



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

**“Análisis del efecto de la membrana amniótica en la  
translocación nuclear de NF $\kappa$ B, IRF3 e IRF7 en miofibroblastos  
del limbo esclerocorneal”**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA**

**Edson Javier Robles Sánchez**

**TUTOR:**

**Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra**

**Facultad de Medicina UNAM**

**México Distrito Federal, Junio 2015**



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.



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.

Esta tesis se realizó bajo el financiamiento de CONACYT-SALUD-160286; CONACYT-CIENCIA BÁSICA 167438; PAPIIT IA203514 CVU 519572.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
I..INTRODUCCIÓN.....	2
1.0 Anatomía y fisiología de la superficie ocular. ....	2
1.1 Película Lagrimal.....	2
1.2 Conjuntiva.....	2
1.3 Limbo esclerocorneal.....	3
1.4 Córnea.....	4
2.0 Queratitis Estromal Herpética.....	6
2.1 Patofisiología.....	7
3.0 Inmunidad innata vs virus del herpes simple tipo I.....	9
3.1 Expresión, localización, ligandos y vía de señalización de TLR3.....	10
3.2 Expresión, localización, ligandos y vía de señalización de RIG1 y MDA5.....	12
3.3 Factores de respuesta a interferón 3 y 7 (IRF3 y 7).....	13
3.4 Interferones.....	14
3.5 NFκB.....	14
4.0 Membrana amniótica y queratitis estromal herpética.....	16
4.1 Estructura de la membrana amniótica.....	16
4.2 Trasplante de membrana amniótica.....	17
4.3 Propiedades biológicas de la membrana amniótica como sustrato en patología de superficie ocular.....	18
4.4 Trasplante de membrana amniótica en humanos como tratamiento en queratitis estromal herpética.....	19
II ANTECEDENTES .....	21
III JUSTIFICACIÓN.....	23

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
V PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	24
VI HPÓTESIS.....	24
VII OBJETIVO GENERAL.....	24
VIII OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
IX DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO.....	24
X DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
XI METODOLOGÍA.....	26
1.0 Procesamiento de la membrana amniótica.....	26
1.2 Aislamiento de las poblaciones celulares.....	26
1.3 Caracterización de miofibroblastos del limbo esclerocorneal por citometría de flujo e inmunofluorescencia.....	27
1.4 Cinética de translocación nuclear de factores de transcripción.....	28
1.5 Efecto de la membrana amniótica sobre la translocación nuclear de factores de transcripción.....	29
1.6 Análisis de imágenes.....	31
XII RESULTADOS.....	33
1.1 Caracterización de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia.....	33
1.2 Cinética de translocación nuclear de factores de transcripción.....	35
a) Cinética de translocación de NFκB.....	35
b) Cinética de translocación de IRF3.....	37
c) Cinética de translocación de IRF7.....	39

1.3 Efecto de la membrana amniótica en la translocación nuclear de NFκB, IRF3 e IRF7 .....	42
a) Efecto de la membrana amniótica en la translocación nuclear de NFκB.....	42
b) Efecto de la membrana amniótica en la translocación nuclear de IRF3 .....	44
c) Efecto de la membrana amniótica en la translocación nuclear de IRF7 .....	46
XIII DISCUSIÓN .....	49
XIV CONCLUSIONES.....	55
XV BIBLIOGRAFÍA.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Capas de la córnea
- Figura 2 Receptores de reconocimiento de patrones de herpesvirus reconocidos por receptores tipo Toll y receptores tipo RIG.
- Figura 3 Vías de señalización de TLR3
- Figura 4 Vía de señalización de RIG-1 y MDA5
- Figura 5 Expresión de interferones en célula dendrítica plasmocitoide.
- Figura 6 Proteínas que son promovidas por la translocación nuclear de NFκB
- Figura 7 Modelo Transwell.
- Figura 8 Caracterización de miofibroblastos aislados del limbo esclerocorneal
- Figura 9 Imágenes de Inmunofluorescencia de la expresión de α-SMA en MFBLEC.
- Figura 10 Inmunofluorescencia de cinética de translocación nuclear de NFκB
- Figura 11 Inmunofluorescencia de cinética de translocación nuclear de IRF3
- Figura 12 Inmunofluorescencia de cinética de translocación nuclear de IRF7

- Figura 13 Imagen representativa de 3 ensayos de Inmunofluorescencia de MFBLEC con marcaje para NF $\kappa$ B estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA.
- Figura 14 Gráfica de barras de la CFCT de los núcleos celulares de 3 ensayos con MFBLEC estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA con inmunomarcaje para NF $\kappa$ B a los 120 minutos .
- Figura 15 Imagen representativa de 3 ensayos de Inmunofluorescencia de MFBLEC con inmunomarcaje para IRF3 estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA.
- Figura 16 Gráfica de barras de la CFCT de los núcleos celulares de 3 ensayos con MFBLEC estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA con inmunomarcaje para IRF3 a los 120 minutos.
- Figura 17 Imagen representativa de 3 ensayos de Inmunofluorescencia de MFBLEC con inmunomarcaje para IRF7 estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA.
- Figura 18 Gráfica de barras de la CFCT de los núcleos celulares de 3 ensayos con MFBLEC estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA con inmunomarcaje para IRF7 a los 90 minutos.

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1      Aplicaciones de trasplante de MA en desórdenes de la superficie ocular.
- Tabla 2      Anticuerpos primarios utilizados para la cinética de NFκB, IRF3 e IRF7.
- Tabla 3      Anticuerpos secundarios utilizados para la cinética de NFκB, IRF3 e IRF7.
- Tabla 4      Anticuerpos primarios utilizados para ensayo de MFBLEC con y sin exposición a MA.
- Tabla 5      Anticuerpos secundarios utilizados para ensayo de MFBLEC con y sin exposición a MA.

## RESUMEN

**Propósito:** El trasplante de membrana amniótica es útil en el tratamiento de la queratitis estromal herpética, disminuye la inflamación y fomenta la pronta resolución de la infección viral. Algunos receptores de reconocimiento de patrones como TLR3, RIG-1 y MDA5 han sido implicados en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos del herpesvirus, activando la respuesta inflamatoria mediada por la activación de NFκB, por otra parte también son capaces de activar la vía de los interferones a través de IRF. El principal objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la membrana amniótica en la translocación nuclear de NFκB, IRF3 e IRF7 en miofibroblastos humanos aislados del limbo esclerocorneal cuando se estimulan con análogo de RNA de doble cadena (poli I:C).

**Métodos:** Los miofibroblastos humanos del limbo esclerocorneal fueron aislados de rodetes residuales de cirugías de trasplante de cornea y caracterizados mediante citometría de flujo, se estimularon con poli I:C en presencia o ausencia de membrana amniótica, la translocación nuclear de NFκB, IRF3 e IRF7 se determinó mediante microscopía de inmunofluorescencia.

