contacto célula-célula, la presencia de agregados de cromatina dentro de densas masas unidos a la membrana celular (visibles en TEM), la formación de cuerpos apoptóticos (*blebs* o ampollas) y finalmente fagocitosis (Willie et al 1980) (Chen et al 2002) Además de los aspectos morfológicos, se puede identificar mediante diferentes pruebas inmunohistoquímicas. Estas pruebas demuestran, básicamente, que las células apoptóticas sufren una característica fragmentación del DNA.

En el epitelio corneal sano también se han descrito células descamadas apoptóticas desde el punto de vista inmunohistoquímico pero morfológicamente normales (Estil et al 2000). Dichas células se han considerado sometidas a una apoptosis no clásica.

Por otro lado, los estudios de viabilidad más recientes describen al epitelio corneal como una superficie formada, principalmente, por células viables con membranas intactas. Las células inviables, o terminalmente diferenciadas, aparecen en número reducido y se identifican por la disminución de la actividad metabólica y el incremento de la permeabilidad de la membrana (Ren y Wilson 1996b). Desde un punto de vista morfológico, estas células, llamadas también células fantasmas, han perdido su núcleo, no están bien conectadas con sus vecinas pero suelen mantener, por lo demás, un aspecto normal bajo microscopía electrónica de transmisión (Ren y Wilson 1996b) (Estil et al 2000)

Se sabe, también, que la densidad de células inviables aumenta desde la periferia corneal hacia el centro, siendo un 1% el valor promedio de dichas células en un epitelio corneal sano. (Ren y Wilson 1996b) El incremento de células inviables en la córnea central es compatible con la teoría de que el movimiento de los párpados establece un gradiente de fuerzas de exfoliación con el resultado de una mayor muda en el centro (como se explicará más adelante, con detalle).

En cualquier caso, se podría afirmar que la pérdida de viabilidad característica de la diferenciación terminal desencadena la descamación celular, como sugiere el hecho de que en las células que ya han mudado se aprecia un número elevado de células no viables. (La pérdida de viabilidad probablemente induce más cambios que los utilizados como indicadores pero están todavía por dilucidar).

La existencia de una diferenciación terminal, sin las características morfológicas típicas de la apoptosis clásica, parece ser común a los tejidos que poseen una rápida renovación celular, como sucede en el epitelio corneal. (Gavrieti et al 1992) (Tamada et al 1994)

Aunque no se conocen exhaustivamente las conexiones entre los diferentes mecanismos descamativos (apoptosis clásica, apoptosis no clásica y diferenciación terminal) se ha postulado que las células epiteliales no viables se desprenderían al alcanzar el estadio terminal de su diferenciación fisiológica,

programada de forma natural (como ya se ha comentado). En un epitelio sano también se desprenderían algunas células viables pero lo harían por medio de la apoptosis y necesitarían de un factor desencadenante externo para iniciar el proceso. (Ren y Wilson 1996b) (Estil et al 2000)

Parece que de entre varios factores externos, algunos todavía por resolver, el estrés que sufre la superficie celular (Nakamura et al 2003) (Ren y Wilson 1996b) es determinante para dirigir la descamación hacia la vía de la diferenciación terminal o hacia la apoptosis. De tal modo que cuanto más estrés sufre el epitelio más apoptótica será la descamación y, viceversa, cuanto menos estrés más diferenciación terminal.

Un aspecto a resaltar dentro de la renovación del epitelio es la regeneración de las uniones estrechas. Estas merecen una especial atención debido a su decisiva importancia en la fisiología corneal.

Las uniones estrechas son uniones que obliteran completamente el espacio intercelular entre dos células contiguas. Para conseguir este cierre hermético las células fusionan sus membranas gracias a la confluencia de ciertas fibras proteicas que las atraviesan. (Ban et al 2003)

Los componentes proteicos necesarios para formar dichas uniones no están presentes en el citoplasma de las células basales pero van incrementándose a medida que la célula sube a la superficie. (Ban et al. 2003) (Remington 1998) De este modo, la mayoría de uniones estrechas se hallan en las capas más superficiales de las células escamosas, aunque también se han hallado en las capas más profundas de este estrato epitelial y ocasionalmente entre las células aladas. (Oyster 1999)

Las uniones celulares estrechas hacen que la membrana sea más impermeable y altamente resistiva (12-16 Kohms/cm²) (Klyce 1975). La barrera así formada impide el paso de sustancias no liposolubles (Oyster 1999) y es básica para la correcta homeostasis del epitelio corneal como se verá a continuación.

La visión normal depende entre otras cosas del mantenimiento de una transparencia corneal que permita una adecuada refracción de la luz en la retina. Dicha transparencia corneal depende, principalmente, de dos factores. El primero es la habilidad de la capa epitelial para mantener una perfecta cohesión entre las células, con ausencia virtual de espacios intercelulares, suprimiendo, así, cualquier variación del índice de refracción. El segundo factor es la necesidad de un correcto flujo de líquido estromal hacia la cámara anterior que mantenga un grosor adecuado del estroma. Este flujo neto unidireccional se consigue gracias a la correcta formación de una barrera de uniones estrechas que restrinja el intercambio entre lágrima y fluido intraocular. (Chen et al 2002) (Kim et al 2002)

Algunos autores (Ban et al 2003) apuntan, que las uniones estrechas también actúan en contra de la pérdida de células causada por el parpadeo, conjuntamente con los desmosomas.

Otra de las funciones esenciales de la barrera epitelial es evitar la penetración corneal de patógenos. En esta acción de defensa participa también la película lagrimal, gracias a la presencia de lactoferrina, lisozima e inmunoglobulinas y del papel mecánico del parpadeo que arrastra microorganismos, cuerpos extraños y células descamadas hacia el saco conjuntival. (Rigal 1993)

Si se produce una lesión epitelial la pérdida de la integridad en las uniones estrechas puede desencadenar fallos en las funciones de la barrera con alteraciones de la permeabilidad y de la selectividad. En consecuencia, la córnea se vuelve más vulnerable a la invasión de microorganismos infectantes y, además, pueden originarse opacidades como resultado directo de la disminución en el transporte de fluido estromal hacia la cámara anterior (Luo et al 2001)

Por lo tanto, es de vital importancia que las células diferenciadas sean capaces de reestablecer las uniones estrechas, a pesar de que el epitelio este renovándose constantemente. A este respecto, la membrana apical consigue mantener la continuidad de la barrera epitelial durante la exfoliación fisiológica

porque las células descamadas se desprenden sólo después de que las células reemplazantes, inmediatamente inferiores, hayan reestablecido sus uniones estrechas con las células vecinas. (Duane y Jaeger 1990) (Clinical anatomy of the visual system Lee ann Remington). De este modo cuando una célula muda el epitelio se mantiene intacto y puede continuar realizando sus funciones. Además, con este sistema la constante renovación del epitelio se convierte en el artífice de un incesante refuerzo de la barrera con uniones estrechas nuevas.

En definitiva, la renovación del epitelio corneal exige una homeostasis que debe conciliar la estabilidad de la masa celular epitelial y la diferenciación epitelial de tipo corneal. Dicha homeostasis implica una regulación crítica y compleja con un elevado número y diversidad de factores implicados.

Hasta la fecha, para estudiar la renovación del epitelio se han empleado datos indirectos como los obtenidos en estudios embriológicos, estudios sobre recombinaciones heterotópicas, cultivos celulares, estudios sobre la cicatrización epitelial y ciertos trabajos de cirugía refractiva experimental.

