



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA  
SALUD**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ENTIDAD ACADÉMICA  
INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA FUNDACIÓN CONDE DE  
VALENCIANA**

**"Estudio de la expresión del receptor CCR3 en muestras de  
córneas humanas neovascularizadas"**

**TESIS QUE PARA OPTAR EL GRADO  
DE MAESTRO EN CIENCIAS PRESENTA**

**Med. Esp. Alberto Haber Olguín.**

**Esta tesis se realizó en la unidad de investigación del instituto de oftalmología fundación Conde de Valenciana bajo la tutoría del Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra (Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud) y fue parcialmente financiada por el fondo Conacyt-salud-C01-150289; cvu 390525**

México D.F. junio del año 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **INDICE**

Introducción: .....	3-18
Anatomía y fisiología de la córnea humana .....	3-6
Metabolismo de la córnea humana.....	9
Transparencia corneal.....	11
La angiogénesis.....	12
Refracción y transparencia corneal.....	14
Angiogénesiscorneal.....	16
CCR3 y eotaxinas.....	16
CCR3 y neovascularización corneal.....	17
Pregunta de investigación: .....	17
Justificación: .....	17
Diseño: .....	17
Objetivo General: .....	18
Objetivos Específicos: .....	18
Planteamiento del problema: .....	18
Material y métodos: .....	18
Criterios de inclusión: .....	19
Criterios de exclusión: .....	19
Criterios de eliminación: .....	19
Tamaño de muestra: .....	19
Variables del estudio: .....	20
Metodología: .....	21-22
Resultados: .....	22-32
Discusión: .....	33
Conclusión: .....	35
Bibliografía: .....	35-41

Introducción :

Anatomía y fisiología de la córnea humana :

La córnea, la conjuntiva y su área de transición denominada limbo esclero-corneal constituyen la superficie ocular (1). Estas tres regiones comparten cualidades estructurales e histológicas como lo es un epitelio escamoso estratificado no queratinizado que se asienta en una membrana basal, mismo que se conecta mediante un complejo de anclaje al tejido conectivo del estroma (2). Este epitelio funge como una barrera para la pérdida de líquidos así como una primera línea de defensa contra microorganismos y sustenta a la película lagrimal que cumple con funciones ópticas y de humectación (3). Las condiciones necesarias para el correcto funcionamiento de la superficie ocular están a cargo de los anexos que incluye a los párpados con una importante función de distribución de la lágrima por la superficie ocular así como para limitar la exposición de la misma a la desecación (4). Las glándulas que participan en la superficie ocular que incluyen las glándulas de meibomio, las glándulas lagrimales accesorias de Kraus y Wolfring, la glándula lagrimal principal y las pequeñas glándulas de Zeiss y Moll que secretan directamente al espacio que rodea al folículo de las pestañas (5,6). La córnea es un tejido altamente especializado para refractar la luz. Tiene un grosor aproximado de 0.8 mm en la periferia y 0.5 mm en el centro (7).

El epitelio corneal se conforma de 5 a 7 capas de células con un grosor aproximado de 50  $\mu\text{m}$  y contiene múltiples características únicas en referencia a los demás epitelios del resto del organismo (8). A diferencia de otros epitelios similares en otras localizaciones

anatómicas, el epitelio corneal se sustenta en un lecho de tejido conectivo avascular, cualidad indispensable para mantener su transparencia y capacidad de refracción (9,10).

El epitelio corneal constituye una barrera para la pérdida de líquidos debido a las uniones estrechas entre sus células apicales y a su vez a su membrana basal, lo cual le confiere también una resistencia considerable a la abrasión (11, 12).

Las células del epitelio corneal incluyen de tres a cuatro capas de células escamosas planas, de una a tres capas de células intermedias denominadas alares y una capa de células en contacto con la membrana basal denominadas células columnares basales (13).

Las células basales mantienen una actividad mitótica intensa que al momento de dividirse se dirigen a la superficie continuamente (14).

El citoplasma de las células basales así como de las intermedias contienen altas concentraciones de queratinas y citoqueratinas en especial las tipo 1 y 2 mientras que las queratinas tipo 5 y 14 se expresan mientras conllevan su proceso de diferenciación de la región basal a apical y la queratina 3 y 12 son expresadas por todas las células epiteliales sin importar su diferenciación. La queratina 12 que es una proteína de 64 kilodaltones es específica para la córnea. Los otros dos elementos citoesqueléticos presentes en las células epiteliales son los filamentos de actina y los microtúbulos (15).

Las membranas apicales de las células basales e intermedias contienen una abundante cantidad de interdigitaciones entre las cuales sobresalen grandes cantidades de desmosomas anclados estos a bordes celulares (16). Otro enlace celular entre células epiteliales lo son las uniones *gap* las cuales contienen conexina y se distribuyen ampliamente en las membranas laterales de estos grupos celulares (17-19). Las células basales se adhieren a la membrana basal y al tejido conectivo subyacente debido a una serie de estructuras denominadas complejo de anclaje las cuáles son producidas por las

células basales del epitelio corneal. En la cara basal del citoplasma de la célula basal incluye una región con abundantes anclajes de filamentos de queratina a la cual se le conoce como hemidesmosoma. La proteína alfa 6 beta 4 integrina une los componentes intracelulares del hemidesmosoma con la membrana basal extracelular además de recibir uniones cruzadas fibrilares a base de colágeno tipo VII, la cual cuenta con un dominio helicoidal y uno globular las cuales forman las placas de anclaje al estar relacionando la membrana basal y al hemidesmosoma con la membrana de Bowman. Junto con este sistema de anclaje se complementa con uniones cruzadas de colágeno tipo I y V los cuales contribuyen a la adherencia entre el epitelio y el estroma, lo cual está demostrado en la enfermedades ampollas en que un defecto en la expresión de la colágeno tipo VII provoca una pobre adherencia epitelial a su membrana basal (20).

Las células epiteliales migran de forma centrípeta sobre la superficie corneal, así las células basales y alares se deslizan hacia la córnea inferior central y hacia la superficie donde tiene lugar su descamación a lo cual se le conoce como la hipótesis x-y-z. El deslizamiento centrípeto de la células epiteliales basales se debe al mayor índice mitótico y a la menor pérdida de células superficiales que ocurren en la periferia respecto a la córnea inferocentral (21). Las células madre se localizan en el limbo corneal, y con predominio superior. Estas células dan origen a las células transitorias amplificadoras que se desplazan centralmente transformándose en células completamente diferenciadas (22). La capa de Bowman es una zona acelular de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de grosor situada debajo de epitelio, se limita anteriormente por la membrana basal del epitelio y posteriormente se mezcla con las fibras de colágeno del estroma anterior (23).

El estroma corneal constituye el 90% del grosor del tejido y se constituye fundamentalmente de fibras de colágeno, células del estroma y sustancia fundamental. El

80% de su peso es agua. Las fibras de colágeno constituyen el 80% del peso seco de la córnea mientras que la sustancia fundamental el 15% y los elementos celulares únicamente al 5%. Las fibrillas de colágeno se disponen de 200 a 300 laminas paralelas llamadas lamelas, las cuáles se entrecruzan entre sí de manera regular a menos de 90 grados del estroma anterior formando ángulos casi rectos en el estroma posterior. Las lamelas discurren paralelas entre sí a la superficie de la córnea recorriendo cada una de ellas la totalidad de cada uno de sus meridianos. De esta forma un corte transversal del estroma mostrara unas fibrillas paralelas al corte y otras perpendiculares a éste (24).

Las fibrillas de colágeno del estroma corneal son altamente uniformes de aproximadamente 250 a 300 Årmstrong de diámetro y son más pequeñas que en cualquier otra localización anatómica. El colágeno tipo I es el predominante en la córnea , los tipos V y VI representan el 10 y 25% respectivamente (25,26).

El queratocito es la célula más abundante del estroma corneal y se encuentra en un número aproximado de 2450 en la córnea humana. Es una célula grande y plana con prolongaciones que le dan una forma característica de estrella. Estas células se encuentran entre las láminas de colágeno y sus prolongaciones se extienden en el espacio de la misma lamela. El queratocito deriva de la cresta neural y elabora el colágeno y la matriz extracelular del estroma. En la respuesta reparativa de la córnea al trauma el queratocito migra a la zona de la herida y se transforma a fibroblasto presentando un aumento significativo del retículo endoplásmico rugoso y complejos de Golgi así como una disminución de la prolongaciones citoplasmáticas. Esta transformación es esencial en la formación de cicatrices y opacificaciones corneales posteriores a su cicatrización. Los queratocitos pueden acumular abundantes productos metabólicos como lo es el caso de la cistinosis, el mieloma múltiple, mucopolisacaridosis y esfingolipidosis (27).

