



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INMUNOSUPRESIÓN
DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA SOBRE LA INMUNIDAD INNATA
DE LOS FIBROBLASTOS LIMBOCORNEALES HUMANOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ALFREDO DOMÍNGUEZ LÓPEZ

TUTOR

DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO. NOVIEMBRE 2017



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.

La tesis “ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INMUNOSUPRESIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA SOBRE LA INMUNIDAD INNATA DE LOS FIBROBLASTOS LIMBOCORNEALES HUMANOS” se realizó bajo la Dirección del Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra en el Departamento de Bioquímica y en la Unidad de Investigación de la Unidad Periférica de la Facultad de Medicina UNAM-Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP. Para su realización se obtuvo el apoyo de los siguientes fondos: CONACYT-Ciencia Básica 167438; CONACYT Problemas Nacionales 2015-311; DGAPA-UNAM-PAPIIT IN215617 y CVU 406706

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	01
I. 1 Superficie ocular	01
I. 2 Queratitis estromal herpética	03
I. 3 Membrana amniótica	06
II. ANTECEDENTES	09
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
VI. HIPÓTESIS	14
VII. OBJETIVOS	15
VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL	16
IX. DESARROLLO EXPERIMENTAL	17
X. RESULTADOS	31
XI. DISCUSIÓN	46
XII. CONCLUSIÓN	53
XIII. PERSPECTIVAS	53
XIV. REFERENCIAS	54
XV. ANEXO: ARTÍCULO	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Corte transversal del limbo esclerocorneal	01
Figura 2	Manifestaciones clínicas de la queratitis estromal herpética	03
Figura 3	Corte transversal de la membrana amniótica	06
Figura 4	Esquema de la respuesta inmune innata contra dsRNA	10
Figura 5	La membrana amniótica disminuye la inflamación y ulceración corneal	12
Figura 6	Estructura tipo transwell	21
Figura 7	La membrana amniótica disminuye la secreción de citocinas pro-inflamatorias	31
Figura 8	La membrana amniótica disminuye la expresión de MDA5, RIG-1 y TLR3	32
Figura 9	La membrana amniótica inhibe la translocación nuclear de NF- κ B	33
Figura 10	La membrana amniótica no tiene efecto sobre la translocación nuclear de IRF3	34
Figura 11	La membrana amniótica no tiene efecto sobre la translocación nuclear de IRF7	35
Figura 12	La membrana amniótica incrementa la secreción de IFN- β	36
Figura 13	La membrana amniótica induce cambios morfológicos y reorganización de cadherinas	37
Figura 14	Determinación de la concentración del medio condicionado	38
Figura 15	El medio condicionado disminuye la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y PRRs	39
Figura 16	El medio condicionado disminuye la secreción de CCL2, CCL5, y CXCL10	40
Figura 17	Análisis de la translocación nuclear de NF- κ B	41
Figura 18	Análisis de la translocación nuclear de NF- κ Bp	41
Figura 19	Análisis de la translocación nuclear de IRF3	42
Figura 20	Análisis de la translocación nuclear de IRF3p	42
Figura 21	Análisis de la translocación nuclear de IRF7	43
Figura 22	Análisis de la translocación nuclear de IRF7p	43
Figura 23	Los tratamientos disminuyen la actividad inmunosupresora del medio condicionado	44
Figura 24	La membrana amniótica libera lumican al medio condicionado	45

ABREVIATURAS

CARD	<i>Dominios de reclutamiento de caspasa N-terminal</i>
CBA	<i>Ensayo de perlas por citometría de flujo</i>
CCL2	<i>Quimiocina con dominio C-C ligando 2</i>
CXCL8	<i>Quimiocina con dominio C-X-C ligando 8</i>
cDNA	<i>Ácido desoxirribonucleico complementario</i>
DAMP	<i>Patrón molecular asociado a daño</i>
DMEM/F 12	<i>Medio Dulbecco modificado de Eagle/mezcla de nutrientes F-12</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
dsRNA	<i>Ácido ribonucleico de cadena doble</i>
EDTA	<i>Ácido etilendiaminotetraacético</i>
ELISA	<i>Ensayo inmunoenzimático en fase sólida</i>
FLC	<i>Fibroblasto limboconal</i>
GTPasa	<i>Guanosina trifosfatasa</i>
HRP	<i>Peroxidasa de rábano picante</i>
HSK	<i>Queratitis estromal herpética</i>
HSV-1	<i>Virus herpes simple tipo 1</i>
IFN α/β	<i>Interferón α/β</i>
IFNAR	<i>Receptor para interferones α/β</i>
IL-1 β	<i>Interleucina 1 β</i>
IRF-3/7	<i>Factor regulador de interferón 3/7</i>
MA	<i>Membrana amniótica</i>
MAVS	<i>Proteínas de señalización antiviral mitocondrial</i>
MDA5	<i>Proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5</i>
MFI	<i>Intensidad media de fluorescencia</i>

MMP	<i>Metaloproteasa de matriz extracelular</i>
MX	<i>GTPasa de resistencia a mixovirus</i>
mRNA	<i>Ácido ribonucleico mensajero</i>
NF- κB	<i>Factor nuclear κB</i>
PAMP	<i>Patrón molecular asociado a patógeno</i>
PBS	<i>Solución reguladora de fosfatos</i>
PFA	<i>Paraformaldehido</i>
PI3K	<i>Fosfatidilinositol 3 quinasa</i>
PKR	<i>Proteína cinasa R</i>
Polí I:C	<i>Ácido poliinosínico-policitídico</i>
PRR	<i>Receptores de reconocimiento de patrones</i>
RIG-1	<i>Gen inducible por ácido retinoico 1</i>
RLR	<i>Receptor similar a RIG-1</i>
RNA	<i>Ácido ribonucleico</i>
RT-PCR	<i>Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa</i>
SLRP	<i>Proteoglicano pequeño rico en leucina</i>
ssRNA	<i>Ácido ribonucleico de cadena sencilla</i>
TGF-β	<i>Factor de crecimiento transformante β</i>
TLR	<i>Receptor similar a Toll</i>
TNF-α	<i>Factor de necrosis tumoral α</i>
TRAF3	<i>Factor asociado a receptores de TNF 3</i>
TRIF	<i>Adaptador inductor de interferón β</i>
VEGF	<i>Factor de crecimiento endotelial vascular</i>
VHS-1	<i>Virus Herpes Simple tipo 1</i>

RESUMEN

La queratitis estromal herpética (HSK) es una de las causas más comunes de opacidad corneal y pérdida de la visión a nivel mundial. Se ha descrito que la patología de esta enfermedad se debe en parte, a los efectos adversos que ejerce la respuesta inmune innata contra el virus a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Uno de los tratamientos contra la HSK es el trasplante de membrana amniótica (MA) debido a que disminuye la inflamación y promueve la epitelización corneal restaurando la claridad óptica. Sin embargo, no ha sido descrito qué mecanismo utiliza la MA para suprimir la respuesta inflamatoria de células de la superficie ocular. Por lo que el objetivo del proyecto fue identificar el mecanismo de inmunosupresión que ejerce la MA sobre la respuesta inmune innata de fibroblastos limbocorneales (FLC) humanos estimulados con poli I:C.

Se aislaron los FLC de rodetes esclerocorneales humanos y se cultivaron sobre membrana amniótica o con medio condicionado de membrana amniótica y se estimularon con poli I:C. Se recuperó el sobrenadante de cultivo, los FLC o su RNA para medir la secreción de citocinas, la expresión de PRRs y la translocación nuclear de factores de transcripción. Los resultados mostraron que la MA disminuye la expresión de PRR (90%), la secreción de citocinas pro-inflamatorias (100%) y la translocación nuclear de NF- κ B (60%); asimismo induce la secreción de IFN- β (100%) y la translocación nuclear de IRF3 (50%) de los FLC estimulados con poli I:C. Se comprobó que el efecto inmunomodulador de la MA depende de sus factores solubles; dentro de los cuales se identificó a lumican, una proteína que ha sido ampliamente estudiada debido a sus características anti-inflamatorias, anti-angiogénicas y pro-epitelizantes. Estos resultados indican que la MA modula la respuesta inmune de los FLC a través de factores solubles y que lumican podría tener un papel fundamental, por lo que es necesario continuar su estudio para considerarla como terapia contra diversas enfermedades inflamatorias de la superficie ocular.

ABSTRACT

Herpetic stromal keratitis (HSK) is one of the most common causes of corneal opacity and loss of vision worldwide. It has been described that the pathology of this disease is due in part to the adverse effects exerted by the innate immune response against the virus through pattern recognition receptors (PRRs). One of the treatments against HSK is amniotic membrane (MA) transplantation because it decreases inflammation and promotes corneal epithelization by restoring optical clarity. However, it has not been described what mechanism uses MA to suppress the inflammatory response of ocular surface cells. The aim of the project was to identify the mechanism of immunosuppression that exerts MA on the innate immune response of human limbo-corneal fibroblasts (FLC) stimulated with poly I: C.

FLCs were isolated from human sclerocorneal rims and cultured on the amniotic membrane or with amniotic membrane conditioned medium and stimulated with poly I: C. We recovered the culture supernatant, the FLC or its RNA to measure the secretion of cytokines, expression of PRRs and nuclear translocation of transcription factors. The results demonstrated that MA decreases PRRs expression (90%), pro-inflammatory cytokine secretion (100%) and NF- κ B nuclear translocation (60%); similarly, increases IFN- β production (100%) and IRF3 nuclear translocation (50%) of FLC stimulated with poly I : C. It was found that the immunomodulatory effect of MA depends on its soluble factors; among which was found lumican, a protein that has been extensively studied due to its anti-inflammatory, anti-angiogenic and pro-epithelizing properties. These results indicate that MA modulates the immune response of FLC through soluble factors and that lumican could have a fundamental role, therefore it is necessary to continue its study to be considered as therapy against various inflammatory diseases of the ocular surface.

I. INTRODUCCIÓN

I. 1 Superficie ocular

La superficie ocular es una estructura del ojo que anatómicamente comprende la conjuntiva, el limbo esclerocorneal, la córnea y se integra en una unidad funcional compuesta por la película lagrimal, los párpados y la glándula lagrimal principal¹.

Esta estructura desempeña dos funciones principales: evitar la entrada de microorganismos y mantener la transparencia corneal. La transparencia corneal es fundamental para permitir la visión y se debe a la ausencia de vasos sanguíneos en la porción central de la córnea y a la organización adecuada de las fibras de colágeno. En las proximidades de la córnea se encuentra el limbo esclerocorneal, el cual constituye la zona de transición entre la córnea y la esclera. Su función es renovar el epitelio corneal y los queratocitos estromales debido a la presencia de células troncales en las capas basales del epitelio límbico¹⁻³.



Figura 1: Corte transversal del limbo esclerocorneal. Microfotografía en campo claro del limbo esclerocorneal humano teñido con hematoxilina-eosina, aumento 10x. Unidad de investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP.

Disminución de la agudeza visual

Debido a su ubicación, la superficie ocular puede verse afectada por diversos microorganismos y agentes físicos o químicos que desencadenan patologías corneales, como se muestra en la tabla 1, se pueden clasificar de la siguiente manera^{4,5}:

Tabla 1: Clasificación de la patología corneal

Patología corneal		
Origen	Tipo	Ejemplo
Queratitis	Infecciosas	Queratitis bacterianas, víricas, parasitarias y fúngicas.
	No infecciosas	Queratitis alérgicas Queratitis intersticiales
Traumatismos	Contusiones	Perforaciones Cuerpos extraños
	Agresiones por agentes	Agentes físicos Agentes químicos
Distrofias	Degeneraciones	Arco senil Queratopatía en banda
	Neoplasias	Pterigión Episcleritis

La inflamación corneal se denomina queratitis y es una de las causas más comunes de opacidad corneal. Sus manifestaciones clínicas comprenden dolor, enrojecimiento, lagrimeo y fotofobia que en conjunto inducen la disminución de la agudeza visual⁵.

Dentro de las principales causas de queratitis, destacan las infecciones virales como las generadas por herpes simple tipo 1 (HSV-1) que infecta alrededor del 90% de la población mundial. La infección por HSV-1 puede desencadenar queratitis estromal herpética (HSK, por sus siglas en inglés), cuyas manifestaciones clínicas incluyen conjuntivitis, lesiones dendríticas en el epitelio corneal y en algunos casos opacidad y ulceración corneal^{6,7}.

I. 2 Queratitis estromal herpética

La queratitis estromal herpética es una de las principales causas de opacidad corneal y pérdida de la visión a nivel mundial. Su agente causal pertenece a la familia *herpesviridae* (HSV-1) y su material genético se compone de DNA de doble cadena con un genoma aproximado de 152 Kb que codifica 84 polipéptidos diferentes. La entrada del HSV-1 a las células del hospedero se lleva a cabo mediante el anclaje de las glicoproteínas virales C, B y D a receptores de la superficie celular. Esta interacción induce la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática permitiendo la liberación de su material genético para iniciar su replicación^{8,9}.

Posterior a una infección primaria, el HSV-1 migra a través de los axones de las neuronas sensoriales y se dirige por transporte axonal retrógrado a los ganglios trigeminales. Una vez en los ganglios, el virus establece una infección latente en la célula neuronal y de esta manera evade su erradicación por el sistema inmune. Sin embargo, se puede reactivar la replicación del HSV-1 debido a un trauma local, exposición a luz ultravioleta, daño tisular, estrés, hipertermia o desequilibrio hormonal^{9,10}.

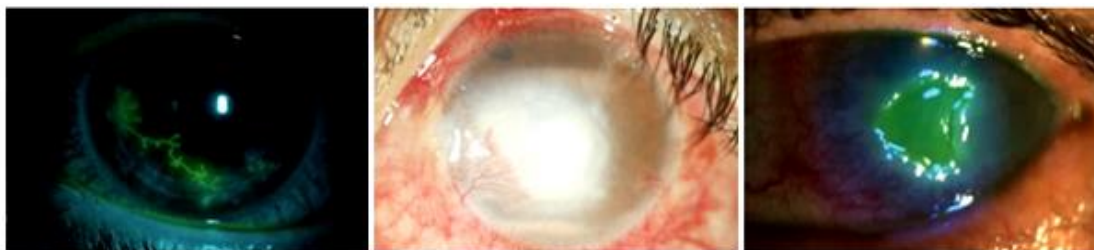


Figura 2: Manifestaciones clínicas de la queratitis estromal herpética. Imágenes de biomicroscopías que muestran una superficie ocular teñida con fluoresceína en donde se manifiesta lesiones en forma de dendrita ejemplificando una descamación del epitelio corneal e inflamación en conjuntiva (izquierda); una superficie ocular con inflamación en conjuntiva, neovangiogénesis desde el limbo esclerocorneal hacia el centro de la córnea y opacidad corneal (centro) y una superficie ocular teñida con fluoresceína en donde se muestra una úlcera corneal, inflamación conjuntival y neovangiogénesis (derecha). Son imágenes representativas de tres diferentes pacientes con queratitis herpética. Departamento de córnea y cirugía refractiva del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP.

Respuesta inmune contra queratitis estromal herpética

Se ha descrito que las manifestaciones clínicas de la HSK dependen en parte, de los efectos adversos de la respuesta inmune que generan las células de la superficie ocular contra los componentes virales. La principal línea de defensa en córnea es la respuesta inmune innata a través de receptores conocidos como (PRR) que reconocen moléculas asociadas a patógenos (PAMP) y moléculas asociadas a daño (DAMP)^{11, 12}.

Cuando el HSV-1 inicia su replicación en las células epiteliales se exponen proteínas virales y diversos intermediarios como motivos CpG contenidos en el DNA del herpesvirus, RNA de cadena sencilla (ssRNA) o doble (dsRNA). Estos PAMP pueden ser detectados por PRR como los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores tipo gen inducible por ácido retinoico 1 (RIG-I) (RLR). La activación de estos PRR desencadena vías de señalización que favorecen la translocación nuclear de los factores reguladores de interferón (IRF) 3 o 7 y del factor nuclear κ B (NF- κ B) principalmente¹³⁻¹⁵.

La translocación nuclear de IRF3 e IRF7 inducen la expresión génica de interferones (IFN) tipo 1 (IFN- α y β), los cuales tienen efecto antiviral. IFN- α y β ejercen actividad paracrina o autocrina debido a que son reconocidos por sus receptores (IFNAR 1 y 2). La activación de IFNAR 1 y 2 desencadena vías de señalización que favorecen la producción de proteínas que restringen la diseminación del virus. Algunas de estas proteínas son la 2'-5'oligoadenilatosintetasa (2'-5' OAS), la proteína cinasa R (PKR) y la GTPasa de resistencia a mixovirus (Mx) que contribuyen al efecto antiviral mediante la activación de la RNasa L para degradar el RNA viral, la inhibición del reciclamiento de guanósín difosfato para bloquear el transporte del RNA viral y el bloqueo de liberación de partículas virales para impedir la síntesis de proteínas virales, respectivamente¹⁵⁻¹⁷.

Por otra parte, el factor de transcripción NF- κ B regula la transcripción de una gran cantidad de genes involucrados en diferentes procesos como supervivencia, diferenciación celular, respuesta inmune, inflamación y regulación de la apoptosis. La translocación nuclear de NF- κ B inducida por PRR promueve principalmente, la expresión génica de quimiocinas que atraen células inflamatorias al sitio de infección y citocinas que promueven la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular para permitir su diapédesis y la angiogénesis corneal^{18,19}.

Durante la HSK se observa un gran infiltrado de neutrófilos y macrófagos en el estroma corneal que puede favorecer la eliminación del HSV-1. Sin embargo, sus mecanismos efectores provocan colateralmente la inmunopatogénesis de esta enfermedad. La activación de neutrófilos y macrófagos provoca la secreción de metaloproteasas de matriz extracelular que degradan la matriz estromal; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que genera vasos sanguíneos corneales; especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que dañan el tejido y quimiocinas que atraen más células inflamatorias al estroma corneal^{11,12}.

La replicación viral y el ambiente inflamatorio en la córnea ocasionan opacidad y desepitelización por lo que las estrategias terapéuticas para eliminar la infección e inflamación corneal comprenden antivirales como el aciclovir en conjunto con corticoesteroides tópicos. Sin embargo, existen algunos casos con alto grado de ulceración corneal que son resistentes a este tratamiento, por lo que se ha recurrido al trasplante de membrana amniótica debido a sus propiedades anti-inflamatorias y pro-epitelizantes para tratar estas complicaciones^{9,20}.

I. 3 Membrana amniótica

La placenta humana a término tiene aproximadamente 20 cm de diámetro, 3 cm de espesor y 500 gr de peso; cuya histología es compuesta por dos estructuras independientes denominadas membrana amniótica (MA) y corión. La MA recubre a la placenta por su cara fetal, carece de conductos sanguíneos, canales linfáticos y conexiones nerviosas; tiene de 20 a 400 μm de espesor y se ubican tres capas: el epitelio, la membrana basal y la matriz estromal²¹.

El epitelio comprende una monocapa de células cúbicas con abundantes microvellosidades asentadas sobre la membrana basal. Mientras que la matriz estromal se divide a su vez en tres zonas: la compacta con abundantes fibras de colágenas que proporciona la resistencia a la tracción; la fibroblástica con células troncales mesenquimales; y la esponjosa con abundantes glicoproteínas y proteoglicanos que está en contacto con el corion^{21, 22}.

Interesantemente, los componentes principales de la matriz estromal de la MA son las colágenas tipo I, III, IV, V, VII, la elastina, la laminina y la fibronectina; cuya distribución y concentración es similar a la matriz estromal de la conjuntiva y la córnea²³⁻²⁵.

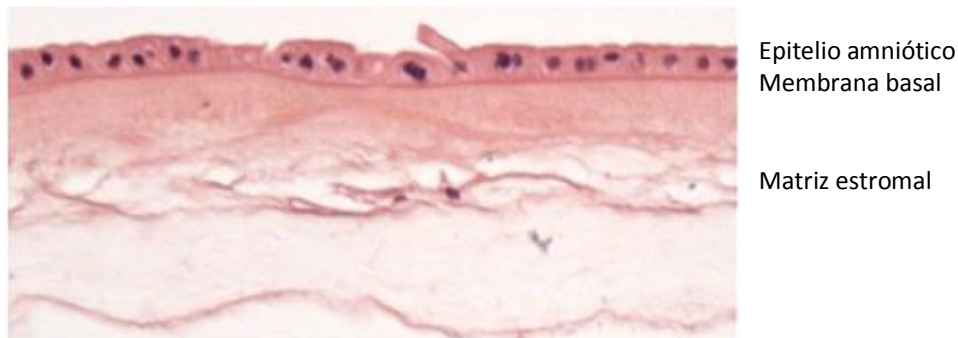


Figura 3: Corte transversal de la membrana amniótica. Microfotografía en campo claro de la membrana amniótica teñida con hematoxilina-eosina, aumento 20x. Unidad de investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP.

Trasplante de membrana amniótica

Las características anatómicas y las propiedades biológicas de la MA han permitido su uso en diferentes procedimientos quirúrgicos, principalmente de la superficie ocular para disminuir la inflamación y favorecer la regeneración tisular²⁰.

El primer reporte data de 1910, cuando se empleó la MA en conjunto con el corión como trasplante de piel. Posteriormente, en 1913 se trasplantó la MA para tratar quemaduras y úlceras cutáneas; donde se reportó la disminución del dolor y del periodo de reepitelización en comparación con pacientes no tratados²⁶. Mientras que en 1940, el trasplante de membrana amniótica fue introducido en oftalmología para el tratamiento de pacientes con simbléfaron y en 1946 para quemaduras químicas oculares de superficie. Sin embargo, hasta 1995 se propuso una técnica de procesamiento y crio-preservación de la MA para tratar diversas enfermedades de la superficie ocular²⁷⁻²⁹.

Actualmente, la MA es usada a nivel mundial para tratar diferentes enfermedades oculares como queratitis ulcerativa por herpes virus, úlcera corneal trófica, queratoconjuntivitis, necrosis epidérmica tóxica aguda, defecto epitelial persistente, queratopatía en banda, queratopatía bullosa, insuficiencia límbica parcial o total, simbléfaron y pterigión³⁰⁻³². En México, las 5 principales indicaciones oftálmicas del trasplante de MA son para tratar pterigión, úlceras corneales, reparación de la superficie conjuntival, neoplasias y defectos epiteliales persistentes³³. La eficacia del trasplante de MA se debe a sus propiedades anti-inflamatorias, anti-fibróticas, anti-angiogénicas y pro-epitelizantes que promueven la cicatrización adecuada y la reparación de heridas corneales³².

Se ha descrito que las propiedades biológicas de la MA son promovidas en parte, por los componentes de su matriz estromal. Dentro de ellos se encuentran las colágenas tipo I, III, IV y V con características pro-epitelizantes debido a que promueven la adhesión y migración de células epiteliales para permitir una adecuada epitelización³⁴. Otro componente importante es la endostatina, con características anti-angiogénicas ya que inhibe la proliferación de células endoteliales, la angiogénesis y el crecimiento tumoral^{35, 36}.

Igualmente, se ha reportado que la matriz estromal actúa como un depósito local de diversos factores de crecimiento debido a que retiene el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante (TGF) $-\alpha$, $-\beta1$, $-\beta2$ y $-\beta3$, el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); lo que podría explicar la propiedad pro-epitelizante en la superficie ocular^{37, 38}. Además, se han identificado citocinas anti-inflamatorias como la interleucina (IL) -10 y el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RA) en la matriz estromal; lo que sugiere su participación en los mecanismos anti-inflamatorios de la MA^{39, 40}. De esta manera, se ha propuesto que la liberación de estas moléculas brinda a la MA las propiedades anti-inflamatorias, anti-fibróticas, anti-angiogénicas y pro-epitelizantes que la hacen una opción terapéutica para diferentes procedimientos quirúrgicos. Estas características y propiedades hacen de la MA un tejido altamente empleado para disminuir las manifestaciones clínicas de los pacientes con queratitis y úlceras corneales como la queratitis estromal herpética.

II. ANTECEDENTES

La patogénesis de la queratitis estromal herpética es desencadenada en parte, por los efectos adversos de la respuesta inmune contra los componentes virales. Se ha demostrado que las células epiteliales de la superficie ocular son la primera línea de defensa contra HSV-1; cuando el virus induce su replicación en el epitelio corneal, libera diversos PAMP que son detectados por PRR¹². Uno de los PAMP más estudiados del HSV-1 es el dsRNA, cuyo reconocimiento es llevado a cabo por TLR3, RIG-1 y MDA5. Se ha reportado que células del epitelio corneal y conjuntival expresan estos receptores de manera constitutiva y que al ser estimuladas *in vitro* con poli I:C (un dsRNA sintético) se incrementa su expresión, así como la secreción de citocinas pro-inflamatorias^{41, 42}.