Todavía no se ha establecido de forma exhaustiva la regulación de la renovación del epitelio corneal pero si se conoce la influencia que sobre el proceso ejercen diferentes factores como son la edad y los ritmos circadianos. El fenómeno de envejecimiento, común a todas las células del organismo, afecta también a las células del epitelio corneal que ven disminuidas sus capacidades regenerativas en caso de heridas respecto de epitelios jóvenes (Rigal 1993). También se ha comprobado la relación entre ciertos defectos epiteliales de adhesión y estabilidad con un aumento de grosor de la membrana basal en pacientes a partir de 60 años (Alvarado et al 1983)

Cabe resaltar que, el análisis de la influencia de la edad se ve muy dificultado por la gran variabilidad en el índice mitótico del epitelio, no sólo interindividuos sino también entre las dos córneas de un mismo sujeto (Fogle et al 1980), por lo que los efectos de la edad son más difíciles de apreciar.

Sobre el efecto de las influencias circadianas en el epitelio corneal existen numerosos estudios (Rigal 1993). Según Lavker et al (1991) bajo técnicas autoradiográficas en epitelio de conejo y ratón muestra un pico de la fase S a las 2-6h de la mañana, 4-6h antes del índice mitótico máximo que aparece entre las 6-12h de la mañana. Este ritmo confirma la regla general, observada en otros epitelios estratificados (Potten et al 1977). El sincronismo en los ciclos diarios de proliferación de todos los epitelios del organismo sugiere la existencia de factores sistémicos que intervendrían en dicha regulación.

Otro factor regulador en el proceso de renovación del epitelio corneal es la película lagrimal y los párpados que aseguran, en común, la protección del tejido permitiendo así su desarrollo en unas buenas condiciones.

Además, la película lagrimal interviene en la renovación del epitelio corneal a nivel metabólico gracias al oxígeno disuelto en ella (como se expuso anteriormente). Posee, también, una acción a nivel de la regulación de la proliferación celular (papel de electrolitos como el calcio o de factores de crecimiento) y además favorece los procesos de maduración y de diferenciación epitelial porque aporta vitamina A al epitelio bajo la forma de retinol. (El retinol y su metabolito el ácido retinoico condicionan la expresión queratínica de la superficie celular entre otras acciones (Rigal 1993)

Por su parte, los párpados intervienen en la exfoliación del epitelio corneal superficial por medio del parpadeo. Durante dicho mecanismo reflejo, sólo el párpado superior, que se desplaza hacia abajo, ejerce una fuerza de apoyo sobre la superficie epitelial. Mientras tanto, el párpado inferior ejerce un movimiento hacia arriba que puede considerarse despreciable. El apoyo máximo del párpado superior en un parpadeo normal se hace a nivel de la zona supero-central, cerca del ápice corneal. De ello se deduce que el parpadeo generaría una mayor exfoliación en el centro corneal que podría ser el desencadenante de los movimientos centrípetos de las células (como ya se ha comentado anteriormente) progresando de las zonas periféricas hacia las centrales donde la pérdida celular es mayor.

No se debe olvidar que la acción del parpadeo sobre la descamación epitelial se suaviza gracias a la lubricación de la película lagrimal, que favorece el deslizamiento de los párpados y evita el desprendimiento masivo.

La inervación del epitelio forma parte, también, de los factores reguladores de su renovación. La córnea es el tejido más densamente inervado con fibras nerviosas sensitivas y vegetativas (Luo et al 2001) que emergen hacia las capas más superficiales del epitelio corneal (Muller et al 2003)

La relación entre la inervación y el mantenimiento de una estructura y función epitelial normal es conocida desde hace mucho tiempo. Ya en 1824 Magendie (según Rigal 1993) observó la aparición de modificaciones degenerativas corneales después de seccionar del trigémino y concluyó el papel trófico de este nervio para la córnea. Mishima y sus colaboradores en 1957 (según Rigal 1993) analizaron los efectos de la desnervación y de la estimulación del simpático y del trigémino en la actividad mitótica del epitelio corneal del conejo. Demostraron que tanto la desnervación simpática como la estimulación entrañaban una disminución del número de mitosis. Por otro lado, comprobaron que la desnervación parasimpática provocaba una disminución de las mitosis después de un cierto periodo de latencia y que la estimulación era responsable del efecto contrario.

Además, se sabe que los nervios corneales liberan una serie de sustancias vitales para la buena salud del epitelio aunque dichas sustancias no se conocen exactamente. (Muller et al 2003) Tampoco se conocen bien los mecanismos de acción de las terminaciones nerviosas intraepiteliales sobre la actividad de las células epiteliales. Puede afirmarse, de momento, que los nucleótidos cíclicos intracelulares, AMPc y GMPc, elementos reguladores de la división celular y de la maduración, dependen de neurotransmisores como la acetilcolina y las catecolaminas

Cavanagh y Colley (1989) han propuesto una regulación del sistema proliferativo en la cual los agentes adrenérgicos, cuyos receptores se localizan en la membrana plasmática, inhibirían la actividad mitótica mientras que los

agentes colinérgicos, cuyos receptores se hallan en la membrana nuclear, producirían un estímulo mitótico específico sobre la actividad de la RNA polimerasa II.

El sistema colinérgico, también, parece regular el crecimiento celular y la curación de las heridas (Luo et al 2001). A tenor de estos datos la influencia del sistema vegetativo, en especial del parasimpático, sobre la córnea se vislumbra importante. Además, de todos los tejidos es en el epitelio corneal donde se acumula el más alto nivel de acetilcolina. (Rigal 1993)

Otros factores reguladores son los factores de crecimiento celular. Estos péptidos solubles de pesos moleculares variables (de 5 a 30000 daltons), activos a concentraciones fisiológicas muy bajas (nanomolares), constituyen una gran familia de macromoléculas y están presentes tanto en los organismos procariontes como en los eucariotes. Controlan el desarrollo normal de los tejidos, aseguran la regulación de la proliferación de las células que los constituyen y tienen un papel importante en la cicatrización y la regeneración de los tejidos (Wilson et al. 2001)

Los numerosos efectos de los factores de crecimiento se manifiestan mediante la mediación de receptores específicos presentes en las membranas plasmáticas de las células diana y su acción final se realiza a través de la modificación de la expresión de diferentes genes. (Jones and Kazlauskas 2000).

A nivel del epitelio corneal actúa un variado grupo de factores de crecimiento producidos por el propio epitelio, el estroma, el endotelio y, también, la glándula lagrimal. (Klenkler y Sheardown 2004) De este modo, la lágrima es una fuente de factores de crecimiento y otros nutrientes que, disueltos en ella, regulan activamente la renovación del epitelio corneal (Rolando and Zierhut 2001)

Aunque las respuestas celulares específicas todavía no son bien conocidas, se sabe que existe una relación directa entre la proliferación celular y el número

de receptores ocupados por ciertos factores de crecimiento (Lauffenburger y Linderman 1993)

La importancia vital de estos factores en el mantenimiento de las funciones normales del epitelio corneal se desprende del carácter crítico de sus acciones. De este modo, la respuesta celular que generan estas sustancias depende no sólo de su concentración absoluta sino también de la cantidad de un factor respecto del resto de factores de crecimiento (Imanishi et al 2000). Según como sea esta relación se puede promover o inhibir un proceso determinado.

La acción de los factores de crecimiento es todavía más compleja ya que no sólo depende de la interacción entre ellos sino también del medio extracelular y de los mecanismos reguladores de las células afectadas, en cada situación. Por ejemplo, se ha comprobado que la respuesta mitogénica del factor de crecimiento EGF (Epidermal growth factor) es inversamente proporcional a los niveles de prostaglandina PGE₂ en las células y en el medio (Luo et al 2001), como sucede en caso de inflamación.