En el estroma sano se encuentran en menor medida otros grupos celulares como lo son leucocitos polimorfonucleares, células plasmáticas y macrófagos. La membrana de Descemet tiene un espesor de 10  $\mu\text{m}$  en los adultos y se trata de una lámina basal producida por el endotelio. El anillo de Shwalbe señala el final de la membrana de Descemet. A la microscopía electrónica se observa que esta membrana está compuesta por 2 zonas, una anterior en banda y una posterior homogénea, la zona anterior se produce en útero y la posterior después del nacimiento y aumenta su grosor conforme a los años. La membrana de Descemet contiene colágeno tipo IV, VIII y fibronectina. La membrana de Descemet puede exhibir engrosamiento periférico en las personas de la séptima década de la vida y se le conocen como cuerpos de Hassal Henle. La membrana de Descemet se desprende del estroma con facilidad y se regenera con rapidez tras una agresión a diferencia de la capa de Bowman. la membrana de Descemet es susceptible de acumular sustancias metálicas como lo es cobre en la enfermedad de Wilson o plata en la argirosis (28). El endotelio corneal se encuentra posterior a la membrana de Descemet y la constituye una capa única de células hexagonales, las cuales son más cuboides al nacimiento con un grosor de 10  $\mu\text{m}$  que se aplanan hacia la edad adulta hasta llegar a un grosor de 4  $\mu\text{m}$  y con su forma hexagonal característica, las células endoteliales no exhiben mitosis por lo que al nacer se cuenta con un número aproximado de 4000 a 3500  $\text{cel}/\text{mm}^2$  disminuyendo hacia 2500–3000 en la adultez y mostrando un déficit metabólico funcional cuando éstas son menores de 500 en estados generalmente patológicos. Cuando una agresión disminuye el número de células endoteliales las áreas afectadas son cubiertas por la migración de las células vecinas dando como resultado un aumento en el área celular y una disminución en su densidad. Las células del endotelio corneal muestran histológicamente numerosas mitocondrias, grandes retículos endoplásmicos lisos y

rugosos y abundantes ribosomas libres. En algunas células endoteliales se puede observar un cilio central, cuya función aún se desconoce (29,30).

La córnea es un tejido altamente innervado por la primera división del nervio trigémino mediante las ramas ciliares largas y las ciliares cortas del nervio naso ciliar. Los nervios ciliares largos penetran en el ojo cerca del nervio óptico y pasan anteriormente al espacio supra coroideo, se ramifican antes de alcanzar el limbo y se anastomosan con las ramas de los nervios ciliares cortos. La innervación de la córnea está dada por 70 troncos nerviosos que atraviesan en el tercio medio de su espesor y pierden su vaina de fibrina al transcurrir 0.5 mm de la córnea para transcurrir el resto de su trayecto como estructuras transparentes. Los nervios confluyen en la capa de Bowman donde forman un plexo subepitelial denso, atraviesan la Bowman y finalizan entre las células epiteliales como terminaciones axónicas simples .

Las células epiteliales basales se encuentran ampliamente relacionadas con las fibras nerviosas axonales y casi todas las células basales se encuentran en contacto directo con estas fibras nerviosas. Algunas fibras nerviosas en vez de superficializarse se dirigen hacia el estroma medio aunque en un número muy reducido. Las fibras simpáticas también inervan la córnea, sus cuerpos celulares se encuentran en el ganglio cervical superior y sus axones los transportan el nervio trigémino (31). La innervación corneal al ser interrumpida por una axotomosis sectorial induce una redistribución de sus fibras nerviosas al área denervada que suele prolongarse hasta por 9 meses, mientras que en el caso de la queratoplastia penetrante la reinnervación no se presenta incluso años después de la misma con la subsecuente anestesia de la parte central del tejido, la córnea es altamente sensible en su porción superficial y central, disminuyendo hacia el área periférica y posterior o profunda (32). Se le conoce como limbo esclerocorneal a la zona de transición

entre la conjuntiva y la córnea, es una zona vascularizada en donde el margen corneal periférico se confunde con la esclera, mientras que la región central del limbo está definida por una línea que une los extremos de la capa de Bowman y la membrana de Descemet. Es en el limbo esclerocorneal donde las fibras de colágeno pierden su arreglo perpendicular y varían su diámetro y distancia interfibrilar perdiendo con esto su transparencia. El final de la capa de Bowman coincide con los ápices de los vasos sanguíneos del limbo. El epitelio corneal aumenta su grosor teniendo un total de 12 capas celulares, el epitelio se proyecta hacia atrás en donde se disponen linealmente entre las papilas subepiteliales apareciendo como líneas blancas orientadas radialmente que cruzan el limbo cada 1 o 2 mm a estas proyecciones se le conocen como empalizadas de Vogt (33). El epitelio corneal y conjuntival contienen cualidades distintas que se pueden evidenciar mediante queratinas que expresan de forma diferencial uno y otro. El limbo corneal posee una importancia fundamental en la regeneración epitelial ya que tiene un gran potencial proliferativo en donde habitan las células madres que tras su diferenciación dan lugar a las células del epitelio corneal. El limbo superior contiene el mayor número de células madre (34).

## Metabolismo

Las células de la córnea son metabólicamente activas y exhiben importantes diferencias dependiendo su localización anatómica. El epitelio utiliza nutrientes como la glucosa, oxígeno, vitaminas, aminoácidos y es mediante el catabolismo de la glucosa y glucógeno su principal fuente de energía, casi toda la glucosa proviene del humor acuoso y sólo un 10% de los vasos límbicos o la lágrima. El epitelio corneal acumula glucógeno, mismo

que puede ser movilizado en caso de haber un déficit en la disposición de glucosa, como puede ser durante la hipoxia o por un traumatismo. La glucosa se cataboliza a través de ciclo de Krebs y la derivación de las hexosas mono fosfato y de otras vías anaerobias. La glucólisis anaerobia en el epitelio produce piruvato y lactato que puede después convertirse en  $\text{CO}_2$  el cual se elimina rápidamente por difusión a través de la superficie y por conversión a bicarbonato en el endotelio. El lactato no puede atravesar el epitelio y debe difundir por el estroma hacia el humor acuoso (35).

Casi todo el oxígeno que consume la córnea es consumido por el epitelio y el endotelio, este oxígeno proviene principalmente de aquel que se disuelve en la lágrima a partir del oxígeno atmosférico. Cuando el ojo está abierto la tensión parcial de oxígeno es de aproximadamente 155 mmhg, mientras que al estar cerrado disminuye a sólo 55 mmhg debido a la difusión de los vasos sanguíneos y la lágrima (36).

El endotelio corneal contiene las mismas vías glucolíticas aerobias o anaerobias que el endotelio aunque su actividad es mucho menor, su principal fuente de energía es la glucosa que proviene del humor acuoso y sus requerimientos de oxígeno derivan directamente del humor acuoso. El glutatión es un elemento importante en la eliminación de los radicales libres y peróxidos tóxicos que se forman durante la exposición a la luz (37). El estroma corneal deberá mantener una concentración hídrica constante para poder mantener su grosor, el 78% del mismo es agua lo cual es una concentración mayor a la mayoría del tejido conectivo del resto de la economía. La hidratación también puede describirse como la relación entre el agua y el peso seco del estroma, la hidratación de la córnea es de 3.45, si la hidratación aumenta hasta 6.8 el espesor se duplica y son varios los elementos que participan en la regulación de esta relación como lo es la función de barrera del epitelio y del endotelio, la presión de hinchado del estroma, el transporte

iónico del endotelio y del epitelio, la presión intraocular y la evaporación en la superficie corneal (38).

Transparencia corneal :

La transparencia corneal se debe a la transmisión lumínica con la que cuenta el tejido, esta transmisión es del 90% del espectro electromagnético visible y se absorbe la totalidad del espectro que se encuentra por debajo de los 300 nm y arriba de los 1400 nm. Una de las causas de la transparencia corneal la constituye la ausencia de vasos sanguíneos o linfáticos, las fibras desmielinizadas nerviosas que trascurren por ella y la adecuada hidratación del estroma. El colágeno seco posee un índice de refracción de 1.55 en cuanto la sustancia fundamental de 1.35 y tal disparidad debería producir una dispersión lumínica y una opacidad del tejido, sin embargo la disposición regular de sus lamelas y fibras de colágeno produce que la dispersión por fibras individuales se suprima con la interferencia destructiva con la luz dispersa de las fibras vecinas, por lo que mientras las fibras estén regularmente dispuestas y separadas por lo menos de una longitud de onda de luz, la córnea permanecerá transparente, sin embargo si la córnea se torna edematosa y la distancia entre sus fibras aumenta esta interferencia entre fibras no se da provocando opacidad. La transparencia corneal se pierde cuando las variaciones en el índice de refracción se produce en áreas mayores a los 2000 Årmstrong (39).

