



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

“EFECTO DEL ACICLOVIR SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE IL-6 y TNF- α
EN FIBROBLASTOS LIMBOCORNEALES HUMANOS EN CULTIVO CON
CONIDIOS DE *Fusarium solani*”

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE ESPECIALISTA EN OFTALMOLOGÍA

PRESENTA

DRA. DANIELA CASTRO FARÍAS

TUTORES PRINCIPALES

M. EN C. HERLINDA MEJÍA LÓPEZ

DR. VÍCTOR MANUEL BAUTISTA DE LUCIO

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2014



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.

ÍNDICE

RESUMEN	04
INTRODUCCIÓN.....	05
ANTECEDENTES	07
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	07
HIPÓTESIS	09
OBJETIVO GENERAL.....	09
OBJETIVOS PARTICULARES	09
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Cultivo Primario de Fibroblastos LimbocornealesHumanos	11
Caracterización fenotípica de los FLCH	12
Crecimiento y preparación de conidios inactivos e hifas.....	12
Tinción Ácido Peryódico de Schiff	13
Tasa de división de FLCH	13
Infección de células con conidios e hifas de <i>F.solani</i> y tratamiento con Aciclovir	14
Análisis de la expresión relativa de citocinas pro-inflamatorias de los FLCH infectados con conidios de <i>F. solani</i> inactivos e hifas en presencia o ausencia de ACV.....	15
Retrotranscripción.....	15
PCR.....	15
Análisis de Resultados.....	16

RESULTADOS.....	17
Cultivo Primario de Fibroblastos LimbocornealesHumanos	17
Caracterización fenotípica de los FLCH	17
Crecimiento y preparación de conidios inactivos e hifas.....	18
Tinción Ácido Peryódico de Schiff	19
Tasa de división de FLCH	21
Análisis de la expresión relativa de IL-6 por FLCH infectados con conidios de <i>F. solani</i> inactivos e hifas en presencia o ausencia de ACV, por el método de densitometría.....	21
Análisis de la expresión relativa de TNF- α por FLCH infectados con conidios de <i>F. solani</i> inactivos e hifas en presencia o ausencia de ACV, por el método de PCR Tiempo Real.....	23
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	33

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. Las queratitis de origen infeccioso pueden ocasionar daño a nivel de la córnea y generar disminución visual o ceguera. Son entidades difíciles de resolver tanto en el diagnóstico como por su pronóstico y muchas veces se empieza tratamiento empírico, lo que resulta hasta en un 30.6% de casos multitratados con antimicóticos, antibióticos, antivirales o esteroides. Esto a su vez, genera costos elevados, tiempo insuficiente en el tratamiento, poco acceso a las pruebas microbiológicas específicas y la necesidad de atención especializada en hospitales de tercer nivel.

OBJETIVO. Evaluar la expresión relativa de IL-6 y TNF- α de fibroblastos limbocorneales humanos en presencia de *F.solani*, tratados con o sin Aciclovir, en un modelo *in vitro*.

MÉTODOS. Se obtuvieron fibroblastos limbocorneales humanos (FLCH) de rodetes de donadores cadavéricos y fueron infectados con una cepa de *Fusarium solani* aislada de un paciente con queratomicosis. Algunos fueron tratados con Aciclovir. Se evaluó la expresión relativa de IL-6, β -actina y TNF- α por medio de densitometría y PCR tiempo real.

RESULTADOS. IL-6 es expresada de manera constitutiva por los fibroblastos limbocorneales humanos bajo condiciones *in vitro*, y el Aciclovir modula a la baja la expresión relativa de TNF- α .

CONCLUSIONES. Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio que demuestra el efecto antimicótico del Aciclovir en células corneales humanas infectadas con uno de los hongos que producen las queratomicosis más frecuentes en nuestro país. Los resultados representan una alternativa a los tratamientos convencionales. Sin embargo es necesario realizar más estudios al respecto, para poder llegar a la fase de experimentación *in vivo*.

“EFECTO DEL ACICLOVIR SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE IL-6 y TNF- α EN FIBROBLASTOS LIMBOCORNEALES HUMANOS EN CULTIVO CON CONIDIOS DE *Fusarium solani*”

INTRODUCCIÓN

Las queratitis de origen infeccioso tienden a ocasionar daño a nivel de la córnea dejando en algunos casos, cicatriz u opacidad que puede culminar en trasplante, en otros, puede progresar a una endoftalmitis con riesgo de pérdida del órgano. Las queratitis infecciosas son causa de pérdida visual y ceguera.¹

Las queratitis pueden ser de origen bacteriano, micótico, parasitario o bien de origen mixto.² Las infecciones producidas por hongos también conocidas como queratomicosis son entidades infecciosas difíciles de resolver tanto en el diagnóstico como por su pronóstico; esto se debe a que, a pesar de que está indicado el manejo médico, no existe una búsqueda previa del agente etiológico, y se empieza tratamiento empírico, lo que resulta hasta en un 30.6%, que casos multitratados con antimicóticos, antibióticos, antivirales o esteroides y esto a su vez, genere costos elevados, tiempo insuficiente para en tratamiento, poco acceso a las pruebas microbiológicas específicas y la necesidad de atención especializada en hospitales de tercer nivel.^{3,4}

En los casos en donde el tratamiento no fue indicado de manera correcta, el cuadro clínico se puede mimetizar con una infección bacteriana, viral o parasitaria, haciendo extremadamente difícil el diagnóstico correcto, por lo tanto, el pronóstico se vuelve aún más incierto debido a la posibilidad de una infección agregada.⁵

La queratitis generadas por hongos filamentosos se han incrementado en nuestro país de manera significativa, esto fue comprobado por Mejía-López, estudiando muestras de pacientes con queratomicosis, basados en pruebas moleculares y

confirmado por la modificación de las características clínicas típicas en cada caso.⁶ Los géneros más comunes identificados en México mediante estos métodos, fueron *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp y *Curvularia* spp.^{6,7}

Las queratomycosis también pueden presentarse como una co-infección con bacterias o virus.^{8,9} En estas condiciones, los casos se vuelven crónicos y refractarios a los tratamientos convencionales, por lo que es común que los pacientes reciban medicamentos múltiples que pueden incluir antibióticos, antimicóticos, antivirales y/o esteroides.^{10,11} La queratoplastia es un procedimiento cada vez más frecuente en pacientes que no responden al tratamiento conservador.¹²

Existen más de 20 especies conocidas de *Fusarium*, las cuales se encuentran generalmente en vegetales. *Fusarium solani* parece ser la más virulenta, debido en parte a su alta resistencia a medicamentos antimicóticos. Su espectro clínico va desde un cuadro indolente, hasta una infección que avanza a pesar de tratamiento específico, ya sea con Anfotericina B, Natamicina o Voriconazol, las cuales son las únicas drogas que han probado ser efectivas, pero a pesar de que son necesarias para contener la infección, también contribuyen a la destrucción de la córnea, conduciendo a daños irreversibles, sobre todo cuando se administran por tiempos prolongados, dando lugar a pseudomembranas, maceración palpebral, epitelización corneal retardada y queratitis punteada superficial, entre otras.¹³

Las manifestaciones clínicas pueden incluir hiperemia conjuntival marcada, defectos epiteliales corneales, úlceras corneales superficiales, inflamación en cámara anterior, infiltrados satelitales y bordes emplumados. Algunos pacientes abandonan el tratamiento dando lugar a la posibilidad de una sobreinfección. Se piensa erróneamente que si se administraran dos antimicóticos, el efecto podría ser sinérgico, contrariamente, lo único que generan estas combinaciones, son

mayor toxicidad, en ocasiones antagonismo y por lo tanto más efectos adversos.¹⁴⁻

16

ANTECEDENTES

Con la finalidad de tener una primera aproximación en el estudio de las interacciones entre los patógenos que generar una queratitis infecciosa, en el área de microbiología y proteómica de la unidad de investigación del “Conde de Valenciana, se estableció un modelo *in vitro* para evaluar el Aciclovir (ACV) como parte de los multitratamientos. Un resultado muy interesante en este estudio, fue que el ACV tiene la capacidad de inhibir del crecimiento de *F. solani* y *A. fumigatus*. Además, la actividad del ACV fue afectada dependiendo de la combinación de agentes antimicóticos con quinolonas y por el tipo de asociación hongo-bacteriana. Así, la actividad del ACV fue mayor con el tratamiento NAT en ambas especies de hongos, mientras que los tratamientos con ACV y Anfotericina B (AmB) o Itraconazol (ITRA) ejercen una inhibición parcial de los hongos en cocultivos con bacterias (*Staphylococcus* spp).¹⁷

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con los hallazgos expuestos anteriormente, resulta necesario evaluar estas infecciones en un modelo de células corneales humanas que faciliten el entendimiento de los fenómenos implicados.

Las células epiteliales corneales, constituyen la primera línea de defensa contra microorganismos y tiene la capacidad de detectar la presencia de hongos. Ha sido demostrado que *Fusarium solani* y *Aspergillus flavus* inducen en células corneal es la expresión de interleucina 1 β (IL-1 β) y baja expresión de IL-1 α . También, se ha observado un aumento de citosinas pro-inflamatorias IL-8, IL-17, TNF α , IL-17 e INF- γ no así IL-4.¹⁸ Por otro lado, se ha descrito que *A. fumigatus* altera la respuesta de las citocinas IL-1 e IL-6 producidas por estas células, e inducidas por

la estimulación de receptores Toll-Like 2 (TLR2) por las hifas del hongo y por zimosán, que es un componente esencial de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*.¹⁹ Además, se ha comprobado que células del epitelio corneal humano (CECH) producen IL-17, una citocina que parece tener una importante influencia en perpetuar la inflamación por la presencia de *A. fumigatus*.²⁰

Las CECH se encuentra en constante renovación, esto es posible por la presencia de células madre adultas que se encuentran localizadas en la base del epitelio limbal, conocidas como células madre limbales.^{21,22} Diversos factores pueden dañar a estas células, entre otros, trastornos inmunológicos, quemaduras por químicos, procedimientos quirúrgicos invasivos, infecciones, etc.²³ En estas circunstancias el epitelio corneal es reemplazado por epitelio conjuntival con serias implicaciones. En particular los pacientes con deficiencias en células madre limbales desarrollan defectos epiteliales, neovascularización y/o cicatrización que resultan en pérdida de la visión.²³ Algunos reportes dejan clara la participación del microambiente estromal (nicho) en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio corneal y limbal.^{24,25} Si bien las características del nicho limbal aún no han sido completamente caracterizadas, es posible que incluya tanto células como factores extracelulares.^{26, 27}

Por otro lado, los fibroblastos del estroma (FLCH) parecen ser elementos importantes en el nicho limbal teniendo en cuenta su estrecha relación con el epitelio a través de la producción de citocinas y factores de crecimiento.^{28, 29} Estudios previos han demostrado la función de los FLCH de la córnea y el limbo en la regulación y diferenciación epitelial así como de la cicatrización.³⁰⁻³⁴ Del mismo modo, los FLCH parecen tener injerencia en el mantenimiento del fenotipo del epitelio limbal.^{35, 36}

Con respecto al reconocimiento de antígenos por FLCH, está documentado que pueden expresar TLR1-4 y TLR9 los cuales tiene una participación fundamental en la estimulación temprana de la respuesta inmune el reclutamiento celular,

liberación de citocinas y modulación de la cicatrización.^{37, 38} Una característica por la cual la córnea es un tejido inmunoprivilegiado es la falta de vasos sanguíneos, es por eso que la generación de células y moléculas producidas en el primer contacto con el antígeno, tiene un impacto decisivo en el establecimiento de la protección a largo plazo.