Los posibles desequilibrios en los factores de crecimiento pueden alterar profundamente las estructuras oculares desencadenando estados patológicos como la neovascularización, el edema o el glaucoma y, también, dificultades en la curación de heridas (Klenkler y Sheardown 2004)

Los factores de crecimiento que están presentes en la lágrima (*Epidermal growth factor* (EGF), *Hepatocyte growth factor* (HGF) y *Keratinocyte growth factor* (KGF)) promueven, esencialmente, la proliferación y la migración epitelial. Sus niveles en este medio acuoso podrían considerarse básicos para el mantenimiento y la renovación normal del epitelio corneal (Ohashi et al 1989) (Nakamura et al 2001).

En la siguiente tabla aparece un listado de las acciones que estas sustancias promueven a concentraciones fisiológicas.

<i>EGF</i>	<i>HGF</i>	<i>KGF</i>
Actividad mitógena y aumento de la proliferación celular Producción de moléculas de la matriz celular Reagrupación del citoesqueleto de actina promoviendo la motilidad celular Inhibición de la diferenciación terminal	Actividad mitógena y aumento de la proliferación celular Se une con facilidad a la matriz extracelular Promueve la motilidad celular	Actividad mitógena y aumento de la proliferación celular Promueve la motilidad celular e inhibe la diferenciación celular en determinadas zonas con baja densidad de células

Tabla 1.1 Principales acciones de los factores de crecimiento presentes en la lágrima sobre el epitelio corneal. Estas acciones aparecen descritas en estudios in vivo e in vitro (Datos obtenidos de Klenkler y Sheardown 2004)

Existen todavía otros factores que regula la renovación del epitelio corneal. Estos son un conjunto de sustancias presentes en la membrana basal y el estroma corneal. Gracias a diferentes estudios sobre cultivos celulares se sabe que la correcta proliferación y morfología de las células del epitelio corneal depende, también, de ciertos componentes de la lámina basal y la matriz extracelular estromal.

En concreto, la laminina favorece el crecimiento, la unión celular al soporte y la diferenciación de tipo corneal de las células del cultivo (Rigal 1993) mientras que la fibronectina posee también un papel en la unión y la migración celular, en la reparación tisular y en la ordenación del citoesqueleto (Tervo et al 1986)

Por el contrario se ha constatado que ciertos componentes como el colágeno III, V y VI, y la misma fibronectina sólo son abundantes durante la vida fetal y reaparecen en el adulto en caso de cicatrización. De este modo, se podría

pensar que su acción en la renovación del epitelio corneal, en la vida postnatal, es discutible. (Rigal 1993)

La influencia del estroma sobre el epitelio corneal parece ejercerse, también, a partir de los queratocitos, si atendemos al hecho de que sólo en los cultivos con queratocitos y fibroblastos se obtienen epitelios estratificados.

Se sabe que las células que ya se encuentran en una vía de diferenciación corneal no son sensibles a las inducciones mesenquimatosas subyacentes pero las células epiteliales límbicas basales, debido a su carácter inmaduro, si y sería a este nivel que las interacciones estroma- epitelio tendrían lugar (Rigal 1993).

Como se ha podido comprobar el conjunto de factores que condicionan la renovación del epitelio corneal es muy amplio y heterogéneo, con lo que la regulación de este proceso, desconocida por ahora en muchos aspectos, se vislumbra compleja y claramente crítica para el buen estado de dicho tejido.

1.2. El síndrome de ojo seco

En este subapartado se describe la patología del ojo seco, en sus aspectos clínicos, y se realiza una revisión actualizada de los mecanismos implicados en el origen de dicha enfermedad. Además, en base a los objetivos de esta tesis, se exponen los descubrimientos, realizados hasta la fecha, sobre las alteraciones morfológicas que dicha patología provoca en las diferentes estructuras oculares, especialmente a nivel del epitelio corneal.

El ojo seco se define como una alteración en la película lagrimal que desencadena daños en la superficie corneo-conjuntival ocular asociados a la producción de molestias y discomfort ocular (Lemp MA. 1995)

Esta patología, también llamada queratoconjuntivitis seca (QCS), es una degeneración epitelial en su sentido más estricto porque supone la alteración del epitelio anteriormente sano sometido a unas condiciones físicas o a un medio particular. Las degeneraciones del epitelio así descritas incluyen,

también: las queratitis de exposición, de Dellen, queratitis neuroparalíticas y queratitis avitaminosas. (Rigal 1993)

La lesión histológica común a estas degeneraciones es la metaplasia malpigiana del epitelio corneal que aumenta su espesor y queratiniza las células superficiales, por lo que el tejido se vuelve opaco.

En cuanto al origen del ojo seco, puede considerarse, sin lugar a dudas, plurietiológico. De este modo, las causas pueden ser congénitas, como la ausencia de glándula lagrimal, o adquiridas entre las que encontramos desencadenantes tan diversos como, por ejemplo, agentes físicos, algunas reacciones autoinmunes o la acción de ciertos fármacos. (Más adelante se comenta la etiopatogenia de esta enfermedad con detalle)

En base al origen de la enfermedad se ha establecido una clasificación en la que se distinguen dos categorías principales: ojo seco por deficiencia acuosa o por evaporación excesiva. (Ver figura 1.1)

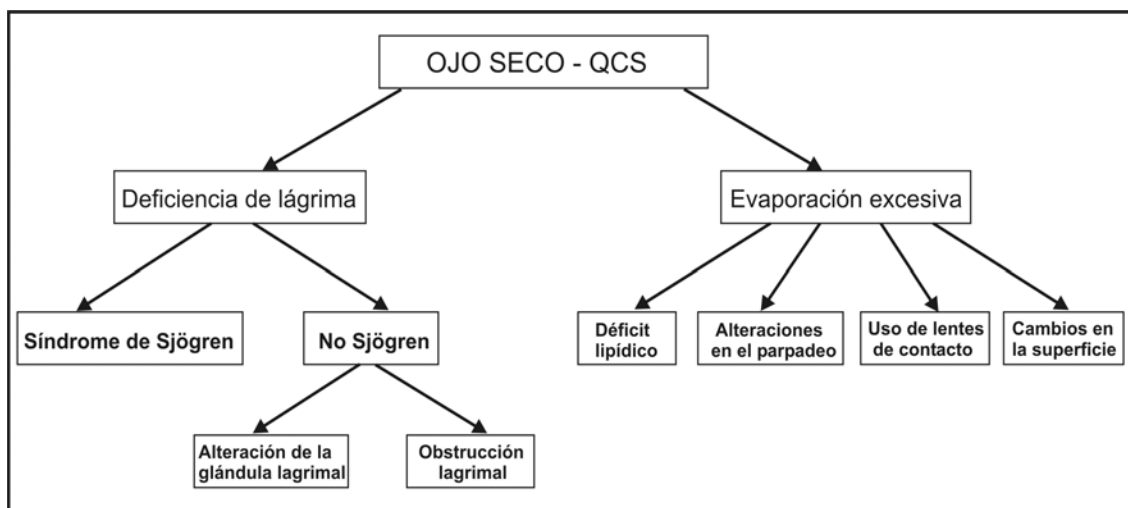


Figura 1.1 Clasificación del síndrome de ojo seco atendiendo a su etiología. (Modificada de Lemp 1999).

Desde un punto de vista clínico la degeneración epitelial se traduce en una queratitis superficial punteada, como signo más característico del ojo seco,

asociada de forma variable a diversos síntomas como son: sensación de cuerpo extraño, picor, escozor ocular, fotofobia, lagrimeo (epífora paradójica) y disminución de la agudeza visual. En casos muy avanzados se observan queratitis filamentosas, en las que una secreción blanquecina de mucosa palpebral se pega a la córnea seca.