Los receptores de dsRNA se ubican en diferentes compartimentos celulares, TLR3 se encuentra acoplado a las membranas endosomales mientras que RIG-1 y MDA5 se encuentran en el citosol celular¹³. Una vez que el TLR3 se une a su ligando, se activan la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y la tirosina quinasa c-scr ocasionando la dimerización de TLR3. Posteriormente el adaptador inductor de interferón β (TRIF) se une al dominio TIR del TLR3 y es fosforilado por el factor asociado al receptor de TNF tipo 3 (TRAF3) desencadenando la dimerización de IRF3 e IRF7 para ingresar al núcleo y promover la producción de IFN- α y β . Además, TRAF3 desencadena la degradación del complejo inhibidor de NF- κ B, condicionando su activación y translocación al núcleo para promover la producción de citocinas pro-inflamatorias^{14, 15}.

Por otra parte, RIG-1 y MDA5 están compuestos de un dominio de reclutamiento de caspasa N-terminal (CARD) y una caja de dominio de helicasa (DExD/H). Cuando el dominio helicasa reconoce dsRNA se genera la unión de sus dominios CARD con proteínas localizadas en la membrana mitocondrial conocidas como proteínas de señalización antiviral mitocondrial (MAVS). Una vez dimerizados estos receptores, se induce la activación de TRAF3 para incrementar la translocación de IRF3/ IRF7 y NF- κ B^{16, 17}.

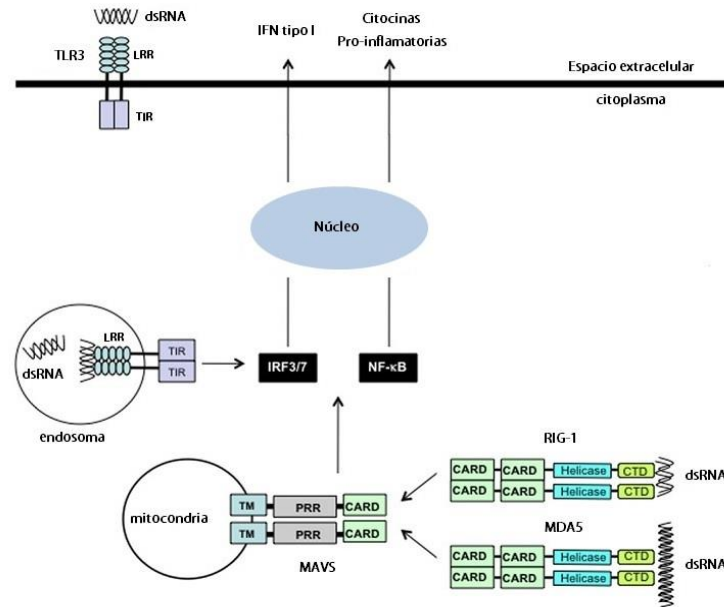


Figura 4: Esquema de la respuesta inmune innata contra dsRNA. TLR3, RIG-1 y MDA5 reconocen dsRNA e induce la producción de interferones de tipo I y de citocinas pro-inflamatorias. Modificado de: Cytokine & Growth Factor Reviews 22 (2011) 63–72.

Unas células altamente implicadas en la respuesta inmune innata de la superficie ocular son los fibroblastos limbocorneales (FLC). Consideradas inicialmente como productoras de matriz extracelular, actualmente se conoce que pueden reconocer diferentes PAMP debido a que cuentan con un gran repertorio de PRR y son consideradas centinelas del sistema inmune innato⁴³.

Se ha reportado que la estimulación de FLC con poli I: C incrementa la expresión de TLR3, de moléculas de adhesión, de metaloproteinasas de matriz extracelular, la translocación nuclear de NF-κB e induce la secreción de IL-6, IL-8, CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CXCL10 e IFN-γ. Todas estas citocinas involucradas en diferenciación, quimiotaxis y activación de diversas estirpes celulares, principalmente de neutrófilos y macrófagos^{43,44}. Por lo que los FLC pueden desempeñar un papel fundamental en la modulación de la respuesta inmune antiviral, ya que orquestarían la quimiotaxis de células inflamatorias y la fibrosis del estroma corneal exacerbando la patogénesis de la queratitis estromal herpética.

Actualmente, el trasplante de MA es una de las estrategias terapéuticas contra la queratitis estromal herpética debido a su eficacia para contrarrestar la inflamación, la opacidad y la ulceración corneal de los pacientes. Estas propiedades han llevado a diversos grupos de trabajo a investigar sus mecanismos de inmunosupresión a través de modelos *in vivo* con ratones infectados con HSV-1 para generar queratitis estromal herpética. Dentro de los resultados obtenidos destacan la disminución del edema corneal, del infiltrado estromal de macrófagos y neutrófilos, de la secreción de citocinas inflamatorias y de la expresión de metaloproteinasas 8 y 9; la inducción del inhibidor de la metaloproteinasa tisular-1 y de la apoptosis de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T⁴⁵⁻⁴⁷.

Asimismo, se han realizado modelos *in vitro* utilizando la MA en sistemas tipo *transwell* o sus factores solubles empleando su sobrenadante. Se ha descrito que células epiteliales del limbo esclerocorneal estimuladas con LPS y cultivadas sobre la MA disminuyen la síntesis y secreción de IL-1 α/β en comparación con las cultivadas sin MA. Además, los factores solubles de la MA suprimen la activación de linfocitos T aloreactivos y la secreción de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 en comparación con los cultivados con MA fijada con etanol. Mientras que la MA incubada durante 48 horas en DMEM libera factores solubles que aceleran la apoptosis de neutrófilos en comparación con los cultivados en DMEM sin MA⁴⁸⁻⁵⁰.

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha reportado que células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS y cultivadas sobre la MA disminuyen la síntesis y secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y la proliferación celular e incrementan su apoptosis en comparación con las cultivadas sin MA. También se ha descrito que la MA sirve como andamio para cultivar células epiteliales limbales y su trasplante a pacientes con deficiencia bilateral de células de limbo esclerocorneal por quemaduras; permitiendo el crecimiento de las células epiteliales y su estratificación⁵¹⁻⁵³.

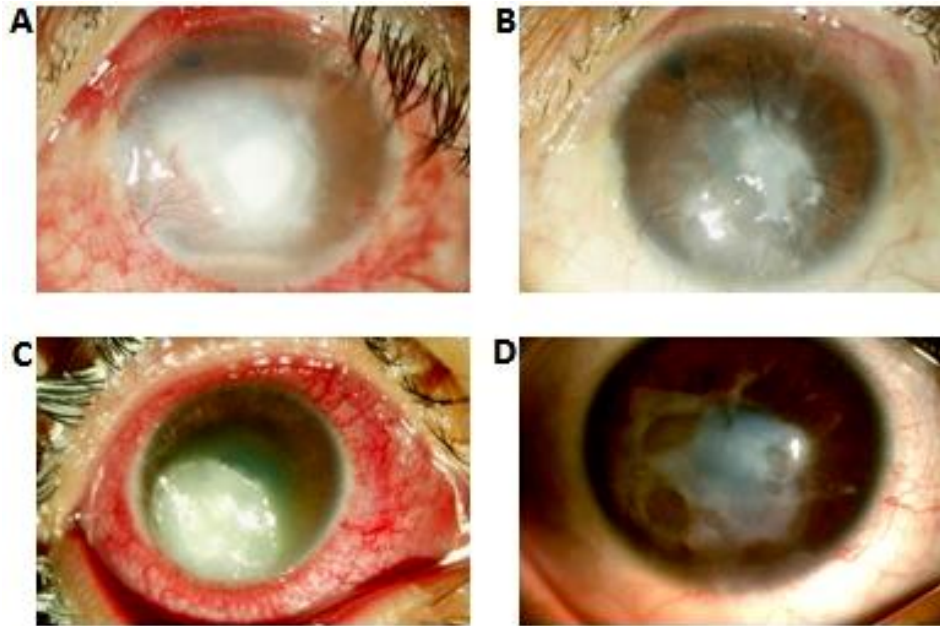


Figura 5: La membrana amniótica disminuye la inflamación y ulceración corneal. Imágenes de biomicroscopías de un paciente con inflamación conjuntival, neoangiogénesis y opacidad corneal **A)** y de un paciente con inflamación conjuntival y úlcera que abarca gran parte de la córnea **C)**; mientras que en **B)** y **D)** 30 días postoperatorios con membrana amniótica donde se observa la disminución de las manifestaciones clínicas. Departamento de córnea del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP.

Tomando en cuenta todos estos datos en conjunto, se puede sugerir que la MA ejerce sus propiedades biológicas a través de factores solubles que regulan la activación celular en la superficie ocular. Sin embargo, se conoce poco acerca de los mecanismos inmunosupresores que ejerce la MA sobre células residentes de la superficie ocular como los fibroblastos limboconiales. Igualmente, se desconocen todas las moléculas inmunosupresoras contenidas en el estroma de la MA, por lo que su identificación y caracterización podría servir para emplearlas como tratamiento de otras enfermedades con características inflamatorias.

III. JUSTIFICACIÓN

La superficie ocular es susceptible a infecciones que pueden ocasionar inflamación, desepitelización y opacidad corneal desencadenando la pérdida de la visión. Una de las principales causas de ceguera por infección es la HSK, cuyas manifestaciones clínicas representan un problema de salud pública debido al impacto significativo sobre la calidad de vida del paciente. Su patología se debe en parte, a los efectos adversos de la respuesta inmune contra el virus a través del sistema inmune innato del hospedero. Una de las células implicadas en la respuesta inmune de la superficie ocular son los FLC ya que pueden responder a ligandos virales sintéticos como el poli I:C mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias.

En los últimos años, el trasplante de MA ha demostrado ser un tratamiento eficaz para diversas enfermedades de la superficie ocular debido a sus propiedades anti-inflamatorias. Se ha reportado que la MA disminuye el infiltrado de macrófagos y neutrófilos, induce su apoptosis e inhibe la secreción de citocinas inflamatorias durante la HSK. Sin embargo, se desconoce si la MA suprime la respuesta inmune innata antiviral de células residentes de la superficie ocular como los FLC, si su mecanismo depende del contacto o de factores solubles y las moléculas encargadas de la inmunosupresión. La identificación de estos mecanismos y de las moléculas participantes podría ofrecer mejores tratamientos para diversas enfermedades que cursen con inflamación, fibrosis, angiogénesis y desepitelización.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha descrito que el trasplante de membrana amniótica disminuye el infiltrado de células inflamatorias en la córnea durante la queratitis estromal herpética. Sin embargo, se desconoce si se debe a la supresión de la respuesta inmune innata antiviral de células residentes de la superficie ocular como los fibroblastos limbocorneales humanos.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Conseguirá la membrana amniótica suprimir la respuesta inmune innata antiviral de los fibroblastos limbocorneales humanos mediante la disminución de los PRR y de la translocación nuclear de NF- κ B?

VI. HIPÓTESIS

La membrana amniótica suprimirá la respuesta inmune innata antiviral de los fibroblastos limbocorneales humanos mediante la disminución de los PRR y la translocación nuclear de NF- κ B.

VII. OBJETIVOS

VII. 1 Objetivo general

Describir el mecanismo que la membrana amniótica utiliza para suprimir la respuesta inmune innata antiviral de los fibroblastos limbocorneales humanos estimulados con poli I:C.

VII. 2 Objetivos específicos

Cuantificar la secreción de citocinas pro-inflamatorias de los fibroblastos limbocorneales humanos estimulados con poli I:C en contacto con membrana amniótica.

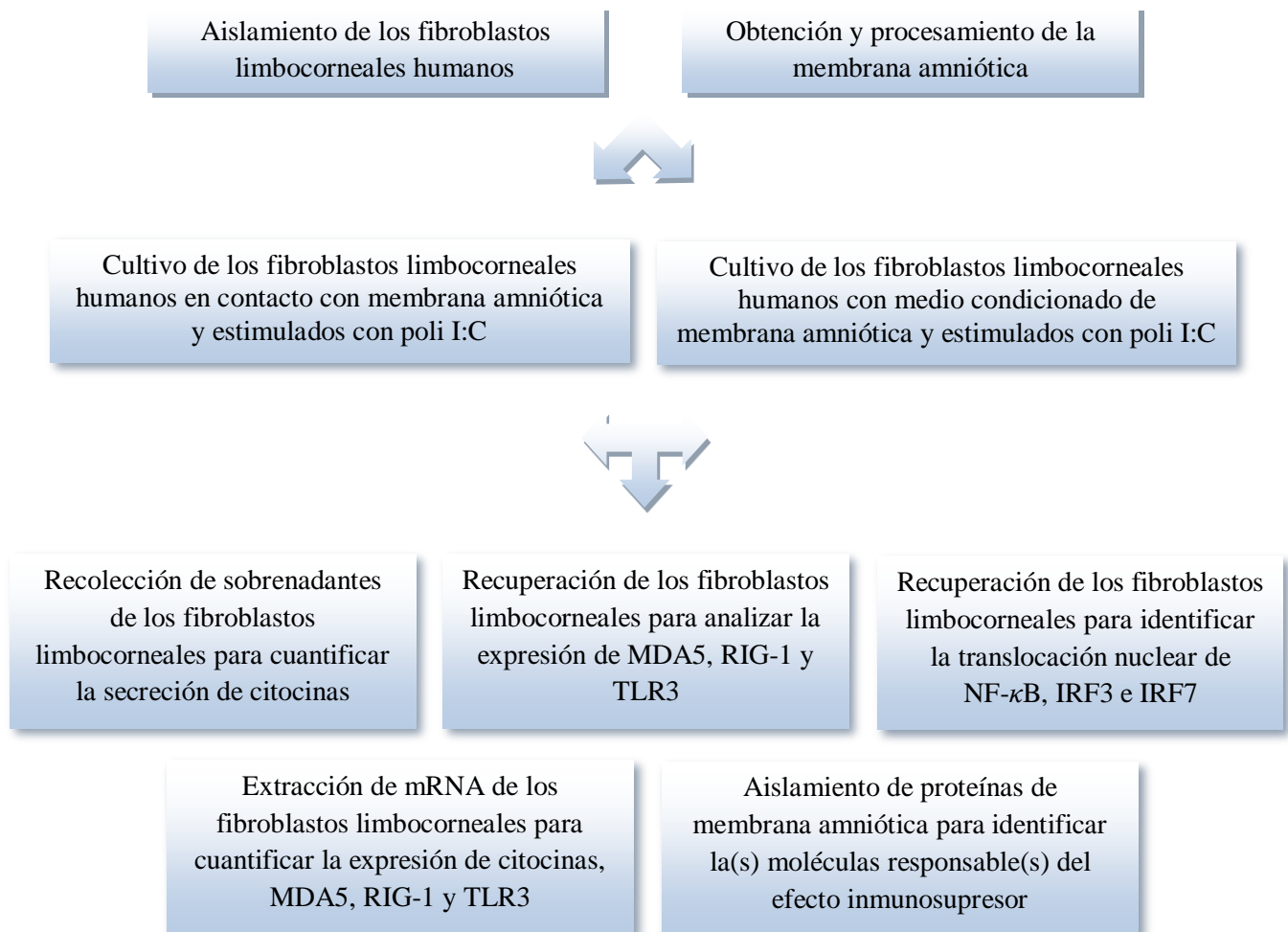
Analizar la expresión de los receptores TLR3, RIG-1 y MDA5 en los fibroblastos limbocorneales humanos estimulados con poli I:C en contacto con membrana amniótica.

Identificar la translocación nuclear de NF- κ B, IRF3 e IRF7 en fibroblastos limbocorneales humanos estimulados con poli I:C en contacto con membrana amniótica.

Evaluar el efecto de los factores solubles de la membrana amniótica sobre la respuesta inmune innata antiviral de los fibroblastos limbocorneales humanos estimulados con poli I:C.

Identificar la(s) molécula(s) de la membrana amniótica responsable(s) de la supresión de la respuesta inmune innata antiviral de los fibroblastos limbocorneales humanos.

VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL



IX. DESARROLLO EXPERIMENTAL

IX. 1 Materiales y reactivos

Penicilina, estreptomicina, anfotericina B, DMEM/F12, glicerol, azul tripano, proteinasa K, poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA); gentamicina, dispasa, colagenasa, SFB, tripsina (Gibco, Carlsbad, California, USA); poli I:C, (Invivogen, San Diego, California, USA); botellas de cultivo celular de 25 cm², placas de cultivo celular de 24, placas de cultivo celular de 6 pozos (Corning, Corning, New York, USA).

Human IL-6/IL-8 DuoSet ELISA kit, *Human Cytokine Array Kit Panel A*, *Human Lumican DuoSet ELISA kit* (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA); anticuerpos anti-MDA5, -RIG1, -TLR3, -NF- κ B, -IRF3, -IRF7, - α -SMA - β actina, -biotina HRP, -pan cadherina (Abcam, Cambridge, England); anticuerpos anti -IgG de conejo/Alexa Fluor 488, - IgG de ratón/Alexa Fluor 594 (Life Technologies, Carlsbad, California, USA); *Vectashield-DAPI* (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA); anticuerpo anti- IgG biotinilado de conejo (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA); *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, England).

Human Chemokine BD CBA Kit (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, California, USA); *OneStep RT-PCR Kit*, *HotStarTaq Master Mix* (Qiagen, Hilden, Germany); *Trizol Reagent* (Invitrogen, Grand Island, New York, USA); unidades de filtración *Amicon Ultra*, *Cell Culture Inserts* (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA); *VeriKine Human IFN- β ELISA kit* (PBL Assay Science, Piscataway, New Jersey, USA).

IX. 2 Procesamiento de la membrana amniótica

La membrana amniótica se obtuvo a través de cesáreas electivas con el consentimiento firmado por las pacientes (Convenio de Colaboración para el fortalecimiento de los Programas de Donación de amnios con fines de Trasplante, suscrito por la Secretaría de Salud del Distrito Federal “Hospital General, la Villa” y la Fundación de Asistencia Privada “Conde de Valenciana” I.A.P./ Instituto de Oftalmología. Oficio No. SSDF/SSMI/0520/14). Se utilizó la membrana amniótica de 5 donadoras, cada una se lavó eliminando los restos de sangre con solución de lavado [solución salina estéril (0.9%), penicilina (50µg/ml), estreptomina (50µg/ml), anfotericina B (100µg/ml) y gentamicina (100µg/ml)] y se realizó una disección roma para retirar el corion. La membrana amniótica se dividió en fracciones de diversos tamaños y se conservaron en DMEM/F12 y glicerol 50% v/v a -80°C. Antes de cada ensayo, se descongelaron las fracciones a temperatura ambiente durante 30 minutos previos a su uso y se lavaron con solución salina estéril.

IX. 3 Aislamiento de fibroblastos limboconiales

Se utilizaron rodetes esclerocorneales obtenidos *post mortem* y donados por el banco de ojos del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana I.A.P”. Se descartó el exceso de úvea e iris con bisturí y se lavó con solución salina estéril. Se incubaron con dispasa 1.7 UI/ml durante 1 hora a 37° C, se retiró el epitelio de los rodetes esclerocorneales mediante un raspado y se lavaron con PBS, para incubarse con colagenasa 0.75 mg/ml durante toda la noche a 37° C. Una vez disgregado el tejido, se lavó con PBS para aislar y cultivar las células en DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% (previamente descomplementado a 56° C durante 20 minutos) en botellas de cultivo celular de 25 cm² y se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% hasta alcanzar una confluencia del 90%.

IX. 4 Caracterización de los fibroblastos limbocorneales

Se recuperaron los fibroblastos limbocorneales de cada ensayo para analizar la expresión de vimentina y α -SMA. Se agregaron 500 μ l de PBS-EDTA tripsina 0.25% a las monocapas celulares durante 5 minutos y se detuvo la reacción enzimática adicionando DMEM/F12 suplementado. Después, se incubaron con 300 μ l de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos y se realizó un lavado con PBS. Finalmente, se adicionaron 200 μ l de solución de bloqueo (PBS-BSA 0.1%-saponina 1%) durante 15 minutos y se realizó un lavado con PBS.

Se incubaron los fibroblastos limbocorneales con los anticuerpos anti-vimentina/ FITC (1:50) o anti- α -SMA (1:100) en solución de bloqueo durante 15 min a 4°C y se realizó un lavado con PBS. Se añadió el anticuerpo anti- IgG de conejo/ Alexa Fluor 488 (1:200) en solución de bloqueo durante 15 min a 4°C, se realizó un lavado con PBS y se resuspendieron las muestras con 300 μ l de PBS. Se adquirieron 10^4 eventos en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, California, USA) evaluando las características fenotípicas de tamaño contra granularidad celular y posteriormente los marcadores. Todos los ensayos se analizaron en el programa Cellquest (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, California, USA).

IX. 5 Cuantificación de IL-6 e IL-8 mediante ELISA

Se cultivaron 10^5 fibroblastos limbocorneales en placas de 24 pozos con DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% durante 24 horas. Se reemplazó el medio con DMEM/F12 no suplementado durante 12 horas para controlar la producción basal de citocinas. Los fibroblastos limbocorneales se estimularon con poli I:C a diferentes concentraciones (0, 0.1, 1, 10 μ g/ml) y tiempos (6, 12, 24 y 48 hrs) para determinar la concentración y la duración del estímulo.

Se recolectaron los sobrenadantes de cada ensayo para cuantificar la concentración de IL-6 e IL-8 mediante los “*Human IL-6/IL-8 DuoSet ELISA kit*” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubaron placas de 96 pozos con 100 μ l (2 μ g/ml) de anticuerpo de captura correspondiente durante toda la noche a 4°C y se lavaron 3 veces (PBS con tween-20 al 0.05%). Posteriormente, a temperatura ambiente: se agregaron 200 μ l de solución de bloqueo (PBS con BSA al 1%) durante 1 hora y se lavaron 3 veces. Se agregaron 100 μ l de las diluciones seriadas de cada estándar o de los sobrenadantes durante 2 horas y se lavaron 3 veces. Se agregaron 100 μ l (50 ng/ml) de los anticuerpos de detección correspondientes durante 1 hora y se lavaron tres veces. Se añadieron 100 μ l de estreptavidina-HRP durante 30 minutos y se lavaron 3 veces. Se añadieron 100 μ l de tetrametilbenzidina - peróxido de hidrógeno durante 30 minutos, se añadieron 50 μ l de ácido sulfúrico 2N durante 20 minutos y se leyeron las placas a una absorbancia de 450 nm con el fotómetro de microplatas Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

IX. 6 Estimulación de fibroblastos limbocorneales en contacto con membrana amniótica

Se descongelaron las fracciones de membrana amniótica y se incubaron en dispensa (1.7 UI/ml) durante 1 hora a 37°C para desepitelizarlas con un aplicador (membrana amniótica desepitelizada). Se construyeron estructuras tipo *transwell*: mediante “*cell culture inserts*” sin su membrana de celulosa e intercambiada por la membrana amniótica desepitelizada sujeta con una liga (3/8”) para colocarlas en placas de 24 pozos (figura 6). Se cultivaron 10⁵ fibroblastos limbocorneales dentro de los *transwell* con DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% durante 24 horas y se reemplazó con DMEM/F12 no suplementado durante 12 horas para controlar la producción basal de citocinas. Posteriormente se estimularon con poli I:C (10 µg/ml durante 12 horas), como se muestra en la tabla 2.

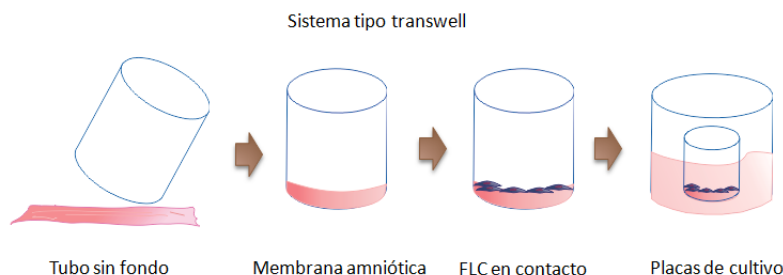


FIGURA 6: Estructuras tipo transwell. La membrana amniótica ya desepitelizada fue colocada en la base de cilindros (1 cm de diámetro) para construir un sistema tipo transwell. Fueron colocados dentro de pozos de placas de cultivo para cultivar los fibroblastos limbocorneales en contacto con membrana amniótica.

Tabla 2: Diseño experimental de ensayos realizados con fibroblastos limbocorneales.