La angiogénesis :

La angiogénesis se define como la generación de nuevos vasos a partir de células endoteliales vasculares derivados de vasos sanguíneos existentes. Dejando de un lado los ciclos reproductivos femeninos y la cicatrización de la heridas; la angiogénesis ocurre de manera normal en el adulto únicamente en el 0.01% del volumen total de vasos sanguíneos. A la vascularización corneal se le considera invariablemente patológica y representa una importante causa de morbilidad corneal y ocurre en el 41% de los trasplantes corneales, siendo uno de los principales factores en el rechazo inmunológico. Existen modelos animales por los cuales la neovascularización perjudica la transdiferenciación, proceso por el cual las células madres epiteliales migran y se diferencian hacia un epitelio sano y transparente, los vasos de neo vascularización son friables y poseen una aumentada permeabilidad con lo que pueden generar depósitos corneales de lípidos y opacidad corneal (40). El crecimiento de vasos sanguíneos de neo formación resulta por lo general de entidades patológicas relacionadas con inflamación crónica, deficiencia de células límbicas o hipoxia. En los Estados Unidos de Norteamérica la queratitis herpética y bacteriana son las causas mas frecuentes de neo vascularización. Otra causa ceguera a nivel mundial lo constituye el tracoma que afecta a mas de 400 millones de personas de los cuales son ciegos un total aproximado de 6 millones (41). La deficiencia de células límbicas deriva en vascularización y puede deberse a traumatismos, quemaduras, inflamación o enfermedades como el síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide cicatrizal o incluso algunas patologías congénitas como la anhidridia. La causa principal de vascularización corneal lo constituye el uso de lentes de contacto por un mecanismo hipóxico local (42). La angiogénesis se inicia por un desequilibrio en el balance entre los mecanismos angiogénicos y antiangiogénicos, esto

se ha evidenciado en modelos animales y tumorales en donde la producción de factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) provee a ciertos tumores de una acelerada tasa de creación de nuevos vasos sanguíneos confiriéndole un marcado incremento en su irrigación y una subsecuente ventaja con respecto a los tejidos aledaños (43). Por otro lado los tejidos también producen sustancias antiangiogénicas como la trombospondina-1 la cual se encarga de nivelar este equilibrio angiogénico. La inhibición de la angiogénesis surge con el descubrimiento de ciertos componentes de matrices extracelulares como la fibronectina y el plasminógeno que al ser degradados por enzimas incluyendo metaloproteinasas en pequeños fragmentos le conferirán potentes cualidades antiangiogénicas, como es el ejemplo de la angiostatina y las moléculas parecidas a la endostatina las cuales al combinarse con otras como el factor de crecimiento de fibroblastos tienen una función importante en la homeostasis de la vascularización (44). En la córnea en específico la matrilisina (MMP-7) participa en lo que se conoce como privilegio angiogénico de la córnea (45). El desequilibrio entre los factores pro y antiangiogénicos puede desencadenar la secuencia de factores que conllevan a la generación de vasos sanguíneos como lo son la disrupción de la membrana basal, migración celular endotelial vascular, proliferación endotelial celular, diferenciación endotelial y formación de túbulos, maduración y reclutamiento de pericitos. La migración endotelial es facilitada por la expresión de algunas moléculas de adhesión como lo son las integrinas alfa 5 beta 3 y alfa 5 beta 5. La maduración del vaso sanguíneo por pericitos y músculo liso parece estar mediado por agiopoyetina así como por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformador beta (TGF- $\beta$ ) (46).

## Refracción y transparencia corneal

La curvatura corneal le permite a esta estructura comportarse como un lente positivo y converger las imágenes que posteriormente se enfocarán en la retina; la córnea es el elemento refractivo más potente del sistema óptico del ojo humano contribuyendo con dos terceras partes de este poder. El radio de curvatura corneal central es aproximadamente de 7.5 a 8 mm en los 3 milímetros centrales en donde es casi esférica, aumentando su radio de curvatura conforme se aproxima a la periferia condición que se le conoce como asfericidad (47). La función corneal visual depende en gran medida de su forma, de su índice de refracción y de su transparencia, la cual depende de la integridad de las fibras de colágeno y de la ausencia de elementos opacos como pueden ser cicatrices o vasos sanguíneos (48,49). La córnea humana en homeostasis es avascular, esta condición suele ser una constante en las demás especies animales que cuentan con este tejido con fines sensoriales, sin embargo existen algunas excepciones a esto como es el caso del manatí (*Trichechus manatus latirostris*), que posee vasos sanguíneos corneales que se acompañan de una marcada opacidad (50,51). En el ser humano la vascularización corneal es invariablemente un proceso patológico que puede ser desencadenada por varios mecanismos como son las infecciones o queratitis infecciosas que conlleven a un mecanismo reparativo y a su vez la generación de vasos sanguíneos que obstruyen la función refractiva del tejido corneal. Algunos ejemplos son la queratitis viral (52,53), queratitis bacteriana (54), queratitis infecciosa asociada a un proceso cicatrizal como es el caso de el tracoma la cual puede progresar con triquiasis o entropión y puede producir ulceración corneal y opacidad permanente constituyendo una de las principales causas de ceguera mundial (55-60). Otras causas de vascularización

corneal son los traumatismos y quemaduras tanto térmicas como químicas en donde además de atentar directamente contra la constitución del tejido pueden verse vulneradas las estructuras limbales que impiden la transconjuntivalización o ingreso de la conjuntiva vascularizada a la córnea a vascular (61-63).

#### Angiogénesis corneal :

La angiogénesis es un proceso esencial para el desarrollo y crecimiento, los primeros vasos sanguíneos que se desarrollan en la etapa embrionaria además de proveer de oxígeno a los tejidos en formación son también elementos de señalización tróficos en la morfogénesis de los órganos. Después del nacimiento la angiogénesis persiste durante el crecimiento y desarrollo de órganos y sistemas para mantenerse quiescentes en su mayoría en la etapa adulta. Sin embargo la neovascularización es un proceso en el cual la generación de nuevos vasos sanguíneos responden a diversos estímulos como son la hipoxia o la inflamación, condicionando eventos patológicos cuando se llega a un desbalance debido a un estímulo excesivo como es el caso de los tumores, asma, endometriosis y en el caso del ojo la retinopatía diabética proliferativa, vascularización corneal por inflamación crónica, vascularización excesiva en leucomas corneales secundario a queratitis infecciosas, entre otras (64).

Estudios recientes han relacionado a la neo vascularización con procesos inflamatorios como el asma bronquial, en donde el reclutamiento de eosinófilos mediante eotaxinas desde la circulación sanguínea provoca una migración hacia el sitio de la inflamación mediante estímulos quimiotácticos asociados a neo vascularización bronquial(65).

CCR3 y eotaxinas :

Numerosas interacciones entre las células del sistema inmunitario se controlan por mediadores solubles llamados citocinas las cuales son un grupo diverso de proteínas de señalamiento que regulan no solo la respuesta inmunitaria e inflamatoria locales y sistémicas sino también la reparación de heridas, la hematopoyesis y muchos otros procesos biológicos. En los últimos 10 años se ha caracterizado una familia de citocinas con actividad quimioatrayente para leucocitos y fibroblastos, a estas citocinas con actividad quimioatrayente se les ha denominado quimiocinas. Estas citocinas varían en peso molecular y comparten de 20 a 50 % de semejanza en su secuencia de aminoácidos, se enlazan a receptores transmembranales y son activas a bajas concentraciones. Las quimiocinas poseen numerosas funciones en sus células blanco aunque predominan aquellas relacionadas con su función más que con su crecimiento y desempeñan una función muy relevante en la atracción de diversos grupos celulares a sitios de lesión e inflamación.

Los receptores de eotaxinas se dividen en cuatro familias (CXCL, CCL, CL y CX<sub>3</sub>CL) con base a la posición de uno o dos residuos de cisteína localizados cerca del extremo amino terminal. Los receptores para estas citocinas pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana tipo serpina o rodopsina, la mayoría de ellos acoplados a una proteína G, con tres asas intracelulares y tres extracelulares (66).

El CCR3 es el receptor para las eotaxinas 1, 2 y 3 y se encuentra altamente expresado en los eosinófilos, implicado en respuestas inflamatorias y alérgicas bronquiales.

La eotaxina-1/CCL11, aislada en 1994 en los lavados bronco alveolares de cobayos alérgicos expuestos a reto alérgico junto con la eotaxina 2/CCL24 y la eotaxina 3/CCL26 constituyen los principales ligandos del receptor CCR3 el cual se encuentra

expresado en los eosinófilos y endotelio vascular de vías respiratorias. Se ha relacionado al receptor de CCR3 y su principal ligando la eotaxina 1 a angiogénesis in vivo en el caso del linfoma Hodgkin, poliposis nasal, endometriosis y procesos alérgicos (67).

CCR3 y neovascularización :

El receptor de eotaxinas CCR3 o CD193 se ha visto implicado en la neo vascularización coroidea que acompaña a la degeneración macular relacionada con la edad en su variedad húmeda, el bloqueo farmacológico del receptor CCR3 resultó generar inhibición de la proliferación endotelial e incluso fue más eficiente para la reducción del tamaño de la membrana neo vascular que el bloqueo del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (68,69). En el caso de los procesos patológicos de córnea, interesantemente, se ha encontrado una participación activa de CCR3. En un modelo de síndrome de ojo seco en ratón, se ha observado que se encuentran incrementados el transcrito de CCR3 así como la expresión de la proteína en tejido corneal expuesto a un estrés por desecación de la superficie ocular (70). En el caso de la neo vascularización corneal inducida por lesión, se ha observado que existe una activación selectiva de las moléculas derivadas del ácido araquidónico como la prostaglandina E2, De la misma forma fue analizada la expresión de CCR3 y sus ligandos CCL11 y CCL24, encontrándose una elevación en los transcritos de estas moléculas (71) y cuantificando la neovascularización mediante inmunofluorescencia de CD31 (molécula de adhesión endotelial plaquetaria o PECAM1 ) marcador ampliamente utilizado para evidenciar localizar y cuantificar células endoteliales vasculares y por lo tanto angiogénesis (72) . Por lo que es posible que se exprese el receptor CCR3 en el tejido corneal con neovascularización .