Existe, además, un importante componente ambiental por lo que es muy frecuente que las molestias aparezcan, solamente o se agraven, en determinados ambientes (calefacción excesiva, aire acondicionado, muchos humos, etc) o en determinadas épocas del año dependiendo de la humedad ambiental.

El examen biomicroscópico con lámpara de hendidura revela que la queratitis punteada superficial está constituida por pequeñas exfoliaciones, de profundidad variable, que al confluir pueden ocasionar ulceraciones. La localización topográfica y anatómica (epitelial o intraepitelial) de dichas alteraciones permiten una orientación diagnóstica etiológica ya que la respuesta del epitelio frente a un proceso patológico es limitada y de expresión poco específica. (Waring y Rodríguez (1987)

En caso de QCS las lesiones superficiales se localizan, con frecuencia, en la parte inferior de la córnea o en el área de exposición palpebral (Rigal 1993) Su evolución, en función de la etiología y, sobre todo, del estado de la película lagrimal, puede ir acompañada de complicaciones infecciosas y tróficas con alteraciones del estroma subyacente.

El diagnóstico se hace en base al examen biomicroscópico con fluoresceína analizando el estado de la córnea y, también, el tiempo de ruptura de la película lagrimal (que determina el grado de estabilidad del film lagrimal). Este examen se acompaña del test de Schirmer que evalúa una posible disminución en la producción acuosa de la lágrima.

En determinados pacientes con ojo seco incipiente, cuyas alteraciones corneales no se evidencian con Fluoresceína, es necesario realizar una tinción con Rosa de Bengala.

Para diagnosticar esta patología es imprescindible llevar a cabo, como mínimo, todas estas pruebas ya que son complementarias. Los resultados de alguna de ellas pueden ser normales, según el tipo de alteración lagrimal (alteración del volumen, de la capa mucínica, déficit de lípidos, etcétera) o el estadio en que se encuentra la patología y el análisis completo es el que proporciona mayor probabilidad de diagnosticar correctamente. Por ejemplo, si un paciente padece una alteración de la capa lipídica el test de Schirmer será normal porque dicho test mide el volumen de lágrima, volumen que depende, básicamente, de la capa acuosa.

No existe un criterio de diagnóstico unitario, en parte, debido al amplio espectro de condiciones que engloba el término ojo seco, la variable severidad de la patología y la poca especificidad de sus signos y síntomas asociados (Johnson y Murphy 2004)

El tratamiento del ojo seco es difícil y muchas veces frustrante ya que, en la mayoría de las ocasiones, las causas que lo motivan no tienen un remedio satisfactorio ni específico (Carreras et al. 1995). La enfermedad se trata, por lo tanto desde un punto de vista paliativo y, en los casos que sea posible, etiológico.

La estrategia terapéutica más frecuentemente empleada es el uso de lágrima artificial que pretende sustituir a la natural. En el mercado existen muchas especialidades farmacéuticas diferentes tanto por su mecanismo de acción (disminución de la tensión superficial, disminución del rozamiento, aumento del volumen, etcétera) como por su composición.

Además se han utilizado diversos medicamentos para estimular la producción de lágrima. La más usada ha sido la eledoisina, β -adrenérgico que estimula la secreción de lágrima y saliva. Ha sido empleada para tratar el ojo seco por vía

tópica o sublingual, aunque con resultados poco concluyentes. (Carreras et al (1995)) (Murube 1997)

El uso de parasimpaticomiméticos, como la pilocarpina, tampoco es habitual ya que si bien producen un aumento de la producción de lágrima (por estímulo directo sobre la glándula lagrimal principal) pueden provocar congestión ocular además del riesgo de generar cataratas a largo plazo, con lo que su relación riesgo beneficio no es buena.

Otra estrategia terapéutica empleada en la queatoconjuntivitis seca es conservar la lágrima ya existente mediante un taponamiento del conducto lagrimal ya sea transitorio o definitivo. Con este fin también deben evitarse los ambientes extremadamente secos o cargados que, como ya se ha comentado antes, pueden agravar el cuadro en estos pacientes.

Si el ojo seco es secundario a otra patología se intentará tratar la causa de origen ya sea local (tumoración palpebral, ectropión, entropión, etc) o sistémica (Síndrome de Sjögrens, artritis reumatoide, etc)

Estas son las terapias clásicamente utilizadas pero se están investigando nuevas y variadas estrategias de tratamiento basadas en los últimos descubrimientos sobre los mecanismos implicados en la patogénesis de esta enfermedad, como el uso de andrógenos, ciertos antiinflamatorios o los fármacos agonistas de los receptores purinérgicos (ver más adelante).

A pesar de dichos progresos, cabe señalar que, la evaluación de los nuevos agentes terapéuticos se ve dificultada por importantes problemas clínicos. Por ejemplo, la elección del tratamiento se suele realizar en ausencia de una clara diferenciación del tipo de ojo seco. Además existe un pobre conocimiento del valor de las pruebas diagnósticas específicas y de la interrelación entre los factores que causan las alteraciones de la superficie ocular. De tal modo que, en el diseño de los estudios clínicos es muy difícil establecer indicadores de eficacia objetivos que permitan evaluar la medicación siempre con un único test. (Lemp 1999) (Jonson y Murphy 2004)

En resumen, la complejidad de la plurietiología, los múltiples factores que intervienen en el proceso que desencadena una QCS y la intrincada interrelación que entre ellos existe condicionan, enormemente, la valoración de la eficacia clínica de los posibles avances terapéuticos y, en consecuencia, su uso generalizado. A pesar de estos problemas el conocimiento de la enfermedad es cada día más amplio y, cabe esperar que, los avances en investigación permitan mejorar pronto aquellos aspectos clínicos aún por resolver.

Entre dichos avances se hallan los descubrimientos sobre las alteraciones que el ojo seco produce en la composición y las funciones de la lágrima. Este tipo de estudios ha ido teniendo viabilidad gracias al conocimiento paralelo de las condiciones fisiológicas que, aún hoy, poseen algunos puntos oscuros.

Clásicamente, la lágrima se consideró constituida por tres capas diferentes. La primera, directamente en contacto con el aire es una capa lipídica secretada por diversas glándulas que desembocan a nivel del margen palpebral (glándulas de Meibomio, de Zeiss, etc.) La capa intermedia, secretada por la glándula lagrimal principal y las accesorias de Krause y Wolfring, es acuosa y representa casi todo el volumen lagrimal. La capa más profunda, segregada principalmente por las células caliciformes conjuntivales, es rica en mucinas y está en contacto con las membranas de las células superficiales del epitelio por medio del glucocálix.

Sin embargo, los estudios fisicoquímicos sugieren que sólo hay dos fases en la película lagrimal (Mc Culley y Shine 1997). La más externa lipídica formada por lípidos apolares (esteres, triglicéridos, etcétera) y fosfolípidos (polares) y la más interna, en contacto con el epitelio, formada por un gel acuoso-mucínico (descrito con detalle más adelante). Cabe resaltar que los fosfolípidos se situarían en la interfaz de las dos fases como tensioactivos estabilizando, así, la película lagrimal. (Tiffany and Nagyová 2002)

Aunque no se sabe con exactitud cual es la estructura de la película lagrimal, se conocen algunas de las características y acciones de cada uno de sus tres componentes principales (componente mucínico, acuoso y lipídico), así como del glucocálix. Además, se ha descubierto, también, la significación clínica de ciertos cambios de la lágrima originados en la QCS.

Según trabajos de Dilly (1985) y Gipson et al (1992) el glucocálix esta formado por un conjunto de glucoproteinas segregadas por las células epiteliales corneo-conjuntivales, previa liberación desde sus vesículas intracitoplasmáticas. Gipson et al (1992) proponen que la señal que desencadena la fusión de las vesículas con la membrana citoplasmática se emite sólo cuando las células toman contacto con la película lagrimal y que esta señal podría ser la formación de las uniones estrechas.