**Resultados:** Poli I:C incrementa la translocación de NFκB en MFBLEC, cuando estos se exponen a membrana amniótica se observó una disminución de la translocación comparado con el control no estimulado. IRF3 se encontró constitutivamente expresado en el núcleo de los MFBLEC y su translocación no parece ser afectada por poli I:C y MA. IRF7 se encontró constitutivamente expresado en los MFBLEC. Poli I:C estimula la translocación de IRF7 hacia el núcleo de los MFBLEC, la translocación de este factor parece incrementarse cuando los MFBLEC se exponen a MA.

**Conclusiones:** Parte del efecto anti inflamatorio que ejerce la MA cuando se aplica sobre corneas con QEH puede ser explicado por la inhibición que ejerce la MA sobre la translocación de NFκB, por otra parte la MA parece no interferir con la translocación de IRF3 e incluso favorecer parcialmente la translocación de IRF7 y por lo tanto la vía de los interferones en los MFBLEC estimulados con poli I:C.

# I.- INTRODUCCIÓN

## 1) ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR

La superficie ocular es una estructura del ojo y de los párpados que anatómicamente comprende la conjuntiva, el limbo y la córnea; sus funciones son proveer una superficie externa que permita la transparencia para la visión y proporcione una barrera mecánica eficiente que evite la entrada de microorganismos dentro del ojo así como funciones nutricionales y metabólicas.

### 1.1 PELÍCULA LAGRIMAL

Proporciona confort a la superficie ocular a través de una lubricación constante. Las lágrimas son redistribuidas por el parpadeo a partir del menisco lagrimal<sup>1</sup>. Protege la superficie ocular de patógenos, alérgenos, desecación, cambios de temperatura y contaminantes. Además contiene elementos antimicrobianos como peroxidasa, lactoferrina, inmunoglobulina A y lisozima entre otros. La película lagrimal provee de un gran número de factores de crecimiento, neuropéptidos e inhibidores de proteasa importantes para mantener la integridad corneal y estimular la reparación de las heridas<sup>2</sup>.

### 1.2 CONJUNTIVA

La conjuntiva es la superficie mucosa que se extiende desde el limbo esclerocorneal a los márgenes palpebrales y la carúncula lagrimal. Sus funciones principales son de protección, proveer una película lagrimal acuosa y mucosa; es una fuente de tejido inmune y facilita el movimiento ocular.

**Conjuntiva Bulbar.-** Está constituida por un epitelio secretor estratificado no queratinizado anclado a una membrana basal y la sustancia propia subyacente. Presenta células epiteliales cuboidales y células de Goblet (5 a 10%), además de células de Langerhans, linfocitos y melanocitos. En el limbo, el epitelio cúbico se transforma a aplanado. Los pliegues radiales en el limbo son conocidos como la empalizada de Vogt<sup>3</sup>.

**Fórnix.-** La conjuntiva del fórnix está compuesta por un epitelio escamoso estratificado no queratinizado, células de Goblet, melanocitos y células dendríticas. La sustancia propia se compone de una capa superficial linfoide compuesta por tejido conectivo entremezclado con linfocitos, mastocitos y células plasmáticas. La lámina fibrosa profunda contiene los vasos, nervios y las glándulas de Krause.

**Conjuntiva palpebral.-** La unión mucocutánea marginal marca la transición del epitelio escamoso estratificado queratinizado de los párpados al no queratinizado de la conjuntiva palpebral<sup>4</sup>.

### **1.3 LIMBO ESCLERO-CORNEAL**

El epitelio límbico es estratificado no queratinizado, no presenta células de Goblet, contiene un gran número de células dendríticas maduras e inmaduras, linfocitos T, melanocitos altamente pigmentados y vasos sanguíneos subyacentes<sup>5</sup>.

**Células madre del epitelio límbico.-** Las células madre del epitelio límbico (LESC) residen en los nichos límbicos o empalizadas de Vogt, donde permanecen en un estado indiferenciado. Estas células pueden ser diferenciadas del epitelio corneal por varios marcadores, incluyendo p63, vimentina, integrina  $\alpha 9\beta 1$ , citoqueratina (CK)19, CK5, CK14, cadherina 342 y miembros de la proteína transportadora de ATP como ABCG2, con ausencia de marcadores para CK3 y de CK12. Algunas características que poseen son: un ciclo celular prolongado, alta capacidad de autorenovación, activación de la proliferación cuando se ponen en medio de cultivo o al presentarse un daño a la superficie ocular<sup>5,6</sup>.

**Células madre estromales.-** Los nichos límbicos también presentan células madre estromales, que se encuentran bajo las células madre epiteliales límbicas; son semejantes a fibroblastos con potencial de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica, además tienen una alta capacidad de formación de colonias de unidades de fibroblastos, así como propiedades inmunosupresoras<sup>7,8</sup>.

## **CÓRNEA**

La córnea es una estructura avascular y transparente cuyo aporte de glucosa y de oxígeno para sus funciones metabólicas proviene de la circulación límbica, el humor acuoso y la película lagrimal. Es una estructura altamente inervada que contribuye con 2/3 partes del potencial refractivo del ojo<sup>9</sup>. De anterior a posterior la cornea está compuesta por 5 capas (Figura 1).

**Epitelio corneal.-** El epitelio corneal es un epitelio estratificado compuesto por 5 o 6 capas de células en su región central que aumentan a 8-10 capas celulares en su zona periférica donde también residen células de Langerhans y melanocitos, en conjunto presentan un espesor uniforme de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . Las células más superficiales son escamosas planas sin queratina que están conectadas por cuerpos de inserción (desmosomas). Las capas intermedias constan de células con forma alada. La capa más interna (células basales) está formada por células columnares que están conectadas por hemidesmosomas. Entre las células epiteliales columnares y la membrana de Bowman hay una membrana basal de 60 a 65 nm de espesor.

**Membrana de Bowman.-** Es una capa acelular cuyo espesor oscila entre 8 y 14  $\mu\text{m}$  compuesta de fibras de colágeno transparente, adherida a la membrana basal epitelial por medio de fibras de colágeno tipo VII y fibronectina.