Diseño experimental	
Fibroblastos limbocorneales	Sin estimulo (SE)
	Con estimulo (CE) poli I:C (10µg/ml)
Fibroblastos limbocorneales en contacto con membrana amniótica	Sin estimulo (SE)
	Con estimulo (CE) poli I:C (10µg/ml)

IX. 7 Identificación de citocinas mediante arreglo proteico

Se recolectaron los sobrenadantes de cada ensayo para identificar las citocinas secretadas mediante el “*Human Cytokine Array Kit Panel A*” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes se incubaron 1 hora con los anticuerpos de detección. Por otra parte, las membranas de nitrocelulosa sensibilizadas con anticuerpos de captura para 36 citocinas distintas se incubaron con solución de bloqueo durante 1 hora y se lavaron 3 veces. Las membranas se incubaron con la mezcla de los sobrenadantes y los anticuerpos de detección durante toda la noche a 4°C y se lavaron 3 veces. Se incubaron con estreptavidina-HRP 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces. Las membranas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia con “*ECL Plus Western Blotting Detection Reagents*”, las imágenes fueron capturadas y digitalizadas usando el G-Box system y el Gene Snap Software version 7.12.06 (Syngene, London, UK). Se calculó la densidad óptica de cada uno de los blots de la membrana de nitrocelulosa, los datos fueron normalizados con respecto a los controles negativos de cada membrana independiente y se graficaron cada uno de los resultados del arreglo proteico.

IX. 8 Análisis de la expresión de PRRs mediante citometría de flujo

Se recuperaron los fibroblastos limbocorneales de cada ensayo para analizar la expresión de los receptores MDA5, RIG-1 y TLR3. Se agregaron 500 µl de PBS-EDTA tripsina 0.25% a las monocapas celulares durante 5 minutos y se detuvo la reacción enzimática adicionando DMEM/F12 suplementado. Después, se incubaron con 300 µl de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos y se realizó un lavado con PBS. Finalmente, se adicionaron 200 µl de solución de bloqueo (PBS-BSA 0.1%- saponina 1%) durante 15 minutos y se realizó un lavado con PBS.

Se incubaron los fibroblastos limbocorneales con los anticuerpos anti-MDA5, -RIG1 o -TLR3 (1:50) en solución de bloqueo durante 15 min a 4°C y se realizó un lavado con PBS. Se añadió el anticuerpo anti- IgG de conejo/ Alexa Fluor 488 (1:200) en solución de bloqueo durante 15 min a 4°C, se realizó un lavado con PBS y se resuspendieron las muestras con 300 µl de PBS. Se adquirieron 10⁴ eventos en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, California, USA) evaluando las características fenotípicas de tamaño contra granularidad celular y posteriormente los marcadores. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se analizaron en el programa Cellquest (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, California, USA).

IX. 9 Identificación de proteínas mediante microscopía de fluorescencia

Se cultivaron 2 x 10⁴ fibroblastos limbocorneales sobre cubreobjetos cargados con poli-L-lisina en DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% durante 24 horas. Se reemplazó con DMEM/F12 no suplementado durante 12 horas, se colocaron dentro de los *transwell* de membrana amniótica y se estimularon con poli I:C (10 µg/ml) durante 120 minutos (previamente establecido a través de una cinética de 20, 40, 60, 90, 120 o 150 minutos) para analizar la translocación nuclear de los factores de transcripción y la distribución de cadherinas.

Posteriormente, los cubreobjetos se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos a 4°C y se realizó un lavado con PBS. Se incubaron en solución de bloqueo (PBS-BSA 5% - tritón x100 0.1%) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS. Se incubaron con los anticuerpos anti-NF-κB/p (1:100), -IRF3/p (1:100), -IRF7/p (1:200) o -pan cadherina (1:100) en PBS durante toda la noche a 4°C y se lavaron 3 veces con PBS.

Se incubaron con los anticuerpos anti- IgG de conejo/Alexa Fluor 488 (1:200) o anti- IgG de ratón/ Alexa Fluor 594 (1:500) durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron con PBS, se montaron en portaobjetos y se sellaron con “*Vectashield-DAPI*”. Las imágenes fueron capturadas con el microscopio ApoTome II (Carl Zeiss, Jena, Germany) y se analizaron con el programa Image J versión 1.46r (Wayne Rasband, USA). Se cuantificó la intensidad media de fluorescencia de los factores de transcripción en los compartimentos nucleares (zona colocalizada con DAPI) y citoplasmáticos (marcaje total menos el compartimento nuclear).

IX. 10 Cuantificación de cadherinas mediante western blot

Se recuperaron los fibroblastos limbocorneales cultivados dentro de los *transwell* de membrana amniótica del ensayo anterior para cuantificar la concentración de cadherinas. Se realizó un conteo celular con cámara de Neubauer determinando viabilidad celular con azul tripano a 0.1% y se agregó buffer de carga (SDS 4%, Glicerol 20%, Tris 0.12M pH 6.8, β -ME10%) directamente a una concentración de 5×10^6 células/ml.

Las muestras fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 12% para separar las proteínas mediante electroforesis a 90V constantes. Se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa mediante electroforesis semiseca a 12V constantes. Se incubaron en solución de bloqueo (PBS-BSA 5% - tween20 0.05%) durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces. Se incubaron con los anticuerpos anti-pan cadherina o β -actina (1:1000) en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y se lavaron 3 veces.

Se incubaron con el anticuerpo anti- IgG biotinilado de conejo (1:40 000) en solución de bloqueo durante 2 horas a 4°C y se lavaron 3 veces. Se incubaron con el anticuerpo anti-biotina HRP (1:2000) en solución de bloqueo durante 40 minutos a 4°C y se lavaron 3 veces. Las membranas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia con “*ECL Plus Western Blotting Detection Reagents*”, las imágenes fueron capturadas y digitalizadas usando el G-Box system y el Gene Snap Software version 7.12.06 (Syngene, London, UK). Se calculó la densidad óptica media de cada una de las bandas resultantes de pan-cadherina y fueron normalizadas con respecto a las bandas control de β -actina correspondientes para graficar los datos obtenidos.

IX. 11 Cuantificación de IFN- β mediante ELISA

Se recolectaron los sobrenadantes de cada ensayo para identificar la concentración de IFN- β mediante el “*VeriKine Human IFN- β ELISA kit*” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubaron placas de 96 pozos con 100 μ l de las diluciones seriadas de cada estándar o de los sobrenadantes durante 1 hora y se lavaron 3 veces. Se agregaron 100 μ l de anticuerpos de detección durante 1 hora y se lavaron tres veces. Se añadieron 100 μ l de estreptavidina-HRP durante 1 hora y se lavaron 3 veces. Se añadieron 100 μ l de tetrametilbenzidina - peróxido de hidrógeno durante 15 minutos en oscuridad. Se añadieron 100 μ l de ácido sulfúrico 2N durante y se leyeron las placas a una absorbancia de 450 nm con el fotómetro de microplatas Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

IX. 12 Obtención del medio condicionado de membrana amniótica

Se incubó la membrana amniótica desepitelizada en DMEM/F12 no suplementado a una concentración de 50 mg/ml durante 1, 2, 4, 6, 8 ó 12 horas a 37°C. Cada sobrenadante fue empleado a una concentración final del 20%, 40%, 60%, 80% ó 100% para cultivar los fibroblastos limbocorneales y se evaluó la adherencia celular 12 hrs después a través de microscopía de campo claro. Los ensayos posteriores se realizaron con el sobrenadante de membrana amniótica incubada durante 4 hrs a una concentración final del 40% (medio condicionado).

IX. 13 Estimulación de fibroblastos limbocorneales con medio condicionado

Se cultivaron 10^5 fibroblastos limbocorneales con medio DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% durante 24 horas y se reemplazó con DMEM/F12 no suplementado durante 12 horas para controlar la producción basal de citocinas. Posteriormente se estimularon con poli I:C (10 µg/ml durante 12 horas) en medio condicionado como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Diseño experimental de ensayos realizados con fibroblastos limbocorneales

Diseño experimental	
Fibroblastos limbocorneales	Sin estímulo (SE)
	Con estímulo (CE) poli I:C (10µg/ml)
Fibroblastos limbocorneales en medio condicionado	Sin estímulo (SE)
	Con estímulo (CE) poli I:C (10µg/ml)

IX. 14 Cuantificación de CCL2, CCL5 y CXCL10 mediante CBA

Se recolectaron los sobrenadantes de cada ensayo para cuantificar la concentración de CCL2, CCL5 y CXCL10 mediante el “*Human Chemokine BD CBA Kit*” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se mezclaron en un tubo 50 µl de las perlas de captura, 50 µl de las diluciones seriadas del estándar o de las muestras y 50 µl del anticuerpo de detección durante 3 horas a temperatura ambiente cubiertos de la luz. Se añadió 1 ml de solución de lavado, se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón de perlas con 300 µl de solución de lavado. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSVerse (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, California, USA) y se analizaron en el programa FCAP Array v3.0 (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, California, USA).

IX. 15 Cuantificación de los transcritos para citocinas, MDA5, RIG-1 y TLR3 mediante RT-PCR

Se purificó el mRNA de los fibroblastos limbocorneales para cuantificar la expresión los transcritos para citocinas, MDA5, RIG-1 y TLR3 a través de “*Trizol Reagent*” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se agregaron 500 µl de Trizol a cada monocapa de fibroblastos limbocorneales, se agregaron 100 µl de cloroformo y se centrifugaron las muestras a 12 000 x g durante 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa, se agregaron 250 µl de alcohol isopropílico frío y se centrifugaron las muestras a 12 000 x g durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se agregaron 250 µl de etanol al 75% y se centrifugaron las muestras 10 000 x g durante 5 minutos. Las muestras se resuspendieron en 30 µl de agua DEPC y se cuantificaron mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Se sintetizó cDNA mediante el “*OneStep RT-PCR Kit*” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 2 µl de buffer RT, 2 µl de dNTP Mix, 1 µl de Omniscript Reverse Transcriptase, 1 µl de Oligo dT y 200 ng de RNA, llevando a un volumen de 14 µl con agua libre de RNAsas para cada reacción, manteniéndose toda la noche a 37°C.

Se amplificó la muestra mediante el “*HotStarTaq Master Mix*” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 5 µl de HotStarTaq Master Mix, 3 µl de agua libre de RNAsas, 0.5 µl de cada primer (1 µM) y 1 µl de la muestra (200 ng de RNA). El termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) fue programado para realizar 40 ciclos, cada uno de 95°C por 10 segundos, 60°C por 15 segundos y 72°C por 20 segundos. Las muestras se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% adicionando bromuro de etidio. Las imágenes fueron capturadas y digitalizadas usando el G-Box system (Syngene, London, UK) y se realizó el análisis de densidad óptica mediante el Image J versión 1.46 (Wayne Rasband, USA). Los resultados se graficaron mediante el análisis de la densitometría de las bandas obtenidas en los geles normalizando los datos con base a su gen constitutivo β-2 microglobulina. Cada primer utilizado se describe en la tabla 4.

Tabla 4: Primers utilizados en los ensayos de RT-PCR.

Gen	Primer forward	Primer reverse
TLR3	5'-TAAACTGAACCATGCACTC-3'	5'-TATGACGAAAGGCACCTA-3'
MDA5	5'-CTCATCAGAATCTTTTGCAG-3'	5'-TTGCTGCCACATTCTCTTCA-3'
RIG-1	5'-GCTTGCCTGCTATGAAAGG-3'	5'-CTGGGATCTGATTTCGAAAA-3'
CCL2	5'-TCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3'	5'-CACTTGCTGCTGGTGATTCT-3'
CCL5	5'-CGCTGTCATCCTCATTGCTA-3'	5'-GAGCACTTGCCACTGGTGTA-3'
CXCL8	5'-AAGAAACCACCGGAAGGAAC-3'	5'-AAATTTGGGGTGGAAAGGTT-3'
CXCL10	5'-CCATTCTGATTTGCTGCCTTA-3'	5'-CAAAATTGGCTTGCAGGAAT-3'
IL-6	5'-CTCAGCCCTGAGAAAGGAGA-3'	5'-TGATTTTCACCAGGCAAGTCT-3'
IFN-β	5'-TTGCAAGGACCAAATGTCAA-3'	5'-TCTCGCTCAGGTCAGTGATG-3'
β-2 microglobulina	5'-CACCCCCACTGAAAAAGATC-3'	5'-ATATTA AAAAAGCAACCAAGCA-3'

IX. 16 Evaluación de la actividad del medio condicionado con tratamiento térmico y enzimático

Se cultivaron 10^5 fibroblastos limboconiales con medio DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% durante 24 horas y se reemplazó con DMEM/F12 no suplementado durante 12 horas para controlar la producción basal de citocinas. Se estimularon con poli I:C (10 μ g/ml durante 12 horas) en medio condicionado con diferentes tratamientos: incubado durante 1 hora a 90°C e incubado durante 1 hora a 60°C con o sin proteinasa K. Se purificó el mRNA de los fibroblastos limboconiales para cuantificar la expresión los transcritos para CCL2, CCL5 y CXCL10 conforme al protocolo previamente descrito.

IX. 17 Identificación de las proteínas del medio condicionado mediante espectrometría de masas

Se concentró 50 veces el medio condicionado con unidades de filtración “Amicon Ultra” y se cargó en un gel de poliacrilamida con gradiente de 4 al 20% para separar las proteínas mediante electroforesis a 90V constantes. Se tiñó el gel con azul de Coomassie para seleccionar, aislar y secuenciar las proteínas mediante espectrometría de masas.

Se lavaron las proteínas con NH_4HCO_3 de acetonitrilo (50Mm) durante 5 minutos y después con acetonitrilo al 100% durante 5 minutos. Se agregaron 375 ng de tripsina durante 12 horas a 37°C y se resuspendieron los péptidos con matriz MALDI (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico 10mg/ml en acetonitrilo al 50%). Las masas de las proteínas se determinaron utilizando MALDI 4800 TO/TOF MS de Applied Biosystem (Foster City, California, USA) en modo de detector lineal. El intervalo de confianza igual o superior a 95% se utilizó para la identificación de proteínas.

IX. 18 Cuantificación de lumican mediante ELISA

Se utilizó medio condicionado recién obtenido para cuantificar la concentración de lumican mediante el “*Human Lumican DuoSet ELISA kit*” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubaron placas de 96 pozos con 100 µl de anticuerpo de captura durante toda la noche a 4°C y se lavaron 3 veces (PBS con tween-20 al 0.05%). Posteriormente, a temperatura ambiente: Se agregaron 200 µl de solución de bloqueo (PBS con BSA al 1%) durante 1 hora y se lavaron 3 veces. Se agregaron 100 µl de las diluciones seriadas del estándar o del medio condicionado durante 2 horas y se lavaron 3 veces. Se agregaron 100 µl de anticuerpo de detección durante 1 hora y se lavaron tres veces. Se añadieron 100 µl de estreptavidina-HRP durante 30 minutos y se lavaron 3 veces. Se añadieron 100 µl de tetrametilbenzidina - peróxido de hidrógeno durante 30 minutos, se añadieron 50 µl de ácido sulfúrico 2N durante 20 minutos y se leyeron las placas a una absorbancia de 450 nm con el fotómetro de microplatas Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

IX. 19 Análisis estadístico

Los datos fueron presentados con error estándar y se realizó un análisis de varianza de una cola con test de Bonferroni considerando una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa mediante el software GraphPad Prism 5 (GraphPad, California, USA).

X. RESULTADOS

X. 1 La membrana amniótica disminuye la secreción de citocinas pro-inflamatorias de fibroblastos limboconeaes estimulados con poli I:C

Previamente, se cuantificó la secreción de IL-6 e IL-8 para determinar las condiciones del estímulo con poli I:C, observando que los fibroblastos limboconeaes alcanzan una respuesta inflamatoria más intensa al ser estimulados 12 horas con 10 µg/ml de poli I:C por lo que se consideraron esas condiciones para los siguientes ensayos. Posteriormente, se evaluó el perfil de citocinas que producen los fibroblastos limboconeaes estimulados con poli I:C identificándose un incremento de CCL1, CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL8, CXCL10, IL-6, GM-CSF e IL-1RA con respecto a los fibroblastos limboconeaes no estimulados. Sin embargo, los fibroblastos limboconeaes estimulados con poli I:C cultivados en contacto con membrana amniótica disminuyeron la secreción de las citocinas pro-inflamatorias e incrementaron la secreción de IL-1RA.

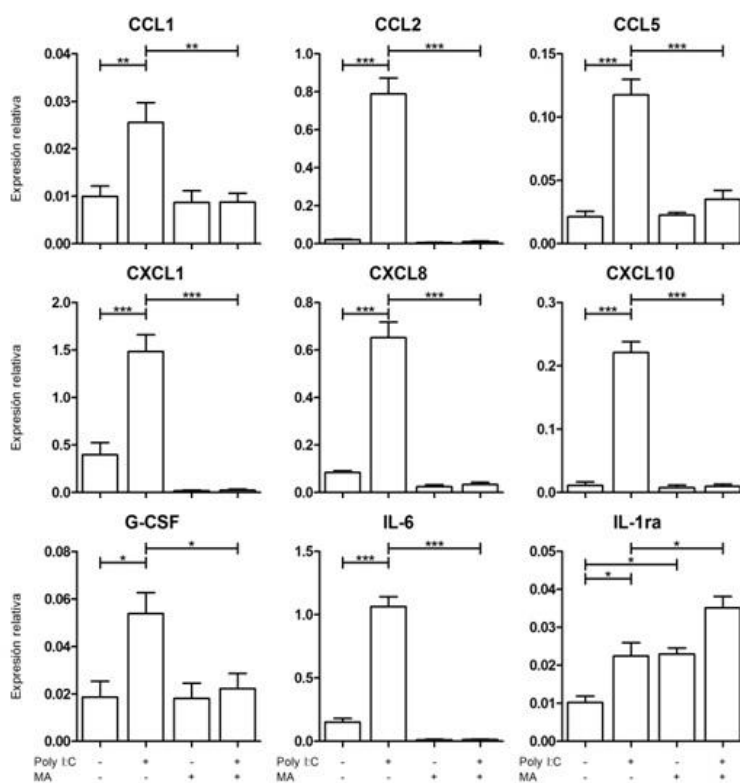


Figura 7: La membrana amniótica disminuye la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Graficas de barras donde se representa la expresión relativa de las citocinas identificadas del sobrenadante de los fibroblastos limboconeaes bajo las diferentes condiciones (*p<0.05; **p<0.005; ***p<0.001).

X. 2 La membrana amniótica disminuye la expresión de MDA5, RIG-1 y TLR3 en fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C

Las citocinas pro-inflamatorias pueden ser inducidas tras la activación de los receptores de respuesta inmune innata como MDA5, RIG-1 y TLR3, los cuales pueden reconocer poli I:C. Por lo que se cuantificó su expresión para identificar si la membrana amniótica modificaba su expresión. Como se muestra en la figura 8, los fibroblastos limbocorneales expresaron constitutivamente TLR3 y en menor proporción RIG-1 y MDA5 e interesadamente, al estimularlos con poli I:C incrementaron principalmente la expresión de RIG-1 y de MDA5. Sin embargo, la membrana amniótica disminuyó en un 90% la expresión de los 3 receptores en los fibroblastos limbocorneales independientemente si se habían estimulado o no con poli I:C.

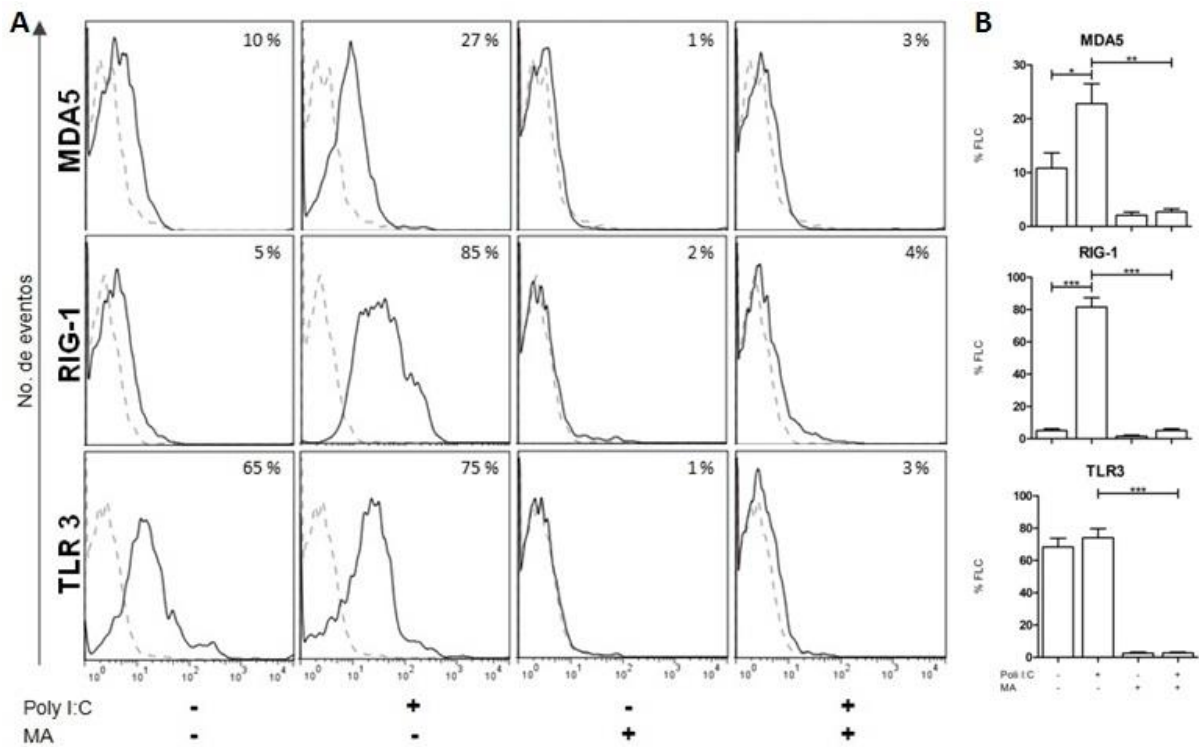


Figura 8: La membrana amniótica disminuye la expresión de MDA5, RIG-1 y TLR3. A) Histogramas que representan la cantidad de células positivas para cada receptor, cada uno es representativo de al menos 3 experimentos por separado. B) Graficas de barras donde se representa el porcentaje de células que expresan MDA5, RIG-1 y TLR3, (*p<0.05; **p<0.005; ***p<0.001).

X. 3 La membrana amniótica inhibe la translocación nuclear de NF-κB en fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C

Uno de los resultados de la activación de MDA5, RIG-1 y TLR3 es la inducción de la translocación nuclear de NF-κB para inducir la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias. Por lo tanto, se analizó el perfil de translocación nuclear de NF-κB en los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C. Se observó que la translocación nuclear de NF-κB inicia a los 40 minutos y se incrementó paulatinamente hasta alcanzar su máxima translocación a los 120 minutos para después descender a los 150 minutos. Se consideraron 120 minutos de estimulación para evaluar el efecto de la membrana amniótica, como se muestra en la figura 9B, la membrana amniótica inhibió la translocación nuclear de NF-κB en los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C.

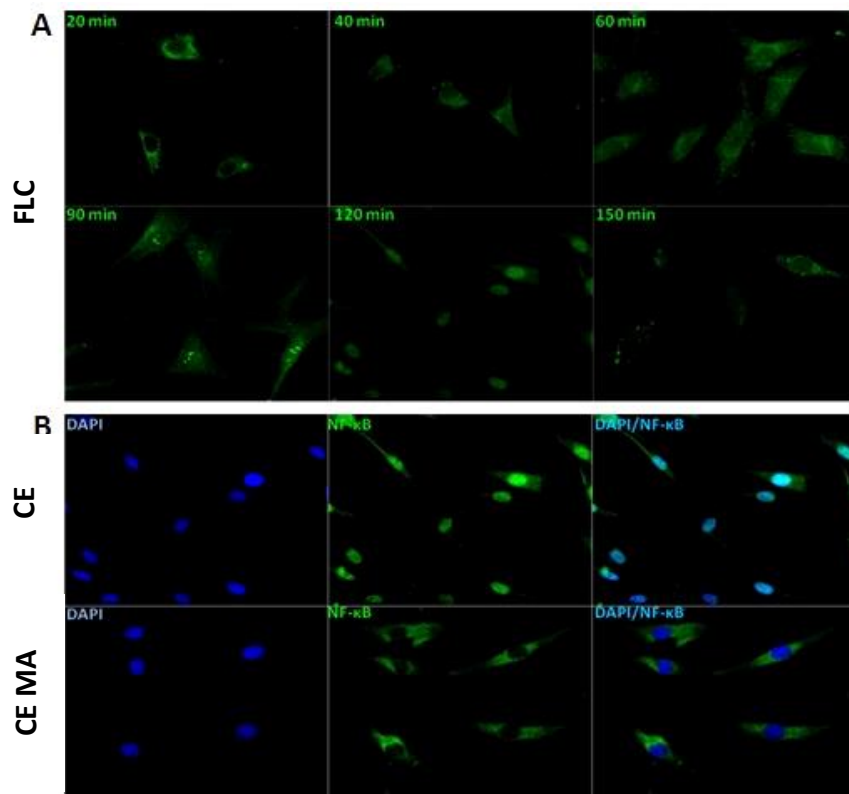


Figura 9. La membrana amniótica inhibe la translocación nuclear de NF-κB. A) Microfotografías de fluorescencia de FLC estimulados con poli I:C a 20, 40, 60, 90, 120 y 150 minutos teñidos con anti-NF-κB-alexa fluor 488 (verde). B) Microfotografías de fluorescencia de FLC estimulados 120 minutos con poli I:C (FLC E arriba) comparados con FLC estimulados 120 minutos con poli I:C en contacto con MA (FLC E MA abajo). De izquierda a derecha: marcaje con anti-NF-κB-alexa fluor 488 (verde), marcaje de nuclear con DAPI (azul) y empalme de colores. Imágenes representativas de 3 ensayos realizados por separado con un aumento de 40x.