Gracias a la coloración con ácido tánico Nichols et al (1983) mostraron que, en el cobaya, el glucocálix está constituido por una fina capa filamentosa. Cada filamento está insertado en la membrana citoplasmática y se divide de manera dicotómica siendo muy prominentes en el ápice de las microproyecciones.

El glucocálix actúa como barrera frente a los patógenos (Corfield et al 1997) y gracias a su humectabilidad estabiliza la película lagrimal sobre la superficie corneal (Liotet 1987). Además esta clase de glucoproteínas parece estar implicada en la transmisión de ciertas señales celulares (Zrihan-Licht et al 1994) y podrían formar parte del receptor celular para el factor de crecimiento epitelial y participar en su regulación (Carraway et al 1999)

Por su parte, la mucina de la lágrima, que está compuesta por glucoproteinas similares a las del glucocálix, es hidrófila y muy difícil de estudiar por microscopía electrónica (como ya se ha comentado, ampliamente, en el subapartado anterior) ya que la estructura de la película lagrimal se altera con la fijación química convencional. A pesar de las dificultades se sabe que, la mucina parece estar formada por una entramada red de polímeros que se superpone al glucocálix. (Nichols et al (1985))

Esta sustancia es la responsable del comportamiento viscoelástico de la lágrima que evita el desprendimiento del epitelio durante los, relativamente rápidos, movimientos de los párpados y del globo ocular (Corfield et al 1997). En cuanto a su acción como surfactante, disminuyendo la tensión superficial de la lágrima (Holly y Lemp 1971), ha sido cuestionada por varios autores pero sin resultados concluyentes ni a favor ni en contra (Johnson y Murphy 2004). Por otro lado, como ya se ha comentado antes, se sabe que los lípidos polares (fosfolípidos) y ciertas combinaciones de proteínas de la lágrima son, también, importantes para obtener una baja tensión superficial. (Tiffany and Nagyová 2002)

Las mucinas transmembrana (glucocálix) y las mucinas secretadas por las glándulas caliciformes están unas en frente de las otras, en el límite entre la superficie ocular y la película lagrimal, pero no se adhieren entre ellas. (Gipson y Inatomi (1997)) Este comportamiento es debido a que las diferentes mucinas presentan varias zonas con una distribución irregular de cargas. Dichas cargas generan uniones con el agua de la lágrima impidiendo, así, las adherencias entre moléculas mucínicas, ya sea de la lágrima o del glucocálix. De este modo, se facilita la extensibilidad de la película lagrimal y se previenen los microtraumas porque se amortigua la fuerza transmitida durante el parpadeo. (Corfield et al 1997).

Sin embargo, en la QCS la mucina sin hidratación tiende a unirse con otras moléculas mucínicas y, por lo tanto, con el epitelio formando agregados hidrofóbicos y filamentos (Sharma 1993). En consecuencia, la lágrima se extiende peor y el glucocálix pierde su capacidad humectante y su eficacia como barrera antipatógenos (Sharma 1998a)

Por lo que respecta al componente acuoso de la lágrima, no es simplemente agua que lubrica la superficie ocular sino que contiene numerosos electrolitos, proteínas, factores de crecimiento, vitaminas, sustancias antimicrobianas, citoquinas, inmunoglobulinas y hormonas. Estos constituyentes sirven para nutrir y proteger la superficie ocular, además de actuar como mediadores de los

mensajes entre las estructuras que están en contacto con la lágrima. (Johnson y Murphy 2004)

En los años sesenta se creía que el principal desencadenante del ojo seco era el déficit cuantitativo de lágrima, o sea, la falta de volumen en la secreción de la capa acuosa de la lágrima por parte de la glándula lagrimal principal y las accesorias. Pero, al inicio de los setenta los investigadores empezaron a encontrar cambios cualitativos en la lágrima de algunos pacientes, particularmente en aquellos que sufrían inflamación crónica conjuntival como, por ejemplo, en un déficit de vitamina A, en caso de penfingoide ocular o síndrome de Stevens-Johnson. Esta composición alterada podía ir asociada o no a una poca producción de lágrima (Lemp 1973)

Uno de los cambios aparece en la composición de los electrolitos. La relación entre cationes divalentes (calcio y magnesio) y cationes monovalentes (sodio y potasio) es determinante para la elaboración del patrón de cristalización de la lágrima (Golding et al (1989) y Kogbe et al (1991)) que es imperfecto en el 90% de las QCS (Kogbe et al (1991) sugiriendo, así, una composición diferente a la normal. Esta alteración en la composición de los electrolitos aparece, según Gilbard (1994) en aquellos ojos secos con problemas en la glándula lagrimal.

Los electrolitos de la capa acuosa son importantes porque son los responsables de la osmolaridad de la lágrima, actúan como tampón manteniendo el pH a un nivel relativamente constante y juegan un importante papel en la homeostasis epitelial (Bachman y Wilson 1985).

Gilbard y Rossi (1992) mostraron, en un modelo experimental de QCS en el conejo, que la densidad de células caliciformes y las reservas epiteliales corneanas de glucógeno aumentaban después de la administración de un colirio hipotónico que sólo contenía los electrolitos de una lágrima normal.

El perfil proteico de las lágrimas está también alterado en un ojo seco. Por un lado, estas alteraciones son el resultado del paso de proteínas plasmáticas (albúmina, céruloplasmina, transferrina, etcétera) a la lágrima. Este trasiego

irregular se debe a un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos conjuntivales que, en la QCS, están sometidos a una reacción inflamatoria local (Seal et al 1986). Por otro lado, también contribuirá a alterar dicho perfil la reducción de la síntesis de ciertas proteínas lagrimales como la lisozima, la lactoferrina, la lipocalina o las inmunoglobulinas A secretoras (Liotet 1990), debido a los problemas de secreción del aparato lagrimal y a una disminución de andrógenos (Johnson y Murphy 2004).

En los pacientes con ojo seco el déficit de algunas proteínas lagrimales con actividad antibacteriana podría aumentar el riesgo de infecciones oculares (Rigal 1993). Además, la falta de ciertas proteínas específicas de la lágrima (como la prealbumina) desencadenaría una carencia relativa de vitamina A ya que estas sustancias se encargan de transportar el retinol desde el plasma a las células epiteliales conjuntivales (Speek et al 1986)

En cuanto a los factores de crecimiento presentes en la lágrima, ya han sido comentados anteriormente al hablar de la renovación celular. Cabe añadir ahora que, se ha descrito una disminución en la concentración de EGF (epithelial growth factor) en el ojo seco (Ohashi et al 2003) y en otras muchas enfermedades oculares. Parece, pues, razonable suponer que los otros factores de crecimiento secretados por la glándula lagrimal también estarían cuantitativamente alterados. (Johnson y Murphy 2004)

La capa de la lágrima más externa, en contacto directo con el aire, es (como ya se ha comentado anteriormente) una capa lipídica que evita una evaporación excesiva, previene el desbordamiento de la lágrima e impide que los lípidos sebáceos penetren en ella. (Rigal 1993) La falta o disminución relativa de estos lípidos lagrimales, como sucede en algunos casos de QCS, podría ser el desencadenante de las alteraciones corneo-conjuntivales observadas en esta patología debido, sobre todo, a una tasa de evaporación demasiado elevada de la lágrima. (Johnson y Murphy 2004)

Ronaldo et al (1983) demostraron que la evaporación estaba aumentada en el ojo seco y esto contribuiría a la hiperosmolaridad de la lágrima responsable, a

su vez, de alteraciones de la morfología y del metabolismo de la célula epitelial. (Gilbard et al 1984)

Cabe resaltar que, los niveles reducidos de los fosfolípidos de la lágrima (esfingomielina y fosfatidiletanolamina), observados en QCS asociadas con blefaritis crónica (Shine y Mc Culley 1998), podrían ser la causa de una desestabilización de la película lagrimal ya que se ha sugerido (como ya se ha comentado anteriormente) que dichas sustancias actúan como surfactantes entre la capa acuosa y lipídica (Tiffany and Nagyová 2002)

Una vez definidos los componentes de la lágrima, su función y las alteraciones que presentan en caso de ojo seco, es importante remarcar que la cantidad y composición de las secreciones de la película lagrimal están determinadas por una compleja interacción entre el sistema nervioso autónomo y el sistema endocrino, además de citoquinas localmente activas.