Bajo esta premisa, pretendemos indagar cómo es la respuesta de citocinas por los FLCH humanos, frente a la infección con *Fusarium solani* en presencia del tratamiento con Aciclovir.

HIPÓTESIS

El tratamiento de Aciclovir afecta el perfil de expresión de IL-6 e TNF- α en fibroblastos limbocorneales en cultivo con conidios de *Fusarium solani*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión relativa de IL-6 y TNF- α de fibroblastos limbocorneales humanos en presencia de *F. solani*, tratados con o sin Aciclovir, en un modelo *in vitro*.

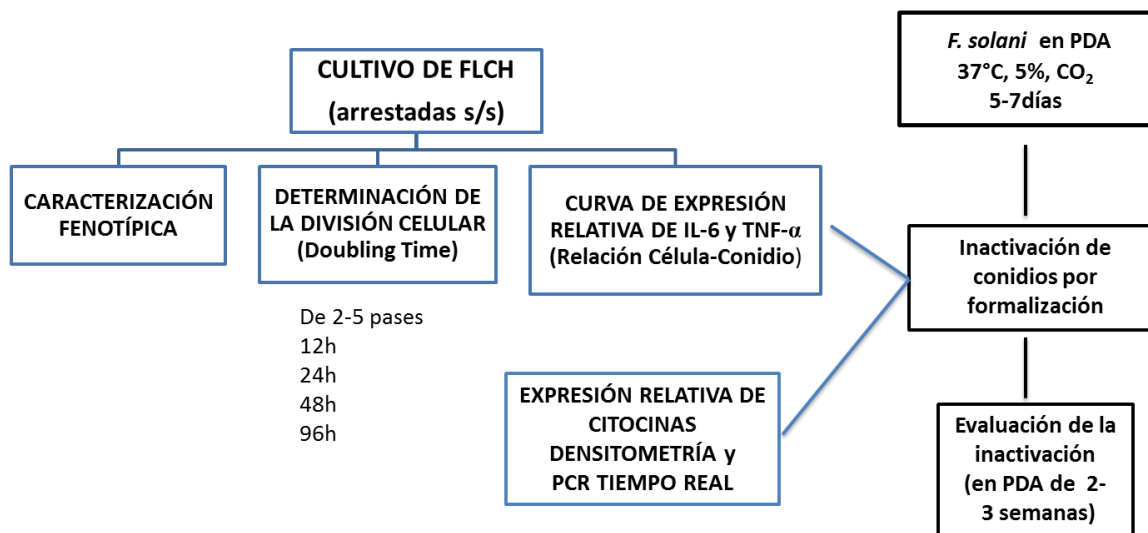
OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Establecer un modelo de infección *in vitro* de Fibroblastos limbocorneales humanos (FLCH) con *F. solani* inactivos por formalización.
- ✓ Caracterizar fenotípicamente a los FLCH.
- ✓ Evaluar la tasa de división de los FLCH.
- ✓ Inactivar conidios y determinación de su viabilidad.
- ✓ Determinar la curva de expresión de IL-6 y TNF- α por FLCH infectados con conidios de *F. solani* inactivos, en la relación célula-conidio 1:2 y 1:4.

- ✓ Evaluar el efecto que tienen el Aciclovir sobre los transcritos de IL-6 y TNF- α de FLCH infectados con *F.solani* inactivos, a la relación óptima encontrada.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología siguió el flujograma descrito a continuación:



Cultivo primario de fibroblastos limbo-corneales Humanos (FLCH)

El rodete limbo-corneal conservado en OptisolTM-GS (Bausch and Lomb Inc, Rochester, NY, USA) a 4 °C procedente de donadores cadavéricos fue obtenido del banco de ojos del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”. El cultivo primario de FLCH se realizó de la siguiente manera: Se eliminó el exceso de esclera, córnea y la inserción del iris. El borde limbal se trató con dispasa II (Roche, Mannheim, Germany) durante 45 min/1 h, 37 °C, 5% de CO₂ y 95 % de humedad. Se lavó con PBS (por sus siglas en inglés: PhosphateBufferedSaline) y se incubó con colagenasa de 10 a 17h. Trascurrido este tiempo, se lavó con D-MEM-F12 (DulbeccoModified Eagle Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg /mL de estreptomycin (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA). Se distribuyeron las células en placas para cultivo de 24 pozos (Costar, Corning, NY, USA) y se incubaron de 3 a 5 días para evaluar

confluencia. El medio se cambió según crecimiento y pH. Se tomó registro fotográfico para valorar la morfología celular.

Caracterización fenotípica de los FLCH

Se identificaron las células por marcadores característicos de células epiteliales limbales, para determinar el grado de enriquecimiento celular y el tipo de célula que se usaron en el presente trabajo, esto es, que un cultivo de células limbocorneales puede estar constituido de células fibroblastoides y células epiteliales. Con este fin, se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos (en células permeabilizadas), para Vimentina y Citoqueratina 12 (CK12). Un control de isotipo permitió eliminar la cuenta de fondo según el tipo de anticuerpo. (Kit Cytifix/Cytoperm. BD BiosciencePharmingen, TorreyanaRd; Sn Diego CA). *Permeabilización con el kit Cytifix/Cytoperm.* Los marcadores escogidos para determinar el fenotipo de la población limbocorneal son citoplasmáticos (CK12 y vimentina) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por lo que se utilizó un kit comercial para permeabilizar las células. Brevemente: las células tripsinizadas se lavaron 2X con PBS, se distribuyeron 1.5×10^5 células para la detección de cada marcador y para el control de isotipo. Se eliminó el PBS y se agregaron 250 μ L del reactivo Cytifix/Cytoperm, se incubaron 20 minutos a 4°C. Se lavaron las células con el buffer BD perm/wash y se centrifugaron a 1500 rpm/5 min, se eliminó el sobrenadante y se realizó la tinción intracelular según protocolo. Todas las células teñidas y fijadas se lavaron 2X con PBS y se analizaron por citometría de flujo. Se adquirieron de 5 000 eventos en una ventana de tamaño/granularidad celular y se realizó el análisis con el software CELLQUEST pro versión 5.2.1.

Crecimiento y preparación de conidios inactivos e hifas

Los hongos filamentosos obtenidos de pacientes con queratomycosis fueron crecidos en medio papa dextrosa agar (PDA) durante 5-7 días a 37°C. Se cosecharon los conidios por raspado suave de las superficies de los cultivos y

fueron suspendidos en PBS y contados en un hemocitómetro para calcular el número de conidios por μL . Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% en agitación constante por 1h y fueron dejados toda la noche. Se evaluó la efectividad de la inactivación, sembrando los conidios en PDA.

Para la obtención de hifas, se obtuvo el micelio de los hongos crecidos durante 5-7 días en PDA, se lavó exhaustivamente con PBS para eliminar conidios. Se fragmentó el micelio incubando con perlas de vidrio en agitación constante en un agitador Daigger Vortex; Genie 2 (Daigger & Company; Inc.) a máxima velocidad.

Tanto conidios como fragmentos fueron contados para realizar las infecciones.

Tinción Ácido Peryódico de Schiff (PAS)

Esta técnica histológica es utilizada para contrastar un tejido y estructuras fúngicas. Las células (30×10^3) fueron crecidas sobre cubreobjetos redondos fijados en portaobjetos, los cuales se prepararon con Poly-L-lisina 0.1% (Sigma-Aldrich, Inc., St, Louis MO. USA) con la finalidad de facilitar la adherencia de las células. Se realizaron infecciones con conidios de *F. solani* vivos e inactivos en relación 1:2, 1:4 y 1:8. Después del tiempo de cultivo, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído al 4% por 10 minutos y lavadas nuevamente 2X con PBS. Posteriormente, los portaobjetos fueron enviados a patología para su tinción.

Tasa de división de FLCH

El período de tiempo que requieren los FLCH para obtener una generación de células después de cada pase, se conoce como "Doubling Time". Fue necesario evaluarlo para conocer la curva dosis-respuesta con respecto a la infección con conidios.

Infección de células con conidios e hifas de *F. solani* y tratamiento con Aciclovir

Se sembraron 20,000 FLCH/pozo en placas de 24 pozos con DMEM-F12 suplementado al 10% con suero fetal bovino. 24 horas después, se cambió el medio por DMEM sin suplementar (arresto), con la finalidad de llevar a todas las células a G0, incubándose por otras 12 horas (tiempo óptimo de producción de citocinas). Terminado este tiempo se volvió a colocar DMEM-F12 suplementado, para dejar que las células se recuperaran en un período de 6 horas (conteo de células para determinación de viabilidad con azul de tripano). Posteriormente, el cultivo celular fue infectado en relación 1:2, 1:4 y 1:8 célula-conidio y célula-hifa (hifas previamente fragmentadas con perlas de vidrio) y se incubaron durante 12 horas. (Figura 1). En algunos pozos de células infectadas y a otros sin infectar, se adicionaron 15,6 $\mu\text{m}/\text{mL}$ de ACV (GlaxoSmithKline, Brentford, Middlesex, UK), empleado como solución de trabajo, de acuerdo a la presentación comercial de 2.5 mg/mL.