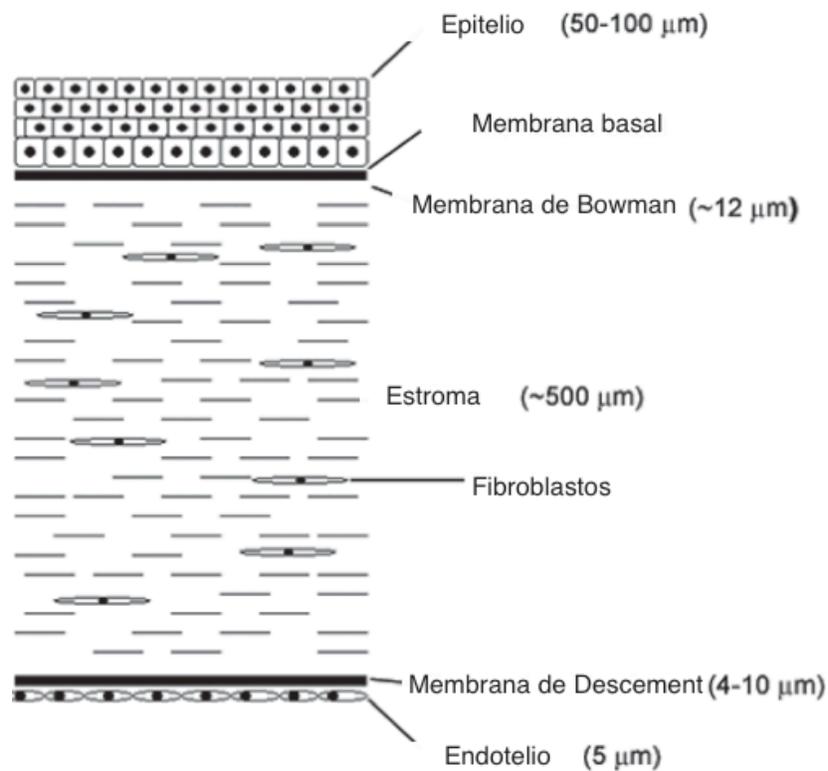
**Estroma.-** Constituye el 90% del espesor corneal tiene un grosor aproximado de 500  $\mu\text{m}$  y está formado por fibras de colágeno (tipo I principalmente), queratocitos o fibroblastos corneales y matriz extracelular. Los queratocitos son capaces de diferenciarse en miofibroblastos durante la reparación del estroma, después de una lesión o infección por virus o bacterias<sup>10</sup>.

El colágeno estromal está altamente organizado formando lamelas en red que se conforman paralelas unas a otras extendiéndose de limbo a limbo, son de un calibre similar y uniformemente espaciadas. La matriz extracelular está compuesta por proteoglicanos que son secretados por fibroblastos o queratocitos que se ubican paralelos a la superficie y cuyas extensiones se entrelazan entre sí mediante uniones tipo *gap*. Existen alrededor de 2,4 millones de queratocitos y su densidad se estima

que es un 30% superior en el estroma anterior que en el posterior. Se conoce que participan en la estabilidad de las lamelas y desempeñan un papel primordial en la cicatrización<sup>11</sup>.

**Membrana de Descemet.-** Es la membrana basal del endotelio, gradualmente incrementa en grosor desde el nacimiento (3  $\mu\text{m}$ ) hasta la vida adulta (8 a 10  $\mu\text{m}$ )<sup>12</sup>.

**Endotelio.-** Es una capa de células escamosas, hexagonales de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, su función es regular el fluido que entra a la córnea desde la cámara anterior. No se reproducen, por lo que cuando una célula endotelial muere, las células vecinas rellenan el espacio modificando su tamaño (polimegatismo) y forma (pleomorfismo)<sup>9,12</sup>.



**Figura 1.-** Capas de la córnea. Extraído y modificado de: Clout NJ et al. A model of FAS1 domain 4 of the corneal protein  $\beta\text{ig-h3}$  gives a clearer view on corneal dystrophies. Mol Vis, 2003; 9:440-448 (Ref. 13)

La superficie ocular es un conjunto de estructuras complejas que sirven como protección contra patógenos, mantienen la transparencia corneal y brindar confort al ojo, su patología constituye una de las principales causas de morbilidad ocular y de alteración de la visión. Dentro de las enfermedades que pueden afectarla destacan las queratitis que son una inflamación que afecta a la cornea, pueden estar originadas por múltiples causas; infecciones víricas, bacterianas, fúngicas o bien secundarias a procesos autoinmunes como la artritis reumatoide, clínicamente se caracterizan por producir dolor ocular intenso, enrojecimiento, lagrimeo y fotofobia. En ocasiones se forman úlceras en la córnea que pueden llegar a ser graves u ocasionar disminución de la agudeza visual por alteración de la transparencia.<sup>14</sup>

## **2) QUERATITIS ESTROMAL HERPÉTICA**

La queratitis causada por el virus del herpes simple es una de las mayores causas de ceguera secundaria a opacidad corneal ocupando el segundo lugar en países desarrollados después de la catarata <sup>15,16</sup>. La tasa de infección por virus del herpes simple es aproximadamente de 4.7 a 20.1 por cada 100,000 habitantes en los Estados Unidos<sup>17</sup>. El virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) es el causante del 95% de los casos de queratitis, pertenece a la familia Herpesviridae, presenta una cápside y en su interior ADN de doble cadena, es capaz de establecer latencia en los ganglios nerviosos y de causar reactivaciones de la enfermedad. Hasta 90% de la población por arriba de los 60 años presenta anticuerpos contra el VHS<sup>18</sup>.

Aunque el sitio blanco principal de infección del virus es el epitelio corneal un 25% de los casos presenta afectación estromal causando queratitis estromal herpética (QEH), ésta se divide en queratitis estromal necrotizante y en queratitis estromal inmune o queratitis disciforme<sup>16</sup>.

La queratitis estromal inmune es la más común, resulta de la recurrencia e infección crónica en el estroma corneal, clínicamente se caracteriza por presentar un infiltrado blanco estromal denso no ulcerativo que en algunos casos puede presentar un anillo inmune acompañante. En este caso la destrucción del estroma corneal está

mediado inmunológicamente sin que exista necesariamente una replicación viral activa<sup>19</sup>.

La queratitis estromal necrotizante se caracteriza por ser una inflamación severa que produce en corto tiempo ulceración, necrosis e infiltración densa del estroma y defecto epitelial, también presenta neovascularización<sup>19,20</sup>. La replicación viral activa así como el daño tisular mediado inmunológicamente contribuyen a la lesión corneal<sup>19,20,21</sup>.

## **2.1 Patofisiología**

La patofisiología de la enfermedad corneal por herpes es compleja e involucra componentes de 3 procesos: la infección activa por sí misma, la inflamación causada por la infección activa-inactiva y la respuesta inmune mediada por células y complemento<sup>22,17</sup>.

**Infección por virus del herpes simple:** El VHS-1 causa diversas lesiones a la célula que infecta, tanto estructurales como bioquímicas. Algunas alteraciones que resultan de la infección viral son: las modificaciones en el núcleo, daño a sitios específicos de los cromosomas y del citoesqueleto y alteraciones en la membrana plasmática. Si el virus entra a una fase lítica, la replicación tendrá lugar en la célula hospedadora, causando lisis celular y diseminación viral a las células vecinas<sup>23</sup>.