Esto significa que son muchos los posibles factores que condicionan la producción fisiológica de la lágrima, por lo que los posibles desencadenantes de un déficit cualitativo o cuantitativo son, también múltiples.

Por lo que respecta a la síntesis de las diferentes mucinas en las células caliciformes, se sabe que está, principalmente, bajo el control del sistema autónomo (Johnson y Murphy 2004). Aunque el ácido 15(S)-hidroxieicosatetranoico (15(S)-HETE), un producto del metabolismo del ácido araquidónico de la membranas celulares, parece estimular la producción de alguna de estas mucinas (Jumblatt et al 2002). La vitamina A y ciertas citoquinas influyen, también en su producción pero el mecanismo es actualmente desconocido (Johnson y Murphy 2004)

En cuanto a la secreción, se produce por un reflejo de estimulación sensorial de la córnea y la conjuntiva (Kessler et al 1995). Además existen ciertas sustancias agonistas de los receptores purinérgicos P_2Y_2 que, también estimulan la secreción de mucinas en las células caliciformes. (Jumblatt y Jumblatt 1998).

Estos descubrimientos se han aprovechado para intentar mejorar los recursos terapéuticos de la QCS, aunque todavía están en fase de experimentación (como se comentó anteriormente)

Por otro lado, el control de la secreción de la fase acuosa (agua, electrolitos y proteínas) lo realiza, principalmente, el sistema parasimpático. Los nervios simpáticos, que se distribuyen alrededor de los vasos sanguíneos de la glándula lagrimal principal, intervienen también en el control de la síntesis pero de un modo más secundario. Además, la glándula esta innervada por algunos nervios sensoriales que regulan la producción de proteínas y su posterior secreción. (Johnson y Murphy 2004)

De las glándulas accesorias se conoce muy poco. Parecen estar innervadas por el parasimpático y es posible que posean un mecanismo de secreción parecido al de la glándula lagrimal principal (Lucarelli et al 2003)

En cuanto al control de la secreción lipídica, se ha propuesto que las glándulas de Meibomio, principales productoras de los lípidos lagrimales, secretarían su contenido en los reservorios elásticos de los conductos y que cierta presión crítica sobre su parte terminal sería el modo en que se liberaría. (Bron y Tiffany 1998). La presión depende de la cantidad de lípidos almacenados y de las fuerzas contráctiles del parpadeo. Este mecanismo explica la propensión al bloqueo de las glándulas de Meibomio después del sueño nocturno (debido a la ausencia de parpadeo) que es una alteración común en muchos pacientes con ojo seco.

La innervación de dichas glándulas no es del todo conocida. Se sabe que estas y los vasos sanguíneos que las riegan están innervados por el parasimpático, el simpático y algunos nervios sensoriales. Sin embargo el control principal de la glándula parece ser hormonal, igual que en el caso de las glándulas sebáceas de la piel (los dos tipos de glándulas están emparentados desde un punto de vista embriológico). Las glándulas de Meibomio poseen receptores

androgénicos (Wickham et al 2000) y el déficit de andrógenos está asociado con su disfunción y con el ojo seco. (Krenzer et al 2000).

Una mayor prevalencia del ojo seco en mujeres (Johnson y Murphy 2004), particularmente después de la menopausia, también sugiere que las hormonas sexuales están implicadas en la etiología y la patogénesis de esta enfermedad. Actualmente, se acepta que los andrógenos y en menor grado los estrógenos, la progesterona y ciertas hormonas producidas por el eje hipotálamo-hipofisario juegan un papel clave en el normal funcionamiento de la glándula lagrimal y las glándulas de Meibomio y, consecuentemente, sobre la superficie ocular. (Sullivan et al 1998)

En términos generales, el ojo seco se inicia con una inadecuada lubricación ocular como resultado de una disfunción lagrimal, un fallo en la transferencia del fluido lagrimal hacia el saco conjuntival, y/o excesiva evaporación de lágrima (Lemp 1995). Sin embargo, la patogénesis de las consecuentes alteraciones de la superficie corneo-conjuntival no sólo se deben a la desecación, sino, también a la hiperosmolaridad de la lágrima, la falta de factores nutricionales y de renovación celular y, además, al proceso inflamatorio concomitante.

La película lagrimal, el epitelio corneo-conjuntival, las glándulas lagrimales y los párpados actúan como una única unidad funcional (Stern et al 1998, Mathers 2000, Ronaldo y Zierhut 2001) Esta unidad posee un mecanismo de control feedback que hace reaccionar de forma simultánea y coordinada a todos sus integrantes frente a un estímulo. Los acontecimientos que alteren la homeostasis y no sean prontamente neutralizados por este sistema unitario crearán un círculo vicioso que desencadenará los signos y síntomas de la enfermedad. (Johnson y Murphy 2004)

La etiología y la patogénesis de la QCS son complejas y en ellas están implicados múltiples factores que interaccionan entre sí.

Además, hay pacientes con deficiencias de la glándula lagrimal debido a una enfermedad autoinmune, llamada síndrome de Sjögren (primario o secundario a una enfermedad sistémica de los tejidos conectivos, como por ejemplo la artritis reumatoide), mientras que otros padecen deficiencias en la glándula pero no se les detectan signos de autoinmunidad. Entre estos últimos se incluye los pacientes con una falta congénita de glándula y, más frecuentemente, los que sufren una deficiencia adquirida.

La deficiencia adquirida es el resultado de una específica y gradual destrucción de la glándula de origen desconocido (deficiencia adquirida primaria) (Murray et al 1981) o como consecuencia de una patología sistémica (deficiencia adquirida secundaria) como la sarcoidosis, los linfomas o la infección por VIH, entre otras.

A veces, una patología que provoque cicatrices en la conjuntiva puede estrechar los orificios de salida de los conductos secretores de las células caliciformes, como por ejemplo en el tracoma, el penfingoide ocular, el eritema multiforme o las quemaduras, desencadenando, así, una disminución del flujo de lágrima (Johnson y Murphy 2004).

Otra causa desencadenante de QCS es una lenta velocidad de renovación lagrimal que aumentaría el tiempo de residencia de la lágrima y el de las sustancias disueltas en ella como, ciertas citoquinas proinflamatorias o algunos contaminantes ambientales. De este modo, se activaría o se exacerbaría la inflamación de la superficie ocular (Pflugfelder et al 2002).

La velocidad de renovación es función de la producción y de la eliminación de lágrima. Se ha comprobado que una disminución en la producción conduce a una reducción en su renovación (Tomlinson et al 1998) aunque no se conoce como funciona este mecanismo de retroalimentación.