### Pregunta de investigación:

¿Existe la expresión del receptor CCR3 en córneas humanas sanas y neovascularizadas?

### Hipotesis :

El receptor CCR3 se expresa en córneas humanas vascularizadas.

### Justificación:

Actualmente se desconoce si existe la expresión del receptor CCR3 en córneas humanas sanas y neovascularizadas. En caso de encontrarse la expresión de este receptor únicamente en córneas vascularizadas contribuiría al conocimiento fisiopatológico de la neovascularización corneal.

### Diseño:

El presente es un estudio observacional descriptivo.

### Objetivo General:

Detectar la expresión del receptor de eotaxinas CCR3 en córneas humanas avasculares y vascularizadas.

### Planteamiento del problema:

Una de las principales causas de ceguera en el mundo es la opacidad corneal secundaria a neovascularización, por esta razón importante entender su fisiopatología. Demostrar la existencia de CCR3 únicamente en córneas vascularizadas podría utilizarse como blanco terapéutico para evitar la ceguera ocasionada por la neovascularización corneal.

## Material y métodos

### Criterios de inclusión:

Tejido corneal obtenido de pacientes a los que se les realice trasplante corneal en el servicio de córnea del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

Tejido corneal avascular producto de córneas para fines de investigación que no cumplen criterios para ser trasplantadas con fines ópticos (tejido tectónico).

### Criterios de exclusión:

Tejido corneal avascular producto de córneas para fines de investigación (tejido tectónico) que cumplan criterios para ser trasplantadas .

Todos aquellos tejidos provenientes de pacientes que se realicen trasplante corneal en el servicio de córnea del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana, que expresen negativa a firmar el consentimiento informado.

### Criterios de eliminación:

Tejido corneal que se obtenga de aquellos pacientes a los que se les realice trasplante corneal en el servicio de córnea del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana, del cual no se pueda disponer al momento de la trepanación.

### Variables del estudio:

Variables predictoras: Categórica, nominal, dicotómica

Presencia o ausencia de vascularización corneal.

Variables de resultado principal: continua

Determinación de la expresión de CCR3

Otras variables de resultado:

Presencia o ausencia del receptor CD31

**Definición conceptual:**

Vascularización corneal: Presencia de vasos sanguíneos en la región central de la córnea que rebasen los 2 mm anteriores al limbo (La córnea sana no presenta vasos en esta región).

Presencia o ausencia de la proteína CCR3 mediante inmunofluorescencia

Presencia o ausencia de la proteína CD31 mediante inmunofluorescencia, como marcador para vasos sanguíneos

**Definiciones operativas:**

Vascularización corneal: Evidencia fotográfica digital de vasos sanguíneos en la región central corneal o que rebasen más de 2 mm del limbo. La presencia del marcador CD31 mediante inmunofluorescencia en la región central corneal más de 2 mm del limbo .

Presencia o ausencia de la proteína CD31 como marcador para vasos sanguíneos

**Estrategia general:**

A los pacientes programados para trasplante corneal del servicio de córnea del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana se les tomó previo consentimiento informado fotografías digitales para posteriormente durante la cirugía disponer del tejido retirado con o sin neovascularización.

**Inmunofluorescencia**

Los tejidos fueron fijados en PFA al 4 % por 1 hora , posteriormente se deshidrataron con sacarosa al 10 % por 30 minutos , 20 % por 30 minutos y el ultimo intervalo de 30 minutos con sacarosa al 30 % a una temperatura de 4 grados centígrados . Se realizó montaje del tejido en OCT sobre un blíster para darle orientación y se montaron en una platina con Tissue Tek y se espero su congelación a -30 grados centígrados . Se realizaron los cortes mediante el micrótopo de 10 micras de grosor para ser colocadas sobre las laminillas cargadas eléctricamente . Se cubrieron a las laminillas con los cortes con 300 ul. de solución de bloqueo ( BSA 5 % - suero fetal bovino , suero de caballo al 5 % y tween al 0.5 % ) durante 1 hora . Se retiro el exceso de solución de bloqueo por laminilla y se agregaron los anticuerpos primarios dejándolos toda la noche a 4 grados centígrados Se disolvió la solución de bloqueo al 50 % con PBS para diluir a los

anticuerpos primarios . Se retiraron al día siguiente las laminillas del refrigerador y se dejan a temperatura ambiente por 5 minutos . Se retiro el exceso de anticuerpos mediante 3 lavados con PBS de 5 minutos de diferencia .Se agrego el anticuerpo secundario diluido en PBS a 300 ul por laminilla y dejándolo reposar por 1 hora . Se retiro el exceso de anticuerpos mediante 3 lavados con PBS de 5 minutos de diferencia . Se agrego 15 ul de DAPI +Vecta a la orilla de la laminilla y se cubrió con portaobjetos .

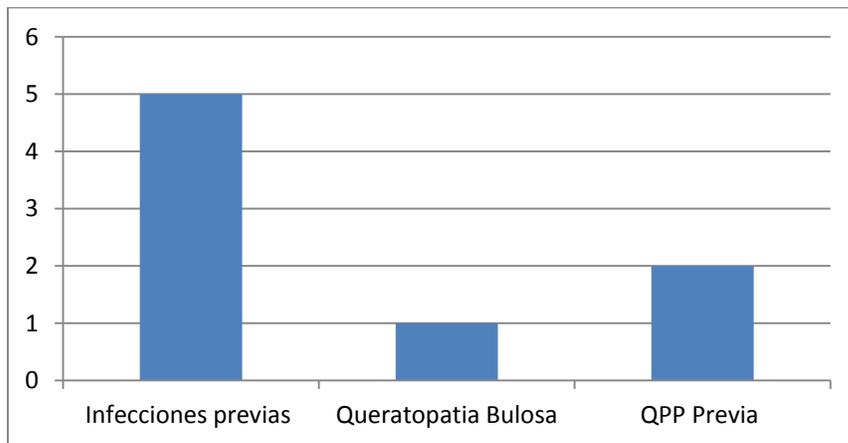
### Aspectos éticos

Los comités de Investigación y de Ética en Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de valenciana aprobaron el protocolo con número de registro: CC-029-2011.

## Resultados:

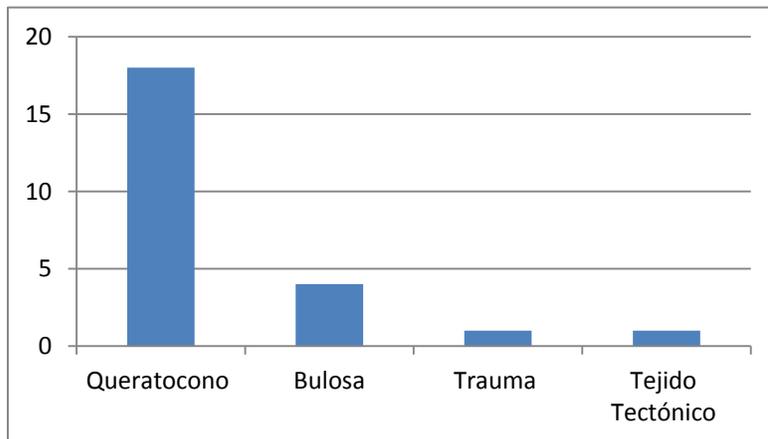
Del total de los 32 tejidos obtenidos, 8 fueron vascularizados y 24 avasculares . En el caso de los tejidos vascularizados 5 fueron por causas infecciosas , 1 queratopatía bulosa y dos queratoplastias penetrantes previas con falla secundaria (Tabla 1)

Tabla 1. Tejido corneal vascularizado



De los tejidos sin vascularización 18 correspondieron a queratocono, 4 a queratopatía bulosa pseudofáquica , un traumatismo corneal y un tejido tectónicoavascular. (Tabla 2)

Tabla 2. Tejido corneal sin vascularización



Se realizó inmunofluorescencia indirecta para la totalidad de los tejidos utilizando los siguientes inmunomarcajes : de color rojo correspondiente al receptor CD31 el cual se encuentra de forma constitutiva en los vasos sanguíneos, color verde correspondiente al receptor CCR3, así como el inmunomarcaje de azul inespecífico para núcleos celulares, encontrando los siguientes hallazgos :

En el caso de las córneas vascularizadas se encontró un marcaje positivo para CD31 en todos los tejidos analizados, así como un marcaje positivo en todos los casos para CCR3. Interesantemente, al realizar la trasposición de colores, el inmunomarcaje reveló un color amarillo producto de la coexpresión de CD31 y CCR3. (Figuras 1- 10)

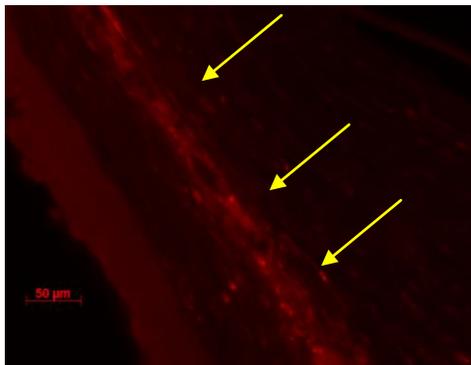


Fig 1: Corte histológico de una córneavascularizada en la que se aprecia en el extremo izquierdo el epitelio corneal , seguido en la unión del tercio anterior y medio del estroma en donde sobresalen algunas estructuras tubulares con marcaje positivo en rojo para CD31 que corresponden a vasos sanguíneos ( flechas ) .