**Inflamación causada por la infección activa e inactiva:** Las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas (CD) y los macrófagos localizados en la membrana basal del epitelio corneal y en el espesor del estroma son fundamentales para montar una respuesta inmune a partir de los antígenos virales de las células infectadas en la córnea, para directamente presentar estos antígenos a las células T en los nódulos linfáticos<sup>24,25</sup>. En los modelos murinos de infección corneal por VHS1, se

ha demostrado que las CD residentes en la córnea y aquellas derivadas del torrente sanguíneo reaccionan rápidamente a la infección por virus del herpes y se requieren para atraer linfocitos asesinos naturales (NK) y monocitos al sitio de la infección corneal<sup>26,27</sup>. El queratocito es un fibroblasto que actúa como célula presentadora de antígeno durante la infección ocular por VHS-1 en modelos murinos de queratitis herpética, incrementando la expresión de IFN, CD80, CD40 y CD137<sup>28,29</sup>, además producen una gran cantidad de citocinas que incluyen célula T normal expresada y secretada regulada en activación o CCL5 (RANTES), proteína quimioatáctica de monocitos (MCP-1), ligando 1 del motivo C-C de quimiocina (CCL1), proteína inflamatoria de macrófagos 2 alfa o CXCL2 (MIP2) y eotaxina. Existe evidencia de que MCP1 es responsable de atraer linfocitos TCD4+ al interior del estroma corneal<sup>19</sup>. Durante la infección activa el sistema inmune innato, incluyendo neutrófilos, células NK y los linfocitos T $\gamma\delta$  son activados y reclutados al sitio de la infección en el tejido corneal donde liberan citocinas que pueden inhibir la replicación viral, pero también pueden causar daño tisular y atraer posteriormente células inmunes al mismo sitio<sup>22</sup>. Células inflamatorias, principalmente neutrófilos infiltran el espesor de la lesión. Sin embargo, aún después de la eliminación del virus (infección inactiva) se observa una actividad inflamatoria más robusta en el estroma donde la replicación y la expresión genética viral es casi indetectable<sup>30</sup>. Esta reacción inmunoinflamatoria está orquestada principalmente por células TCD4+, que reconocen epítopos peptídicos UL21 y UL49 correspondientes a proteínas tegumentarias del VHS-1 más otros antígenos derivados del virus y de las células hospedadoras. La formación de neovasos es otro factor que contribuye a la patogénesis de la QEH<sup>31</sup>.

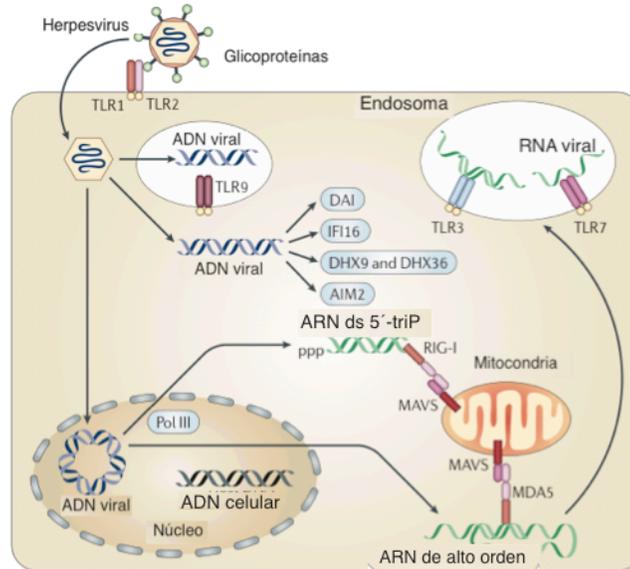
### **Reacción inmune mediada por células y complemento:**

Cuando el virus penetra el estroma, infecta a los queratocitos, se replica y causa citólisis de la célula, lo que produce una inflamación aguda pero también los antígenos virales solubles permean desde la superficie corneal y se anclan a las membranas de los queratocitos, alterando su antigenicidad e iniciando una respuesta inmune mediada por células NK cuando no hay una sensibilización previa por células T junto con estas últimas actúa la IgG con la consecuente activación del complemento<sup>32,33</sup>.

### 3) INMUNIDAD INNATA VS VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO 1

El control inmunológico de las infecciones por herpesvirus se lleva a cabo tanto por la respuesta inmune innata, como por el adaptativa<sup>34</sup>. Sin embargo gran parte del daño ocasionado al tejido corneal es secundario a esta actividad inmunológica. En la respuesta inmune innata los interferones tipo I (INF-I) y las células asesinas naturales (NK) tienen una función fundamental para contener la infección viral<sup>35,36</sup>. El sistema inmune innato se inicia con la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) los cuáles detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que a su vez son estructuras altamente conservadas evolutivamente características de patógenos<sup>36</sup>.

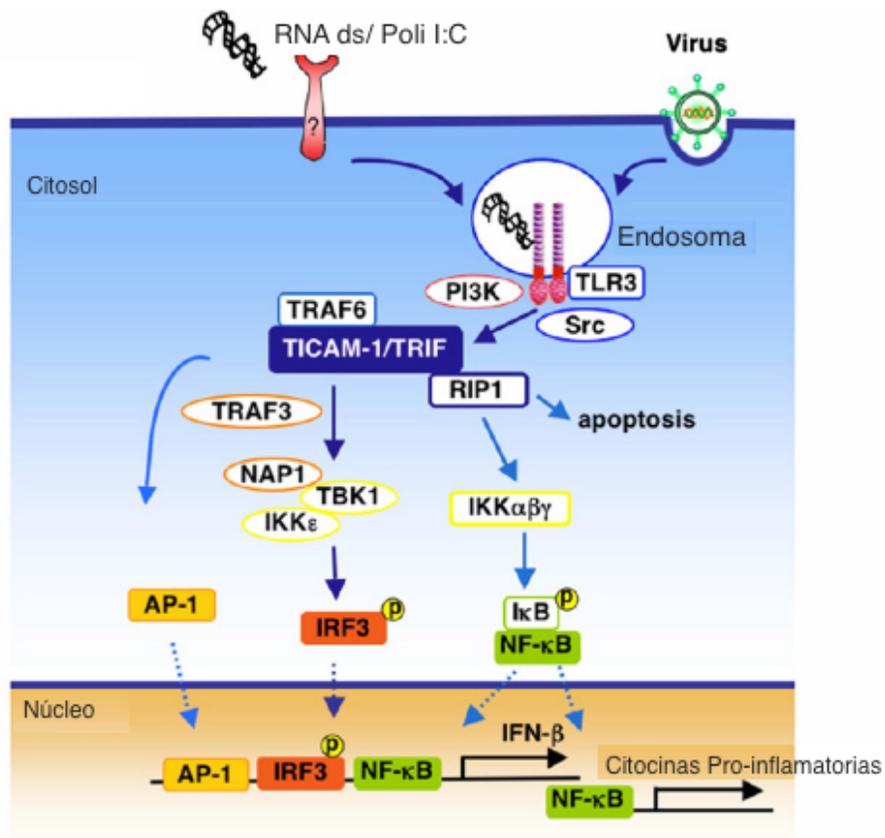
Los receptores tipo Toll (TLR) son los PRR mejor caracterizados debido a que fueron los primeros en ser descritos, son receptores acoplados a membrana que se localizan en la membrana plasmática y en los compartimientos endosomales, su activación alerta al sistema inmune de infecciones por medio de la liberación de citocinas inflamatorias activando la respuesta inmune innata. Los TLR de la membrana plasmática generalmente reconocen moléculas hidrofóbicas como los lípidos y algunas proteínas mientras que los TLR endosomales reconocen ácidos nucleicos<sup>37,38</sup>. Dentro de ellos TLR2, TLR3, TLR7 y TLR9 se conoce que están involucrados en el reconocimiento de PAMP del VHS-1 (Figura 2)<sup>39,40</sup>. TLR2 reconoce las partículas de la superficie viral, TLR9 reconoce los motivos CpG contenidos en el DNA del herpesvirus, TLR7 reconoce el herpesvirus a partir del RNA de cadena simple. Durante la replicación viral el ARN de doble cadena (ARNds) es producido como un intermediario del ciclo de replicación o como parte del ARN del genoma viral. El ARNds originado de la replicación viral así como el ARNds endógeno que se libera de las células en proceso de degeneración activa al TLR3. La cascada de señalización de estos TLR inducen la activación del factor nuclear kappa B (NFκB) y de factores de respuesta a interferones (IRF) promoviendo la expresión de citocinas proinflamatorias y de IFN tipo I<sup>40,41,42,43,44</sup>.