Las causas que alteran la síntesis y secreción de lágrima ya han sido comentadas. En cuanto a la eliminación, el factor que más influye es el drenaje nasolagrimal, más que la evaporación o la absorción ocular. Por su parte, el

drenaje nasolagrimal depende del parpadeo, el cual comprime el canalículo lagrimal bombeando la lágrima hacia el saco lagrimal. Además de un pobre parpadeo existen varias situaciones que reducen la eliminación pero todas ellas conllevan obstrucción de las vías de drenaje lagrimales. (Johnson y Murphy 2004)

Las alteraciones del parpadeo se consideran, también, causantes de ojo seco. El parpadeo es un acto reflejo que depende de la sensibilidad corneal y se inicia posiblemente por la acción refrescante de la lágrima al evaporarse. (Fujishima et al 1996) (Mori et al 1997). En consecuencia, un parpadeo infrecuente puede ser el resultado de una disminución de la sensibilidad corneal. Desde un punto de vista clínico, el parpadeo inefectivo o infrecuente de un paciente puede ser debido a causas muy variadas como son: cambios degenerativos de la edad, trauma, lagofthalmos, proptosis o trabajos que requieren una concentración visual constante (Murube y Murube 2002)

Hay que añadir que el parpadeo inefectivo o infrecuente, además de disminuir la velocidad de renovación de la lágrima, intensifica la pérdida de lágrima por evaporación, ya sea de forma directa por la prolongación del periodo interparpadeo, ya sea indirectamente, por la disminución de la secreción de lípidos que desestabiliza la película lagrimal aumentando, así, su evaporación. (Korb et al 1994)

Por lo tanto, el parpadeo infrecuente está claramente implicado en el desarrollo de QCS, aunque en esta enfermedad es frecuente observar pacientes con una frecuencia de parpadeo más alta de lo normal, seguramente, como resultado de la adaptación fisiológica a una reducida estabilidad de la lágrima. (Tsubota et al 1996)

La falta de estabilidad es, pues, otra posible causa de QCS. Una lágrima estable es esencial para minimizar las pérdidas por evaporación y mantener un recubrimiento lagrimal sobre la superficie ocular entre parpadeos. La ruptura de la película lagrimal ocurre siempre, ya sea en una persona sana que momentáneamente no parpadea o en un paciente con ojo seco, debido a la

formación de áreas no humectadas (Holly y Lemp 1971). El mecanismo que conduce a esta no humectabilidad no está del todo aclarado.

Existe una hipótesis clásica según la cual la ruptura de la película lagrimal se debe a una difusión y absorción de lípidos hidrofóbicos en la interfaz mucocelular (Holly y Lemp 1971). Sin embargo, no parece muy plausible que estos lípidos de baja solubilidad acuosa difundan a través de la película lagrimal en cantidades suficientes como para desestabilizarla. Además, este modelo no explica por qué se reduce drásticamente el tiempo de ruptura en casos de anomalías de la capa mucosa y de la superficie ocular.

Un mecanismo alternativo para la ruptura de la película lagrimal sugiere que esta es instigada por una amplia gama de fuerzas de van der Waals que generan pequeños agujeros en la capa mucosa; puntos de contacto entre la lágrima acuosa y el epitelio. (Sharma y Ruckenstein 1985) (Sharma 1998b). Aunque el epitelio es normalmente humectable gracias al glucocáliz, es probable que existan áreas microscópicas de baja humectabilidad debido a la descamación celular o a una menor madurez del glucocáliz (Gipson et al 1992). Las pequeñas áreas secas aumentan rápidamente de tamaño porque el epitelio, sin mucina hidratada, se une más fácilmente a los contaminantes hidrofóbicos (Sharma 1998a y b) que a la parte acuosa de la lágrima causando, así, la ruptura de la película lagrimal.

Sin embargo, existe una explicación alternativa para este fenómeno. Fatt (1991) considera que la rotura se produce cuando las fuerzas que mantienen la tensión son superadas por la presión negativa de los meniscos lagrimales que estiran la lágrima hacia arriba y hacia abajo. Como las dos hipótesis son plausibles y no contrapuestas lo más probable es que el proceso de ruptura implique más de un mecanismo desencadenante. (Johnson y Murphy 2004)

Un tiempo de ruptura corto ha sido asociado a deficiencias de la lágrima, irregularidades de la superficie o inflamación ocular. Esta última disminuye la estabilidad de la película lagrimal porque causa metaplasia escamosa (las células no queratinizadas, fácilmente humectables se convierten en células

queratinizadas que no se pueden mojar), pérdida del glucocálix y disminución de la producción de las células caliciformes; aumentando la irregularidad de la superficie ocular. Ello genera puntos de acelerado adelgazamiento de la película lagrimal, además de alteración en su composición (Rivas et al 1992)

Otro mecanismo desencadenante de ojo seco es el aumento de la osmolaridad de la lágrima. Se ha comprobado que la hiperosmolaridad es una característica constante en esta patología y se la considera un indicador con excelente sensibilidad y especificidad para diagnosticar la existencia de una QCS (Lucca et al 1990)

Este aumento de la osmolaridad lagrimal, típico de los pacientes con ojo seco (Mishima 1965), se cree que es debido, principalmente, a una velocidad de evaporación elevada. (Ronaldo et al 1983) Las causas que originan un aumento en la evaporación de la lágrima se han ido comentando a lo largo de este subapartado (falta de lípidos, parpadeo ineficaz, o poco frecuente, baja renovación o inestabilidad de la película lagrimal).

Sin embargo, Tsubota y Yamada (1992) midieron la velocidad de evaporación y sus resultados muestran que es mayor en los pacientes sanos mientras que en los ojos secos es más variable y de media más baja. Para estos autores el problema estriba en la importancia relativa del proceso y proponen que la evaporación posee un peso específico mayor en la dinámica global de una lágrima escasa que en el caso de una lágrima abundante.

Por otro lado, la osmolaridad del fluido secretado por la glándula lagrimal principal se incrementa en condiciones de baja velocidad de flujo (Gilbard y Dartt 1982) debido a una mayor absorción de agua a nivel de los conductos lagrimales, lo que vendría a aumentar más las condiciones de hiperosmolaridad de la película lagrimal.

Estas condiciones adversas conducen a una alteración de la superficie ocular de forma directa (Gilbard et al 1984) (Huang et al 1989) e indirectamente ya que la hiperosmolaridad desencadena una reacción inflamatoria (Ciprandi et al

1994) Una vez iniciada, la inflamación se convierte en el artífice de las lesiones de la superficie ocular; siendo la causa y la consecuencia del daño celular (Baudouin 2001)

A parte de la hiperosmolaridad, también la desecación, los microtraumas producidos en los párpados con el parpadeo, las sustancias proinflamatorias segregadas por la glándula lagrimal y los párpados, además de ciertos factores liberados por las terminaciones nerviosas pueden desencadenar una respuesta inflamatoria. Dicha respuesta se perpetúa gracias a las citoquinas liberadas por las células superficiales dañadas. De este modo, los pacientes con un ojo seco severo se ven atrapados en un círculo vicioso de inflamación y lesiones celulares. (Stern et al 1998) (Mathers 2000) (Ronaldo y Zierhut 2001)

Las citoquinas proinflamatorias se han asociado a queratinización epitelial (Kawasaki et al 2003), hipoestesia (Schafer et al 1994), expresión alterada de las mucinas (Hibino y Watanabe 2002) y neovascularización corneal (Dana et al 1998). Por otro lado, la acción de las citoquinas se ve apoyada por una pérdida de factores de crecimiento de la lágrima (van Setten et al 1991), una falta de vitamina A (Sommer 1983) y de sustancias neurotróficas liberadas por los nervios corneales (Muller et al 2003)

Afortunadamente, las citoquinas y los linfocitos, extravasados gracias al proceso inflamatorio, no pueden atravesar el epitelio o la membrana de Bowman, siempre y cuando estos estén en perfectas condiciones, con lo que las lesiones en esta patología suelen estar circunscritas a las capas más superficiales. Sin embargo, en caso de inflamación severa o cirugía (queratectomía refractiva) se lesionan estas capas limitantes con lo que las citoquinas pueden interactuar con el estroma ocasionando cicatrices y un deterioro subepitelial general. (Wilson et al 2001)

Se ha observado, también, que algunas patologías que conllevan un proceso inflamatorio como la blefaritis o la alergia ocular coexisten, frecuentemente, con QCS en lo que parece ser una mutua relación de causa-efecto (Baudouin 2001). La blefaritis agrava el ojo seco porque aporta muchas sustancias

proinflamatorias y antígenos además de desencadenar alteraciones en la producción de lípidos lagrimales. (Shine y McCulley 1998) De forma recíproca, el sufrir ojo seco puede predisponer a la aparición de blefaritis como resultado de una alteración en la flora bacteriana ocular, debido a la falta de proteínas antibacterianas de la lágrima.