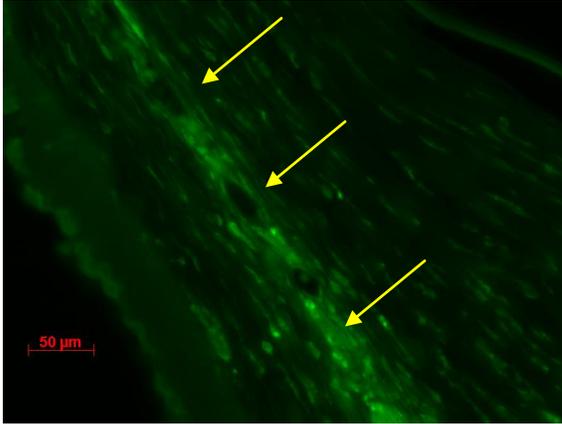


Fig 2.- Corte histológico similar al de la figura 1 en donde las estructuras antes inmunomarcadas para vasos sanguíneos en el estroma corneal e identificadas como vasos sanguíneos presentan un intenso inmunomarcaje positivo para CCR3 en color verde .

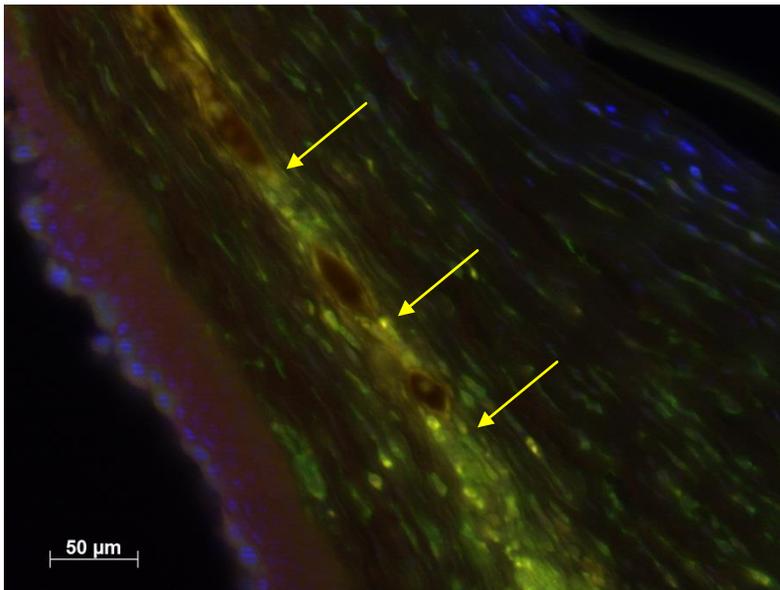


Fig 3.- En este corte histológico correspondiente a la figura 1 y 2 con inmunomarcaje para CCR3 en color verde y CD31 en color rojo se observa un color amarillo contiguo a las estructuras tubulares del estroma corneal que corresponde a la coexpresión positiva de ambos receptores .

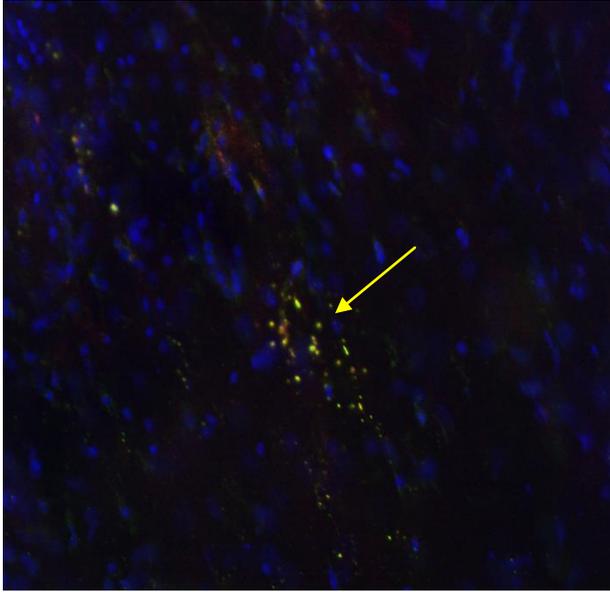


Fig 4 .- Corte histológico del estroma corneal en donde se aprecian abundantes inmunomarcajes en color azul correspondientes a núcleos celulares ( DAPI ,4',6-diamidino-2-phenylindole ) , así como un marcaje positivo para CCR3 y CD31 en color amarillo formando una estructura tubular .

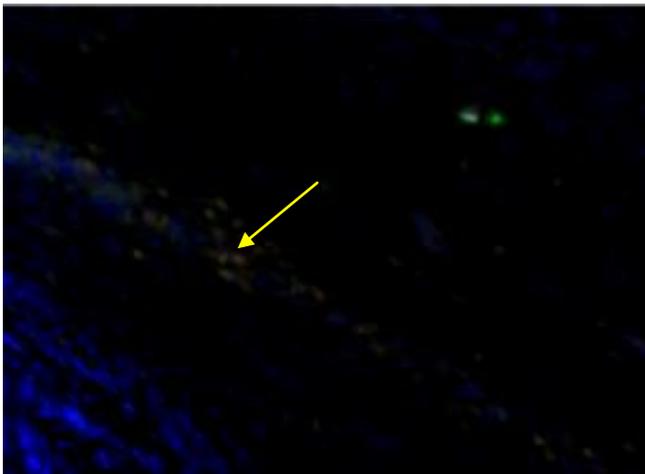


Fig 5 .- Corte histológico de estroma corneal con abundantes inmunomarcajes en color azul correspondientes a núcleos celulares , así como un marcaje positivo para CCR3 y CD31 en color amarillo en la región central .

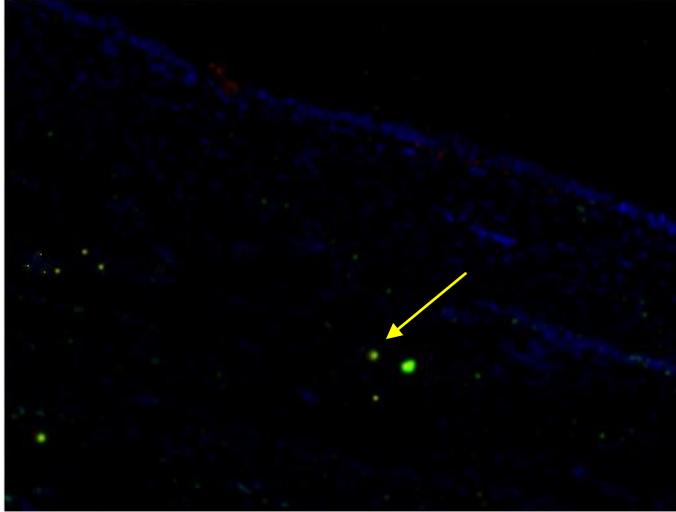


Fig 6 .- Corte histológico de estroma corneal con abundantes inmunomarcajes en color azul en la porción superior correspondientes al epitelio corneal , CCR3 en color verde , CD31 en color rojo y coexpresión de CD31 y CCR3 en color amarillo ( flechas ) .

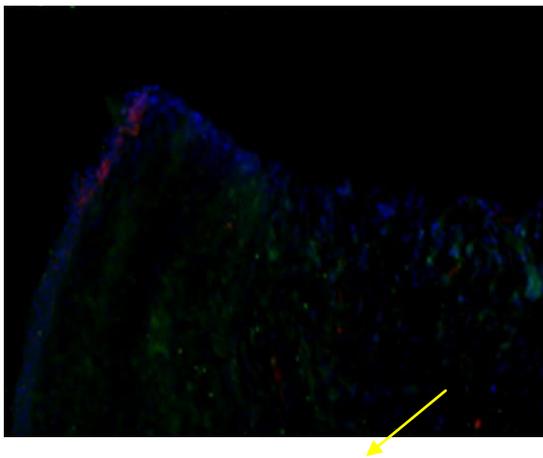


Fig 7 .- Corte histológico de estroma corneal con inmunofluorescencia positiva para CCR3 en color verde , CD31 en color rojo y coexpresión de CD31 y CCR3 en color amarillo ( flechas ) .

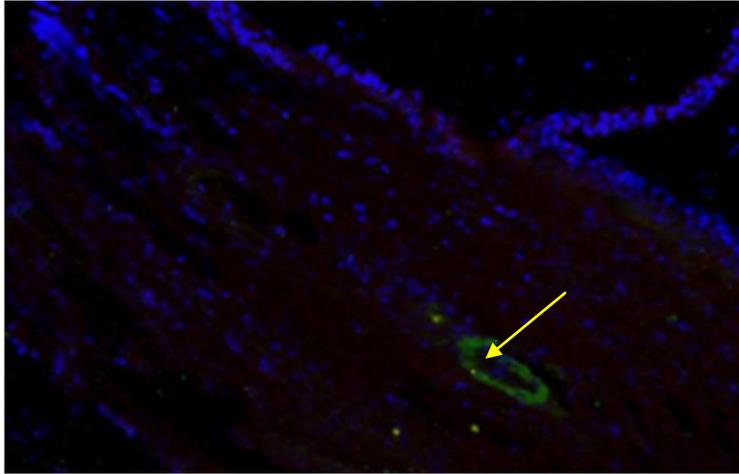


Fig 8 .- Corte histológico de estroma corneal en donde se aprecia un intenso inmunomarcaje en color verde para CCR3 en una estructura de apariencia cilíndrica en el estroma medio , marcate positivo en rojo para CD31 y algunos puntos en color amarillo correspondiente a coexpresión de los dos receptores.