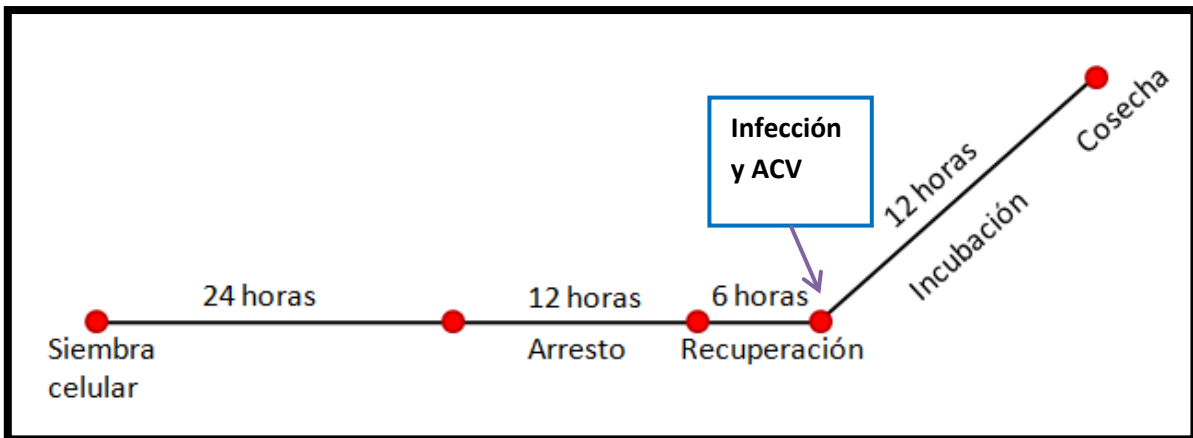


Figura 1. Esquema de infección

Análisis de la expresión relativa de citocinas pro-inflamatorias de los FLCH infectados con conidios de *F. solani* inactivos e hifas en presencia o ausencia de ACV

Los FLCH humanas se pusieron en contacto con conidios inactivados a las dosis infectantes encontradas en las curvas dosis/respuesta. Como controles de producción de citocinas se usó el cDNA de linfocitos humanos estimulados con PMA-ionomicina (Sigma- Aldrich) (4-6 hrs) (Kurt-Jones et al., 2002). Brevemente: Células mononucleares de sangre periférica fueron enriquecidas usando LinfoPrep (<http://www.progen.de/en/lymorphprep.html>) y se evaluó la activación con PMA-ionomicina (1 µg/mL - 10 µg/mL) para encontrar la respuesta a la dosis óptima. Se evaluó la estimulación de linfocitos por la producción de las citocinas incluidas en este protocolo. También se estableció un control de células sin infectar, en cada tiempo de la curva. Transcurrido cada tiempo, de la curva dosis/tiempo de infección, las células se lavaron 2X con PBS y se colectaron con 350 µL de RLT-β-mercaptoetanol (10uL/mL de buffer), agitando vigorosamente por 1min. Los lisados se conservaron a -80°C. La extracción de RNA se realizó según el kit de QIAGEN (RNeasy mini kit).

Retrotranscripción. Kit OneStemRT-PCR (QIAGEN, Sciences. Meryland, USA). El protocolo indica que la reacción de retrotranscripción debe contener agua bidestilada libre de RNAsas, buffer RT, DNTPs, OligodT, y el RNA en estudio: 3 µL de Buffer RT, 0.6 µL de DNTPs, 1.8 µL de cada oligonucleótido respectivos (forward y reversa de la citocina a estudiar), 5 µL del RNA (30 ng) a estudiar, en un volumen total de 15 µL. Se incubó a 37 °C por 30 min. Se adicionó 1 µL de EDT y se incubó nuevamente a 65 °C/ 10 min, se congeló a -80°C hasta la determinación de citocinas.

PCR. El cDNA en estudio y los cebadores específicos para cada gen de citosinas proinflamatorias a estudiar fueron:

Parall-6F	5'-
GAGTAACATGTGTGAAAGCAGCA-3'	e
IL-6R	5'-

ACCTCCAAACTCCAAAAGACCA-3' (\approx 148pb); y para TNF- α fueron TNF- α F 5'-CTCTTCTGCCTGCTGCACTT-3' e TNF- α R 5'-CAGCTTGAGGGTTTGCTACA-3' (\approx 138 pb). Cada reacción se realizó por duplicado. Se incluyeron controles negativos con la mezcla de reacción pero sin templado. Fueron incluidos controles internos los primers: β ActF 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTCCT-3' y β ActR 5'-CAGGGCAGTGATCTCCTTCT-3' que corresponden al gen de la β -actina humana y que amplifican un fragmento de \approx 200 pb. Cada reacción se realizó por duplicado incluyendo células sin infectar como controles negativos. Como controles positivos de producción de citocinas se usó cDNA de linfocitos humanos activados con PMA-ionomicina. El programa de amplificación de PCR Punto Final para el análisis por densitometría, se realizó en un termociclador Axigen/Maxigen (Modelo Maxigen Gradient), con un paso de pre-desnaturalización de 95°C/30 min, desnaturalización de 95°C/15 min; seguido de 25 ciclos de 94°C/1min a 56°C/45 seg de alineamiento y una extensión de 72°C/1min; con una extensión final de 72°C/10 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% y realizada una electroforesis en buffer de TE. Se determinó el incremento relativo del cDNA mediante $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con respecto a controles sin tratamiento. La fórmula implica una relación entre los valores obtenidos de Ct (amplificación del transcrito dependiente de la concentración), en relación al control sin tratamiento, esto es: $\text{Ratio} = 2^{-(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control})}$.

Para los experimentos de PCR Tiempo Real, se utilizó un Termociclador Rotor-Gene Q de QIAGEN, se realizó un Touch Down con un programa integrado en el software del termociclador, con una temperatura máxima de 65°C y disminución gradual de 1°C por ciclo durante 10 ciclos.

Análisis de Resultados

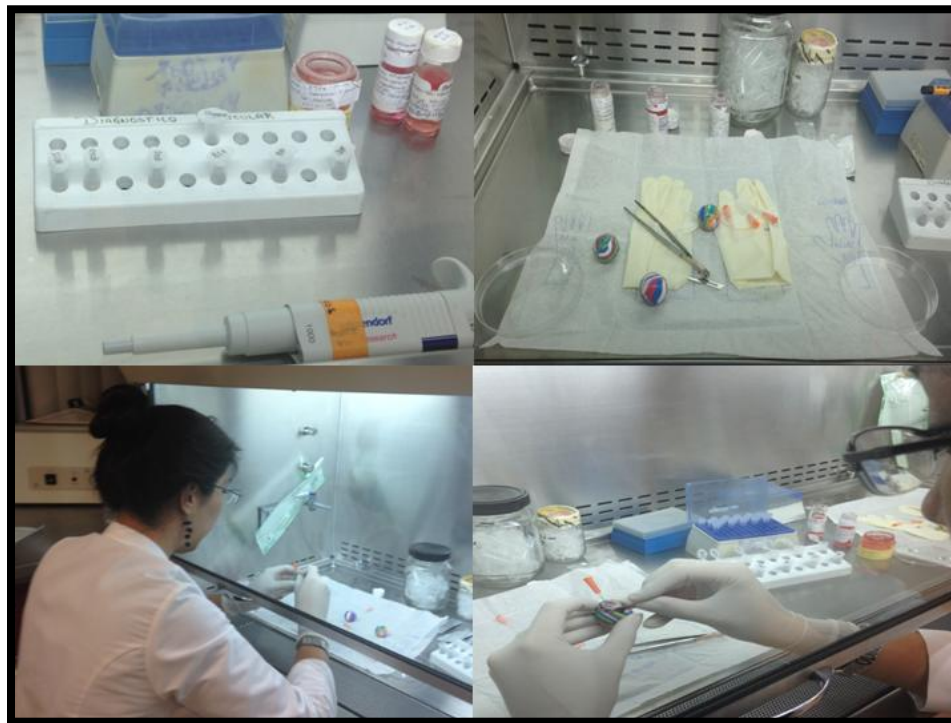
Los resultados para establecer la expresión relativa por densitometría se analizaron con el software Kodak Molecular Imaging Software v 4.0.3, 2005.

Los resultados para la PCR Tiempo Real se analizaron con el Software Rotor-Gene Q V.2.0.2.

RESULTADOS

Cultivo primario de fibroblastos limbocorneales (FLCH)

El establecimiento del modelo de infección *in vitro* de los fibroblastos limbocorneales humanos, requirió de cultivos celulares a partir de rodetes corneales de donadores cadavéricos proporcionados por el Banco de Ojos del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”. Los FLCH fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos.



Caracterización fenotípica de los FLCH

Se identificó el fenotipo de las células con anticuerpos monoclonales específicos Vimentina y Citoqueratina. Se utilizó además un control de isotipo con el fin de eliminar la cuenta de fondo. Las células post-cultivo fueron tripsinizadas y

marcadas con anticuerpos fluorescentes como se describe en materiales y métodos y fueron analizadas en una ventana de tamaño contra granularidad. Se obtuvo un 37.33% de K12 y un 87.32% de Vimentina (Figura 2).

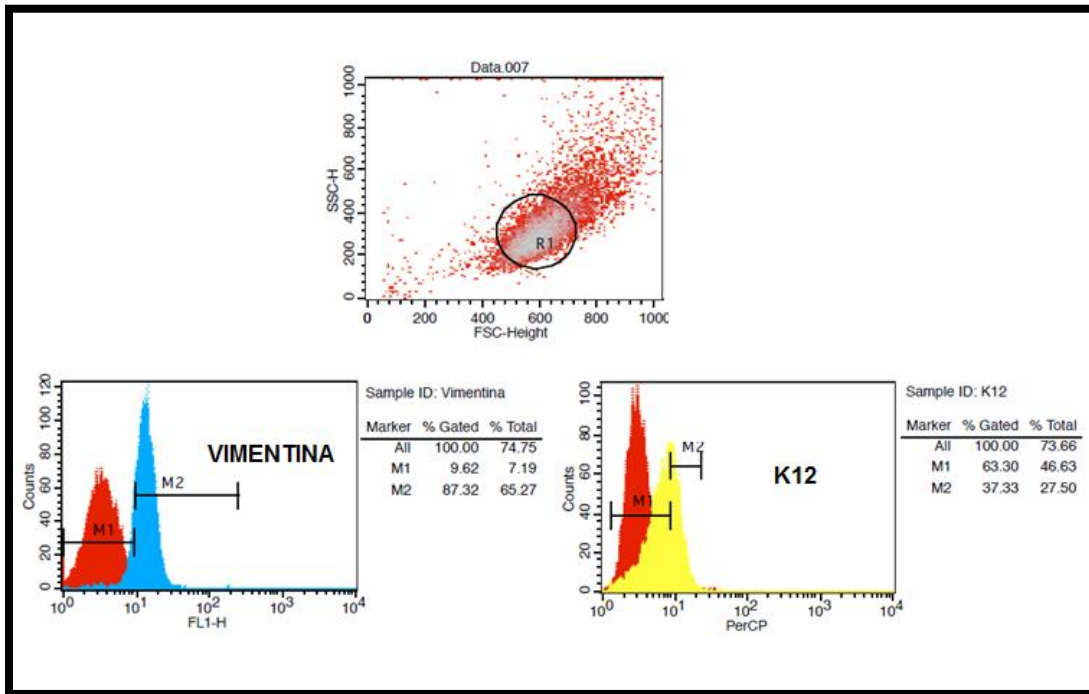


Figura 2. Caracterización fenotípica de células limbo-corneales por citometría de flujo. Los FLCH fueron marcadas con anticuerpos fluorescentes como se describe en materiales y métodos. Se analizaron 5,000 eventos para cada marcador.