En cuanto a los procesos alérgicos, pueden agravarse o desencadenarse debido a la baja dilución de los antígenos en un ojo seco y la inflamación que conlleva una alergia puede conducir a una QCS.

A lo largo de todo este subapartado se han descrito los aspectos clínicos más relevantes de esta patología, las carencias del aparato lagrimal y los posibles factores desencadenantes de un ojo seco. En base a los objetivos de esta tesis, se inicia, ahora, un análisis detallado de las alteraciones morfológicas que la QCS origina en la superficie corneconjuntival, algunas de las cuales ya han sido comentadas al hablar de los aspectos clínicos de esta patología.

La mayoría de las anomalías celulares objetivadas en los pacientes aquejados de ojo seco se han obtenido a partir de observaciones con el biomicroscopio (comentadas anteriormente) citologías de impresión o bajo microscopía especular debido al carácter no invasivo de dichas técnicas.

En las citologías de impresión, el epitelio corneconjuntival de los pacientes con ojo seco presenta una disminución de la densidad de las células caliciformes, metaplasia escamosa y aparecen células inflamatorias en la conjuntiva. (Rivas et al 1992) Otra característica morfológica destacable es la presencia de cambios en la cromatina celular que posee aspecto serpentiforme (*snakelike cromatine*). Sin embargo, estas anomalías no son específicas de la QCS y se han encontrado, también, en caso de conjuntivitis alérgica (Marner K 1980) o en portadores de lentes de contacto (Kruse et al 1986).

Los signos de metaplasia aparecen ya en los primeros estadios de la enfermedad, antes de que exista queratinización (Shalaby et al 1998). Las células del epitelio conjuntival, que normalmente son pequeñas y redondeadas

con un citoplasma eosinófilo, se tornan más grandes, más poligonales, con un núcleo más pequeño o inexistente y con un citoplasma basófilo además de separarse entre ellas. Nelson (1988) propuso una escala, para valorar el grado de metaplasia, en la que existen cuatro estadios de gravedad, siendo el grado cuatro el que posee todas las características mencionadas más arriba además de una densidad de células caliciformes muy baja (<100 células/mm²) Tseng (1985) estableció cinco estadios en este mismo proceso. El grado de metaplasia escamosa informa del estado de la superficie ocular e indica la severidad de la patología.

Las células del epitelio corneal sufren un proceso análogo (Shalaby et al 1998) (Murube y Rivas 2002) aunque fisiológicamente poseen una mayor dispersión de tamaños y un tamaño medio mayor (Doughty 1997).

Con microscopía especular los epitelios corneales que sufren metaplasia escamosa muestran unas células de aspecto menos pulido; más mate y rugoso. Algunas de ellas pierden su unión a la membrana basal. En general la textura celular aparece más heterogénea y los contornos celulares y los núcleos son más marcados (Mayer 1984) Las células más alteradas aparecen como finas placas sobresaliendo del resto de la superficie. Lemp et al (1984) las consideran en un estado preexfoliativo.

Estos últimos cuantificaron el tamaño celular y observaron que existía mayor dispersión de tamaños en los pacientes con QCS. En concreto, la proporción de células de talla mediana disminuía a favor de las tallas pequeña y grande. Para Lemp et al (1984) igual que para Tsubota et al (1991) el tamaño celular predominante sería el pequeño mientras que para Maréchal-Courtois y Delcourt (1986) y Serdarevic y Koester (1985) existiría un predominio de células grandes poco brillantes y de textura heterogénea. Además, para estos últimos la zona central, más apagada, es más pequeña que en las células normales. Se ha postulado (Rigal 1993) que la irregularidad celular y una mejor visibilidad de los núcleos, frecuentemente observadas en los epitelios anormales, podrían indicar un sufrimiento moderado de la superficie ocular.

No se han llevado a cabo estudios de microscopía electrónica de barrido del epitelio corneo-conjuntival de pacientes aquejados de QCS pues no es una técnica clínica debido al carácter invasivo del método de obtención de las muestras. Sin embargo, existen unos pocos estudios realizados en modelos experimentales de ojo seco en los que se ha intentado reproducir las condiciones de esta patología aunque su complejidad y cronicidad hacen difícil una analogía total y precisa (Barabino y Dana 2004)

Xie y Zhang (1993) observaron signos de sequedad ocular diez días después de lesionar la conjuntiva y extraer la glándula lagrimal, la membrana nictitante y la glándula de Harder a cuarenta conejos. Estos signos se manifestaron como multitud de defectos en el epitelio corneal, observado al microscopio electrónico de barrido (SEM). Las microproyecciones de la membrana celular aparecían engrosadas, con forma abalonada, entremezcladas, rotas y descamadas. Las células superficiales y dos o tres capas por debajo de estas, aparecían exfoliadas y las zonas desnudas presentaban forma convexa o cóncava. En las capas más profundas, las separaciones entre células se mostraban confusas y se observaban úlceras. Así mismo, estos autores vieron que la membrana celular de las células superficiales presentaba discontinuidades y aparecían edemas intra e intercelulares tanto en el estrato superficial como en las capas intermedias.

Por su parte, Gilbard et al (1984) estudiaron el epitelio en un modelo experimental de ojo seco en el que bañaban los ojos de los conejos con diferentes soluciones hiperosmóticas. En este caso, la microscopía electrónica de barrido muestra, también, la presencia de una mayor descamación celular. En general, las células se observan con microproyecciones menos afiladas o inexistentes y la superficie corneal presenta, ocasionalmente, hebras de mucina.

Por otro lado, varios autores han estudiado los cambios en la impermeabilidad del epitelio corneoconjuntival de los ojos secos. (Göbbels y Spitznas 1992) (Puy et al 1998) Todos ellos concluyen que la eficacia de la barrera disminuye; con lo que los desmosomas y las uniones estrechas de las últimas capas

epiteliales estarían afectados. La función de barrera del epitelio es considerada el parámetro más sensible para valorar la integridad anatómica y fisiológica de dicho tejido. (Puy et al 1998)

Este aumento de la permeabilidad del epitelio aparece paralelamente a una bajada del nivel energético celular. El glucógeno de las células epiteliales se considera un buen indicador de la vitalidad celular (Gilbard et al 1987a) y parece que la disminución de este soporte energético está relacionada con la hiperosmolaridad y la duración de la enfermedad, según los trabajos realizados por Gilbard et al (1987b) en dos modelos experimentales de ojo seco en el conejo. Los autores interpretan esta disminución progresiva del glucógeno como una consecuencia del estrés celular o un defecto del aporte de elementos nutritivos a las células epiteliales.

La complejidad de la fisiología del epitelio corneconjuntival asociada a una no menos compleja patogénesis hacen que el equilibrio de fuerzas que mantiene a este tejido en perfectas condiciones sea frágil y su pérdida de consecuencias devastadoras. El progresar en su conocimiento es una tarea difícil y lenta pero apasionante.