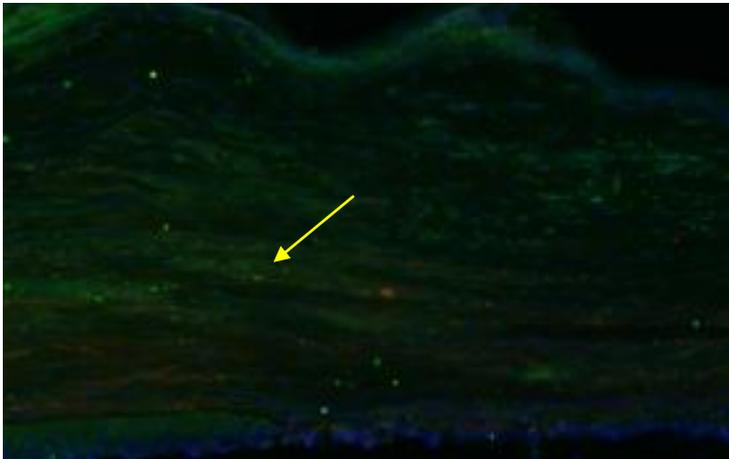


Fig 9 .- Corte histológico de córnea en donde se aprecia en la porción superior abundantes tinciones azules correspondientes al epitelio así como en la región inferior una capa única de células correspondiente al endotelio corneal flanqueando al estroma el cual cuenta con inmunomarcaje positivo para CCR3 en color verde , CD31 en color rojo así como algunas regiones en color amarillo correspondientes a la coexpresión de estos ( flechas ).



Fig 10 .- Corte histológico de estroma corneal con inmunomarcajes positivo para CCR3 en color verde , CD31 en color rojo y coexpresión de CD31 y CCR3 en color amarillo (flechas) .

De los tejidos sin vascularización se realizó inmunofluorescencia indirecta para los mismos marcadores CCR3 , CD31 y específico para núcleos celulares encontrando un inmunomarcaje negativo en todos los casos para CCR3 y CD31.

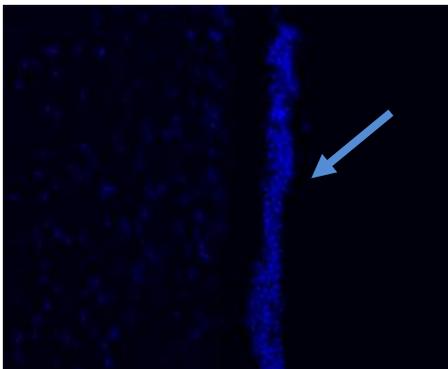


Fig 11 .- Se aprecia un corte histológico de córnea humana en donde se observa un conglomerado celular de lado derecho con inmunomarcaje

positivo específico con DAPI que corresponde al epitelio corneal ( flecha azul ) , el resto de la microfotografía corresponde al estroma en donde fuera del marcaje para núcleos del queratocitos carece de marcaje para CCR3 o CD31 .

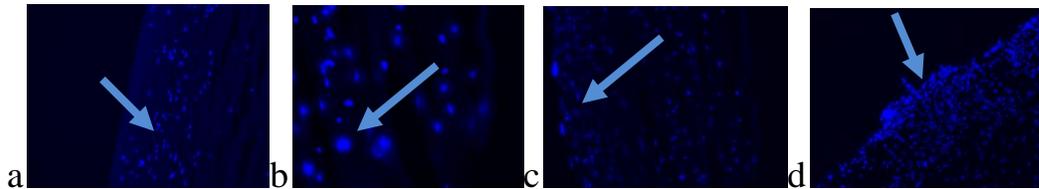


Fig 12 .-Corte histologico de córnea humana avascular con diagnóstico de queratocono .

a.-Tejido corneal correspondiente a queratocono con inmunomarcaje negativo para CCR3 yCD31 así como abundantes tinciones en color azul correspondientes a núcleos celulares .

b.-Tejido corneal avascular con diagnóstico de queratocono con ausencia de inmunomarcaje para CD31 y CCR3 positivo para DAPI en nucleos celulares del estroma corneal .

c.- Muestra corneal con diagnóstico de queratocono en la que se observa inmunomarcaje negativo para CCR3 yCD31 y un marcaje positivo únicamente para DAPI en nucleos celulares .

d.-Tejido corneal avascular proveniente de una cornea con diagnóstico de queratocono en la que se observa un inmunomarcaje negativo para CCR3 en color verde asi como un marcaje negativo para CCR3 en color rojo , encontrándose únicamente tinción positiva para nucleos celualres en color azul .

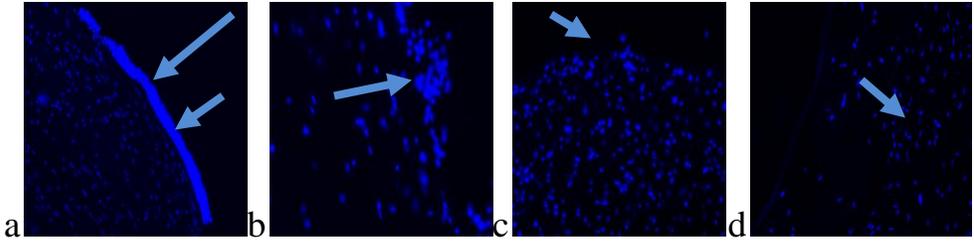


Fig 13 .-Corte histológico de córnea humana avasculares correspondientes a queratopatía bulosa.

a.-Corte histológico en donde se observa de lado derecho ( flecha ) de la imagen el epitelio corneal intensamente teñido de color azul DAPI correspondiente a núcleos celulares delimitando el estroma corneal en donde sobresale la menor celularidad de esta región , con inmunomarcaje negativo para CCR3 y CD31.

b.-Tejido corneal correspondiente a estroma avascular con tinción positiva inespecífica para núcleos celulares DAPI en color azul así como una tinción negativa para CCR3 en color verde y CD31 en color rojo .

c.-Corte histológico con tinción inespecífica para núcleos celulares DAPI , así como una tinción negativa para CCR3 en color verde y CD31 en color rojo .

d.-Tejido corneal avascular en la que se aprecia la ausencia de marcaje para CD31 y CCR3 y una tinción positiva para núcleos celulares en color azul

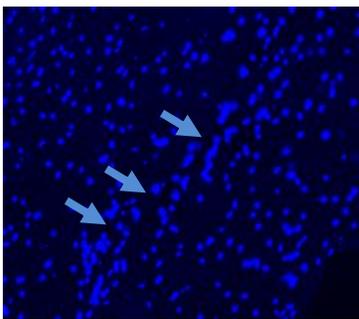


Fig 14 .-Corte histologico de córnea humana avascular correspondientes a traumatismo con inmunomarcaje negativo para CCR3 yCD31 en donde se aprecia una tinción positiva para nucleos celulares en color azul .



Fig 12 .-Corte histologico de córnea humana avascular correspondientes a tejido tectónico con inmunomarcaje negativo para CCR3 y CD31y tinción positiva inespecífica para nucleos celulares .

De esta forma se encontró que todos los tejidos vascularizados contaron con marcaje positivo para CCR3 y CD31 en coexpresión mientras que ninguna de las córneas avasculares presentaron inmunomarcaje para ninguno de estos receptores .