X. 4 La membrana amniótica no tiene efecto sobre la translocación nuclear de IRF3 e IRF7 en fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C

Otro producto de la activación de MDA5, RIG-1 y TLR3 es la translocación nuclear de IRF3 e IRF7 para inducir la expresión génica de IFNs I. Como se muestra en la figuras 10A, los fibroblastos limbocorneales expresaron constitutivamente IRF3 en el núcleo e incrementó la translocación nuclear a los 90 minutos de estimulación para descender posteriormente a los 150 minutos. Interessantemente y contrario a lo ocurrido con NF- κ B, la membrana amniótica no modificó la translocación nuclear de IRF3 en los fibroblastos limbocorneales estimulados como se muestra en la figura 10B.

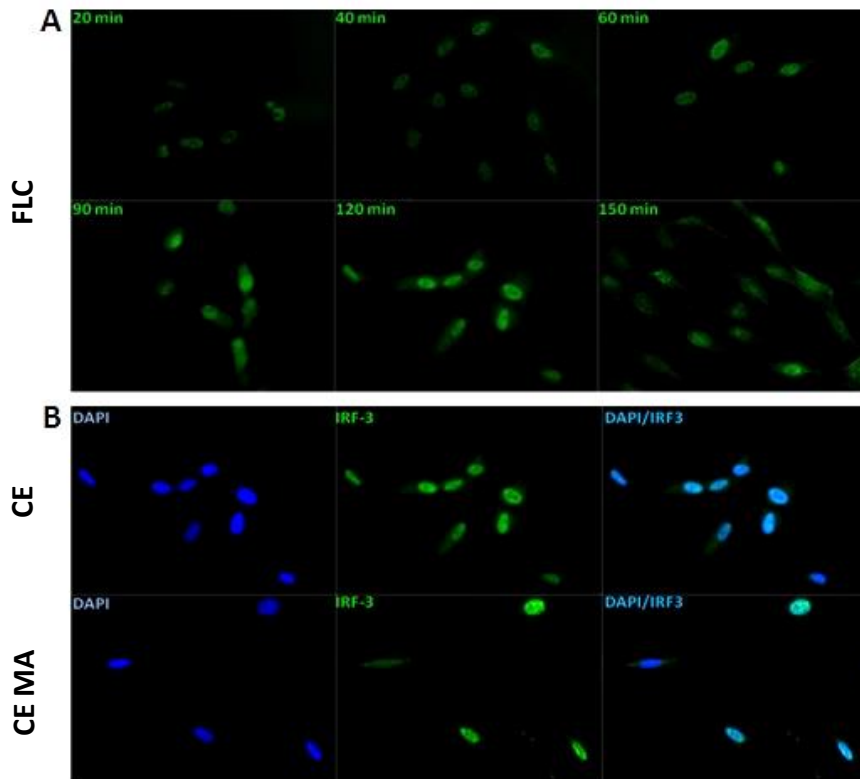


Figura 10. La membrana amniótica no tiene efecto sobre la translocación nuclear de IRF3. A) Microfotografías de fluorescencia de FLC estimulados con poli I:C a 20, 40, 60, 90, 120 y 150 minutos teñidos con anti-IRF3-alexa fluor 488 (verde). B) Microfotografías de fluorescencia de FLC estimulados 120 minutos con poli I:C (arriba) comparados con FLC estimulados 120 minutos con poli I:C en contacto con MA (abajo). De izquierda a derecha: marcaje con anti-IRF3-alexa fluor 488 (verde), marcaje de nuclear con DAPI (azul) y empalme de colores. Imágenes representativas de 3 ensayos realizados por separado con un aumento de 40x.

Por otro lado, el patrón de translocación nuclear de IRF7 fue similar a lo observado con NF- κ B. Como se muestra en la figura 11A, los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C iniciaron la translocación nuclear de IRF7 a los 40 minutos y se incrementó paulatinamente hasta los 120 minutos, aunque en este caso se mantuvo la translocación nuclear a los 150 minutos. Sin embargo, la membrana amniótica no modificó la translocación nuclear de IRF7 de los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C como se muestra en la figura 11B.

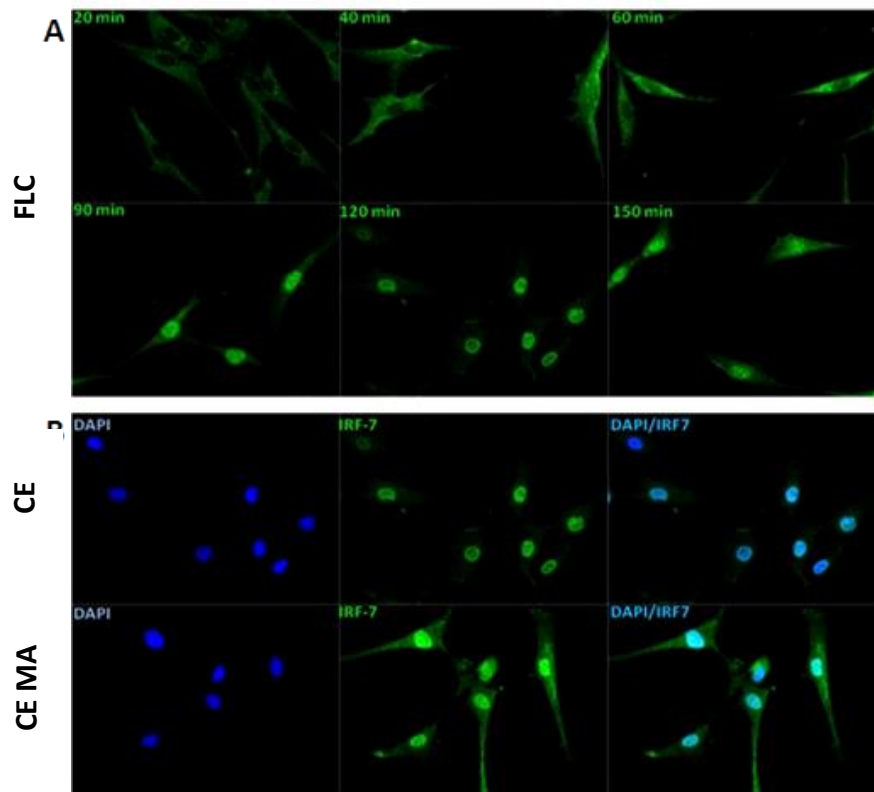


Figura 11. La membrana amniótica no tiene efecto sobre la translocación nuclear de IRF7. C) Microfotografías de fluorescencia de FLC estimulados con poli I:C a 20, 40, 60, 90, 120 y 150 minutos teñidos con anti-IRF7-alexa fluor 488 (verde). D) Microfotografías de fluorescencia de FLC estimulados 120 minutos con poli I:C (arriba) comparados con FLC estimulados 120 minutos con poli I:C en contacto con MA (abajo). De izquierda a derecha: marcaje con anti-IRF7-alexa fluor 488 (verde), marcaje de nuclear con DAPI (azul) y empalme de colores. Imágenes representativas de 3 ensayos realizados por separado con un aumento de 40x.

X. 5 La membrana amniótica induce la secreción de IFN-β en fibroblastos limboconiales estimulados con poli I:C

Los resultados anteriores mostraron que la membrana amniótica disminuye la secreción de citocinas pro-inflamatorias e inhibe la translocación nuclear de NF-κB de los fibroblastos limboconiales. Sin embargo, la membrana amniótica no inhibe la translocación nuclear de IRF3 e IRF7 por lo que se cuantificó la secreción de IFN-β para conocer si se mantenían activos estos factores de transcripción. Como se muestra en la figura 12, la membrana amniótica incrementó de manera estadísticamente significativa la secreción de IFN-β de los fibroblastos limboconiales estimulados con poli I:C cultivados en contacto con membrana amniótica con respecto a los que no se cultivaron en contacto con membrana amniótica.

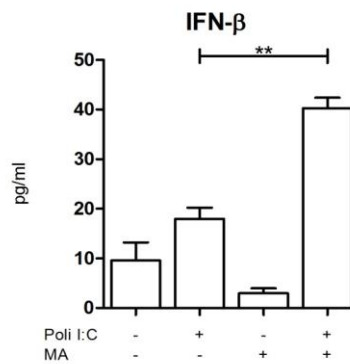


Figura 12. La membrana amniótica incrementa la secreción de IFN-β. Gráfica de barras donde se representa la concentración de IFN-β del sobrenadante de los fibroblastos limboconiales bajo las diferentes condiciones (**p<0.005).

X. 6 La membrana amniótica induce cambios morfológicos y reorganización de cadherinas en los fibroblastos limbocorneales

Una de las características de los fibroblastos limbocorneales cultivados en contacto con la membrana amniótica fue la pérdida de adherencia celular. Por lo que se identificó el cambio morfológico de los fibroblastos limbocorneales mediante la distribución de cadherinas y la evaluación de su expresión relativa. Como se observa en la figura 13, los fibroblastos limbocorneales cultivados en contacto con membrana amniótica pierden su morfología fusiforme o triangular por una redondeada y más pequeña relacionándose con una redistribución de cadherinas y un aumento de su expresión. Cabe mencionar que el anticuerpo utilizado en los ensayos reconoce la porción c-terminal de toda la familia de las cadherinas, siendo la n-cadherina de las más presentes en los fibroblastos limbocorneales por lo que se podría inferir que se trata de esta proteína aunque se requieren otros experimentos para confirmarlo.

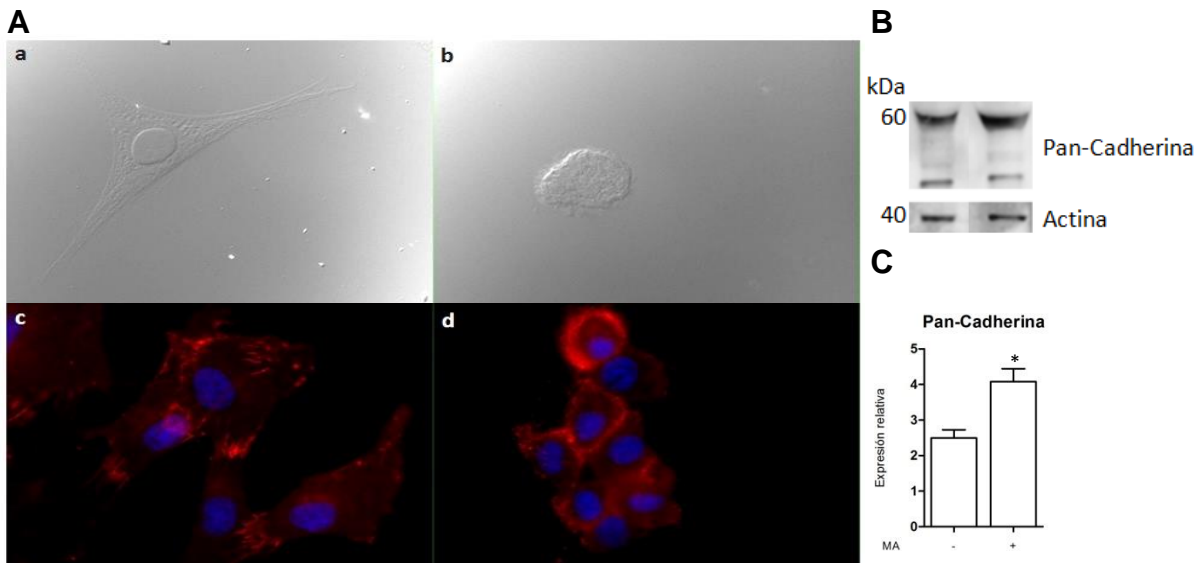


Figura 13. La membrana amniótica induce cambios morfológicos y reorganización de cadherinas. A) Microfotografías de fibroblastos limbocorneales cultivados sin membrana amniótica (a y c) y cultivados en contacto con ella (b y d) con microscopia de contraste diferencial de interferencia (DIC) (a y b) y con microscopia de fluorescencia (c y d) teñidos con anti-pan cadherina-alexa fluor 594 y DAPI. Imágenes representativas de 3 ensayos realizados por separado con un aumento de 63x. B) Fotografía representativa del western blot contra pan-cadherina y actina. C) Gráfica de barras donde se representa la expresión de pan-cadherina realizada mediante la densidad óptica media.

X. 7 Determinación de la concentración del medio condicionado para evaluar el efecto de los factores solubles de la membrana amniótica

Debido a que la membrana amniótica cambia la morfología de los fibroblastos limbocorneales, se determinó la concentración apropiada del medio condicionado de membrana amniótica para no generar cambios morfológicos o la pérdida de adherencia de estas células. Como se muestra en la figura 14, se identificó que los medios condicionados de 2, 8 y 12 horas afectan muy poco la adherencia de los fibroblastos limbocorneales en comparación del medio condicionado de 4 horas. Estos datos podrían indicar que la membrana amniótica libera factores solubles que pierden su actividad con el tiempo debido a su degradación o que es necesario su liberación constante para que modifique la morfología celular.

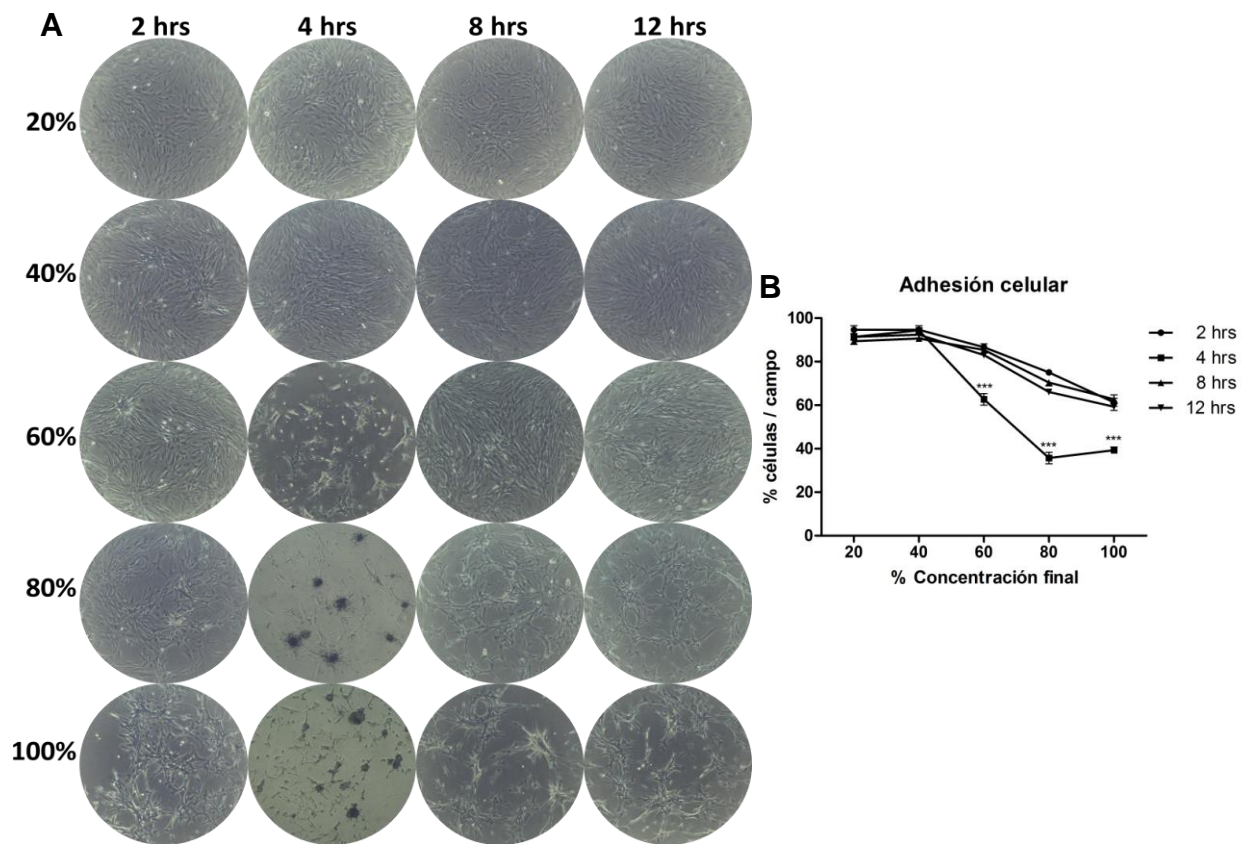


Figura 14. Determinación de la concentración del medio condicionado. A) Microfotografías de campo claro de los campos donde se analizó la adhesión celular de los fibroblastos limbocorneales tras 12 horas de cultivo bajo las diferentes condiciones del medio condicionado. B) Gráficas de barras donde se representa el porcentaje de adhesión celular de los fibroblastos limbocorneales tras 12 horas de cultivo bajo las diferentes condiciones del medio condicionado (***) $p < 0.001$.

X. 8 El medio condicionado disminuye la síntesis de mRNA de citocinas pro-inflamatorias, MDA5, RIG-1 y TLR3 de fibroblastos limboconeaes estimulados con poli I:C

Una vez evaluado las diferentes concentraciones del medio condicionado de membrana amniótica, se decidió utilizar el que no tuvo efecto sobre la adherencia celular (4 horas de incubación a una concentración final del 40%). Con el fin de evaluar la capacidad inmunorreguladora de este medio condicionado se cuantificó la síntesis de mRNA de citocinas pro-inflamatorias, MDA5, RIG-1 y TLR3. Como se muestra en la figura 15, el medio condicionado de la membrana amniótica disminuyó de manera estadísticamente significativa la síntesis de mRNA de las citocinas pro-inflamatorias, MDA5, RIG-1 y TLR3 de los fibroblastos limboconeaes independientemente si fueron o no estimulados con poli I:C. Sin embargo, se observó una mayor disminución de la síntesis de los mRNA en los fibroblastos limboconeaes cultivados en contacto con membrana amniótica.

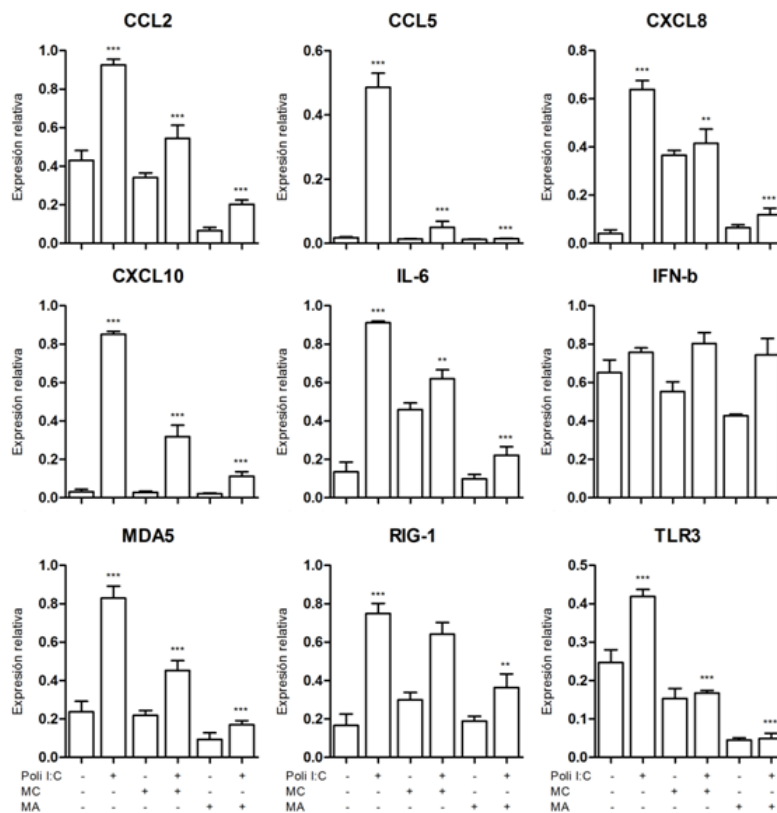


Figura 15. El medio condicionado disminuye la síntesis de mRNA de citocinas pro-inflamatorias y PRRs. Gráficas de barras que representan la expresión relativa de los transcritos para cada gen de los fibroblastos limboconeaes bajo las diferentes condiciones (**p < 0.005; ***p < 0.001).

X. 9 El medio condicionado inhibe la secreción de CCL2, CCL5, y CXCL10 de fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C

Para identificar si la disminución de la síntesis de mRNA de citocinas pro-inflamatorias se correlacionaba con su secreción, se cuantificó la secreción de CCL2, CCL5, y CXCL10. Como se muestra en la figura 16, el medio condicionado de la membrana amniótica disminuyó la secreción de CCL2, CCL5, y CXCL10 en los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C en comparación con los estimulados con poli I:C sin medio condicionado. Sin embargo, se observó una mayor disminución de CCL2 cuando se cultivaron los fibroblastos limbocorneales en contacto con membrana amniótica. Comprobando de esta manera que el medio condicionado de membrana amniótica puede disminuir la respuesta inflamatoria de los fibroblastos limbocorneales.

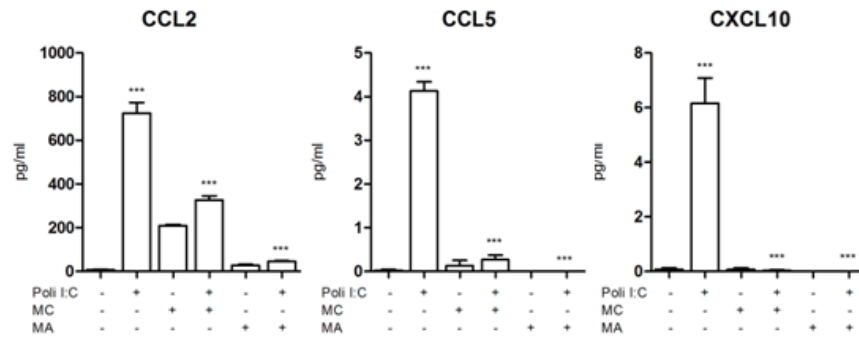


Figura 16. El medio condicionado disminuye la secreción de CCL2, CCL5, y CXCL10. Gráficas de barras que representan la secreción de CCL2, CCL5, y CXCL10 en pg/ml de los fibroblastos limbocorneales bajo las diferentes condiciones (**p<0.001).

X. 10 El medio condicionado inhibe la translocación nuclear de NF- κ B de fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C

Una vez analizado el efecto del medio condicionado de la membrana amniótica sobre la síntesis de mRNA y la secreción de citocinas pro-inflamatorias, se analizó la translocación nuclear de NF- κ B y de su forma activa fosforilada NF- κ Bp. Se emplearon 120 minutos de estimulación con poli I:C y en este caso se analizó la intensidad media de fluorescencia para representar los datos en gráficas de barras. Como se muestra en las figuras 17 y 18, el medio condicionado de la membrana amniótica disminuyó la translocación nuclear de NF- κ B de los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C en comparación con los estimulados con poli I:C sin medio condicionado, explicando en parte la disminución de las citocinas pro-inflamatorias.

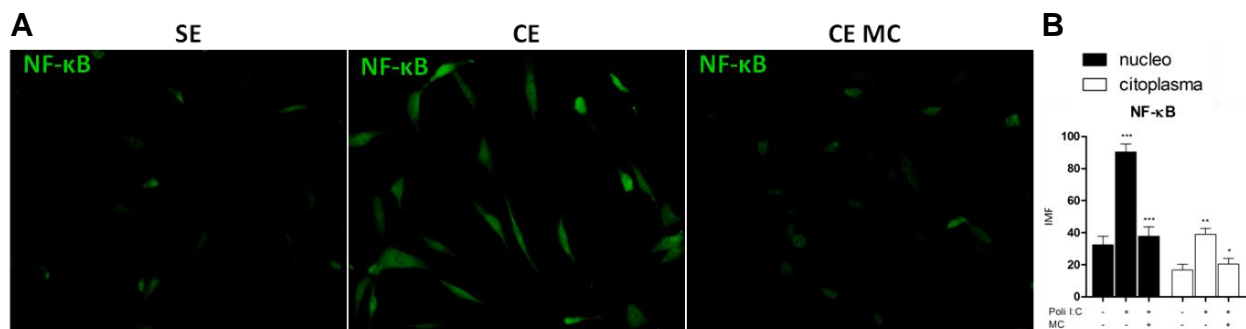


Figura 17. Análisis de la translocación nuclear de NF- κ B. A) Microfotografías de fluorescencia de FLC sin estímulo (SE), estimulados (CE) y estimulados y cultivados con medio condicionado (CE MC); marcados con anti-NF- κ B alexa fluor 488 (verde). Aumento 40x. B) Gráficas de barras que representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) contenida en el núcleo y citoplasma del marcaje contra NF- κ B de las diferentes condiciones de los FLC.