Crecimiento y preparación de conidios inactivos e hifas

Se crecieron cultivos de *Fusarium solani* en medio PDA, la Figura 3 muestra el crecimiento característico de este hongo a las 48 h días de incubación. Se obtuvieron y se desactivaron los conidios según lo descrito en Material y Métodos. Para determinar que el método de fijación fue adecuado, se sembraron nuevamente en PDA y después de 10 días, al no encontrar crecimiento, se comprobó la falta de viabilidad.

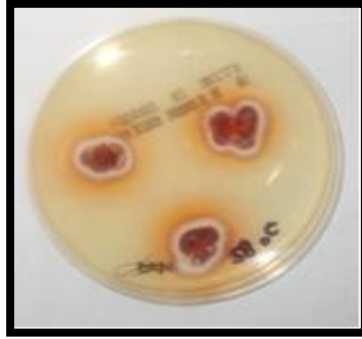


Figura 3. *Fusarium solani* en medio de Papa Dextrosa Agar (PDA) a las 48 horas de cultivo. Se observan sus bordes irregulares, superficie plumbosa y producción de pigmento característico del género.

Tinción Ácido Peryódico de Schiff (PAS)

Las características morfológicas de los fibroblastos fueron modificadas por la presencia de los conidios. La figura 4A muestra las células sin infectar, la figura 4B representa a las células infectadas con conidios vivos en relación 1:4 en donde se observan hifas de gran tamaño al tiempo de incubación (5 horas), la cual contrasta con la figura 4C en donde no hubo adherencia de conidios inactivos y las células se observan con apariencia esponjosa. La figura 4D y 4E representan células infectadas en relación 1:8 y se hace evidente que los conidios crecen hifas de menor tamaño muy probablemente por su confluencia, y las células infectadas con conidios inactivos presentan un mayor cambio morfológico, con respecto al control sin infección.

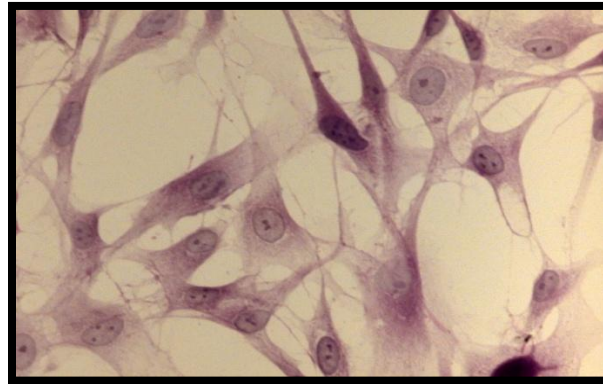


Figura 4A.FLCH sin infectar

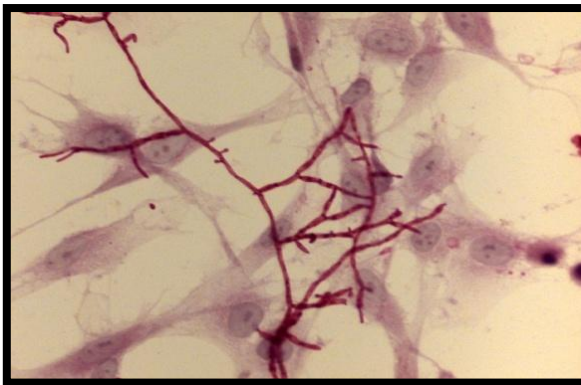


Figura 4B.FLCH infectados con conidios de *F. solani* vivos 1:4

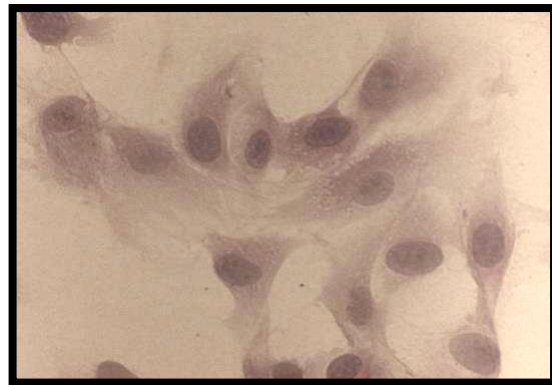


Figura 4C.FLCH infectados con conidios de *F. solani* inactivos 1:4

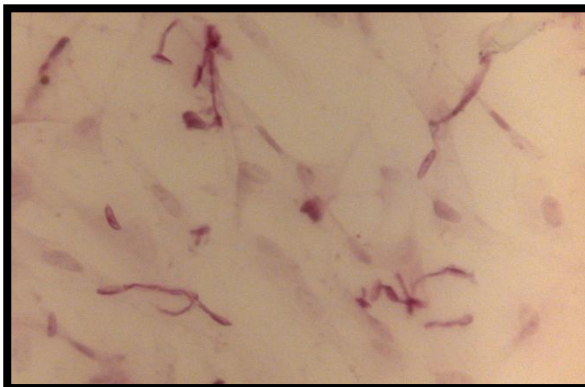


Figura 4D.FLCH infectados con conidios de *F. solani* vivos 1:8

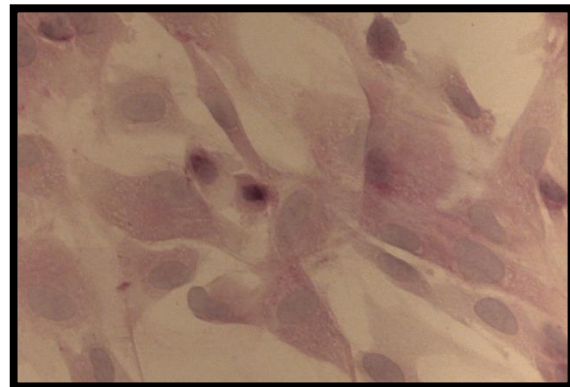


Figura 4E.FLCH infectados con conidios de *F. solani* inactivos 1:8

Tasa de división de FLCH

Las células fueron contadas en un hemocitómetro y se colocaron 7,000 cel/pozo en placas de 24 pozos. Se tripsinizaron y contaron las células cada 24 horas por 5 días. Se calculó la tasa de proliferación, la cual fue de 41.69 horas (Figura 5).

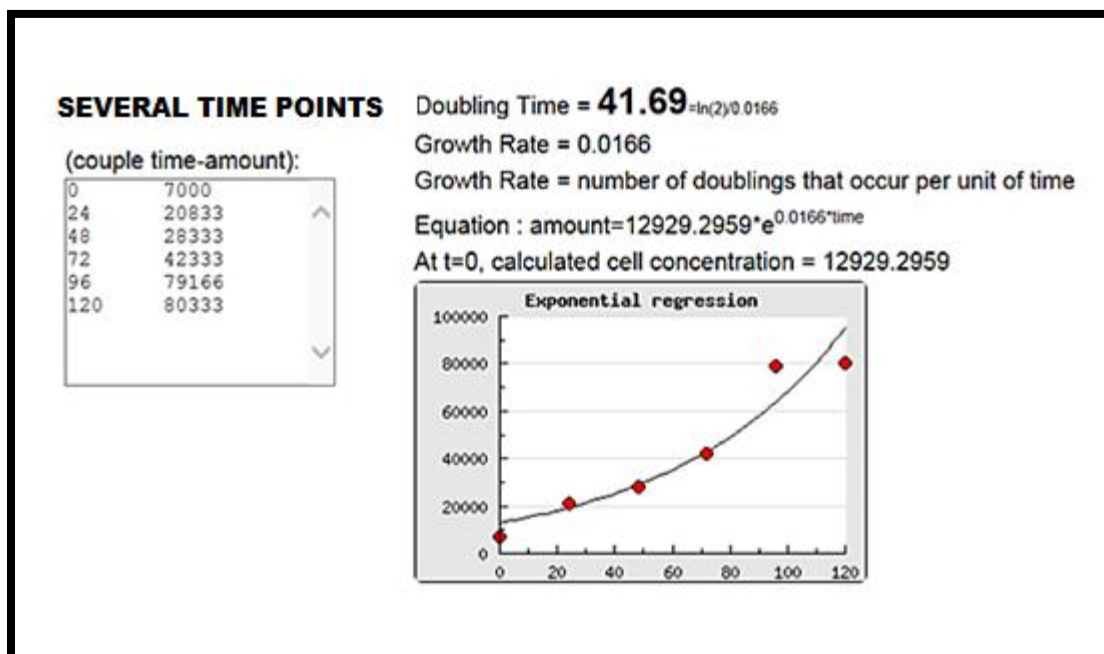


Figura 5. Determinación de la tasa de proliferación de los Fibroblastos Limbocorneales Humanos con apoyo del sitio web: <http://www.doubling-time.com/compute.php>. La gráfica muestra un experimento representativo de tres que se realizaron con células en el mismo pase (pase 4).

Análisis de la expresión relativa de IL-6 por FLCH infectados con conidios de *F. solani* inactivos e hifas en presencia o ausencia de ACV, por el método de densitometría

Se realizó un experimento, cuyos resultados indicaron que no existe diferencia significativa en la expresión relativa de IL6, de FLCH infectados con conidios de *F. solani*, con respecto al control de linfocitos activados con PMA-ionomicina ni con los FLCH sin infectar. En este experimentos también fueron analizados resultados de co-infecciones con conidios-bacterias sobre los cultivos celulares, sin observarse diferencia en la expresión relativa de la citocina (Figura 6 y 7).