**Figura 2.-** PRR de herpesvirus reconocidos por TLR y RLR. El viri3n del herpesvirus es reconocido por TLR2 en la membrana celular, mientras que el genoma viral es reconocido por TLR9, diferentes especies de ARN producto de la replicaci3n del herpesvirus son reconocidas por RIG-1 y MDA5 en el citosol. Modificado de: Innate Recognition of Viruses. *Immunity*. 2007; 27: 370-383 (Ref. 50).

### 3.1 Expresi3n, localizaci3n, ligandos y v3a de se3alizacion de TLR3.-

El TLR3 se encuentra constitutivamente expresado por distintos tipos celulares incluidos miofibroblastos aislados del limbo esclerocorneal (MFBLEC) adem3s es fuertemente inducido por IFN tipo I durante infecciones virales en la mayor3a de las c3lulas<sup>45,46</sup>. Se encuentra localizado principalmente en los endosomas maduros, sin embargo tambi3n se ha descrito en las membranas de algunos tipos celulares. Su ligando principal es ARNs y reconoce an3logos sint3ticos de ARNs como el 3cido poliriboinos3nico:poliribocitidilico (poli I:C)<sup>47,48</sup>. Cuando el TLR3 reconoce a sus ligandos es fosforilado por la cinasa de 3 fosfatidilinositol (PI3K) y la cinasa de tirosina c-Scr lo que conlleva a su dimerizaci3n, posteriormente utiliza la mol3cula adaptadora del receptor Toll 1 (TICAM-1) o adaptador que contiene el dominio TIR inductor de interfer3n beta (TRIF) para estimular la fosforilaci3n del factor de respuesta a interfer3n tipo 3 (IRF3) que se transloca al n3cleo e induce el gene de interfer3n  $\beta$  principalmente. Por otra parte, tambi3n induce la degradaci3n de los inhibidores de NF $\kappa$ B, condicionando su activaci3n y translocaci3n al n3cleo celular promoviendo la producci3n de citocinas pro inflamatorias dentro de otros mediadores (Figura 3)<sup>21</sup>.

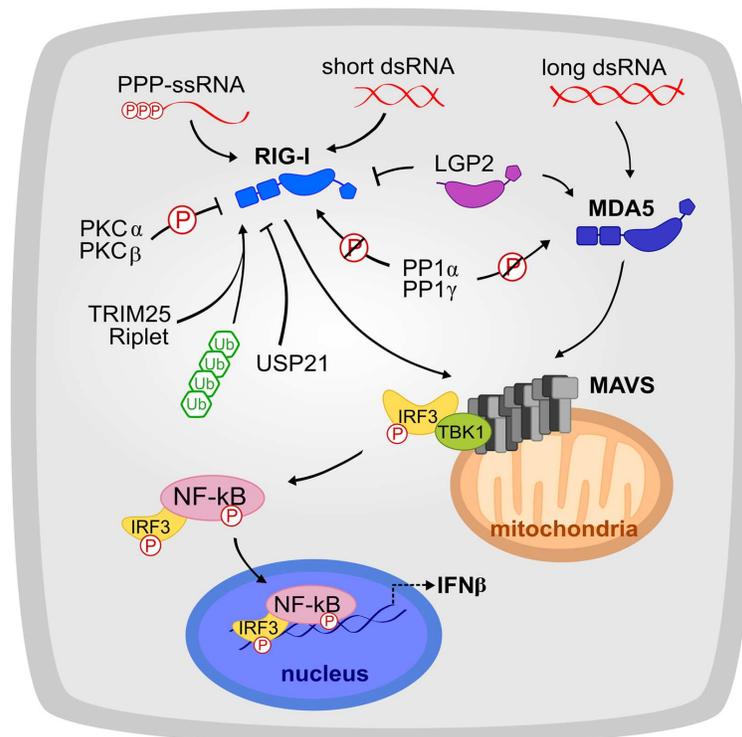


**Figura 3.-** Vías de señalización de TLR3. La activación de TLR3 promueve la translocación de IRF3 y NFκB al núcleo celular para promover la transcripción de interferones tipo I y de citocinas pro inflamatorias. Modificado de TLR3: interferon induction by double stranded RNA including poly (I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60; 807 (Ref. 47).

Por otra parte el RNA intracelular de los herpesvirus también puede ser reconocido por receptores tipo gen inducible por ácido retinoico 1 (RLR) que son expresados por la mayoría de las células y también son fuertemente inducidos por IFN's<sup>49</sup>. La replicación viral induce estructuras de RNA de alto orden que se acoplan a RLR. El gen inducible por ácido retinoico 1 (RIG-1) y la proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5 (MDA5) pertenecen a los RLR que identifican ARNs proveniente de la replicación viral de los herpesvirus y también se une a análogos sintéticos de ARN como poli I:C (Figura 2).