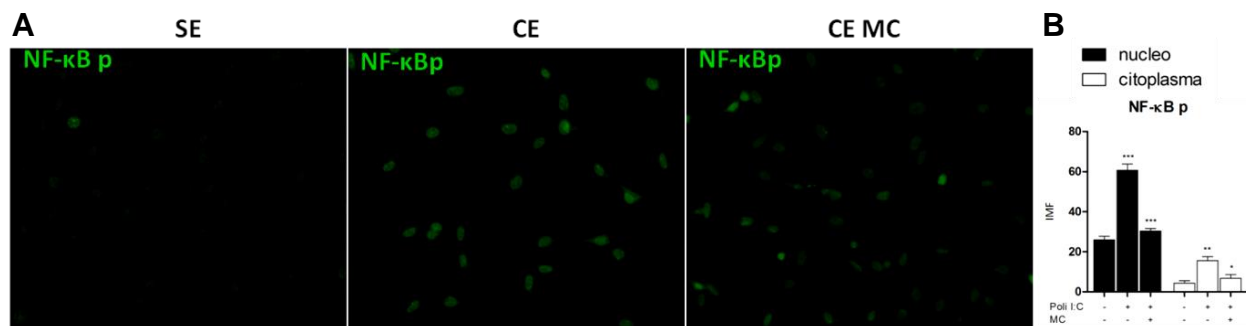


Figura 18. Análisis de la translocación nuclear de NF- κ Bp. A) Microfotografías de fluorescencia de FLC sin estímulo (SE), estimulados (CE) y estimulados y cultivados con medio condicionado (CE MC); marcados con anti-NF- κ Bp alexa fluor 488 (verde). Aumento 40x. B) Gráficas de barras que representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) contenida en el núcleo y citoplasma del marcaje contra NF- κ Bp de las diferentes condiciones de los FLC.

X. 11 El medio condicionado incrementa la translocación nuclear de IRF3 de fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C

Se identificó que el medio condicionado de membrana amniótica disminuye la respuesta inflamatoria de los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C. Sin embargo, se analizó su efecto sobre la translocación nuclear de IRF3 e IRF3p. Interesantemente, el medio condicionado incrementó la translocación nuclear de IRF3 en comparación con los estimulados con poli I:C sin medio condicionado como se muestra en las figuras 19 y 20. Estos resultados sugieren que el medio condicionado tiene un efecto inmunorregulador, ya que modula las respuestas inflamatorias y antivirales de los fibroblastos limbocorneales.

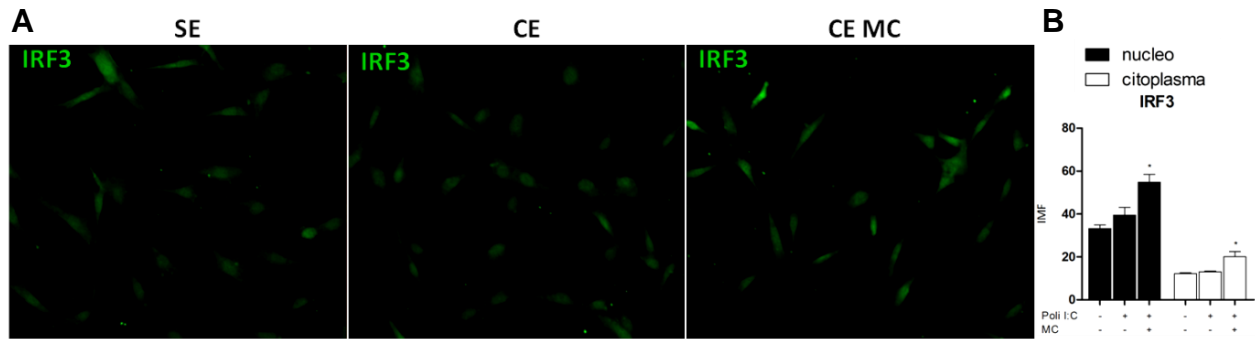


Figura 19. Análisis de la translocación nuclear de IRF3. A) Microfotografías de fluorescencia de FLC sin estímulo (SE), estimulados (CE) y estimulados y cultivados con medio condicionado (CE MC); marcados con anti-IRF3 alexa fluor 488 (verde). Aumento 40x. B) Gráficas de barras que representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) contenida en el núcleo y citoplasma del marcaje contra IRF3 de las diferentes condiciones de los FLC.

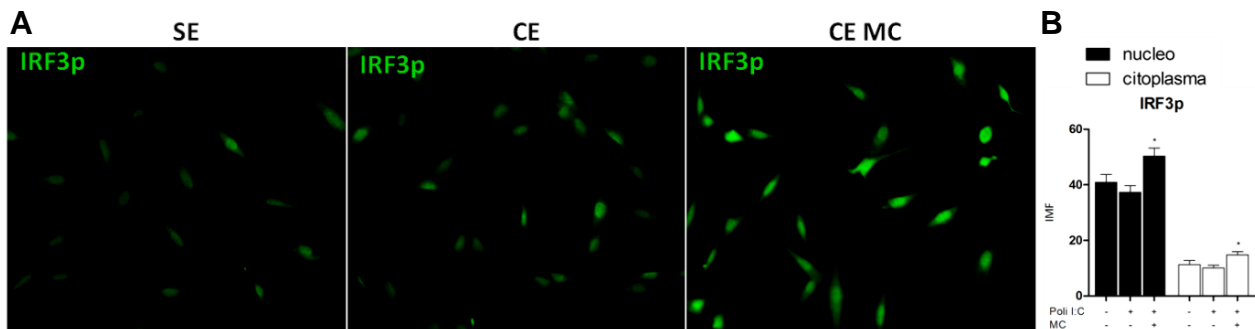


Figura 20. Análisis de la translocación nuclear de IRF3p. A) Microfotografías de fluorescencia de FLC sin estímulo (SE), estimulados (CE) y estimulados y cultivados con medio condicionado (CE MC); marcados con anti-IRF3p alexa fluor 488 (verde). Aumento 40x. B) Gráficas de barras que representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) contenida en el núcleo y citoplasma del marcaje contra IRF3p de las diferentes condiciones de los FLC.

X. 12 El medio condicionado no tiene efecto en la translocación nuclear de IRF7 de fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C

Posteriormente, se analizó si el medio condicionado de la membrana amniótica incrementaba la translocación nuclear IRF7 como sucedió con IRF3. Sin embargo, como se muestra en las figuras 21 y 22, el medio condicionado de membrana amniótica no modificó substancialmente la translocación nuclear de IRF7 de los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C en comparación con los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C sin medio condicionado. Estos resultados muestran que el medio condicionado no genera el mismo efecto sobre los factores de transcripción involucrados con la activación de los receptores de respuesta inmune innata antiviral.

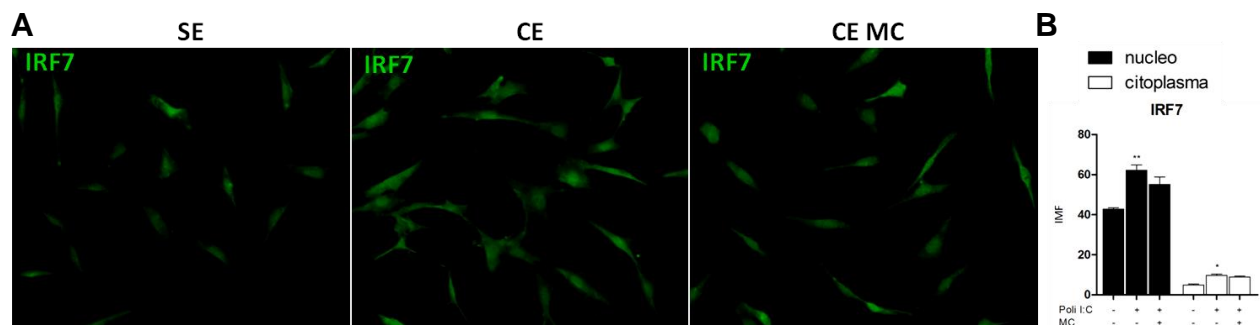


Figura 21. Análisis de la translocación nuclear de IRF7. A) Microfotografías de fluorescencia de FLC sin estímulo (SE), estimulados (CE) y estimulados y cultivados con medio condicionado (CE MC); marcados con anti-IRF7 alexa fluor 488 (verde). Aumento 40x. B) Graficas de barras que representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) contenida en el núcleo y citoplasma del marcaje contra IRF7 de las diferentes condiciones de los FLC.

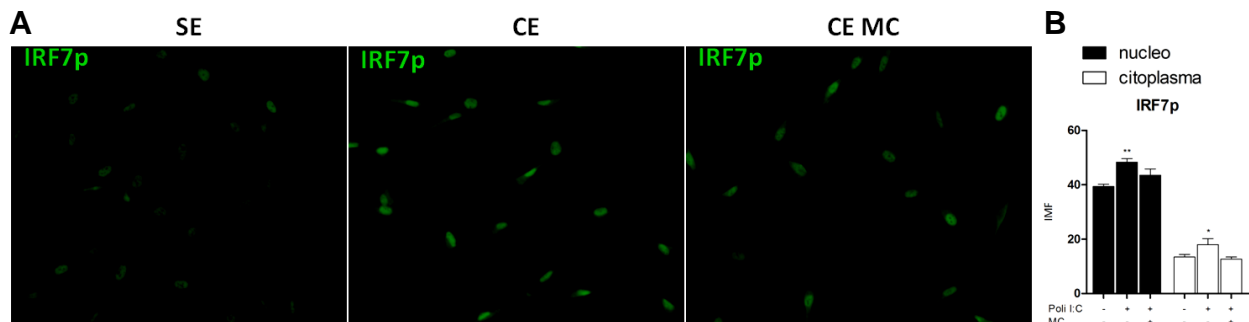


Figura 22. Análisis de la translocación nuclear de IRF7p. A) Microfotografías de fluorescencia de FLC sin estímulo (SE), estimulados (CE) y estimulados y cultivados con medio condicionado (CE MC); marcados con anti-IRF7p alexa fluor 488 (verde). Aumento 40x. B) Graficas de barras que representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) contenida en el núcleo y citoplasma del marcaje contra IRF7p de las diferentes condiciones de los FLC.

X. 13 Los tratamientos térmico y enzimático disminuyen la actividad inmunosupresora del medio condicionado sobre los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C

El medio condicionado de la membrana amniótica puede contener diversas moléculas con actividad inmunorreguladora, con el objetivo de conocer si estas moléculas tenían naturaleza proteica se empleó un tratamiento con proteinasa K o una incubación a 90°C. Posteriormente, se analizó la capacidad para disminuir la expresión génica de CCL2, CCL5 y CXCL10 de los fibroblastos limbocorneales estimulados con poli I:C. Como se muestra en la figura 23, el medio condicionado incubado a 90°C o tratado con proteinasa K pierde la capacidad de disminuir la síntesis de mRNA de CCL2, CCL5 y CXCL10. Los datos sugieren que el medio condicionado contiene factores solubles termolábiles y proteínas que disminuyen la respuesta inflamatoria de los fibroblastos limbocorneales.

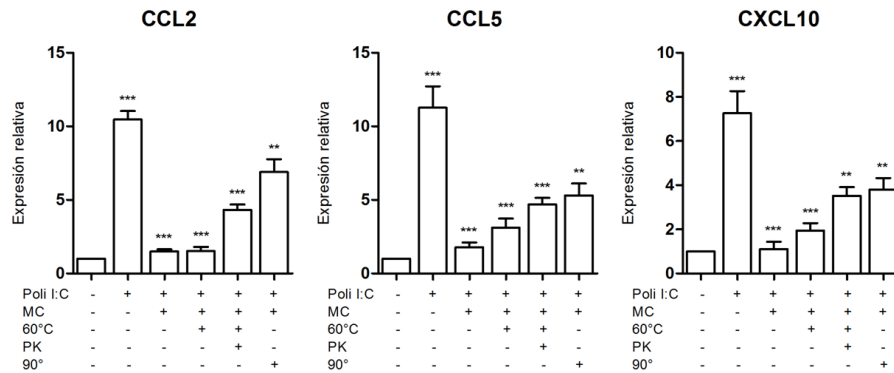


Figura 23. Los tratamientos térmico y enzimático disminuyen la actividad inmunosupresora del medio condicionado. Gráficas de barras que representan la expresión relativa de los transcritos para cada gen de los fibroblastos limbocorneales bajo las diferentes condiciones (**p<0.005; ***p<0.001).

X. 14 La membrana amniótica libera lumican al medio condicionado

Para conocer qué moléculas podrían estar contenidas en el medio condicionado, se aislaron y secuenciaron sus proteínas. Primero, se identificó la integridad de las proteínas del medio condicionado y se aislaron las bandas con mayor concentración. Se tomaron en cuenta las proteínas de 180, 140, 35 y 20 kDa, figura 24A; sin embargo, el programa solo identificó a lumican con un alto índice de confiabilidad, el cual tiene un peso de 35 kDa como se muestra en la figura 24B. Además, se comprobó la presencia de esta proteína mediante ELISA; mostrando que el medio condicionado contiene ± 10 pg/ml de lumican como se representa en la figura 24C.

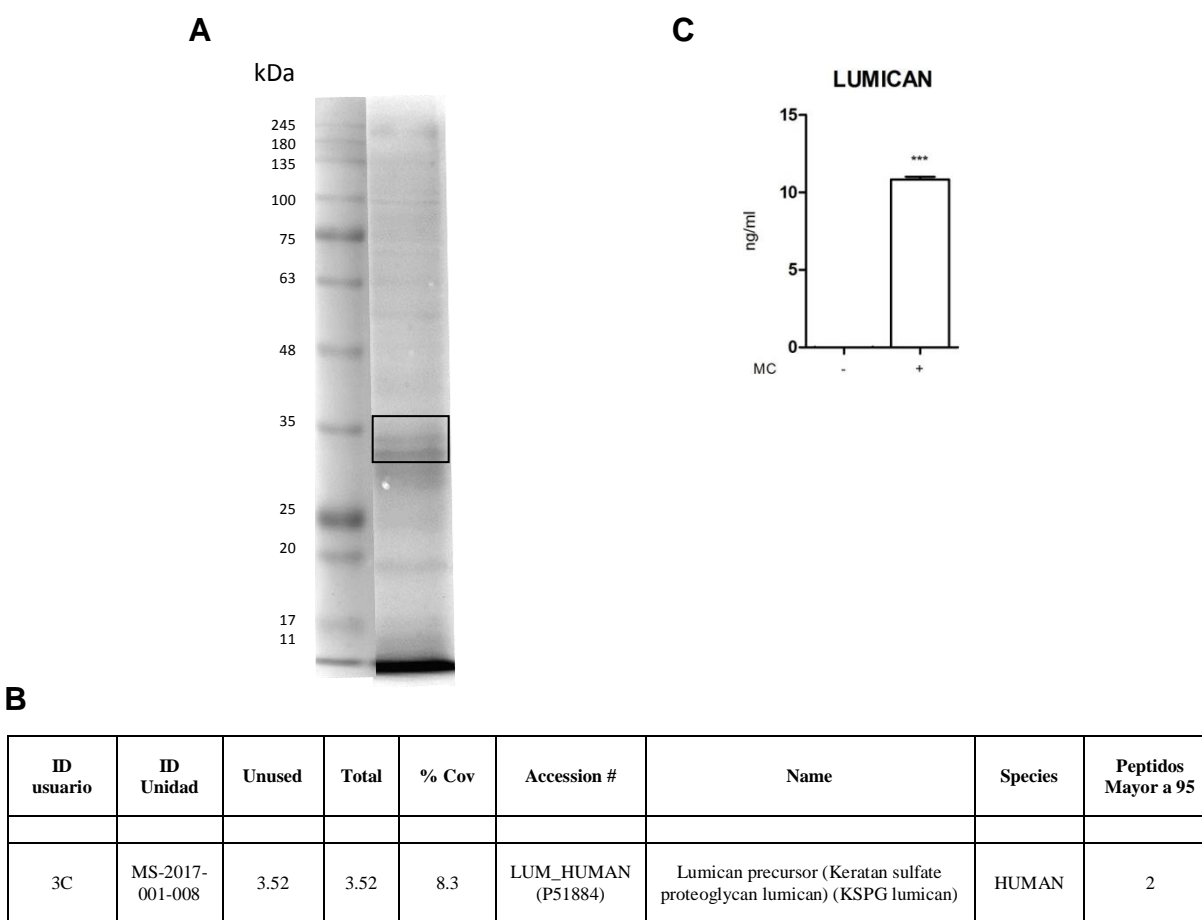


Figura 24. La membrana amniótica libera lumican al medio condicionado. A) Fotografía del gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie donde se identificó la banda correspondiente a 35 kDa. B) Resultados obtenidos de la secuenciación donde se ubica a lumican con un intervalo de confianza superior a 95%. C) Gráfica de barras donde se representa la concentración de lumican del medio condicionado. (***) $p < 0.001$.

XI. DISCUSIÓN

La replicación del virus herpes simple tipo 1 en la córnea genera una enfermedad conocida como HSK, la cual es considerada una de las principales causas de ceguera a nivel mundial. Las manifestaciones clínicas de la HSK son la desepitelización, la inflamación y la opacidad corneal que en algunos casos puede progresar hasta generar úlceras corneales. Estas manifestaciones clínicas representan un problema de salud pública debido a que tiene un impacto significativo sobre la calidad de vida del paciente e implicaciones sociales costosas^{6,7}.

La patogénesis de esta enfermedad se debe en parte, a la respuesta inmune desencadenada contra los componentes virales. Se ha descrito que durante el curso de la infección, se liberan partículas virales que son reconocidas por PRR presentes en las células de la superficie ocular como TLR3, MDA5 y RIG-1. La activación de estos PRR desencadena vías de señalización que culminan en la translocación nuclear de NF- κ B para promover la secreción de quimiocinas y con ello, la migración de células inflamatorias al sitio de infección^{11,12}.

Recientemente se ha reportado que las células epiteliales conjuntivales expresan constitutivamente TLR3 y que al ser estimuladas con poli I:C se induce la expresión de MDA5 y RIG-1⁴³. Asimismo, nuestros resultados demuestran que los FLC expresan de manera constitutiva TLR3 y en menor cantidad MDA5 y RIG-1. Sin embargo, al ser estimulados con poli I:C se incrementa significativamente la expresión de RIG-1 y MDA5 sin modificar la de TLR3. Estos datos sugieren que TLR3, RIG-1 y MDA5 podrían tener una participación en la activación de la respuesta inmune de los FLC; sin embargo, se requieren más experimentos que pudieran confirmar esta hipótesis.

Uno de los tratamientos empleados para disminuir las manifestaciones clínicas de la HSK es el trasplante de membrana amniótica, debido a sus propiedades anti-inflamatorias, anti-fibróticas, anti-angiogénicas y pro-epitelizantes³².

Se han descrito diversos mecanismos para explicar la regulación de la inflamación por parte de la membrana amniótica, ejemplos de ellos son la disminución de citocinas inflamatorias y de metaloproteinasas de matriz extracelular; la síntesis del inhibidor de la metaloproteinasa tisular-1 y de proteínas antiangiogénicas y la supresión de la señalización de TGF- β en fibroblastos conjuntivales^{45-47, 54}. Además, dos de las propiedades más relevantes del trasplante de membrana amniótica son su capacidad para inducir la apoptosis de macrófagos y linfocitos infiltrantes en el estroma corneal de ratones con queratitis estromal herpética y por otro lado, su capacidad para atrapar e inducir la apoptosis de macrófagos, neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK de pacientes con quemaduras corneales^{47, 48, 55}.

Nuestros resultados, sugieren otro mecanismo que podría explicar en parte, el efecto anti-inflamatorio de la membrana amniótica durante la queratitis estromal herpética debido a que disminuye la secreción de citocinas pro-inflamatorias, la expresión de PRR e inhibe la translocación nuclear de NF- κ B de los FLC estimulados con poli I:C e incluso los niveles basales. Por lo que la membrana amniótica reduciría ampliamente el ambiente inflamatorio a través de los FLC, ya que orquestan la respuesta inmune innata del estroma corneal en diversas patologías de la superficie ocular. Este mecanismo actuaría en conjunto con los anteriormente descritos debido a que la membrana amniótica puede inducir la apoptosis de células inflamatorias infiltrantes^{45, 46} y evitar que se recluten más elementos al sitio de infección a través de la disminución de quimiocinas producidas por los FLC.

Aunque los resultados se generaron en un sistema *in vitro*, el mecanismo de acción que describimos es posiblemente de los primeros en activar la membrana amniótica durante una respuesta anti-viral ya que se obtienen cambios en la respuesta inmune de los fibroblastos limbocorneales desde las 2 horas de contacto con la membrana amniótica. Mientras que los reportes de apoptosis de macrófagos y linfocitos se obtienen a los 7 días del trasplante de membrana amniótica en ratones con queratitis estromal herpética^{45, 46} y los reportes de captura y apoptosis de células inflamatorias se consiguen a los 30 días del trasplante de membrana amniótica en pacientes con quemaduras⁵⁵ aunque también se debe considerar que sus experimentos se obtienen de sistemas biológicos.

Por otro lado, en contraste con lo observado con las citocinas pro-inflamatorias y NF- κ B; la membrana amniótica promueve la translocación nuclear de IRF3 e IRF7 y la secreción de IFN- β en FLC estimulados con poli I:C. La disminución de citocinas pro-inflamatorias inhibiría la quimiotaxis e infiltrado inflamatorio y la producción de IFN- β la activación de genes de respuesta a interferón para evitar la replicación y diseminación viral. Esto indicaría un mecanismo que discierne entre las vías de señalización, coadyuvando de esta manera al restablecimiento de la integridad corneal y demostrando la capacidad selectiva de la membrana amniótica.

Interesantemente, el efecto de la membrana amniótica sobre los FLC no solo dependen del contacto, relacionándose con otros reportes donde se describe que los factores solubles de la membrana amniótica suprimen linfocitos T aloreactivos, disminuyen la secreción de citocinas pro-inflamatorias e inducen la apoptosis de neutrófilos^{49, 50}. Asimismo, los resultados obtenidos muestran que el medio condicionado disminuye los transcritos de CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL10, IL-6, MDA5, RIG 1 y TLR3 e inhibe la translocación nuclear de NF- κ B sin modificar el transcrito de IFN- β ni la translocación nuclear de IRF7 o IRF3 de los FLC estimulados con poli I:C.

Por otro lado, se analizó si la membrana amniótica era capaz de inducir la apoptosis de los FLC; sin embargo, tras analizar diferentes tiempos de incubación se determinó que solo induce pérdida de adherencia celular. Estos datos sugieren que la membrana amniótica desempeña parte de sus mecanismos de acción a través de factores solubles; sin embargo, se desconocen todos los que podrían estar involucrados en la regulación de la respuesta inmune innata. La membrana amniótica está compuesta principalmente por una matriz estromal y una monocapa de células epiteliales²¹. No obstante, en nuestros diseños experimentales se descartó la monocapa de células epiteliales, indicando que los factores solubles de la matriz estromal podrían ser los involucrados en los mecanismos de inmunorregulación.

Una de las moléculas más abundantes en la membrana amniótica es el ácido hialurónico, constituyendo aproximadamente un 70% de la matriz estromal. Este glicosaminoglicano genera uniones tipo β para conformar grandes cadenas y representa un componente fundamental de la matriz extracelular de la piel, tejido mucoso, articulaciones y ojo, entre otros tejidos. Sus funciones incluyen el mantenimiento de la hidratación, del soporte y de la reparación tisular, aunque recientemente se ha descrito como una macromolécula con capacidades anti-inflamatorias^{57, 58}. Se ha sugerido ampliamente que el ácido hialurónico es la molécula responsable del efecto inmunosupresor de la membrana amniótica. Diversos estudios han demostrado que la interacción del ácido hialurónico con la glicoproteína transmembranal CD44 tiene efectos anti-inflamatorios, ya que inhibe la actividad de metaloproteinasas, disminuye la producción de prostaglandinas y de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β ^{58, 59}.

Sin embargo, nuestros resultados sugieren que las moléculas responsables del efecto inmunorregulador pueden ser de naturaleza proteica aunado a las moléculas que ya se han descrito por parte de otros autores.