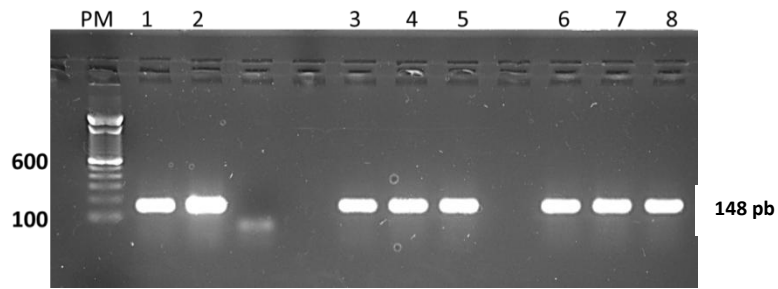


Figura 6. RT-PCR de IL-6. Gel de agarosa al 1.5%. PM = Peso Molecular (Trackit 100 pb DNA Ladder. Invitrogen) 1=control de linfocitos PMA-ionomicina; 2=control de FLCH, 3=conidios de *F. solani* 1:2, 4=conidios de *F. solani* 1:2 + *Staphylococcus aureus* 1:2, 5=*Staphylococcus aureus* 1:4, 6=conidios de *F. solani* 1:4, 7=conidios de *F. solani* 1:4 + *Staphylococcus aureus* 1:4, 8=*Staphylococcus aureus* 1:4. Para todos los amplificados se utilizaron 30 ng de RNA.

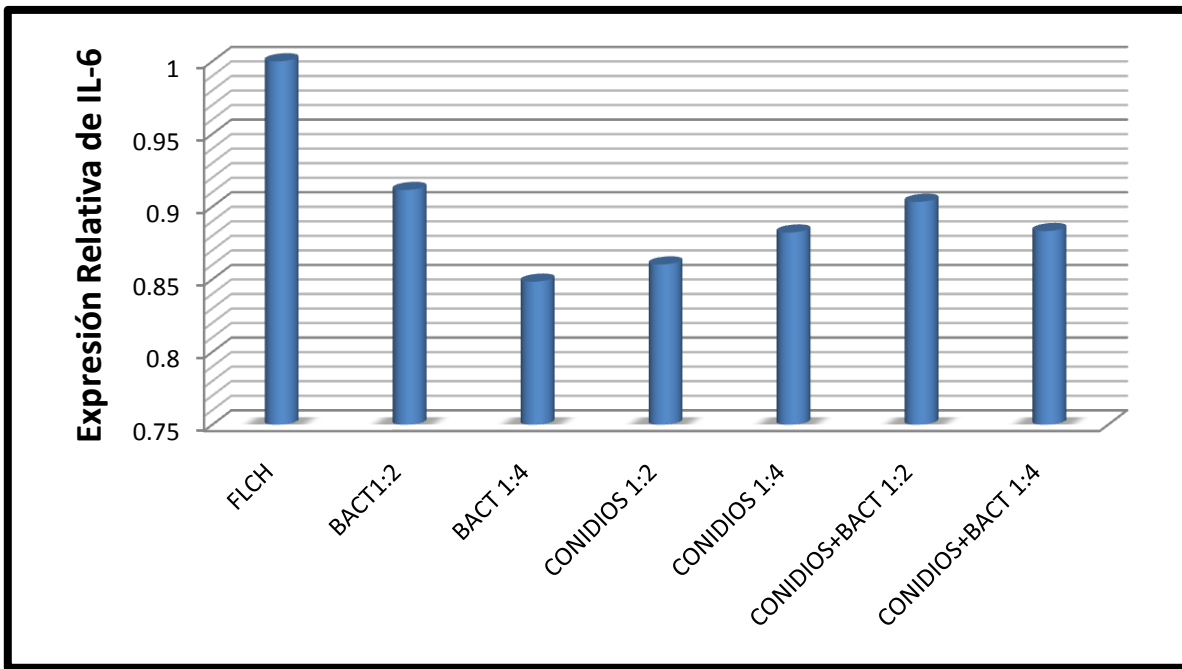


Figura 7. Expresión relativa de IL-6 con respecto a los linfocitos estimulados con PMA-ionomicina. No se observan diferencias significativas con respecto a los controles.

La amplificación de la β -actina humana fue utilizada como control de integridad del RNA experimental, en donde no se observaron diferencias significativas entre los amplificados, en condiciones de infección o en presencia de Aciclovir con respecto al control (Figura 8).

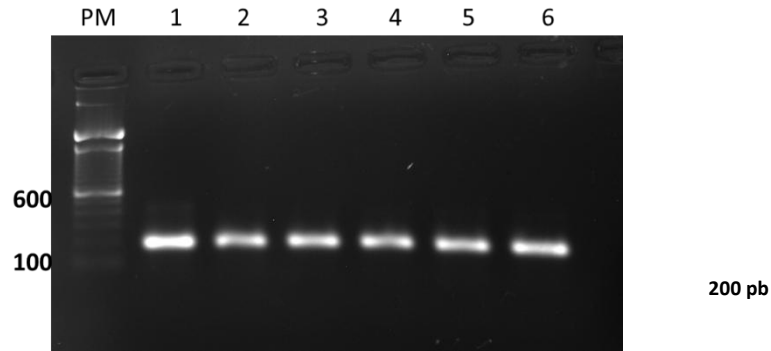


Figura 8. RT-PCR de β -Actina. Gel de agarosa 1.5%. PM=Peso Molecular (Trackit 100 pb DNA Ladder. Invitrogen), 1=control de FLCH, 2=conidios de *F.solani* 1:2, 3=ACV, 4=Conidios/ACV, 5=hifas, 6=hifas/ACV. Para todos los amplificados se utilizaron 30 ng de RNA.

Análisis de la expresión relativa de TNF- α por FLCH infectados con conidios de *F. solani* inactivos e hifas en presencia o ausencia de ACV, por el método de PCR Tiempo Real

Los resultados obtenidos en la amplificación de los transcritos (Figura 9) fueron procesados por el algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se observan en la Figura 10.

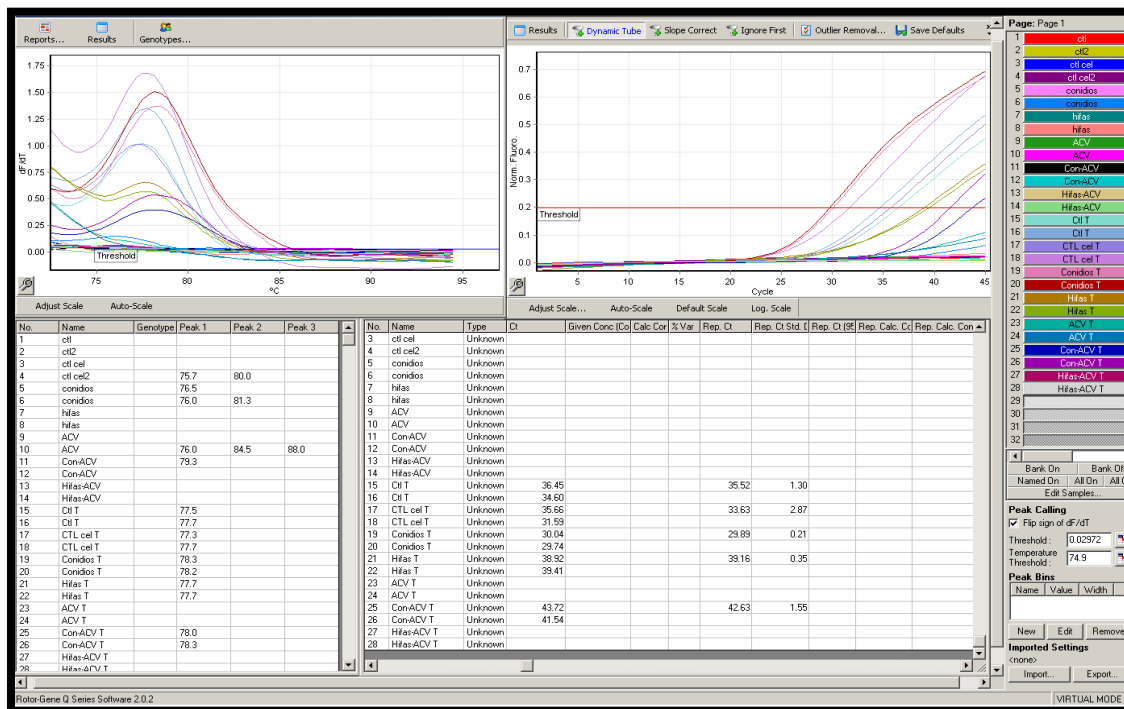


Figura 9. Esquema de amplificación de los transcritos de TNF- α obtenido por PCR Tiempo Real

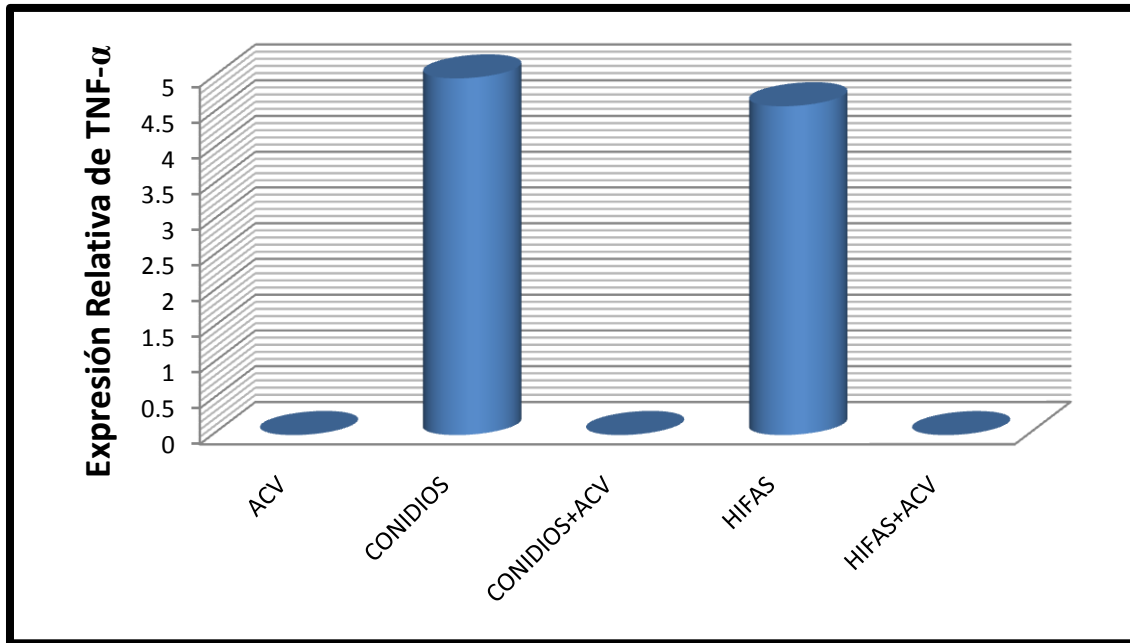


Figura 10. Expresión relativa de TNF- α

El análisis de la expresión relativa de TNF- α generó resultados muy interesantes. La infección de los FLCH con conidios e hifas de *F. solani*, indujo la expresión relativa de TNF- α en 4.99 y 4.6 veces más, respectivamente, en relación al control sin infección; mientras que la presencia de ACV en esas condiciones de infección, abatió de manera significativa la expresión de la citocina. Estos resultados sugieren que el ACV tiene la capacidad de modular a la baja la expresión de TNF- α .