## Discusión :

La córnea humana es un tejido que cumple con funciones refractivas que solo puede desempeñar cuando es transparente, una de las principales razones por las cuales la córnea pierde transparencia la constituye la vascularización corneal la cual es invariablemente un proceso patológico que en la mayoría de los casos obedece al desequilibrio entre los factores antiangiogénicos y pro angiogénicos. Un mecanismo por el cual este equilibrio entre factores pro y antiangiogénicos se rompe lo constituye la respuesta reparativa corneal a las lesiones. Cuando la córnea presenta una respuesta reparativa se expresan al igual que en otros tejidos factores de crecimiento, citocinas, eotaxinas y otros factores que promueven la vascularización y que en algunos casos esta vascularización promueve la integridad anatómica del tejido y del órgano que de otra forma hubiera provocado una solución de continuidad en éste y por lo tanto la posible pérdida de todo el órgano de la visión . (1-3)

El receptor CCR3 ha sido implicado en procesos alérgicos como el asma bronquial, la dermatitis atópica o la rinitis alérgica. (72-75) Son pocos los reportes que asocian al receptor con neovascularización, la primera evidencia en el globo ocular de este receptor asociado a vascularización lo realizó Takeda y cols (69), quienes describieron la presencia de este receptor en las membranas neovasculares coroideas de pacientes con degeneración macular relacionada con la edad variedad húmeda. En este estudio además de correlacionar la expresión con la enfermedad retiniana, al bloquear CCR3 y encontrar una disminución significativa en la formación de una membrana neovascular en un modelo animal lo comparan con un antiangiogénico ampliamente utilizado en la actualidad como el bloqueador del factor de

crecimiento endotelial vascular o VEGF. De manera antagónica otros estudios han minimizado la intervención del CCR3 en la formación de membranas neovasculares así como en la angiogénesis de la degeneración macular (76). Recientemente Wen-Juan y cols, han evidenciado en un modelo animal de quemadura corneal por álcali, la disminución de la vascularización en aquellos tejidos en los cuales se utilizó un bloqueador para CRR3 (77) lo cual evidencia que la expresión del CCR3 no solo se trata de un fenómeno paralelo que ocurre con la neovascularización sino que esta participando activamente en este proceso. Estos estudios nos han llevado a esclarecer la expresión del receptor CCR3 en córneas humanas con y sin vascularización. Nuestros hallazgos demuestran mediante inmunofluorescencia la expresión del receptor CCR3 en vasos de neo formación corneal en coexpresión con un receptor ampliamente utilizado para identificar vasos sanguíneos (CD31) (40-42) y así mismo encontramos la ausencia de este receptor en córneas que aunque contaban con una condición patológica como queratocono o descompensación endotelial, no expresaron el receptor CCR3, por lo cual nos lleva a pensar que no se trata de una expresión inespecífica ante cualquier patología corneal como lo es el traumatismo o la queratopatía bulosa sino de un proceso específico relacionado a la vascularización. Es importante mencionar que la presencia del receptor CCR3 en córneas vascularizadas se encontró en coexpresión con CD31, estos resultados sugieren que el receptor CCR3 desempeña una función en la formación de vasos sanguíneos de la córneas analizadas. Conocemos los efectos devastadores que tiene la vascularización corneal en diversas patologías (52-61) oculares por lo que estos hallazgos nos llevan a la posibilidad de bloquear una importante vía para la vascularización y contribuir con el arsenal ya existente para esta

causa. La vascularización corneal es un proceso complejo que incluye múltiples fenómenos inflamatorios que acompañan a la neovascularización por lo que hacen falta más estudios para determinar el papel del receptor CCR3 en la fisiopatología de la neo formación de vasos sanguíneos en el tejido corneal.

### **Conclusión :**

Las córneas humanas vascularizadas expresan al receptor de eotaxinas CCR3 mientras que las córneas humanas avasculares no expresan este receptor .

### **Bibliografía**

- 1.- Bron AJ, Seal DV. The defences of the ocular surface. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1986; 105: 18.
2. Córnea Krachmer, Jay H; Mannis, Mark J; Holland, Edward J. 3rd ed. [St. Louis, Mo.] :Mosby/Elsevier,
- 3.- Dohlman C.The function of the corneal epithelium in health and disease. *Invest Ophthalmol* 1971; 10: 383.
- 4.- Robert L, Jungua S, Moczar M. Structural glycoproteins ofthe intercellular matrix. *Front Matrix Biol* 1976; 3: 113.
5. Kersten R et al. Orbit, Eyelids and Lacrimal System, in Basicand Clinical Science Course, K Hecht et al., editors. 2000,The Foundation of the American Academy of Ophthalmology:San Francisco, p. 122–131.
6. Font R. Eyelids and lacrimal drainage system. *Ophthalmic Pathology*, ed. Spencer WH. Vol. 3. 1986, Philadelphia: WB Saunders. 241–336.
- 7: Williams R, Fink BA, King-Smith PE, Mitchell GL. Central corneal thickness measurements: using an ultrasonic instrument and 4 optical instruments. *Córnea*. 2011 Nov;30(11):1238-43.
8. Dilly PN. Contribution of the epithelium to the stability of the tear film. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1985; 104(Pt 4):381–9.

9. Foster CS et al. Conjunctival epithelial basement membrane zone immunohistology: normal and inflamed conjunctiva. *Int Ophthalmol Clin* 1994; 34(3):209–14.
10. Ongerboer de Visser B. Anatomical and functional organization of reflexes involving the trigeminal system in man: jaw, blink reflex, corneal reflex and exteroceptive suppression. *Motor control mechanisms in health and disease*, ed. J Desmedt. 1983, New York: Raven. 727–738.
- 11: Lambiase A, Sacchetti M, Bonini S. Nerve growth factor therapy for corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012 Jul;23(4):296-302.
- (12) Kruse FE. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye* 1994; 8: 170–83.
13. Nichols B, Dawson CR, Togni B. Surface features of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24(5):570–6.
14. Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea* 2000; 19(3 Suppl):S7–12.
15. Suzuki K et al. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(9): 2495–500.
- 16 : Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res*. 2010 Sep;91(3):326-35.
- 17: Guzman-Aranguez A, Argüeso P. Structure and biological roles of mucin-type O-glycans at the ocular surface. *Ocul Surf*. 2010 Jan;8(1):8-17.
18. Andrews PM. Microplicae: characteristic ridge-like folds of the plasmalemma. *J Cell Biol* 1976; 68(3):420–9.
- 19 : Mantelli F, Argüeso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008 Oct;8(5):477-83. Review. PubMed PMID: 18769205;
- 20.- Quantock AJ, Young RD. Development of the corneal stroma, and the collagen-proteoglycan associations that help define its structure and function. *Dev Dyn*. 2008 Oct;237(10):2607-21.
- 21: Lu L, Reinach PS, Kao WW. Corneal epithelial wound healing. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001 Jul;226(7):653-64.
- 22 : O'Callaghan AR, Daniels JT. Concise review: limbal epithelial stem cell therapy: controversies and challenges. *Stem Cells*. 2011 Dec;29(12):1923-32. doi: 10.1002/stem.756.

- 23 : Alvarado J, Murphy C, Juster R. Age-related changes in the basement membrane of the human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983 Aug;24(8):1015-28.
- 24 : Newsome DA, Gross J, Hassell JR. Human corneal stroma contains three distinct collagens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982 Mar;22(3):376-81.
- 25: Almubrad T, Akhtar S. Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea. *Mol Vis.* 2011;17:2283-91. Epub 2011 Aug 25.
- 26 : Hayashi Y, Call MK, Chikama T, Liu H, Carlson EC, Sun Y, Pearlman E, Funderburgh JL, Babcock G, Liu CY, Ohashi Y, Kao WW. Lumican is required for neutrophil extravasation following corneal injury and wound healing. *J Cell Sci.* 2010 Sep 1;123(Pt 17):2987-95.
- 27: Salomao MQ, Wilson SE. Corneal molecular and cellular biology update for the refractive surgeon. *J Refract Surg.* 2009 May;25(5):459-66.
- 28 : Christopoulos V, Kagemann L, Wollstein G, Ishikawa H, Gabriele ML, Wojtkowski M, Srinivasan V, Fujimoto JG, Duker JS, Dhaliwal DK, Schuman JS. In vivo corneal high-speed, ultra high-resolution optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol.* 2007 Aug;125(8):1027-35.
- 29 : Wulle KG. Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye. *Invest Ophthalmol.* 1972 Nov;11(11):897-904.
- 30: Kelliher C, Chakravarti S, Vij N, Mazur S, Stahl PJ, Engler C, Matthaei M, Yu SM, Jun AS. A cellular model for the investigation of Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Exp Eye Res.* 2011 Dec;93(6):880-8.
- 31 : Scarpa F, Zheng X, Ohashi Y, Ruggeri A. Automatic evaluation of corneal nerve tortuosity in images from in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Aug 16;52(9):6404-8. doi: 10.1167/iovs.11-7529.
- 32: Allgeier S, Zhivov A, Eberle F, Koehler B, Maier S, Bretthauer G, Guthoff RF, Stachs O. Image reconstruction of the subbasal nerve plexus with in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Aug 24;52(9):5022-8.
- 33: Lathrop KL, Gupta D, Kagemann L, Schuman JS, Sundarraj N. Optical coherence tomography as a rapid, accurate, noncontact method of visualizing the palisades of Vogt. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Mar 15;53(3):1381-7. Print 2012 Mar. PubMed PMID: 22266521;
- 34 : Takács L, Tóth E, Berta A, Vereb G. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry A.* 2009 Jan;75(1):54-66.