Se observó que el medio condicionado incubado con proteinasa K o calentado a 95°C pierde la capacidad para disminuir la producción de CCL2, CCL5 y CXCL10; por lo que se decidió concentrar las proteínas e identificarlas en un gel de electroforesis para secuenciar las más abundantes.

Los resultados obtenidos fueron muy interesantes ya que se identificó a lumican, un proteoglicano con características inmunorreguladoras. Lumican pertenece a los proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP) y es un componente de la matriz estromal de diferentes tejidos como la aorta, la membrana amniótica, el músculo esquelético, el pulmón, el hígado y el estroma corneal^{60, 61}.

El estroma corneal comprende aproximadamente el 90% de la córnea, el cual se encuentra organizado por fibras de colágena rodeado por proteoglicanos⁶². Dentro de ellos se encuentran los SLRP como el lumican, cuya expresión es esencial para mantener la transparencia corneal ya que regula el ensamblaje correcto del colágena. Se ha demostrado que ratones depletados de lumican manifiestan desorganización de fibras de colágena y opacidad corneal^{63, 64}. Asimismo, se ha purificado lumican a partir de la matriz estromal de la membrana amniótica para aplicarse tópicamente a ratones con desepitelización corneal demostrando que incrementa la reepitelización a través de la migración y proliferación de células epiteliales^{65, 66}.

Estos reportes podrían explicar cómo el lumican en el medio condicionado promovería las propiedades pro-epitelizantes del trasplante de membrana amniótica; sin embargo, se han descrito otras funciones de lumican que podrían explicar las propiedades anti-inflamatorias.

Dentro de esas funciones destacan la inhibición de la proliferación y de la migración de células de melanoma a través de la alteración de los filamentos de actina y de los complejos de adhesión focal; la inhibición de la adhesión de células cancerígenas y de la angiogénesis de vénulas umbilicales mediante el bloqueo de las integrinas $\alpha 2\beta 1$ en estas células y la inducción de apoptosis de células inflamatorias por medio de la unión de lumican con FasL soluble para facilitar la unión a Fas⁶⁷⁻⁷⁰.

Nuestros resultados mostraron que los FLC cultivados con el medio condicionado pierden la adherencia y desarrollan cambios morfológicos debido a la reorganización de cadherinas. Las cadherinas son moléculas de adhesión intercelular y se unen a través de α y β cateninas a los filamentos de actina⁷¹. A su vez, los filamentos de actina se unen a las integrinas por medio de la talina y la vinculina para generar las adhesiones focales con la matriz extracelular, las cuáles son necesarias para la migración o anclaje de los FLC⁷². Estos resultados se relacionan con la inhibición de la proliferación y de la migración de células de melanoma donde se alteran los complejos de adhesión focal, sugiriendo por lo tanto, la participación de lumican en los FLC cultivados con medio condicionado.

Además, se ha descrito que la desorganización de las cadherinas también afecta a los microtúbulos, asociándose con una deficiente translocación de NF- κ B⁷³. De tal forma que la disminución de las uniones focales disminuiría también la secreción de citocinas pro-inflamatorias y la expresión de los PRR de los FLC. Por otro lado, lumican se une a las integrinas $\alpha 2\beta 1$ que expresan las células endoteliales de vasos sanguíneos evitando su proliferación y la angiogénesis⁶⁹. La disminución de los vasos sanguíneos en la córnea evitaría por lo tanto la infiltración de células inflamatorias en el estroma corneal aunado a la supresión de la respuesta inflamatoria de los FLC que evita su quimiotaxis; explicando en parte, las propiedades anti-inflamatorias y anti-angiogénicas de la membrana amniótica.

Uno de los mecanismos ampliamente descritos en córnea para evitar la angiogénesis y la inflamación es la expresión de FasL en células del endotelio y de FasL soluble en el estroma corneal⁷⁴. FasL es una molécula que mantiene el inmunoprivilegio debido a que induce la apoptosis de las células que presenten Fas mediante la activación de la caspasa 8⁷⁵. Se ha descrito que Fas se presenta en las células infiltrantes corneales y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos en conjunto con CD31⁷⁶. La presencia de lumican en la membrana amniótica aumentaría la apoptosis de células inflamatorias e inhibiría la angiogénesis corneal, incrementando las propiedades anti-inflamatorias y anti-angiogénicas de la membrana amniótica.

Tomando todos estos datos en conjunto podríamos señalar que lumican tiene diversas características: 1) anti-angiogénica, impidiendo el crecimiento de vasos sanguíneos y generando su apoptosis⁶⁹; 2) anti-inflamatoria, impidiendo la quimiotaxis y promoviendo la apoptosis de células infiltrantes⁷⁰; 3) pro-epitelizante, incrementando la migración y proliferación de células epiteliales⁶⁵ y 4) restaurando la claridad óptica mediante el anclaje y organización de fibras de colágena⁶³. Esto se relaciona con las propiedades biológicas del trasplante de membrana amniótica, por lo que es necesario seguir analizando esta proteína ya que la hace un candidato potencial para servir como terapia en diversas enfermedades tanto oftalmológicas como cualquiera que cursen con inflamación, angiogénesis y desepitelización.

XII. CONCLUSIÓN

Los FLC cultivados sobre membrana amniótica desepitelizada o con el medio condicionado disminuyen la secreción de citocinas pro-inflamatorias, la expresión de los PRR y la translocación nuclear de NF- κ B; asimismo inducen la secreción de IFN- β y la translocación nuclear de IRF3 e IRF7. Este efecto inmunorregulador se debe a los factores solubles que libera la membrana amniótica, dentro de los cuales se encuentra lumican, una molécula con características anti-inflamatorias, anti-angiogénicas y pro-epitelizantes.

XIII. PERSPECTIVAS

- a) Incubar los FLC con lumican para determinar si genera cambios morfológicos, pérdida de adherencia celular o disminución de moléculas de adhesión en los FLC.
- b) Estimular los FLC con poli I:C e incubarlos con lumican para determinar si se disminuye la respuesta inmune innata de los FLC.
- c) Aplicar el tratamiento de lumican a ratones con queratitis estromal herpética para identificar si disminuyen las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

XIV. REFERENCIAS

1. DelMonte, D.W. and T. Kim, *Anatomy and physiology of the cornea*. Journal of Cataract & Refractive Surgery, 2011. **37**(3): p. 588-598.
2. Mantelli, F., et al., *The cellular mechanisms of dry eye: From pathogenesis to treatment*. Journal of Cellular Physiology, 2013. **228**(12): p. 2253-2256.
3. Dua, H.S. and A. Azuara-Blanco, *Limbal Stem Cells of the Corneal Epithelium*. Survey of Ophthalmology, 2000. **44**(5): p. 415-425.
4. Tseng, S.C.G. and K. Tsubota, *Important Concepts for Treating Ocular Surface and Tear Disorders*. American Journal of Ophthalmology, 1997. **124**(6): p. 825-835.
5. Krishnan, N.R. and A.S. Kasthuri, *Iatrogenic Disorders*. Medical Journal, Armed Forces India, 2005. **61**(1): p. 2-6.
6. Farooq, A.V. and D. Shukla, *Herpes Simplex Epithelial and Stromal Keratitis: An Epidemiologic Update*. Survey of Ophthalmology, 2012. **57**(5): p. 448-462.
7. Hendricks, R.L. and T.M. Tumpey, *Contribution of virus and immune factors to herpes simplex virus type I-induced corneal pathology*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1990. **31**(10): p. 1929-1939.
8. Kaye, S. and A. Choudhary, *Herpes simplex keratitis*. Progress in Retinal and Eye Research, 2006. **25**(4): p. 355-380.
9. Tullo, A., *Pathogenesis and management of herpes simplex virus keratitis*. Eye, 2003. **17**(8): p. 919-922.
10. Beutler, B., et al., *Genetic analysis of resistance to viral infection*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 753-766.
11. Thomas, J., et al., *On the essential involvement of neutrophils in the immunopathologic disease: herpetic stromal keratitis*. The Journal of Immunology, 1997. **158**(3): p. 1383-1391.

12. Sarangi, P.P., et al., *Innate Recognition Network Driving Herpes Simplex Virus-Induced Corneal Immunopathology: Role of the Toll Pathway in Early Inflammatory Events in Stromal Keratitis*. Journal of Virology, 2007. **81**(20): p. 11128-11138.
13. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin, *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. Nature, 2006. **442**(7098): p. 39-44.
14. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. International Immunology, 2005. **17**(1): p. 1-14.
15. Kenny, E.F. and L.A.J. O'Neill, *Signalling adaptors used by Toll-like receptors: An update*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 342-349.
16. Yoneyama, M., et al., *Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(5): p. 2851-2858.
17. Rothenfusser, S., et al., *The RNA Helicase Lgp2 Inhibits TLR-Independent Sensing of Viral Replication by Retinoic Acid-Inducible Gene-1*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(8): p. 5260-5268.
18. Liu, Y., et al., *Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecule Expression Mediated by MAPKs in Human Corneal Fibroblasts Exposed to Poly(I:C)*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2008. **49**(8): p. 3336-3344.
19. Zhou, Y., et al., *Activation of Toll-like receptors inhibits herpes simplex virus-1 infection of human neuronal cells*. Journal of Neuroscience Research, 2009. **87**(13): p. 2916-2925.
20. Azuara-Blanco, A., C.T. Pillai, and H.S. Dua, *Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction*. British Journal of Ophthalmology, 1999. **83**(4): p. 399-402.
21. van Herendaal, B.J., C. Oberti, and I. Brosens, *Microanatomy of the human amniotic membranes*. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 1978. **131**(8): p. 872-880.

22. Seitz, B., et al., *Histopathology and ultrastructure of human corneas after amniotic membrane transplantation*. Archives of Ophthalmology, 2006. **124**(10): p. 1487-1490.
23. Malak, T.M., et al., *Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes*. Placenta, 1993. **14**(4): p. 385-406.
24. Mehta, J.S., et al., *Analysis of Matrix Proteins, Growth Factors and Membrane Surface in Commercial Available Freeze-Dried Amniotic Membrane*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2008. **49**(13): p. 5745-5745.
25. Fukuda, K., et al., *Differential Distribution of Subchains of the Basement Membrane Components Type IV Collagen and Laminin Among the Amniotic Membrane, Cornea, and Conjunctiva*. Cornea, 1999. **18**(1): p. 73-79.
26. Sabella, N., *Use of the Fetal Membranes in Skin Grafting*. Medication Reconciliation NY, 1913. **83**: p. 478-480.
27. de RÖ, T.A., *Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes*. Archives of Ophthalmology, 1940. **23**(3): p. 522-525.
28. Sorsby, A., J. Haythorne, and H. Reed, *Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye*. British Journal of Ophthalmology, 1947. **31**(7): p. 409-418.
29. Kim, J.C. and S.C.G. Tseng, *Transplantation of Preserved Human Amniotic Membrane for Surface Reconstruction in Severely Damaged Rabbit Corneas*. Cornea, 1995. **14**(5): p. 473-484.
30. Kruse, F.E., K. Rohrschneider, and H.E. Völcker, *Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers*. Ophthalmology, 1999. **106**(8): p. 1504-1511.
31. Prabhasawat, P., N. Tesavibul, and W. Komoluradej, *Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation*. British Journal of Ophthalmology, 2001. **85**(12): p. 1455-1463.

32. Shimmura, S., et al., *Antiinflammatory Effects of Amniotic Membrane Transplantation in Ocular Surface Disorders*. *Cornea*, 2001. **20**(4): p. 408-413.
33. Chávez-García, C., et al., *Ophthalmic indications of amniotic membrane transplantation in Mexico: an eight years Amniotic Membrane Bank experience*. *Cell and Tissue Banking*, 2016. **17**(2): p. 261-268.
34. Hampson, V., et al., *Amniotic membrane collagen content and type distribution in women with preterm premature rupture of the membranes in pregnancy*. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 1997. **104**(9): p. 1087-1091.
35. Halfter, W., et al., *Collagen XVIII Is a Basement Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(39): p. 25404-25412.
36. O'Reilly, M.S., et al., *Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth*. *Cell*, 1997. **88**(2): p. 277-285.
37. Koizumi, N., et al., *Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane*. *Current Eye Research*, 2000. **20**(3): p. 173-177.
38. Mehta, J.S., et al., *Modification of Human Amniotic Membrane as a Carrier for Stem Cell Transplantation*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2007. **48**(13): p. 453-453.
39. Kim, J.S., et al., *Amniotic Membrane Patching Promotes Healing and Inhibits Proteinase Activity on Wound Healing Following Acute Corneal Alkali Burn*. *Experimental Eye Research*, 2000. **70**(3): p. 329-337.
40. Hao, Y., et al., *Identification of Antiangiogenic and Antiinflammatory Proteins in Human Amniotic Membrane*. *Cornea*, 2000. **19**(3): p. 348-352.
41. Ueta, M., et al., *Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005. **331**(1): p. 285-294.

42. Ueta, M., et al., *Contribution of IPS-1 to polyI:C-induced cytokine production in conjunctival epithelial cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **404**(1): p. 419-423.
43. Kimura, K., et al., *Identification of common secreted factors in human corneal fibroblasts exposed to LPS, poly(I:C), or zymosan*. Experimental Eye Research, 2012. **96**(1): p. 157-162.
44. Liu, Y., et al., *Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecule Expression Mediated by MAPKs in Human Corneal Fibroblasts Exposed to Poly(I:C)*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2008. **49**(8): p. 3336-3344.
45. Heiligenhaus, A., et al., *Improvement of HSV-1 Necrotizing Keratitis with Amniotic Membrane Transplantation*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2001. **42**(9): p. 1969-1974.
46. Bauer, D., et al., *Amniotic Membrane Transplantation Induces Apoptosis in T Lymphocytes in Murine Corneas with Experimental Herpetic Stromal Keratitis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009. **50**(7): p. 3188-3198.
47. Heiligenhaus, A., et al., *Transplantation of Amniotic Membrane in Murine Herpes Stromal Keratitis Modulates Matrix Metalloproteinases in the Cornea*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005. **46**(11): p. 4079-4085.
48. Solomon, A., et al., *Suppression of interleukin 1 α and interleukin 1 β in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix*. British Journal of Ophthalmology, 2001. **85**(4): p. 444-449.
49. Ueta, M., et al., *Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction*. Clinical & Experimental Immunology, 2002. **129**(3): p. 464-470.
50. Zhou, S., J. Chen, and J. Feng, *The effects of amniotic membrane on polymorphonuclear cells*. Chinese medical journal, 2003. **116**(5): p. 788-790.

51. Garfias, Y., et al., *Amniotic Membrane is an Immunosuppressor of Peripheral Blood Mononuclear Cells*. Immunological Investigations, 2011. **40**(2): p. 183-196.
52. Li, W., et al., *Basement Membrane Dissolution and Reassembly by Limbal Corneal Epithelial Cells Expanded on Amniotic Membrane*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006. **47**(6): p. 2381-2389.
53. Serna Ojeda, Juan Carlos, *Análisis de los resultados a corto plazo del trasplante alogénico de células troncales expandidas in vitro con fenotipo ABCB5+/p63+ en pacientes con deficiencia bilateral de células de limbo* (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, 2017.
54. Lee, S.-B., et al., *Suppression of TGF- β signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane*. Current Eye Research, 2000. **20**(4): p. 325-334.
55. Liu, T., et al., *Amniotic membrane traps and induces apoptosis of inflammatory cells in ocular surface chemical burn*. Molecular Vision, 2012. **18**: p. 2137-2146.
56. Breborowicz, A., et al., *Synthesis of hyaluronic acid by human peritoneal mesothelial cells: effect of cytokines and dialysate*. Peritoneal Dialysis International, 1996. **16**(4): p. 374-378.
57. Iannitti, T., D. Lodi, and B. Palmieri, *Intra-Articular Injections for the Treatment of Osteoarthritis*. Drugs in R & D, 2011. **11**(1): p. 13-27.
58. Kikuchi, T., H. Yamada, and M. Shimmei, *Effect of high molecular weight hyaluronan on cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage, 1996. **4**(2): p. 99-110.
59. Presti, D. and J.E. Scott, *Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH \cdot) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass*. Cell Biochemistry and Function, 1994. **12**(4): p. 281-288.
60. Raouf, A., et al., *Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix*. Matrix Biology, 2002. **21**(4): p. 361-367.

61. Schaefer, L. and R.V. Iozzo, *Biological Functions of the Small Leucine-rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(31): p. 21305-21309.
62. Hay, E.D., *Development of the Vertebrate Cornea*. International Review of Cytology, 1980. **63**: p. 263-322.
63. Chakravarti, S., et al., *Lumican Regulates Collagen Fibril Assembly: Skin Fragility and Corneal Opacity in the Absence of Lumican*. The Journal of Cell Biology, 1998. **141**(5): p. 1277-1286.
64. Chakravarti, S., et al., *Corneal Opacity in Lumican-Null Mice: Defects in Collagen Fibril Structure and Packing in the Posterior Stroma*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2000. **41**(11): p. 3365-3373.
65. Yeh, L.-K., et al., *Soluble Lumican Glycoprotein Purified from Human Amniotic Membrane Promotes Corneal Epithelial Wound Healing*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005. **46**(2): p. 479-486.
66. Saika, S., et al., *Role of Lumican in the Corneal Epithelium during Wound Healing*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(4): p. 2607-2612.
67. Brézillon, S., et al., *Lumican core protein inhibits melanoma cell migration via alterations of focal adhesion complexes*. Cancer Letters, 2009. **283**(1): p. 92-100.
68. Zeltz, C., et al., *Lumican inhibits cell migration through $\alpha 2\beta 1$ integrin*. Experimental Cell Research, 2010. **316**(17): p. 2922-2931.
69. Albig, A.R., et al., *Transcriptome analysis of endothelial cell gene expression induced by growth on matrigel matrices: identification and characterization of MAGP-2 and lumican as novel regulators of angiogenesis*. Angiogenesis, 2007. **10**(3): p. 197-216.
70. Vij, N., et al., *Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas–Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea*. Experimental Eye Research, 2004. **78**(5): p. 957-971.

71. Helwani, F.M., et al., *Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization*. The Journal of Cell Biology, 2004. **164**(6): p. 899-910.
72. Suraneni, P., et al., *The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration*. The Journal of Cell Biology, 2012.
73. Lee, H., et al., *Disruption of Microtubules Sensitizes the DNA Damage-induced Apoptosis Through Inhibiting Nuclear Factor κ B (NF- κ B) DNA-binding Activity*. J Korean Med Sci, 2010. **25**(11): p. 1574-1581.
74. Griffith, T.S., et al., *Fas Ligand-Induced Apoptosis as a Mechanism of Immune Privilege*. Science, 1995. **270**(5239): p. 1189-1192.
75. Bellgrau, D., et al., *A role for CD95 ligand in preventing graft rejection*. Nature, 1995. **377**(6550): p. 630-632.
76. Stuart, P.M., et al., *FasL-Fas Interactions Regulate Neovascularization in the Cornea*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2003. **44**(1): p. 93-98.



Amniotic membrane modulates innate immune response inhibiting PRRs expression and NF- κ B nuclear translocation on limbal myofibroblasts



Domínguez-López Alfredo^{a, c}, Bautista-de Lucio Victor Manuel^a, Serafin-López Janet^b, Robles-Sánchez Edson^{a, c}, Garfias Yonathan^{a, c, *}

^a Research Unit, Institute of Ophthalmology Conde de Valenciana Foundation, Chimalpopoca 14, 06800 Mexico City, Mexico

^b Department of Immunology, National School of Biological Sciences, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, 11340 Mexico City, Mexico

^c Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Insurgentes Sur 3000, 04510 Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2014

Accepted in revised form 2 August 2014

Available online 10 August 2014

Keywords:

TLR-3

MDA-5

RIG-1

inflammatory cytokines

amniotic membrane

limbal myofibroblasts

ABSTRACT

Corneal damage observed in a viral infection such as herpetic stromal keratitis is mainly caused by proinflammatory molecules released by resident cells in the response to viral antigens. There are pattern recognition receptors like MDA5, RIG-1, and TLR3, that recognize viral dsRNA and after activation, the innate immune response is exacerbated inducing the synthesis and secretion of inflammatory cytokines through NF- κ B activation. Amniotic membrane (AM) has demonstrated to reduce inflammation by several mechanisms, however the effect of AM on innate immune receptors such as MDA5, RIG-1, and TLR3 has not been reported. In this study, we have determined that the presence of AM significantly inhibited the synthesis and secretion of proinflammatory cytokines on human limbal myofibroblasts (HLM) stimulated with poly I:C. Similarly, the presence of AM reduced the protein expression of MDA5, RIG-1, and TLR3 on poly I:C stimulated HLM. Additionally, the presence of the AM significantly inhibited the NF- κ B nuclear translocation when the HLM were poly I:C stimulated, and concomitantly, the AM was able to relocate cadherins affecting the myofibroblastic cellular morphology. These results suggest that AM generates an anti-inflammatory microenvironment, and specific inhibition of NF κ B nuclear translocation on infected corneal tissue would reduce the inflammation undesirable effects, explaining in part the beneficial usefulness of transplanting AM on herpetic stromal keratitis.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Herpes simplex virus-1 (HSV-1) can cause a severe inflammatory disease in cornea known as herpetic stromal keratitis (HSK) that may induce corneal opacity and loss of vision, considered the major cause of blindness worldwide. A corneal damage is mainly caused by proinflammatory molecules generated during exacerbated immune response directed against viral components (Meyers-Elliott and Chitjian, 1981; Hendricks and Tumpey, 1990; Streilein et al., 1997).

Innate immunity is the first line of defense against corneal infection. In response to virus infections, viral components such as RNA and DNA are recognized by Toll-like receptors (TLRs) and retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1)-like receptors (RLRs) (Philpott et al., 2001; Kawai and Akira, 2009). A potent inducer of antiviral defense mechanisms is the double-stranded RNA (dsRNA), which represents the genome of some viruses and is also a molecule formed by most viruses during their replication cycle (Samuel, 2001). Some receptors that sense dsRNA are Toll Like Receptor-3 (TLR-3), which resides in endosomal compartments and thus recognizes dsRNA taken up from the environment; other cytoplasmic receptors that sense dsRNA are the melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA-5) and the retinoic acid inducible gene-1 (RIG-1), which monitor viral replication within the cell. Upon ligand binding, dsRNA receptors activate by one hand interferon-regulating factors-3 and -7 (IRF-3 and -7), which promote transcription of type I interferons (IFN) such as IFN- α and IFN-

* Corresponding author. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Insurgentes Sur 3000, 04510 Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 56232169.

E-mail addresses: yogarfas@yahoo.com, yogarfas@institutodeoftalmologia.org (G. Yonathan).

β , and by the other hand activate the nuclear factor- κ B (NF κ B) favoring the production of proinflammatory cytokines (Kawai et al., 2005; Hirata et al., 2007; Kanneganti, 2010). In this context, it has been described that NF κ B is an important molecule in cell activation process throughout maintaining cell morphology, showing a close relationship with extracellular cell–cell contact molecules such as cadherins. Cadherins are transmembrane proteins expressed at the cell surface, which directly interact with cytoskeleton proteins leading to a correct cell–cell communication and consequently an appropriate cellular activation (Schmidmaier and Baumann, 2008). Therefore maintenance in the cell signaling mediated by dsRNA receptors results in an exacerbation in the inflammation response. Thus inhibiting this inflammatory mechanism would moderate the severe consequences observed in HSK.

It is known that corticosteroids, antivirals and cyclosporine A are effective to treat HSK and amniotic membrane transplantation (AMT) has been used as an adjuvant in necrotizing HSK in combination with continued use of steroids and antivirals (Knickelbein et al., 2009). Moreover, it has been reported that AMT alone is effective to treat patients with acute ulcerative and necrotizing herpetic keratitis (Heiligenhaus et al., 2003). Also, AMT has been successfully used to treat persistent corneal ulcers of different causes, including HSK (Kim and Tseng, 1995; Lee and Tseng, 1997; Hanada et al., 2001). Additionally, it has recently been reported that AMT is a surgical technique that should be considered in the management of refractory neurotrophic corneal ulcers, in which herpetic keratitis is one of the most common causes (Sacchetti and Lambiase, 2014). Amniotic membrane (AM) is the inner layer of the placenta, which is in contact to the fetus, consists of a thin basement membrane and an avascular stromal matrix (van Herendael et al., 1978). It has been reported that AMT promotes epithelialization, inhibits angiogenesis and diminishes ocular inflammation (Mamede et al., 2012). Additionally, it has been shown that ulcerating necrotizing HSK rapidly improves after AMT (Bauer et al., 2009; Liu et al., 2012). Although several anti-inflammatory mechanisms of action of the AM have been described (Mamede et al., 2012), its role on inhibiting the innate immunity response through the inhibition of TLR-3, MDA-5 and RIG-1 has not been studied. In the present study, we investigated the effect of AM in the synthesis and secretion of proinflammatory cytokines and in the synthesis and secretion of IL1Ra which is an anti-inflammatory cytokine, as well as its contribution on TLR-3, MDA-5 and RIG-1 expression under a dsRNA synthetic analog poly I:C stimulus on human limbal myoblasts. Also, the effect of this fetal membrane was evaluated on the NF- κ B nuclear translocation and cadherins cellular distribution.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), glycerol, trypan blue dye, penicillin, streptomycin, bovine serum albumin (BSA) (Sigma, MO, USA); fetal bovine serum (FBS), 0.25% trypsin-0.5% EDTA, dispase II, collagenase type II, (Gibco, CA, USA). Polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) (InvivoGen, CA, USA). Polytetrafluoroethylene (PTFE) hydrophilic membrane cell culture plate inserts (12 mm) (Millipore, MA, USA). Polycarbonate hydrophilic membrane cell culture plate inserts (24 mm) and 6 and 24-flat-cell culture well plates (Corning, NY, USA). RNeasy Mini Kit and Omniscript kit (Qiagen, Hilden, Germany). Purified rabbit anti-MDA5, anti-RIG-1, anti-TLR3 and mouse anti-pan cadherin antibodies (Abcam, Cambridge, England). Purified goat anti-NF- κ B antibody (Santa Cruz, TX, USA). AlexaFluor488-conjugated goat anti-rabbit and AlexaFluor594-conjugated goat

anti-mouse antibodies (Life Technologies, CA, USA). Fluorescein-conjugated rabbit anti-goat and Vectashield- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)(Vector Laboratories, CA, USA).