DISCUSIÓN

Las queratomicosis son entidades que pueden semejar cuadros infecciosos causados por otros agentes.^{4, 5} Cuando se logran identificar, representan un reto terapéutico importante, esto se debe a diversos factores, tales como: a) el tiempo de evolución de la úlcera, b) factores propios del hongo, como la producción de enzimas proteolíticas que genera resistencia intrínseca y adquirida, c) la poca cantidad de antimicóticos validados para uso oftálmico como la Natamicina,^{40, 41} d) el excesivo costo de ellos o inclusive la disponibilidad en nuestro país.^{42, 43} Así también, los medicamentos a nuestro alcance aún no cumplen con las

características óptimas, como tener una toxicidad mínima, ser de amplio espectro y tener una adecuada penetración a los tejidos oculares.⁴⁴

En el Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”, se ha reportado El 10.91% la frecuencia de queratomicosis confirmada por cultivos, esto es congruente con los porcentajes reportados (5%-20%) en grandes series de queratitis. Los organismos fúngicos más comunes fueron, en orden de frecuencia, *Fusarium spp.*, *Aspergillus flavus* y *Curvularia spp.*⁴⁵

En nuestro país pocos estudios se han realizado sobre queratomicosis, sin embargo, ninguno de ellos está enfocado a mejorar el tratamiento de esta difícil entidad clínica.

Los tratamientos tópicos disponibles son Amfotericina B, Natamicina y otros supuestamente más efectivos, como el Voriconazol, sin embargo como ya mencionamos son costosos y con frecuencia no se encuentran disponibles en el mercado.⁴⁶

La queratitis micótica es un término general que significa inflamación de la córnea. Los hongos pueden infectar (y por lo tanto inflamar) la córnea. La queratitis micótica o queratomicosis es un término que se refiere a una infección de la córnea causada por hongos. Un género que puede infectar la córnea es *Fusarium spp.* Cuando este hongo infecta la córnea, la enfermedad del ojo se conoce como queratitis por *Fusarium*. En las etapas tempranas de la infección se ha observado una rápida progresión de la queratitis que muchas veces se debe una carga alta del agente infectante y una penetración más profunda del hongo, respuesta inflamatoria y, posiblemente, la ineficacia relativa de los agentes antimicóticos, o su aplicación tardía. La progresión en la fase posterior de la queratitis no está necesariamente mediada por el patógeno; podría ser por cualquiera de los moduladores de la fase crónica de la inflamación, o por mediadores relacionados con la especie como son las enzimas y la resistencia a los fármacos, lo que sugiere que los regímenes de tratamiento debe incluir la terapia antimicótica basada en la sensibilidad a los antimicóticos (muy ideal).⁴⁷

El hongo puede acceder al estroma corneal a través de un defecto en el epitelio, y luego se multiplica y causa necrosis de los tejidos y una reacción inflamatoria. El defecto epitelial suele ser resultado de un trauma (por ejemplo, el uso de lentes de contacto, material extraño, la cirugía corneal previa). El filamento puede penetrar a la membrana de Descemet intacta y obtener acceso a la cámara anterior o el segmento posterior. Las micotoxinas y enzimas proteolíticas aumentan el daño a los tejidos.

La respuesta inmunológica tiene una importante participación en el reconocimiento y eliminación de patógenos fúngicos. El encuentro con el hongo requiere de una coordinada respuesta inmune innata y adaptativa, esta última es responsable de dar protección a largo plazo frente a los hongos, sin embargo la calidad y el tipo de respuesta generada por la inmunidad innata es crucial. Se ha demostrado la importancia tanto de CD4+ como de CD8+ para la eliminación del hongo.⁴⁸ También, la mayoría de los hongos generan anticuerpos que neutralizan formas fúngicas y promueven la fagocitosis, por medio de la cual pueden dañar y procesar antígenos del hongo. Un estudio reciente reporta que en la queratomycosis por *Fusarium* y *Aspergillus* en humanos, está caracterizada por inflamación con infiltrado de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T.⁴⁹

Por otro lado, existen evidencias experimentales que demuestran la participación de diversos receptores en células dendríticas (CD), macrófagos (Mf) y polimorfonucleares (PMN), capaces de reconocer componentes de la pared de hongos filamentosos y que generan así la activación de esas células y la consecuente expresión de citocinas pro-inflamatorias quimiocinas y moléculas reguladoras.

Las células dendríticas, en particular, son células que participan en la interacción entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Ellas presentan receptores de reconocimiento de patrones ejemplificados en la Figura 11 (PPR)⁵⁰. Estas células se consideran las células presentadoras del antígeno a linfocitos T por excelencia.⁴⁶ Estas células son capaces de presentar antígenos propios sin

señales activadoras en T haciendo a esta células energicas. Hamrah P y Sahin A⁵¹ exponen que las CD de la córnea central son menos maduras (baja concentración de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 y CD86 y moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CMH) HLA-I y HLA-II en los compartimientos intracelulares), que las encontradas en el área limbal.

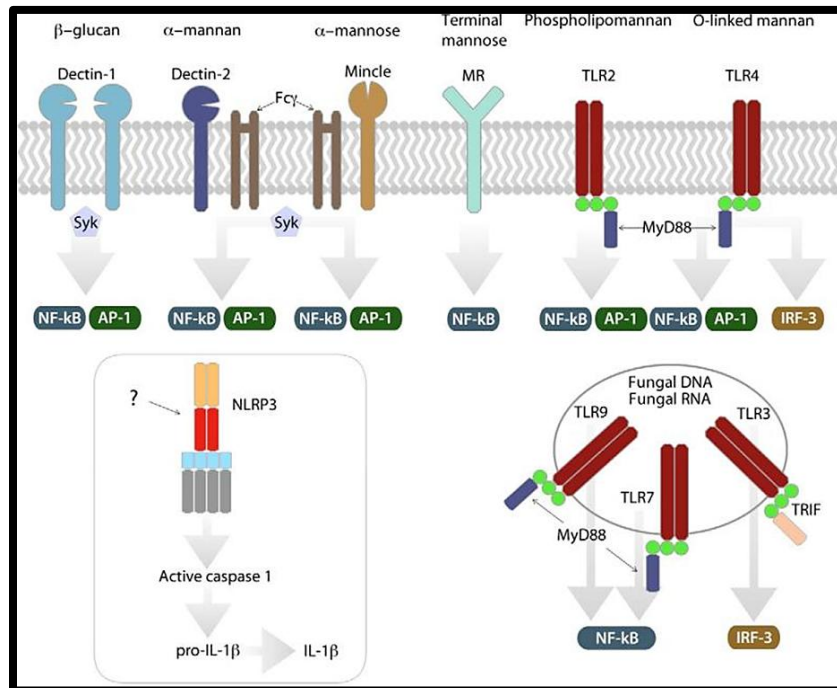


Figura 11. Receptores que reconocen diferentes antígenos micóticos activando a la célula.⁵²

El encuentro del hongo con estos receptores genera la activación de factores de transcripción como es NF-κ B, los cuales pueden llegar al núcleo (translocación), uniéndose a sitios promotores de genes de citocinas pro-inflamatorias y/o defensas.

Las citocinas pro-inflamatorias por excelencia son interleucina-1β (IL-1), interferón gamma (INF-γ), IL-6 y TNF-α. Cutler et al, con base en hallazgos experimentales, proponen una ruta de activación de la respuesta inmune generada por hongos (Figura 12).⁴⁹

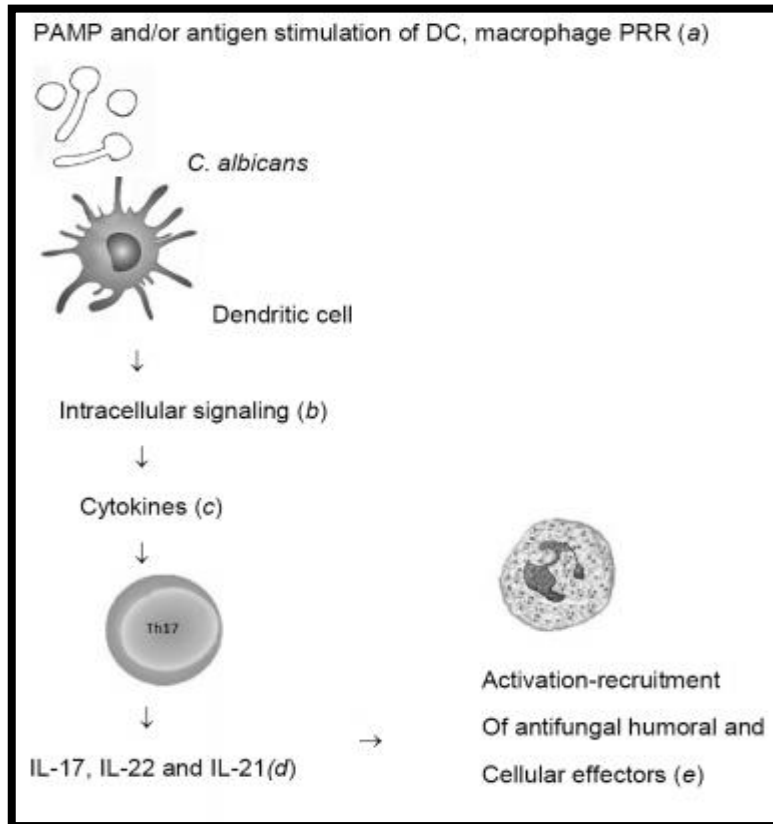


Figura 13. Células Th17 como plataforma celular mayor en la respuesta contra hongos.⁴⁹

En el presente trabajo evaluamos la presencia de IL-6 y TNF- α . La Interleucina 6 (IL-6) es una citocina que tiene una importante participación en las infecciones micóticas. Su falta de regulación se ha visto implicada en el desarrollo de reacciones inflamatorias crónicas. IL-6 es producida en gran cantidad por monocitos y macrófagos posterior a la estimulación de Receptores “Toll Like” (TLRs) con distintos Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). Se ha demostrado que esta citocina se incrementa en células epiteliales corneales en respuesta a lipopolisacáridos de la pared de *A. fumigatus*.⁵² Por otro lado, su bloqueo puede suprimir la respuesta de Th17 y mejorar significativamente la inflamación, al dejar de enviar estímulos a los fibroblastos, células endoteliales y macrófagos que producen quimiocinas, lo que sugiere que TH17 participa como una población de células T perpetuando de la inflamación.⁵³

En nuestro trabajo no pudimos evaluar la partición de IL6 por FLCH con respecto a ninguna infección ni con el tratamiento con ACV, debido a que las células producen grandes cantidades de la citocina, bajo las condiciones *in vitro* trabajadas.