### 3.2 Expresión, localización, ligandos y vía de señalización de RIG-1 y MDA5.-

En MFBLEC se han caracterizado la expresión de estos receptores, además son inducidos por poli I:C. Se expresan en el citosol de manera constitutiva en casi todas las células, están implicados en el reconocimiento de VHS-1 al menos en macrófagos y fibroblastos murinos<sup>51,52,53</sup>. En macrófagos humanos se ha identificado a MDA5 como el principal mediador de IFN's en presencia de VHS-1<sup>51</sup>. La activación de RIG1 y de MDA5 conlleva el reclutamiento de proteínas mitocondriales activadas por señales virales (MAVS) que a través de los dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) promueve su polimerización con lo que se activa la cascada de señalización de RLR's. MAVS activa la cinasa de I $\kappa$ B (IKK) y la cinasa que se une a TANK (TBK1) mismos que activan los factores de transducción NF $\kappa$ B e IRF3 translocándose al núcleo celular promoviendo al igual que los TLR's la producción de proteínas pro inflamatorias e Interferones tipo I (INF $\alpha$  y  $\beta$ ) (Figura 4)<sup>54</sup>.

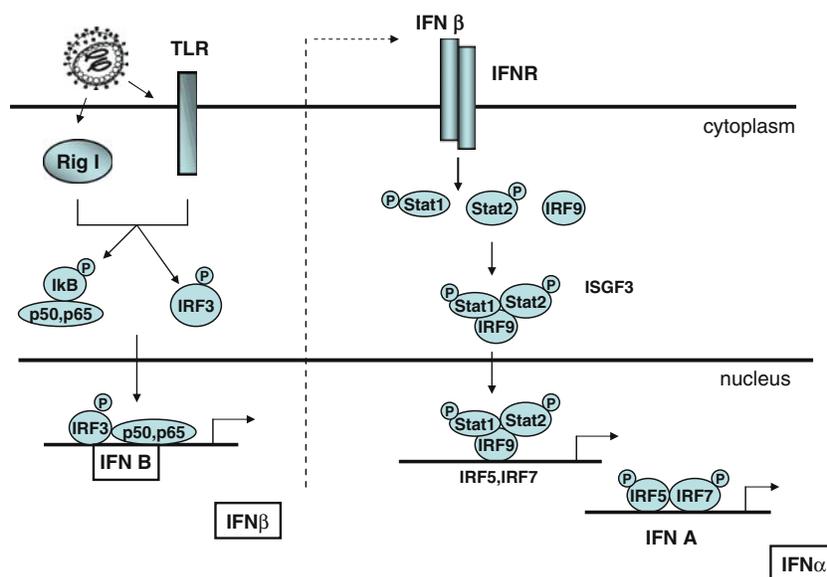


**Figura 4.-** Vía de señalización de RIG 1 y MDA5. RIG 1 y MDA5 promueve la translocación nuclear de IRF3 y NF $\kappa$ B promoviendo la transcripción de interferones tipo I y de citocinas pro inflamatorias a través de la activación de MAVS. Tomado de Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. Front Immunol. 2014; Jul 23;5:342 (Ref. 55).

### 3.3 Factores de respuesta a interferón 3 y 7 (IRF3 y 7).-

Los factores de respuesta a interferón (IRF) son una familia de factores de transcripción que comprende 9 miembros que se expresan en las células de los mamíferos. En general, estructuralmente contienen un dominio de unión a ADN en su región N terminal y un dominio de asociación a otros IRF's (IAD), su región C terminal media su homo-hetero oligomerización con otros miembros de la familia IRF's.

IRF3 se encuentra constitutivamente expresado en la mayoría de las células incluyendo fibroblastos; en ausencia de infección se encuentran en una conformación latente en el citoplasma. Es activado por TLR3, TLR4, RIG-1 y MDA5 por dos cinasas I $\kappa$ B no canónicas: TBK1 e IKK $\epsilon$ . En células infectadas IRF3 se fosforila lo que conlleva su dimerización, translocación al núcleo y su asociación con NF $\kappa$ B y la proteína activada 1 (AP1) donde estimula la transcripción de IFN $\beta$ . A su vez el IFN $\beta$  promueve la transcripción de IRF7 que homodimerizado o heterodimerizado con IRF5 o IRF3 se translocan al núcleo donde estimula la transcripción de IFN  $\alpha$  principalmente (Figura 6) <sup>50, 56,57</sup>.



**Figura 5.-** Expresión de interferones por IRF. La translocación nuclear de IRF3 y su asociación con NF $\kappa$ B promueve la expresión de IFN  $\beta$  que a su vez promueve la expresión de otros IRF's a través del receptor de interferones (IFNR) como IRF7 e IRF5. IRF7 heterodimerizado con otros interferones como IRF3 e IRF5 regula la expresión de interferones  $\alpha$ . Tomado de: Type I Interferon: The Ever Unfolding Story. CTMI 2007;316:41-70 (Ref. 58).

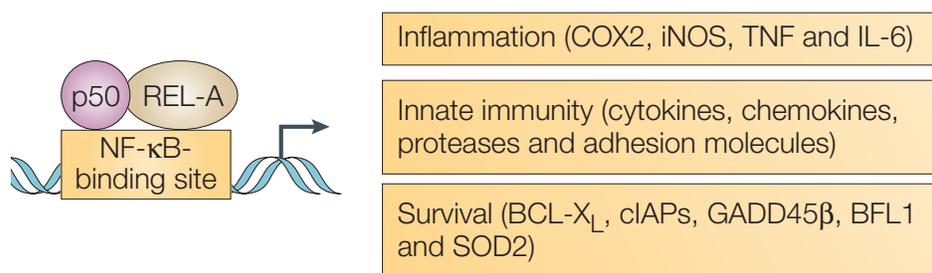
**3.4 Interferones.-** Los IFN-1 inducen la expresión de proteínas que tienen por objeto restringir la diseminación viral de célula a célula<sup>56</sup>. IFN- $\beta$  modula la activación de diversos genes incluyendo 2'-5' OAS (2'-5' oligoadenilatosintetasa), proteína cinasa R (PKR), GTPasas de resistencia a mixovirus (Mx GTPasa), proteína motivo tripartito (TRIM) y p56 que contribuyen al efecto antiviral vía la inhibición de la síntesis de proteínas y la replicación viral<sup>50,56,58</sup>.

2'-5'OAS es una enzima que induce la activación de RNasa L que se encuentran latente en el núcleo y que media la degradación de ARN viral. PKR previene el reciclamiento de difosfato de guanosina que bloquea el transporte del RNA viral. Mx GTPasa y TRIM interfieren con la liberación de partículas virales. La enzima editora de la apolipoproteína B mediante ARNm semejante al polipéptido catalítico 3 (APOBEC-3) es una proteína que induce mutaciones en el ADN viral y también es inducida por IFN. Para confinar y aislar el foco de infección los IFN-1 pueden inducir la activación de la apoptosis para eliminar las células infectadas por virus.