2.2. Tissue preparation

Amniotic membrane (AM) was obtained after elective cesarean section; informed consent was obtained from the donor, and preserved at -80°C as previously reported (Madhavan et al., 2002). Prior to use, the AM pieces were thawed at room temperature; the pieces were used as denuded (see later). All AM fragments were fastened with the stromal surface upwards and attached to the culture plate insert with a rubber band (previously the hydrophilic membrane was removed from the insert) and placed into a 6 or 24-flat-well plate.

2.3. De-epithelization of amniotic membrane (Denuded AM)

After thawing, intact AM pieces were incubated with dispase II (1.7 IU/mL) for 30 min at 37°C . Amniotic epithelium was carefully removed using a rubber policeman. De-epithelization was confirmed under light microscopy and over 98% of the membrane was de-epithelized.

2.4. Human limbal myofibroblasts isolation

Human limbal myofibroblasts (HLM) were isolated from cadaveric sclera-corneal rims. The tissues were incubated with dispase II (1.7 IU/mL) for 1 h at 37°C ; after incubation, the epithelium, the endothelium and the Descemet's membrane were carefully removed; the remaining tissue was digested with collagenase 2 (0.75 mg/mL) for 18 h at 37°C . After digestion, the cells were pooled out by centrifugation at $200 \times g$ for 5 min at 4°C , a pellet was obtained and 4^5 isolated keratocytes were expanded on a 25 cm^2 cell culture bottle and cultured and differentiated onto myofibroblasts with DMEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C , with an atmosphere of 5% CO_2 and 95% of humidity; the medium was changed every other day until the cells reached 90% of confluence. Myofibroblasts phenotype was confirmed by the presence of alpha-SMA. All experiments were performed at 2–4 passages.

2.5. Poly I:C stimulation

The cells (10^5 cells per well) were cultured on a 24-flat-cell culture well plate until they were attached. The medium was replaced with DMEM/F12 without FBS and the cells were cultured for 12 additional hours prior to poly I:C stimulation, to adjust the basal cytokine production. Both, transcripts and proteins from interleukin (IL)-6 and IL-8 were used to determine the appropriate poly I:C concentration (0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$) and stimulation time (6, 12, 24 and 48 h) to induce a significant proinflammatory response. After testing different doses of poly I:C and stimulation time points, a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ for 12 h was chosen for the subsequent assays.

2.6. Cell culture conditions

To identify the cytokines in the supernatants, the expression of PRRs on HLM and production of mRNAs of cytokines, the assays were performed on 24-flat-cell culture well plates. The cells (10^5 cells per well) were stimulated with 10 $\mu\text{g/mL}$ of poly I:C for 12 h either in the presence or not of AM, as previously described with slight modifications (Garfias et al., 2011). At the end of the stimulation period, the supernatants were collected and preserved

at -80°C until use. One cell portion was obtained and stained for flow cytometry and the other portion was used to isolate RNA. To identify the NF- κ B nuclear translocation and the distribution of cadherins, the cells (10^4 cells per well) were cultured on poly-L-lysine coated coverslips, after the cells attached to the coverslips, they were placed into 6-flat-cell culture well plates and subsequently stimulated or not with $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ of poly I:C at different times in the presence or absence of AM.

2.7. Transcript identification

Total RNA was isolated from HLM poly I:C stimulated or not, cultured in the presence of AM or not. The RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit as indicated by the manufacturer. An Omniscript kit was used for retrotranscription reactions using $200\ \text{ng}$ of total RNA. To identify amplicons, specific primers for PCR were used as indicated in Table 1 β 2-microglobulin (β 2 m) gene was used as a housekeeping gene. The PCR products were visualized in 1.5% agarose ethidium bromide gels. Images were captured and digitalized using G-Box system and Gene Snap Software version 7.12.06 (Syngene, London, UK).

2.8. Cytokine protein identification

The secreted cytokines from HLM poly I:C stimulated or not, cultured in the presence of AM or not, were identified by means of a protein array using the Human Cytokine Array panel A (R&D Systems, MN, USA) as indicated by the manufacturer. Briefly, the supernatants were thawed at room temperature and were incubated with a detection biotinylated-antibodies mix for 1 h at room temperature (RT). The sensitized nitrocellulose membranes were incubated with a blocking solution for 1 h at RT and were washed three times with washing buffer. The membranes were incubated with both the antibodies mix and the supernatants overnight at 4°C ; after incubation, the membranes were washed three times with washing buffer and were incubated with horseradish peroxidase-streptavidin for 30 min at RT; finally, enhanced chemiluminescence (ECL Plus, Amersham, Piscataway, NJ) was used to develop the reaction. Images were captured and digitalized using G-Box system and Gene Snap Software version 7.12.06 (Syngene, London, UK). Integrated density values were calculated for each spot (area time relative intensity). Positive control signal on each independent membrane was used to normalize cytokine signal densities. Negative control signal on each independent membrane was used to subtract the background.

2.9. Flow cytometry assays

Flow cytometry assays were carried out to identify the protein expression of the MDA5, RIG-1 and TLR3 on HLF. Briefly, the cells

were harvested and fixed with 4% *p*-formaldehyde for 10 min at 4°C , the cells were washed with phosphate buffer saline (PBS), and incubated with permeabilization buffer (1% saponin, 10% bovine serum albumin and 0.1% NaN_3) for 20 min at RT with constant agitation. The cells were incubated with rabbit anti human MDA-5, RIG-1 and TLR-3 antibodies for 15 min at 4°C , afterward, the cells were washed with permeabilization buffer and incubated with AlexaFluor-488 goat anti-rabbit conjugated antibodies (1:200) for 15 min at 4°C in the dark. Finally, 10^4 cells were acquired by a FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, CA, USA) and analyzed using the CellQuest Software (BD).

2.10. Immunofluorescence staining

Immunofluorescence staining assay was performed to identify the NF- κ B nuclear translocation and cadherins distribution. Briefly, the cells were cultured on poly-L-lysine coated coverslips as previously described. Subsequently, the cells were fixed with 4% *p*-formaldehyde for 10 min at 4°C and were washed with PBS, and incubated with blocking buffer (0.5% TritonX-100, 5% BSA in PBS) 1 h at RT and then incubated with goat anti-NF- κ B or mouse anti-pan cadherin antibodies at 4°C overnight. After washing with PBS, the cells were incubated with fluorescein-conjugated rabbit anti-goat or Alexa Fluor-594 conjugated goat anti-mouse antibodies for 2 h at 4°C . The cells were washed with PBS and mounted with Vectashield-DAPI and observed with an ApoTome II microscope, and analyzed using Axiovision software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.11. Statistical analysis

The data acquired were assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni correction test. The data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All statistics were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad, CA, USA).

3. Results

3.1. Amniotic membrane inhibited the synthesis and secretion of proinflammatory cytokines secreted by poly I:C stimulated human limbal myofibroblasts

In order to determine whether the Human Limbal Myofibroblasts (HLM) were capable to secrete proinflammatory cytokines in the presence of the synthetic dsRNA analog poly I:C, the supernatants from both poly I:C stimulated and non-stimulated HLM, were analyzed by means of cytokines arrays. Protein arrays were performed using the supernatants pooled of at least three different assays; three independent protein arrays were performed for each condition. As expected, poly I:C stimulation exerted an increase on the proinflammatory cytokines released by HLM; though, only nine (CCL1, CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL8, CXCL10, G-CSF, IL-6 and IL-1ra) out of the 36 analyzed cytokines were significantly ($p < 0.05$) increased. After demonstrating that poly I:C stimulation was able to induce a proinflammatory cytokine profile on HLM, the next step was to explore the effect of the AM on the proinflammatory profile induced by poly I:C stimulus on these cells. To investigate this effect, the supernatants from the poly I:C stimulated HLM and cultured in the presence of the AM were compared with the supernatants from the poly I:C stimulated HLM and cultured in the absence of AM; the supernatants were analyzed by means of cytokines arrays. Interestingly, the AM exerted a significant antagonistic effect on the cytokines released from poly I:C stimulated HLM. This antagonistic effect was observed in eight out of the nine

Table 1
Primers sequence used for PCR.

Gene Name	Forward	Reverse
CCL1	5'-ATGCAGATCATCACCACAGC-3'	5'-GTAACACAGGATTGCCCTCAG-3'
CCL2	5'-TCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3'	5'-CACTTGCTGCTGGTGAITCT-3'
CCL5	5'-CGCTGTCATCTCATTTGCTA-3	5'-GAGCACTTGCCTGCTGTA -3'
CXCL1	5'-AGTGGCACTGCTGCTCT -3'	5'-TGGATGTTCTTGGGGTGAAT -3'
CXCL8	5'-AAGAAACCACCGAAGGAAC-3'	5'-AAATTTGGGGTGGAAAGTT-3'
CXCL10	5'-CCATTCTGATTGCTGCTTA-3'	5'-CAAATTGGCTTGCAGGAAT-3'
G-CSF	5'-TCCAGGAGAAGCTGGTGAAGT -3'	5'-TAGAGGAAAAGGCCCTATG -3'
IL-6	5'-CTCAGCCCTGAGAAAGGAGA-3'	5'-TGATTTTACCAGGCAAGTCT-3'
IL-1ra	5'-TTGCAAGGACCAATGTCAA-3'	5'-TCTCGCTCAGTCAAGTATG-3'
β 2 m	5'-CACCCCACTGAAAAAGATG-3'	5'-ATATTAATAAAGCAAGCAAGCA-3'

cytokines that were significantly augmented by poly I:C stimulation on HLF; interestingly, AM favored the secretion of IL-1ra in poly I:C stimulated HLM. (Fig. 1)

To further validate that the increase in protein secretion after poly I:C stimulus observed in the proteome arrays was associated to an increase in protein synthesis, RT-PCR assays were performed. Interestingly, from the nine proteins that their secretion was augmented by the poly I:C stimulus identified in the proteome arrays as seen in Fig. 1, seven proteins (CCL1, CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL10, G-CSF and IL-6) showed a significant ($p < 0.05$) increase in their transcription after poly I:C stimulation. As shown in Fig. 1, there was a dramatic inhibition in the cytokines secretion when the HLM were poly I:C stimulated and cultured in the presence of AM. However, in our system it was difficult to distinguish whether the inhibition in these cytokines was due to potential captures by possible cytokine receptors present in this fetal membrane or in fact a decrease on cytokine synthesis; to solve this matter, the transcripts of the nine cytokines significantly increased by poly I:C (Fig 1) were determined by RT-PCR. Interestingly, only four (CCL1, CCL2, CXCL10 and IL-6) out of the nine studied proteins were significantly ($p < 0.05$) reduced at the transcription level when the

cells were poly I:C stimulated and seeded in the presence of AM. Indicating that AM was also able to down-regulate the proinflammatory cytokines in HLF at the transcription level. Unexpectedly, the presence of AM significantly up-regulated the transcription of G-CSF and CXCL8 ($p < 0.05$). Meanwhile, the presence of AM on the transcription of CCL5, CXCL1, and IL-1ra did not have a significant effect ($p > 0.05$). Furthermore and interestingly AM significantly induced the synthesis and secretion of IL1Ra in HLM without stimulus. (Fig. 2)

3.2. Amniotic membrane inhibited RIG-1, MDA-5 and TLR3 protein expression on human limbal myofibroblasts after poly I:C stimulation

There are some pattern recognition receptors (PPRs) that detect poly I:C such as MDA5, RIG-1 and TLR3, among others. In order to determine the effect of poly I:C on the protein expression of these receptors on HLM, intracellular flow cytometry assays were performed. MDA5, RIG-1 and TLR3 proteins presence was firstly determined in non-stimulated HLM. MDA5 and RIG-1 proteins were not present in basal conditions; meanwhile, TLR3 protein was

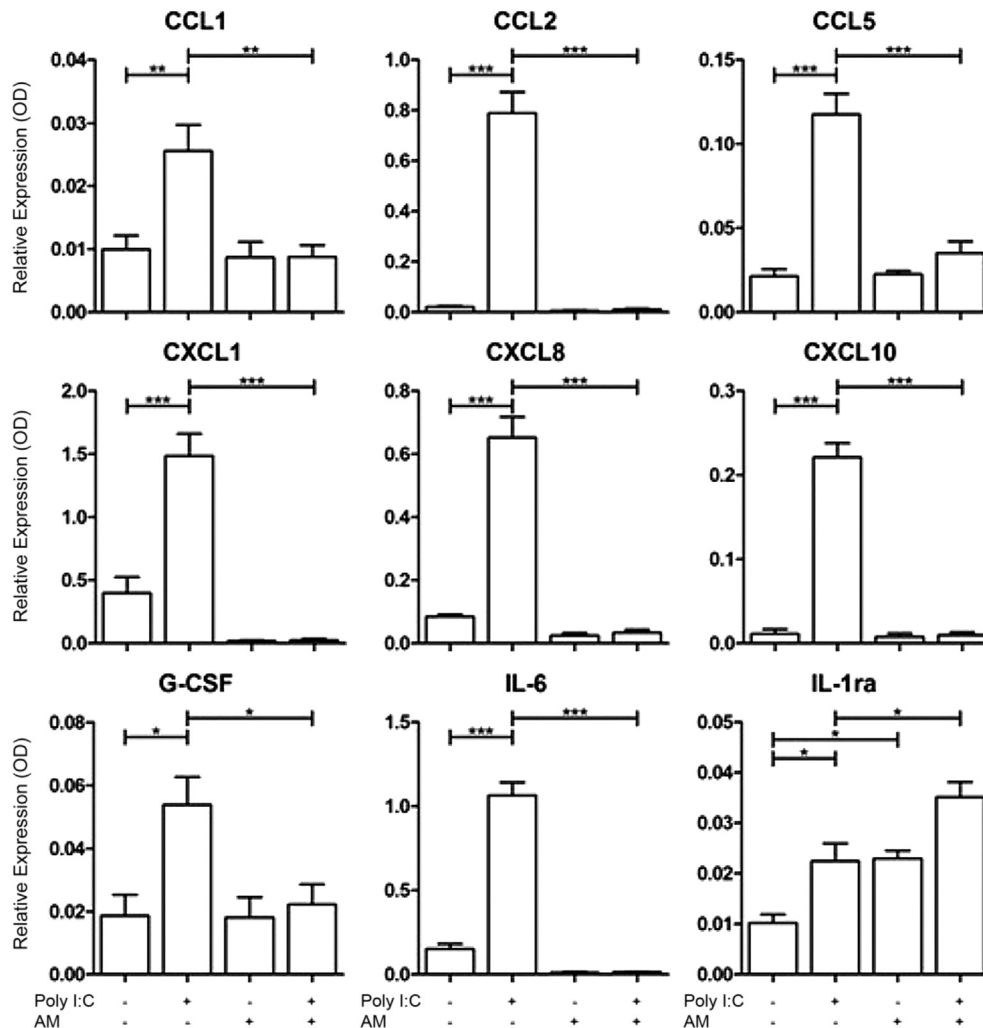


Fig. 1. The secretion of proinflammatory cytokines released by poly I:C stimulated HLM is inhibited in the presence of AM. The supernatants from each experimental condition were mixed with the detection antibodies followed by incubation with the individual blocked human cytokine array membrane overnight at 4 °C. After washing, each membrane was incubated with the biotin-conjugated secondary antibody and a final incubation was performed with streptavidin-peroxidase; the signals were detected with chemiluminescence, and images were captured and digitalized. Protein arrays were performed using the supernatants pooled of at least three different assays; three independent protein arrays were performed for each condition. The digitalized arrays data were analyzed using the GeneTools software; all data were normalized using the positive control plots included in each membrane and negative controls were used to subtract the background. The data are expressed as media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0001$.

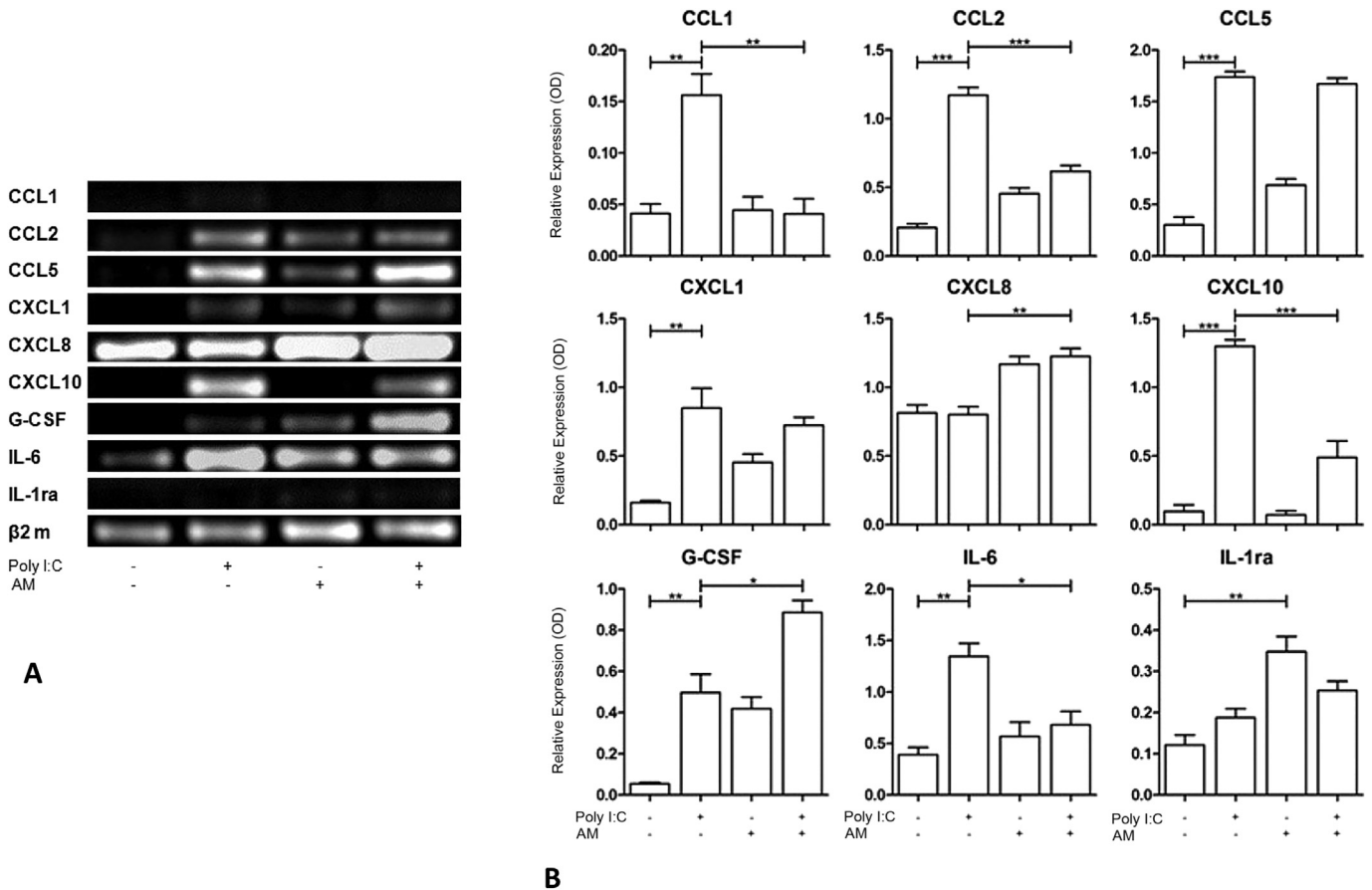


Fig. 2. AM down regulated the synthesis of pro-inflammatory cytokines released by poly I:C stimulated HLM. Total RNA was extracted from HLM exposed to different experimental procedures, cDNA was generated and PCR assays were then performed. PCR products were resolved in agarose gels and evidenced with ethidium bromide; the gels were photographed and digitalized. As shown (A), poly I:C stimulus on HLM increased the transcription of proinflammatory cytokines (lane 2). The transcription of some proteins such as CCL1, CCL2, CXCL10 and IL-6 was significantly reduced when the poly I:C stimulated HLM were cultured in the presence of AM (lane 4). In contrast to these results, AM augmented the synthesis of both CXCL8 and G-CSF and did not have a significant effect on CCL5, CXCL1 and IL-1ra transcripts when the cells were poly I:C stimulated. In order to confirm these results, densitometry analyses were performed and data were normalized using β 2 m as a constitutive gene (B). Data are representative from three independent experiments. Data are expressed as media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0001$.

constitutively present. Subsequently, the HLM were poly I:C stimulated and in contrast to MDA5 and RIG-1 protein expressions that were significantly ($p < 0.05$) up-regulated, TLR3 protein basal expression was not affected by poly I:C stimulus. (Fig. 3)

As previously described, the AM inhibited the synthesis and secretion of certain proinflammatory cytokines on poly I:C stimulated HLM; we then wondered whether this effect was related to a decrease in the protein expression of the above mentioned PRR's. MDA5, RIG-1 and TLR3 proteins were totally inhibited in both non-stimulated and poly I:C stimulated HLM groups. (Fig. 3)

3.3. NF- κ B nuclear translocation of poly I:C stimulated human limbal myofibroblasts is reduced by AM

It has been widely demonstrated that MDA5, RIG-1 and TLR3 transduce signals through NF- κ B activation and this signal transduction drives the synthesis and secretion of proinflammatory cytokines. We then inquired whether the nuclear translocation of NF- κ B on poly I:C stimulated HLM was affected by the presence of AM. As anticipated, poly I:C induced a time dependent NF- κ B nuclear translocation in HLM. After 20 min of poly I:C stimulus, the NF- κ B protein was found in vesicles homogeneously distributed in the cytoplasm; after 40 min of poly I:C stimulus, the distribution of the NF- κ B was mostly perinuclear; while a slight presence of nuclear NF- κ B was determined after 60 min of stimulation; at 90 min after

poly I:C stimulus there was a weak homogeneously nuclear presence of NF- κ B protein; meanwhile, after 120 min of poly I:C stimulation, a strong presence was exclusively found in the nucleus; however at 150 min after stimulus the nuclear presence of NF- κ B was reduced and a cytoplasmic re-distribution was also detected. Suggesting that at this time point, NF- κ B was recirculating into the cytoplasm. Interestingly, when the HLM were poly I:C stimulated for 120 min (time in which the NF- κ B was exclusively expressed into the nucleus) in the presence of AM, the nuclear translocation of NF- κ B was considerably diminished and its presence was also detected in the cytoplasm, suggesting that AM is able to inhibit the NF- κ B nuclear translocation process. (Fig. 4)

3.4. Amniotic membrane affected HLM cell morphology and cadherin organization

When the HLM were seeded on poly-L-lysine coated coverslips, these cells showed a flattened triangular cell body compatible to myofibroblasts morphology, meanwhile, when the cells were seeded in the presence of AM, they adopted a rounded-morphology, this effect was observed as early as 2 h of interaction with the AM. To detect whether this morphology alteration was related to cell-cell interactions, we analyzed the organization of cadherins in the presence or absence of AM. Prominent distribution of cadherins at regions of cell-cell contact was evident