Con respecto al factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), tiene múltiples efectos pro-inflamatorios y co-estimuladores. Regula la activación celular y la respuesta de defensa a varios patógenos y a condiciones autoinmunes. Es producido por los macrófagos y células dendríticas, y también se expresa en respuesta a la activación de PAMPs y los DAMPs.⁵⁴ Su producción por células de epitelio cornea, también es elevada y se ha sugerido que por sus efectos esta citocina participa en el proceso patológico de la infección, más que en la reparación o cicatrización.⁵⁵

En nuestro modelo se utilizaron FLCH infectados con conidios e hifas de *F solani*, en respuesta a estas citocinas. Poco se conoce a cerca de la participación de FLCH en la respuesta inflamatoria de la córnea. Se ha reportado que son capaces de suprimir linfocitos T a través de factores solubles principalmente de TGF- β 1, pero los autores no pudieron detectar la Interleucina 10 (IL-10), representante de una respuesta de tipo TH2. Además, los autores muestran que estas células pueden activar a linfocitos de sangre periférica, para que expresen CD28 una importante molécula necesaria para la activación de T. Por otro lado, estas células responden al factor de crecimiento endotelial vascular.⁵⁶

Con los hallazgos antes referidos, queda claro que los FLCH presentan una extraordinaria plasticidad y en los resultados presentados en esta tesis, estas células pudieran tener una participación reguladora frente a la infección por *Fusarium solani*.⁵⁷

Un hallazgo interesante aquí mostrado, es el efecto del Aciclovir sobre la producción de TNF- α por los FLCH infectados con *F. solani*. En nuestro laboratorio se ha mostrado que el Aciclovir es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* *F. solani*

y *A. fumigatus*⁵⁸, en otro trabajo Aciclovir actuó disminuyendo de manera importante las concentraciones mínimas inhibitorias que tiene Anfotericina B y Natamicina sobre los hongos mencionados.⁵⁹

El mecanismo de la actividad fúngica del Aciclovir es poco entendida, sin embargo, el estudio de moléculas que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha permitido el diseño de inhibidores de proteasas (PI). Su inhibición se basa en el bloqueo de la acción de proteasas del VIH.^{60, 61} Varios de estos inhibidores tiene una poderosa acción sobre aspartil proteasas solubles (SAP) de *Candida albicans*, y se ha propuesto que una combinación de PI, antifúngica podría ser útil en el tratamiento de infecciones micóticas en pacientes infectados por el VIH.^{62,63} Hay varios informes sobre el factor de virulencia estudio de *C. albicans* que sugieren que podría estar interactuando con SAP producido por el hongo.^{64, 65} Se ha reportado ampliamente que estas enzimas comprenden un factor de virulencia de *C. albicans*. Las SAP tiene la capacidad de romper los polímeros que proporcionan nutrientes para el crecimiento de hongos y moléculas que pueden inactivar el sistema inmune del huésped.⁶⁶

También se ha reportado que al menos 10 proteínas de SAP secretadas por *C. albicans* se expresan en diversas condiciones de crecimiento del patógeno durante la infección. El efecto de estos SAP se ha demostrado utilizando mutantes de SAP y por los inhibidores de estas proteasa.⁶⁷ La presencia de SAP está relacionada con la invasión precoz y penetración en el tejido y de las hifas de hongos en crecimiento.⁶⁸ Se ha descrito que SAP2 puede degradar proteínas de la matriz extracelular y proteínas de la superficie huésped, tales como queratina, colágeno, laminina, fibronectina y mucina; otras proteínas de la respuesta inmune innatas son susceptibles a SAP, tales como la proteinasa lactoferrina inhibidor de α -macroglobulina, el estallido respiratorio de los macrófagos, y casi todas las inmunoglobulinas.⁶⁶

Los resultados mostrados aquí podrían estar reflejando la acción del Aciclovir sobre hongos filamentosos en tejidos corneales. Aún no se tiene conocimiento si estos hongos producen SAPs al igual que *Candida albicans*, sin embargo, suponemos que sí podrían estar implicados, debido a que contamos con el antecedente de que el Aciclovir ayuda a disminuir las concentraciones mínimas inhibitorias de los antimicóticos, e inferimos que su acción es directamente sobre el patógeno.

Como ya mencionamos previamente, TNF- α es una citocina involucrada en los procesos inflamatorios generados en las infecciones. En este trabajo ACV demostró modular su expresión en los fibroblastos limbocorneales, pero aún desconocemos si esto conlleva a un efecto clínico benéfico al disminuir el daño tisular y la cicatrización o incluso perjudicial al no permitir que el organismo genere mecanismos de eliminación del hongo, como lo es la inflamación.

CONCLUSIONES

- La morfología de los fibroblastos limbocorneales humanos es afectada por conidios de *Fusarium solani* inactivos.
- La IL-6 se expresó de igual manera en células en presencia y ausencia de conidios, por lo que no es una citocina apropiada para evaluar el evento inflamatorio en FLCH cultivados *in vitro*.
- El Aciclovir modula a la baja la expresión relativa de TNF- α .

Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio que demuestra el efecto del Aciclovir en la producción de una citocina pro-inflamatoria en células corneales humanas infectadas con uno de los hongos que producen las queratomycosis más frecuentes en nuestro país.

Nuestros resultados indican que la administración de Aciclovir en infecciones micóticas corneales podría disminuir la reacción inflamatoria que se genera en los tejidos por la presencia de hongos filamentosos. Este hallazgo marca la pauta para iniciar más investigaciones que profundicen en el tema, para comprobar si

puede ser utilizado como alternativa y/o adyuvante a los tratamientos convencionales, es decir, para saber si realmente tiene algún efecto antimicótico per se.

BIBLIOGRAFÍA

1. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001;79(3):214-221
2. Keay LJ, Gower EW, Iovieno A, Oechsler RA, Alfonso EC, Matoba A, Colby K, Tuli SS, Hammersmith K, Cavanagh D, Lee SM, Irvine J, Stulting RD, Mauger TF, Schein OD. Clinical and microbiological characteristics of fungal keratitis in the United States, 2001-2007: A multicenter study. *Ophthalmology.* 2011; 118(5):920-926.
3. Gopinathan U, Sharma S, Garg P, Rao GN. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. *Indian J Ophthalmol.* 2009;57(4):273-279
4. Jurkunas U, Behlau I, Colby K. Fungal keratitis: changing pathogens and risk factors. *Cornea.* 2009;28(6):638-643
5. Pate JC, Jones DB, Wilhelmus KR. Prevalence and spectrum of bacterial co-infection during fungal keratitis. *Br J Ophthalmol.* 2006;90:289-292
6. Mejía, H, Pérez H, Pantoja C and Bautista VM. Coinfection bacteria-fungus causing corneal ulcer and keratitis, Association for research in vision and ophthalmology (ARVO 2010) Meeting fort Lauderdale, Florida, EUA
7. Bautista- de Lucio VM, Pérez-Cano HJ, Matias-Florentino M y Mejía-López H. Frecuencia de microorganismos asociados a infecciones oculares detectados por técnicas moleculares. 1er. Encuentro Internacional Dr. Francisco DurazoQuiróz sobre control de calidad en el laboratorio clínico, del 3 al 6 de noviembre de 2010 en D.F. México.
8. Gupta V, Dada T, Vajpayee RB, Sharma N, Dada VK. Polymicrobial keratitis after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 2001;17:147–148
9. Srinivasan M, Gonzales CA, George C, Cevallos V, MascarenhasJM, Asokan B, Wilkins J, Smolin G, Whitcher JP. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Madurai, south India. *Br J Ophthalmol* 1997;81: 965–971

10. Rosa RH Jr, Miller D, Alonso EC. The changing spectrum of fungal keratitis in South Florida. *Ophthalmology* 1994;101:1005-1013
11. Wilhelmus KR, Robinson NM, Font RA, Hamill MB, Jones DB. Fungal keratitis in contact lens wear. *Am J Ophthalmol.* 1988;106:708-714
12. Xie L, Dong X, Shi W. Treatment of fungal keratitis by penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol.* 2001;85:1070–1074
13. Ayaki M, Iwasawa A, Soda M, Yaguchi S, Koide R. Cytotoxicity of five fluoroquinolone and two nonsteroidal anti-inflammatory benzalkonium chloride-free ophthalmic solutions in four corneconjunctival cell lines. *ClinOphthalmol.* 2010;4:1019-1024.
14. Lin HC, Chu PH, KuoYH, Shen SC. Clinical experience in managing *Fusariumsolani* keratitis. *Int J ClinPract.* 2005;59(5):549-54
15. Yavas GF, Oztürk F, Küsbeci T, Cetinkaya Z, Ermis SS, Kiraz N, Inan UU. Antifungal efficacy of voriconazole, itraconazole and amphotericin b in experimental *fusariumsolani* keratitis. *Graefes Arch ClinExpOphthalmol.* 2008;246(2):275-279
16. Pérez-Balbuena AL, Vanzzini-Rosano V, Valadéz-Virgen Jde J, Campos-Möller X. *Fusarium* keratitis in Mexico *Cornea.* 2009;28(6):626-30
17. Mejía-López H, Bautista de Lucio VM, Santacruz-Valdes C, Climent-Flores A, Rodríguez-Tovar AV, Robles-Contreras A, Ponce Angulo DG, Martínez-Rivera MA. Effect of Acyclovir on the *In Vitro* growth of fungus, causing keratitis. ARVO 2012.Global Networking, Fort Lauderdale, Florida, USA.
18. Kumar A, Zhang J, Yu FS. Innate immune response of corneal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection: role of peptidoglycan in stimulating proinflammatory cytokine secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(10):3513-3522
19. Guo, H and X Wu. Innate responses of corneal epithelial cells against *Aspergillusfumigatus* challenge." *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;56(1):88-93