Los IFN pueden limitar la infección viral al modular la inmunidad innata y adaptativa. Los IFN tipo I activan directamente las células asesinas naturales confinando la infección. Promueven la maduración de CD incrementando la expresión de citocinas que reclutan y activan células asesinas naturales potenciando la citotoxicidad y eliminando las células infectadas. También se reclutan linfocitos T y B al sitio de la infección, potencian la diferenciación de linfocitos TCD4+ en sus variantes Th1 y Th2. Existe evidencia de que la activación de IFN tipo I fomentan la expansión clonal y proliferación de linfocitos TCD8+<sup>52,59,60</sup>.

**3.5 NF $\kappa$ B.-** Las propiedades únicas de la vía de NF $\kappa$ B la convierten en un regulador central de la respuesta celular fisiológica y durante la enfermedad. NF $\kappa$ B es rápidamente activada en respuesta a una gran variedad de estímulos inductores de estrés, con lo que la célula es capaz de detectar rápida y sensiblemente potenciales daños en el microambiente. NF $\kappa$ B también determina la respuesta celular al convertir la señal activadora en una reprogramación rápida de la expresión genética. Promueve la expresión de genes pro inflamatorios que son importantes para la activación de la

respuesta inmune, incluyendo genes que codifican citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión por las células endoteliales vasculares y las células residentes de los tejidos lo que permite el reclutamiento y activación de células efectoras inicialmente neutrófilos, posteriormente macrófagos y otros leucocitos y también enzimas y moléculas con actividad microbicida. Los programas transcripcionales pro inflamatorios que son modulados por NFκB organizan y ejecutan la respuesta inflamatoria. Estos programas transcripcionales difieren dependiendo del estímulo inducido y el tipo celular que se encuentra mediando el proceso. Por otro lado NFκB protege a la célula de la apoptosis al inducir la expresión de proteínas anti apoptóticas que incluyen BCL-X, proteína inhibidora semejante a FLICE y miembros de la familia de inhibidores de la apoptosis (IAP). Además NFκB también protege a la célula de la necrosis al inhibir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la sobre regulación transcripcional de proteínas con funciones anti oxidantes como la manganeso súper óxido dismutasa (MnSOD) y la cadena pesada de ferritina. De esta manera NFκB tiene funciones duales por un lado promueve la sobrevivencia de la célula y al mismo tiempo monta una respuesta para proteger al organismo de infecciones y lesiones (Figura 7) <sup>61,62</sup>. NFκB es producido por el epitelio corneal posterior a la infección por VHS-1 acompañado de un incremento en la expresión de IL6, IL8, factor de necrosis tumoral α (TNF α) e INF β <sup>63</sup>.



**Figura 6.-** Proteínas que son promovidas por NFκB. Tomado de NF-kappa B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nat Rev Immunol. 2005 Oct;5(10):749-59 (Ref.64).

La QEH es una enfermedad inmunopatológica en la que participan complejos mecanismos que incluyen el efecto citopático celular por la replicación viral y el daño causado por la activación de la inmunidad innata y adquirida, con la consecuente infiltración de células infamatorias y la liberación de mediadores como citocinas,

quimiocinas y moléculas proinflamatorias, las estrategias terapéuticas para contener la infección y disminuir la inflamación comprenden clásicamente la aplicación de medicación tópica antiviral como aciclovir y trifluridina combinado con corticoesteroides tópicos como prednisolona. Sin embargo existen casos que son resistentes a este tratamiento, por lo que el uso asociado de membrana amniótica (MA) ha resultado de gran utilidad principalmente en QEH necrotizante<sup>74,75</sup>.

#### **4) MEMBRANA AMNIOTICA Y QUERATITIS ESTROMAL HERPETICA**

La membrana amniótica (MA) o amnios es una membrana delgada, avascular, casi transparente que durante el desarrollo fetal comprende la parte interna de la placenta, delimita la cavidad amniótica y rodea completamente al embrión o feto.

##### **4.1 Estructura de la membrana amniótica.**

Histológicamente comprende 3 capas diferentes: el epitelio, membrana basal y estroma que en conjunto representan un grosor de 0.02-0.05 mm de ancho .

##### **Epitelio**

Es una monocapa de células cuboidales activas con microvellosidades presentes en su superficie apical. Destaca su función secretora de mediadores del parto como prostaglandinas dentro de muchas otras proteínas.

##### **Membrana basal**

Esta compuesta de colágeno tipo IV, V y VII (que también se encuentran en las membranas basales de la córnea y la conjuntiva), contiene una gran cantidad de proteoglicanos como heparán sulfato, además también es rica en fibronectina, citoqueratinas (CK's), actina, vimentina, desmoplaquinas, espectrina y laminina.

## **Estroma**

Se encuentra dividido en tres láminas contiguas pero distintas: la **capa interna** que se encuentra en contacto con la membrana basal y contribuye a la fuerza tensil de la membrana debido a su contenido de elastina y colágeno tipo I y II, la **lámina fibroblástica** media que es gruesa y esta compuesta de una red suelta de fibroblastos y la capa más externa es la **lámina esponjosa** que es llamada así porque su contenido alto de proteoglicanos y glicoproteínas le dan apariencia esponjosa además presenta un entramado no fibrilar de colágeno tipo III. El estroma permite que la MA sea fácilmente resecable del corion por disección roma<sup>65,66</sup>.

## **4.2 Trasplante de membrana amniótica.**

La ausencia de la expresión de antígenos de histocompatibilidad HLA-A, B y DR<sup>67</sup>, asociado a su transparencia y su habilidad de ser preservada por largos periodos de tiempo hacen de la MA un substrato ideal para el alotrasplante. Ha sido ampliamente utilizada en diversas áreas de la medicina y en especial en patología de superficie ocular<sup>68</sup>. La MA fue utilizada por primera vez en el área oftalmológica por De Roth en 1940 para tratar defectos conjuntivales con un éxito bajo debido a que la inclusión de corion causaba una alta inmunogenicidad<sup>69</sup>. Sorsby en 1947 la utilizó en quemaduras oculares agudas obteniendo adecuados resultados<sup>70</sup>. Desde entonces por motivos desconocidos no se utilizó hasta que en 1995 Kim y Tseng desarrollaron una técnica para procesar y conservar la MA y la utilizaron en modelos murinos con deficiencia de células madre limbales probando su utilidad en la reconstrucción de la superficie ocular<sup>71</sup>. Desde entonces esta técnica ha sido ampliamente utilizada como adyuvante en diversas enfermedades como son: a nivel corneal (defecto epitelial persistente, úlcera corneal trófica, queratopatía en banda, queratopatía bullosa dolorosa o con erosiones corneales recidivantes), en patología corneo conjuntival (insuficiencia límbica parcial o total, asociada a trasplante de células límbicas) y en patología conjuntival (defectos conjuntivales extensos, simbléfaron, pterigión)<sup>72</sup>. También ha sido utilizada como substrato para la expansión *exvivo* de células madre conjuntivales y limbales<sup>73</sup>. Existen varios estudios clínicos donde se demuestra su utilidad en QEH necrotizante<sup>74,75</sup>.