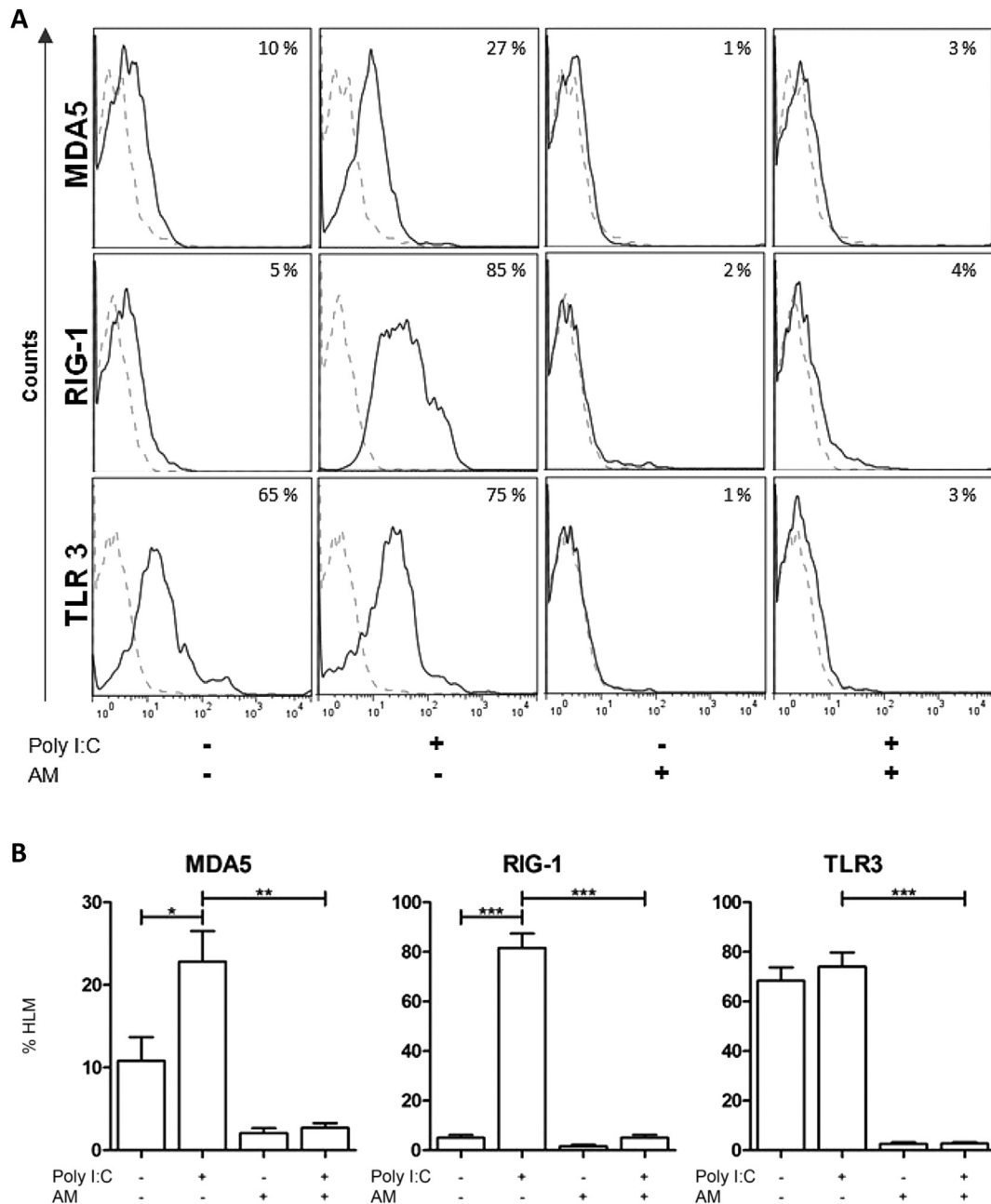


Fig. 3. Poly I:C stimulation induced MDA5 and RIG-1 protein expression on HLM. HLM were stimulated or not with poly I:C and cultured either in the presence or absence of AM and intracellularly stained against MDA5, RIG-1 and TLR3. After staining, the cells were acquired and analyzed by flow cytometry. (A) Histograms of cells stained with anti-MDA5, -RIG-1 and -TLR-3. Dashed lines represent isotype controls, continuous lines represent the cells stained with the corresponding antibodies, inner numbers represent the percentage cell numbers with respect to the isotype control. (B) Comparison between the frequencies of MDA5, RIG-1 and TLR3 positive cells under different experimental conditions. Histograms are representative from three independent assays. The data are expressed as media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0001$.

when the cells were cultured on poly-L-lysine coated coverslips, in contrast to the cells exposed to AM for 2 h, in which the distribution of cadherins was not confined to the cell–cell contact border, and it seemed to be internalized. (Fig. 5)

4. Discussion

It has been reported that AMT is effective to treat HSK (Heiligenhaus et al., 2001, 2003); most of the AM actions in HSK could be related to anti-inflammatory effects such as suppressing lymphocytic reactions, inducing lymphocytes apoptosis, entrapping different inflammatory cells and inducing their apoptosis as

well as reducing local T helper cell immune responses (Ueta et al., 2002; Bauer et al., 2009; Garfias et al., 2011; Liu et al., 2012), among others. Persistent inflammation delays epithelization and accelerates ulceration in which AMT is able to considerably reduce inflammation complications (Liu et al., 2012). Cumulative evidences of AMT anti-inflammatory activities have been proposed, however its action on innate immune receptors such as PRRs remains unknown. In the present study we have determined that AM was able to reduce the synthesis and secretion of proinflammatory cytokines when HLM were poly I:C stimulated. PRRs such as MDA5, RIG-1 and TLR3 are receptors that recognize viral dsRNA as well as poly I:C, and after ligand recognition, proinflammatory cytokines as

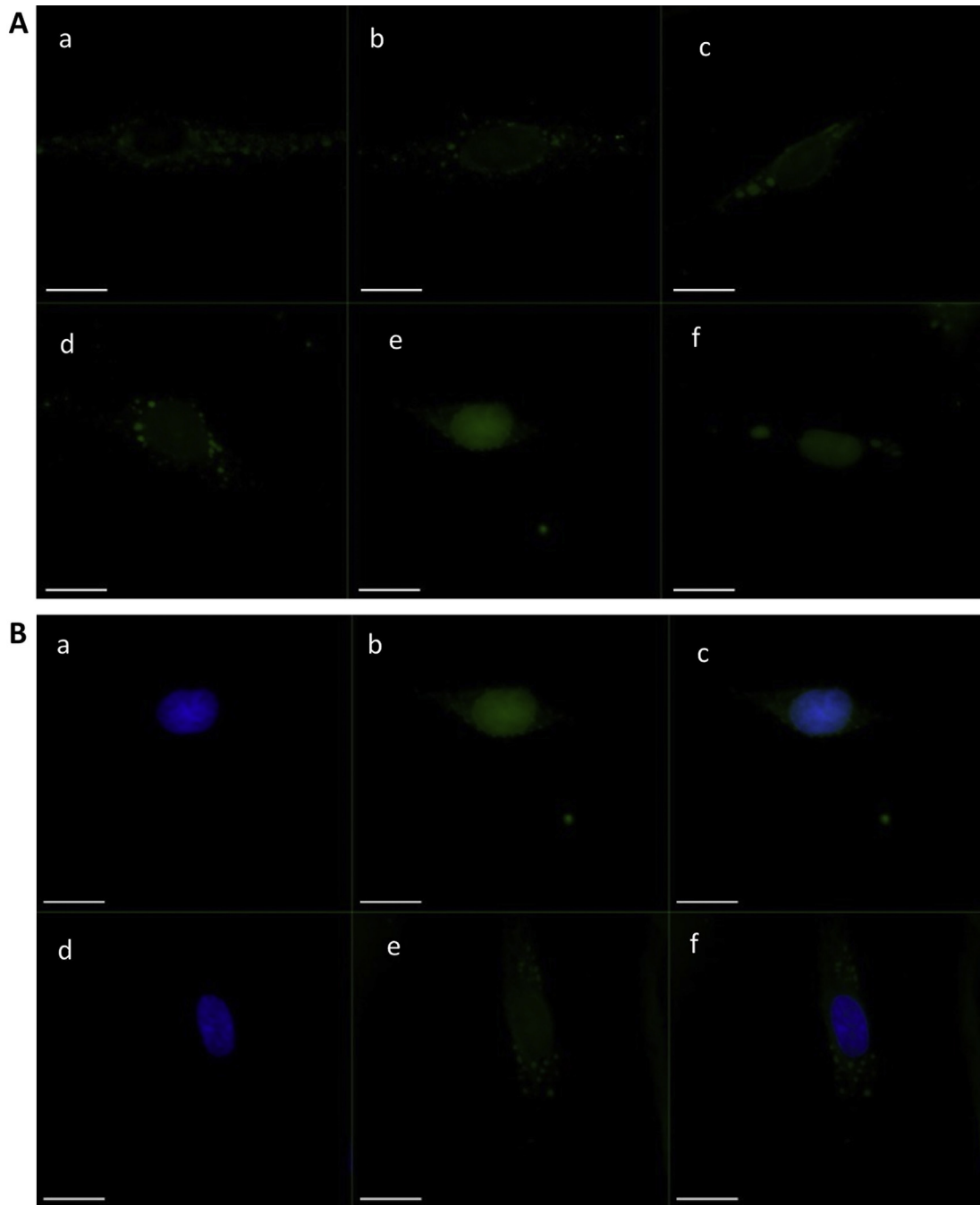


Fig. 4. NF- κ B nuclear translocation from poly I:C stimulated HLM is reduced by AM. HLM were poly I:C stimulated during different time points and after stimulation, the cells were immunostained for NF- κ B and fluorescence microscopy was performed. (A) Micrographs of HLM stimulated with 10 μ g/ml of poly I:C during 20 min (a); 40 min (b); 60 min (c); 90 min (d); 120 min (e), and 150 min (f). (B) Micrographs of HLM stimulated with 10 μ g/ml of poly I:C for 120 min in the absence of AM (a, b and c) and in the presence of AM (d, e and f). Cells stained with DAPI to observe nuclei (a and d); cells stained with NF- κ B (b and e); DAPI and NF- κ B merged (c and f). These are representative images of three independent assays. Scale bars represent 20 μ m.

well as anti-viral interferons are synthesized and secreted (Kawai et al., 2005; Hirata et al., 2007; Kawai and Akira, 2009; Kanneganti, 2010). Hereby, HLM were able to secrete proinflammatory cytokines under poly I:C stimulus, suggesting that these cells could respond to viral antigens through PRRs, these results are in accordance to those described by Liu et al., who determined that human corneal fibroblasts responded to poly I:C stimulus increasing proinflammatory cytokines through TLR3 (Liu et al., 2008). In this context, it has been reported that corneal

myofibroblasts express TLR3 and under a poly I:C stimulus, these cells are able to secrete chemokines (Ebihara et al., 2007, 2011). In agreement with these results, the stimulus with poly I:C on HLM induced the secretion of only nine out of the 36 analyzed cytokines, and interestingly, these cytokines were preferentially proinflammatory chemokines such as CCL1, CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL8 and CXCL10, two inflammatory cytokines such as G-CSF and IL-6, and one anti-inflammatory protein IL-1ra. When it was analyzed the effect of poly I:C on HLM on the synthesis of these proteins by

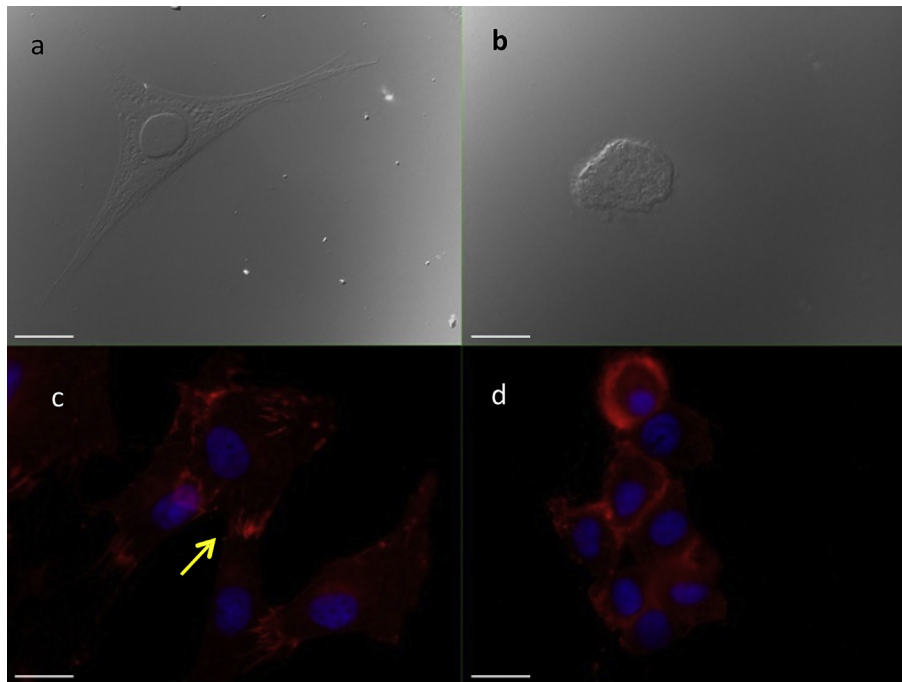


Fig. 5. AM affected HLM cell morphology and cadherin organization. When HLM were seeded on poly-L-lysine coated coverslips, they showed a flattened triangular cell body and a prominent distribution of cadherins at regions of cell–cell contact (arrow)(a and c); meanwhile, the culture in the presence of AM for 120 min caused a rounded morphology on these cells and the distribution of cadherins is not confined to the cell–cell contact border (b and d). These are representative images of three independent assays. Scale bars represent 20 μm .

RT-PCR, there was a concordance between the secretion and transcription in seven (CCL1, CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL10, G-CSF and IL-6) out of the nine analyzed proteins; indicating that poly I:C was able to stimulate the increase of these cytokines at both synthesis and secretion levels in HLM. In contrast, CXCL8 and IL-1ra transcripts were not significantly modified in poly I:C stimulated HLM, this could be due to different moments in which synthesis, translation and/or secretion were achieved (Dodson and Shapiro, 2002). Moreover, it has already been demonstrated that sequence features related to translation and protein degradation have an impact similar to that of mRNA abundance, and their combined contribution explains only two-thirds of protein abundance variation, whether these factors could contribute to the discrepancies found in the results between transcripts and proteins cannot be ruled out (de Sousa Abreu et al., 2009; Vogel et al., 2010; Vogel and Marcotte, 2012).

Corneal inflammation caused by interactions among infiltrated cells such as neutrophils, monocytes, T cells and resident cells is regulated by cytokines and chemokines. Chemotaxis process on monocytes, neutrophils and T and NK lymphocytes activation, are the principal effects of the eight proinflammatory mentioned cytokines (Baggiolini and Loetscher, 2000; Sallusto and Baggiolini, 2008). Different authors have described that AM possesses anti-inflammatory by diverse mechanisms (Bauer et al., 2009; Garfias et al., 2011; Liu et al., 2012). In the present study we have shown that AM was capable to significantly antagonize the poly I:C proinflammatory effect on HLM, inhibiting the secretion of the proinflammatory chemokines (CCL1, CCL2, CCL5, CXCL-1, CXCL8 and CXCL10), and the two inflammatory cytokines (G-CSF and IL-6). Whereas, IL-1ra secretion showed a significant increased when HLM were poly I:C stimulated and cultured in the presence of AM. However, the possibility that the cytokines measured by proteome arrays in the case of the proinflammatory cytokines were captured by their respective receptors present on the AM was excluded based on the results obtained with RT-PCR assays. As shown, there

was a significant transcription synthesis inhibition of CCL1, CCL2, CXCL10 and IL-6; meanwhile, CCL5 and CXCL1 transcription synthesis was not significantly affected by AM. These results support the hypothesis that AM is able to generate an anti-inflammatory microenvironment at the corneal cell surface, as suggested by others (Solomon et al., 2001).

In the present study, we showed that TLR3 was constitutively expressed on HLM according to earlier studies (Ebihara et al., 2007, 2011). After this result, we sought to analyze whether other dsRNA cytoplasmic receptors were expressed; however, only after poly I:C stimulation, MDA5 and RIG-1 were expressed on HLM, while poly I:C did not affect TLR3 basal protein expression. Although, it has been described the presence of MDA5, RIG-1 and TLR3 in other cells such as conjunctival epithelium, and synovial and dermal fibroblasts (Bustos-Arriaga et al., 2011; Ueta et al., 2011; Karpus et al., 2012); to our knowledge this is the first report that describes the presence of MDA5 and RIG-1 after poly I:C stimulus in HLM. Thereafter and interestingly, AM significantly decreased the constitutive TLR3 and the two *de novo* synthesized MDA5 and RIG-1 PRRs on both non-stimulated and stimulated conditions, suggesting that AM would be able to inhibit poly I:C effects on HLM throughout the down-regulation of its specific receptors and probably to the down stream signaling pathway (Orita et al., 2013). Thus, the effect of AM on the key activation molecule NF- κ B for these PRRs was also evaluated. Poly I:C was able to translocate NF- κ B into the nucleus of HLM in a time dependent manner, these results indicate that poly I:C transduce signals through NF- κ B in these cells (Orita et al., 2013). However, the presence of AM substantially inhibited the NF- κ B nuclear translocation when the cells were poly I:C stimulated. It is significant to mention that all of the above described cytokines released by poly I:C and negatively regulated by AM are NF- κ B gene targets. These results are in agreement to those previously reported in which it has been described that AMT inhibited NF κ B expression in an *in vivo* experimental HSK (Bauer et al., 2012).

In this context, NF- κ B is a transcription factor, which has a myriad of targets genes, and its activation is crucial to generate and maintain an efficient inflammatory response (Pahl, 1999).

Finally, in our study we observed that independently to the poly I:C stimulation status, the HLM changed from a myofibroblast structure to a rounded morphology, and this change was associated to a cadherin redistribution. Cadherins are proteins that interact each other in a calcium dependent manner and associate with cytoplasmic proteins regulating the cellular size (Maitre and Heisenberg, 2013). With this respect, it has been described that there is a close relationship between cadherins and cytoskeleton microtubules (Brieher and Yap, 2013) and a disorganization in microtubules has been associated to a deficient NF κ B binding activity (Lee et al., 2010); consequently, these results indicate that AM could inhibit cell–cell communications and impeded a correct HLM cellular activation preventing inflammation exacerbations and their severe corneal complications observed in HSK.

Specific inhibition of innate immune response cytokines through the down regulation of PRRs and impeding NF- κ B nuclear translocation on infected corneal tissue would reduce the inflammation undesirable effects, explaining in part the beneficial usefulness of transplanting AM on herpetic stromal keratitis.

Acknowledgments

This work was supported by CONACYT SALUD-160286 and SEP-167438 grants and CVU: 406706; DGAPA UNAM-PAPIIT IA203514 and “Conde de Valenciana” Foundation.

References

- Baggiolini, M., Loetscher, P., 2000. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol. Today* 21 (9), 418–420.
- Bauer, D., Hennig, M., et al., 2012. Amniotic membrane induces peroxisome proliferator-activated receptor-gamma positive alternatively activated macrophages. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (2), 799–810.
- Bauer, D., Wasmuth, S., et al., 2009. Amniotic membrane transplantation induces apoptosis in T lymphocytes in murine corneas with experimental herpetic stromal keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (7), 3188–3198.
- Brieher, W.M., Yap, A.S., 2013. Cadherin junctions and their cytoskeleton(s). *Curr. Opin. Cell. Biol.* 25 (1), 39–46.
- Bustos-Arriaga, J., Garcia-Machorro, J., et al., 2011. Activation of the innate immune response against DENV in normal non-transformed human fibroblasts. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (12), e1420.
- de Sousa Abreu, R., Penalva, L.O., et al., 2009. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* 5 (12), 1512–1526.
- Dodson, R.E., Shapiro, D.J., 2002. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 72, 129–164.
- Ebihara, N., Ohtomo, K., et al., 2011. Effect of tacrolimus on chemokine production by corneal myofibroblasts via toll-like receptors, compared with cyclosporine and dexamethasone. *Cornea* 30 (6), 702–708.
- Ebihara, N., Yamagami, S., et al., 2007. Expression and function of toll-like receptor-3 and -9 in human corneal myofibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 (7), 3069–3076.
- Garfias, Y., Zaga-Clavellina, V., et al., 2011. Amniotic membrane is an immunosuppressor of peripheral blood mononuclear cells. *Immunol. Invest.* 40 (2), 183–196.
- Hanada, K., Shimazaki, J., et al., 2001. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *Am. J. Ophthalmol.* 131 (3), 324–331.
- Heiligenhaus, A., Bauer, D., et al., 2001. Improvement of HSV-1 necrotizing keratitis with amniotic membrane transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (9), 1969–1974.
- Heiligenhaus, A., Li, H., et al., 2003. Management of acute ulcerative and necrotizing herpes simplex and zoster keratitis with amniotic membrane transplantation. *Br. J. Ophthalmol.* 87 (10), 1215–1219.
- Hendricks, R.L., Tumpey, T.M., 1990. Contribution of virus and immune factors to herpes simplex virus type I-induced corneal pathology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31 (10), 1929–1939.
- Hirata, Y., Broquet, A.H., et al., 2007. Activation of innate immune defense mechanisms by signaling through RIG-I/IPS-1 in intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 179 (8), 5425–5432.
- Kanneganti, T.D., 2010. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat. Rev. Immunol.* 10 (10), 688–698.
- Karpus, O.N., Heutinck, K.M., et al., 2012. Triggering of the dsRNA sensors TLR3, MDA5, and RIG-I induces CD55 expression in synovial fibroblasts. *PLoS One* 7 (5), e35606.
- Kawai, T., Akira, S., 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* 21 (4), 317–337.
- Kawai, T., Takahashi, K., et al., 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 6 (10), 981–988.
- Kim, J.C., Tseng, S.C., 1995. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14 (5), 473–484.
- Knickerbein, J.E., Hendricks, R.L., et al., 2009. Management of herpes simplex virus stromal keratitis: an evidence-based review. *Surv. Ophthalmol.* 54 (2), 226–234.
- Lee, H., Jeon, J., et al., 2010. Disruption of microtubules sensitizes the DNA damage-induced apoptosis through inhibiting nuclear factor kappaB (NF-kappaB) DNA-binding activity. *J. Korean Med. Sci.* 25 (11), 1574–1581.
- Lee, S.H., Tseng, S.C., 1997. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am. J. Ophthalmol.* 123 (3), 303–312.
- Liu, T., Zhai, H., et al., 2012. Amniotic membrane traps and induces apoptosis of inflammatory cells in ocular surface chemical burn. *Mol. Vis.* 18, 2137–2146.
- Liu, Y., Kimura, K., et al., 2008. Cytokine, chemokine, and adhesion molecule expression mediated by MAPKs in human corneal fibroblasts exposed to poly(I:C). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (8), 3336–3344.
- Madhavan, H.N., Priya, K., et al., 2002. Preparation of amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Indian J. Ophthalmol.* 50 (3), 227–231.
- Maitre, J.L., Heisenberg, C.P., 2013. Three functions of cadherins in cell adhesion. *Curr. Biol.* 23 (14), R626–R633.
- Mamede, A.C., Carvalho, M.J., et al., 2012. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell. Tissue Res.* 349 (2), 447–458.
- Meyers-Elliott, R.H., Chitjian, P.A., 1981. Immunopathogenesis of corneal inflammation in herpes simplex virus stromal keratitis: role of the polymorphonuclear leukocyte. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20 (6), 784–798.
- Orita, T., Kimura, K., et al., 2013. Cytokine and chemokine secretion induced by poly(I:C) through NF-kappaB and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in human corneal fibroblasts. *Curr. Eye Res.* 38 (1), 53–59.
- Pahl, H.L., 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18 (49), 6853–6866.
- Philpott, D.J., Girardin, S.E., et al., 2001. Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 13 (4), 410–416.
- Sacchetti, M., Lambiase, A., 2014. Diagnosis and management of neurotrophic keratitis. *Clin. Ophthalmol.* 8, 571–579.
- Sallusto, F., Baggiolini, M., 2008. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat. Immunol.* 9 (9), 949–952.
- Samuel, C.E., 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (4), 778–809. Table of contents.
- Schmidmaier, R., Baumann, P., 2008. ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology. *Curr. Med. Chem.* 15 (10), 978–990.
- Solomon, A., Rosenblatt, M., et al., 2001. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br. J. Ophthalmol.* 85 (4), 444–449.
- Streilein, J.W., Dana, M.R., et al., 1997. Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunol. Today* 18 (9), 443–449.
- Ueta, M., Kawai, T., et al., 2011. Contribution of IPS-1 to poly(I:C)-induced cytokine production in conjunctival epithelial cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 404 (1), 419–423.
- Ueta, M., Kweon, M.N., et al., 2002. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 129 (3), 464–470.
- van Herendael, B.J., Oberti, C., et al., 1978. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 131 (8), 872–880.
- Vogel, C., Abreu Rde, S., et al., 2010. Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol. Syst. Biol.* 6, 400.
- Vogel, C., Marcotte, E.M., 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 13 (4), 227–232.