20. Maertzdorf J, Osterhaus AD, Verjans GM. IL-17 expression in human herpetic stromal keratitis: modulatory effects on chemokine production by corneal fibroblasts. *J Immunol*. 2002;169(10):5897-5903
21. Cotsarelis, G., S. Z. Cheng, et al. (1989). "Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells." *Cell* 57(2): 201-209.
22. Dua, H. S. and A. Azuara-Blanco (2000). "Limbal stem cells of the corneal epithelium." *Surv Ophthalmol* 44(5): 415-425.
23. Hatch, K. M. and R. Dana (2009). "The structure and function of the limbal stem cell and the disease states associated with limbal stem cell deficiency." *Int Ophthalmol Clin* 49(1): 43-52.
24. Ahmad, S., R. Stewart, et al. (2007). "Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche." *Stem Cells* 25(5): 1145-1155.
25. Li, W., Y. Hayashida, et al. (2007). "Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus." *Cell Res* 17(1): 26-36.
26. Blazejewska, E. A., U. Schlotzer-Schrehardt, et al. (2009). "Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells." *Stem Cells* 27(3): 642-652.
27. Notara, M., A. J. Shortt, et al. (2010). "IL6 and the human limbal stem cell niche: a mediator of epithelial-stromal interaction." *Stem Cell Res* 5(3): 188-200.
28. Li, D. Q. and S. C. Tseng (1995). "Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface." *J Cell Physiol* 163(1): 61-79.
29. Li, D. Q. and S. C. Tseng (1996). "Differential regulation of cytokine and receptor transcript expression in human corneal and limbal fibroblasts by epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, platelet-derived growth factor B, and interleukin-1 beta." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(10): 2068-2080.

30. Wilson, S. E., J. W. Walker, et al. (1993). "Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(8): 2544-2561.
31. Wilson, S. E., J. J. Liu, et al. (1999). "Stromal-epithelial interactions in the cornea." *Prog Retin Eye Res* 18(3): 293-309.
32. Wilson, S. E., L. Chen, et al. (1999). "Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding." *Exp Eye Res* 68(4): 377-397.
33. Imanishi, J., K. Kamiyama, et al. (2000). "Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea." *Prog Retin Eye Res* 19(1): 113-129.
34. Chen, T. C. and S. W. Chang (2010). "Effect of mitomycin C on IL-1R expression, IL-1-related hepatocyte growth factor secretion and corneal epithelial cell migration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(3): 1389-1396.
35. Ainscough, S. L., M. L. Linn, et al. (2011). "Effects of fibroblast origin and phenotype on the proliferative potential of limbal epithelial progenitor cells." *Exp Eye Res* 92(1): 10-19.
36. Meyer-Blazejewska, E. A., M. K. Call, et al. (2011). "From hair to cornea: toward the therapeutic use of hair follicle-derived stem cells in the treatment of limbal stem cell deficiency." *Stem Cells* 29(1): 57-66.
37. Johnson, A. C., F. P. Heintel, et al. "Activation of toll-like receptor (TLR)2, TLR4, and TLR9 in the mammalian cornea induces MyD88-dependent corneal inflammation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(2): 589-595.
38. Zhang, J., A. Kumar, et al. "Lack of MD-2 expression in human corneal epithelial cells is an underlying mechanism of lipopolysaccharide (LPS) unresponsiveness." *Immunol Cell Biol* 87(2): 141-148.
39. Pate JC, Jones DB, Wilhelmus KR. Prevalence and spectrum of bacterial co-infection during fungal keratitis. *Br J Ophthalmol.* 90:289-292.
40. Li N, Zhao GQ. 2011. Mechanism of the immune response to keratomycosis. *Zhonghua Yan KeZaZhi.* 47(4):378-381.

41. Wong TY, Au Eong KG, Chan WK, Tseng PS. 1996. Fusarium keratitis following the use of topical antibiotic-corticosteroid therapy in traumatised eyes. *Ann AcadMedSingapore*. 25:862-865.
42. Mould-Quevedo JF, Contreras-Hernández I, Gómez-Morales E, Mejía-Arangure JM, Garduño-Espinosa J. Tratamiento antimicótico empírico de pacientes inmunocomprometidos con neutropenia y fiebre persistente con sospecha de aspergilosis sistémica: análisis de costo-efectividad en México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 2009; 66(3):241-253.
43. Contreras-Hernández I, Antonio Guzmán-Sánchez J, Mould-Quevedo JF, Zendejas-Villanueva JL, Garduño-Espinosa J, Mejía-Aranguré JM. Evaluación económica de antimicóticos en pacientes no neutropénicos con candidiasis invasiva en México. *PharmacoEconomics-SpanishResearchArticles*. 2011; 8(1):16-28
44. Pradhan L, Sharma S, Nalamada S, Sahu SK, Das S, Garg P. Natamycin in the treatment of keratomycosis: correlation of treatment outcome and in vitro susceptibility of fungal isolates. *Indian J Ophthalmol*. 2011; 59(6):512-514.
45. Julio C. Hernández-Camarena, Víctor M. Bautista-de Lucio, Patricia Chirinos-Saldaña, Alejandro Navas, Arturo Ramírez-Miranda, Alejandro Climent-Flores, Mariana Ortiz-Casas, Nadia L. López-Espinosa, Carolina Gaona-Juárez, Luis A. Bautista-Hernández, Enrique O. Graue-Hernández. Queratitis infecciosas: tendencias microbiológicas y sensibilidad a antibióticos. Primer reporte anual del Grupo de Estudio de Microbiología Ocular del Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana". *Revista Mexicana de Oftalmología* Vol. 86. Núm. 04. Octubre - Diciembre 2012
46. Abbs AK, Lichtman AH y Pillai S. Tolerancia Inmunitaria Celular y Molecular p, en: *Inmunología Celular y Molecular*; 7ª ed. Ed. Elsevier Saunders España, S.I. 2012
47. Seal, D., Pleyer, U. *Ocular Infection*. Informa Healthcare. 2nd Ed. N.Y., USA. pp 166-167
48. Vemuganti GK1, Garg P, Gopinathan U, Naduvilath TJ, John RK, Buddi R, Rao GN. Evaluation of agent and host factors in progression of

- mycotickeratitis: A histologic and microbiologic study of 167 corneal buttons. *Ophthalmology* 2002;109(8):1538-1546
49. Cutler JE, DeepeGSJ, Klein BS. Advances in combating fungal disease: vaccines on the threshold. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5:13-28
 50. Karthikeyan RS, Leal SM Jr, Prajna NV, Dharmalingam K, Geiser DM, Pearlman E, Lalitha P. Expression of innate and adaptive immune mediators in human corneal tissue infected with *Aspergillus* or *fusarium*. *J Infect Dis.* 2011; 204(6):942-950
 51. Hamrah, P., Sahin, A. Parte 1 en *Ocular Surface Disease. Cornea, Conjunctiva and Tear Film.* Holland, EJ., Mannis, MJ. Ed. Sanders Elsevier, Inc. 2013 . pp 29-33.
 52. Roy RM, Klein BS. Dendritic cells in antifungal immunity and vaccine design. *Cell Host Microbe.* 2012;11(5):436-46 (FIGURA)
 53. Guo H, Wu X. Innate responses of corneal epithelial cells against *Aspergillus fumigatus* challenge. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56(1):88-93
 54. M. Mesquida, A. Leszczynska, V. Llorenç and A. Adán. Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 176: 301–309
 55. Yong Woo Ji, Yu Jeong Byun, Wungrak Choi, Eunae Jeong, Jin Sun Kim, Haemi Noh, Eun Sun Kim, Yun Jung Song, Seung Kook Park, and Hyung Keun Lee. Neutralization of Ocular Surface TNF- α Reduces Ocular Surface and Lacrimal Gland Inflammation Induced by In Vivo Dry Eye. *IOVS* November 2013 Vol. 54 j No. 12 7558
 56. Guo H, Wu X. Innate responses of corneal epithelial cells against *Aspergillus fumigatus* challenge. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56(1):88-93
 57. Garfias Y, Nieves-Hernandez J, Garcia-Mejia M, Estrada-Reyes C, Jimenez-Martinez MC. Stem cells isolated from the human stromal limbus possess immunosuppressant properties. *Mol Vis.* 2012;18:2087-95. Epub 2012

58. Mejía-López H, Bautista de Lucio VM, Santacruz-Valdes C, Climent-Flores A, Rodríguez-Tovar AV, Robles-Contreras A, Ponce Angulo DG, Martínez-Rivera MA. Effect of Acyclovir on the *In Vitro* growth of fungus, causing keratitis. ARVO 2012. Global Networking, Fort Lauderdale, Florida, USA.
59. Castro-Farías D, Herrerías-Villamil JR, Bautista-de Lucio VM, Mejía-López H. Acylcovir effect as antifungal adjuvanted on fungi isolated from patients with keratitis. ARVO 2014 Global Networking, Orlando, Florida, USA.
60. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev.* 2002;102(12):4501-4524.
61. Spector TI. The Molecular Aesthetics of Disease: The Relationship of AIDS to the Scientific Imagination. *HYLE--International Journal for Philosophy of Chemistry.* 2003;9(1) 51-71.
62. Hube B. Possible role of proteinases in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* 1998;15: 68–71.
63. Felk A, Kretschar M, Albretch A, et al. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg-1 regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* 2002;70(7): 3689–3700.
64. Peleg AY, Tampakakis E, Fuchs BB, et al. Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(38):14585–14590.
65. Carlson E. Synergistic effect of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* on mouse mortality. *Infect Immun* 1982;38: 921–924.
66. Carlson E. Enhancement by *Candida albicans* of *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, and *Streptococcus faecalis* in the establishment of infection in mice. *Infect Immun* 1983;1(39): 193–197