- 35: Johnsen-Soriano S, Haug K, Arnal E, Peris-Martinez C, Moe MC, Romero FJ, Nicolaissen B. Oxidative stress gradient in a medium during human corneal organ culture. *Mol Vis*. 2012;18:1604-8.
- 36 : Miyashita H, Higa K, Kato N, Kawakita T, Yoshida S, Tsubota K, Shimmura S. Hypoxia enhances the expansion of human limbal epithelial progenitor cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Aug;48(8):3586-93.
- 37: Friedman MH. A quantitative description of equilibrium and homeostatic thickness regulation in the in vivo cornea. II. Variations from the normal state. *Biophys J*. 1972 Jun;12(6):666-82.
- 38 : Alomar TS, Al-Aqaba M, Gray T, Lowe J, Dua HS. Histological and confocal microscopy changes in chronic corneal edema: implications for endothelial transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Oct 17;52(11):8193-207.
- 39: Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res Bull*. 2010 Feb 15;81(2-3):198-210. Epub 2009 May 27.
- 40 : Ryu S, Albert DM. Evaluation of tumor angiogenesis factor with the rabbit cornea model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1979 Aug;18(8):831-41.
- 41 1: Wuest T, Zheng M, Efstathiou S, Halford WP, Carr DJ. The herpes simplex virus-1 transactivator infected cell protein-4 drives VEGF-A dependent neovascularization. *PLoS Pathog*. 2011 Oct;7(10):e1002278.
- 42 : Diago T, Harto M, Serra I, Pardo D, Montero J, Díaz-Llopis M. [Aniridia, congenital glaucoma and white corneas in a newborn baby]. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2009 Nov;84(11):573-6.
- 43 : Watari K, Nakamura M, Fukunaga Y, Furuno A, Shibata T, Kawahara A, Hosoi F, Kuwano T, Kuwano M, Ono M. The antitumor effect of a novel angiogenesis inhibitor (an octahydronaphthalene derivative) targeting both VEGF receptor and NF- $\kappa$ B pathway. *Int J Cancer*. 2012 Jul 15;131(2):310-21. doi: 10.1002/ijc.26356.
- 44 : Sekiyama E, Nakamura T, Cooper LJ, Kawasaki S, Hamuro J, Fullwood NJ, Kinoshita S. Unique distribution of thrombospondin-1 in human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Apr;47(4):1352-8.
- 45 : Ma DH, Yao JY, Kuo MT, See LC, Lin KY, Chen SC, Chen JK, Chao AS, Wang SF, Lin KK. Generation of endostatin by matrix metalloproteinase and cathepsin from human limbal corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Feb;48(2):644-51.

- 46 : Cao R, Bråkenhielm E, Li X, Pietras K, Widenfalk J, Ostman A, Eriksson U, Cao Y. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alpha and -beta receptors. *FASEB J*. 2002 Oct;16(12):1575-83.
- 47: Gatinel D, Haouat M, Hoang-Xuan T. [A review of mathematical descriptors of corneal asphericity]. *J Fr Ophtalmol*. 2002 Jan;25(1):81-90.
- 48: Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2006;104:264-302.
49. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol*. 2001;12:242–249.
50. Harper JY, Samuelson DA, Reep RL. Corneal vascularization in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and three-dimensional reconstruction of vessels. *Vet Ophthalmol*. 2005 Mar-Apr;8(2):89-99.
- 51: Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, Albuquerque RJ, Richter E, Sakurai E, Newcomb MT, Kleinman ME, Caldwell RB, Lin Q, Ogura Y, Orecchia A, Samuelson DA, Agnew DW, St Leger J, Green WR, Mahasreshti PJ, Curiel DT, Kwan D, Marsh H, Ikeda S, Leiper LJ, Collinson JM, Bogdanovich S, Khurana TS, Shibuya M, Baldwin ME, Ferrara N, Gerber HP, De Falco S, Witta J, Baffi JZ, Raisler BJ, Ambati J. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*. 2006 Oct 26;443(7114):993-7.
- 52: Wensing B, Relvas LM, Caspers LE, Valentincic NV, Stunf S, de Groot-Mijnes JD, Rothova A. Comparison of rubella virus- and herpes virus-associated anterior uveitis: clinical manifestations and visual prognosis. *Ophthalmology*. 2011 Oct;118(10):1905-10.
- 53: Gupta N, Sachdev R, Sinha R, Titiyal JS, Tandon R. Herpes zoster ophthalmicus: disease spectrum in young adults. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2011 Apr;18(2):178-82.
- 54: Sy A, Srinivasan M, Mascarenhas J, Lalitha P, Rajaraman R, Ravindran M, Oldenburg CE, Ray KJ, Glidden D, Zegans ME, McLeod SD, Lietman TM, Acharya NR. *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis: Outcomes and Response to Corticosteroid Treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Dec 9.
- 55 Haddad D. Ten years left to eliminate blinding trachoma. *Community Eye Health*. 2010 Sep;23(73):38.
- 56: Gyasi ME, Nsiire A, Yayemain D, Debrah OA, Asamani D, Gyapong J, Amoaku WM. Trachoma in northern Ghana: a need for further studies. *Ophthalmic Epidemiol*. 2010 Dec;17(6):343-8.

57: Blake IM, Burton MJ, Solomon AW, West SK, Basáñez MG, Gambhir M, Bailey RL, Mabey DC, Grassly NC. Targeting antibiotics to households for trachoma control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Nov 2;4(11):e862.

58: Harding-Esch EM, Edwards T, Mkocho H, Munoz B, Holland MJ, Burr SE, Sillah A, Gaydos CA, Stare D, Mabey DC, Bailey RL, West SK; PRET Partnership. Trachoma prevalence and associated risk factors in the Gambia and Tanzania: baseline results of a cluster randomised controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Nov 2;4(11):e861.

59: Schellini SA, Lavezzo MM, Ferraz LB, Olbrich Neto J, Medina NH, Padovani CR. [Prevalence and spatial distribution of trachoma among schoolchildren in Botucatu, São Paulo - Brazil]. *Arq Bras Oftalmol*. 2010 Aug;73(4):358-62.

60 Cavalli A, Bamba SI, Traore MN, Boelaert M, Coulibaly Y, Polman K, Pirard M, Van Dormael M. Interactions between Global Health Initiatives and country health systems: the case of a neglected tropical diseases control program in Mali. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Aug 17;4(8):e798.

61: Ruberanziza E, Mupfasoni D, Nizeyimana V, Karibushi B, Kabera M, Kaberuka T, Kabanda G, Sebeza J, Kramer MH, Ruxin J, Fenwick A, Kalua K. Prevalence and risk factors for trachoma in Rwanda. *East Afr J Public Health*. 2009 Dec;6(3):287-91.

62: Li C, Zhang F, Wang Y. S100 A proteins in the pathogenesis of experimental corneal neovascularization. *Mol Vis*. 2010 Oct 31;16:2225-35. 24: Reim M, Redbrake C, Schrage N. Chemical and thermal injuries of the eyes. Surgical and medical treatment based on clinical and pathophysiological findings. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2001 Feb;76(2):79-124.

63: Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol*. 1997 Jan-Feb;41(4):275-313.

64: Pfister RR. Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto- and homotransplantation of limbal stem cells. *CLAO J*. 1994 Jan;20(1):64-72.

65: Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):932-6.

66: Erin EM, Williams TJ, Barnes PJ, Hansel TT. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002 Jun;1(2):201-14.

67. Efremov, R., M.J. Truong, E. Darcissac, J. Zend, O. Grau, G. Vergoten, C. Debard, A. Capron, and G. Bahr. 1999. Human chemokine receptors CCR5, CCR3 and CCR2B share common polarity motif in the first extracellular loop with other human G-protein coupled receptors: Implications for HIV-1 coreceptor function. *Eur. J. Biochem*. 263: 746-756

68: Salcedo R, Young HA, Ponce ML, Ward JM, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7571-8. Erratum in: *J Immunol* 2002 Jan 1;168(1):511.

69: Takeda A, Baffi JZ, Kleinman ME, Cho WG, Nozaki M, Yamada K, Kaneko H, Albuquerque RJ, Dridi S, Saito K, Raisler BJ, Budd SJ, Geisen P, Munitz A, Ambati BK, Green MG, Ishibashi T, Wright JD, Humbles AA, Gerard CJ, Ogura Y, Pan Y, Smith JR, Grisanti S, Hartnett ME, Rothenberg ME, Ambati J. CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature*. 2009 Jul 9;460(7252):225-30.

70 :Yoon, K. C., C. S. De Paiva, et al. (2007). "Expression of Th-1 chemokines and chemokine receptors on the ocular surface of C57BL/6 mice: effects of desiccating stress." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(6): 2561-2569.

71: Liclican EL, Nguyen V, Sullivan AB, Gronert K. Selective activation of the prostaglandin E2 circuit in chronic injury-induced pathologic angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Dec;51(12):6311-20.

72: Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ (1991). "Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule." *J. Cell Biol.*114 (5): 1059–68.

73 Ying S, Robinson DS, Meng Q, Rottman J, Kennedy R, Ringler DJ, Mackay CR, Daugherty BL, Springer MS, Durham SR, Williams TJ, Kay AB. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and redominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. 1997;27(12):3507-3516

74 Yawalkar N, Ugucioni M, Scherer J, Braunwalder J, Karlen S, Dewald B, Braathen LR, Baggiolini M. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. 1999;113(1):43-48

75 Fortin M, Wagner JG, Brault J, Harkema JR, Renzi PM, Paquet L, Ferrari N. Spatial and temporal expression of CCR3 and the common beta chain of the IL-3, IL-5 and GM-CSF receptor in the nasal epithelium and lymphoid tissues in a rat model of allergic hinitis. 2010;52(3): 194-202

76 Li Y, Huang D, Xia X, Wang Z, Luo L, Wen R. CCR3 and choroidal neovascularization. *PLoS One*. 2011 Feb 15;6(2):e17106

77 Zhou WJ, Liu GQ, Li LB, Zhang XG, Lu PR. Inhibitory effect of CCR3 signal on alkali-induced corneal neovascularization. *Int J Ophthalmol*. 2012;5(3):251-7.