Memade y cols. en su artículo de revisión del 2012<sup>65</sup>, divide el trasplante de MA en 3 grandes grupos como: injerto, parche o relleno.

**Tabla 1.** Aplicaciones de trasplante de MA en desórdenes de la superficie ocular

<b>Tipo de trasplante de MA</b>	<b>Aplicación</b>
Injerto	Trasplante de MA sobre el estroma de córnea o esclera induciendo la proliferación y diferenciación del epitelio de la superficie ocular.
Parche	La MA puede ser usada para cubrir la superficie ocular inflamada, especialmente cuando se asocia con defectos epiteliales. También es útil en la fase aguda de quemaduras químicas-térmicas o en el síndrome de Stevens Johnson.
Relleno	Ulceraciones profundas corneales o esclerales o pequeñas perforaciones refractarias a la terapia médica convencional pueden ser tratadas rellenando los defectos estromales con pequeñas piezas de MA, seguido de un injerto o parche de MA sobre el área.

Tomado de A.C. Mamede et al. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. Cell Tissue Res. 2012: 349;447-458 (Ref. 65).

#### **4.3 Propiedades biológicas de la membrana amniótica como substrato en patología de superficie ocular.**

**Promoción de la epitelización.-** la membrana basal de la membrana amniótica semeja fuertemente a aquella localizada en la conjuntiva y en la córnea especialmente en la composición de colágeno. Por lo tanto sirve como un substrato en el cual las células epiteliales pueden crecer fácilmente. Se han descrito 4 efectos regenerativos del epitelio corneal promovidos por la membrana amniótica: 1) facilitación de la migración de células epiteliales 2) reforzamiento de la adhesión de las células epiteliales basales 3) permite la diferenciación de células epiteliales 4) prevención de la apoptosis de células epiteliales. La laminina contenida en la membrana basal de MA podría promover del andamiaje para la epitelización<sup>76</sup>.

**Propiedades anti fibróticas.-** El ácido hialurónico fetal es un importante constituyente de la matriz estromal de la membrana amniótica. Éste suprime la vía de señalización de factor de crecimiento transformante beta (TGF  $\beta$ ), por lo que se inhibe la proliferación corneal de los fibroblastos corneales, conjuntivales y limbales. La diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos también es inhibida, por lo tanto es posible una reducción en el proceso de cicatrización después de cirugía de pterigión y de las reconstrucciones de la superficie ocular<sup>77</sup>.

**Propiedades anti inflamatorias.-** Algunos mecanismos inmunoreguladores promovidos por MA son: inhibiendo a los linfocitos aloreactivos, inhibiendo la expresión de citocinas pro inflamatorias como IL1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL2, IL8, interferón  $\gamma$ , factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF  $\beta$ ), factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), induciendo la apoptosis de linfocitos y de células inflamatorias infiltrantes<sup>78-82</sup>.

**Propiedades anti angiogénicas.-** Producción de diversas sustancias anti angiogénicas potentes que incluyen tromboespondina 1 (TSP1), endostatina y los cuatro tipos de inhibidores de metaloproteasas (TIMP 1, 2, 3 y 4). Además contiene proteínas de matriz extracelular involucradas en la supresión de la neovascularización corneal<sup>80-81</sup>.

#### **4.4 Trasplante de membrana amniótica en humanos por queratitis estromal herpética.**

Algunas de las propiedades biológicas de la MA antagonizan el daño observado durante la QEH, donde la formación de defectos epiteliales-estromales, el infiltrado inflamatorio, la neovascularización, la formación de cicatrices corneales son fenómenos que caracterizan a esta enfermedad, en contraparte la MA promueve la epitelización, la disminución de la inflamación, la formación de vasos y de cicatrices. Por lo tanto la MA es una opción terapéutica para esta enfermedad, existen reportados principalmente dos estudios clínicos que han investigado su uso para tratar QEH necrotizante en pequeñas series de pacientes. El primer estudio incluyó 5 pacientes

con enfermedad ocular recurrente quienes se presentaron con una QEH necrotizante activa que no respondió al tratamiento con antivirales y lubricantes por una semana previa al trasplante de membrana amniótica (TMA). La medicación posoperatoria incluyó dexametasona tópica al 0.1% y Aciclovir oral. Todas las úlceras sanaron en 7 a 28 días (media de 16.8 días) después del TMA. Además 4 de los 5 pacientes experimentaron una mejoría en la agudeza visual de 2 o más líneas de Snellen posteriores al TMA comparados con los valores pre operatorios. Se observó en algunos ojos la recurrencia de la queratitis después de la disolución de la membrana amniótica. No se observaron complicaciones como sobreinfecciones relacionados con el uso de TMA<sup>74</sup>. Un estudio mas reciente evaluó el uso de TMA combinado con el uso de antivirales y corticoesteroides en 15 ojos con ulceración corneal necrotizante, infiltración estromal densa y edema estromal que persistió por más de dos semanas a pesar de la terapia antiviral tópica y sistémica. Al final del seguimiento que fue de 7 a 13 meses, la agudeza visual mejoró de 2 a 3 líneas de Snellen en 14 ojos (93%) con curación de las úlceras centrales y paracentrales en tan solo 2 semanas. No se observó recurrencia de la enfermedad en ningún ojo<sup>75</sup>.

## II.- ANTECEDENTES

La membrana amniótica es utilizada en cirugía oftalmológica en múltiples enfermedades principalmente de la superficie ocular, además existe evidencia clínica de su utilidad en el tratamiento de QEH necrotizante, donde se destaca su efecto antiinflamatorio, antiviral y epitelizante. Con objeto de estudiar el efecto antiinflamatorio que ejerce la MA varios estudios se han realizado en modelos murinos de queratitis estromal herpética, demostrándose una disminución en la producción y actividad de metaloproteasas de matriz corneal e interleucinas (TNF $\alpha$ , IL1- $\alpha$ , IL2 e IL12); disminución de la infiltración y proliferación de linfocitos T y de sus marcadores de activación celular (CD25, CD69 y MHC II). Además la MA induce apoptosis sobre las células inflamatorias que infiltran el estroma corneal (neutrófilos, monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+). También se ha determinado su efecto sobre fibroblastos del estroma corneal concluyendo que existe una disminución de la expresión de quimiocinas como el ligando 1 del motivo C-X-C (CXCL1) y otras proteínas quimiotácticas como IL8 y eotaxina<sup>83-85</sup>.

Recientemente en nuestro laboratorio se ha planteado que los PRR pueden estar involucrados en el mecanismo inmunoregulatorio desencadenado por la MA. Por lo que varios ensayos fueron realizados en miofibroblastos aislados del limbo esclerocorneal (MFBLEC) estimulados con poli I:C simulando una infección viral como la que sucede en la QEH. Se concluyó mediante arreglos proteicos que la MA inhibe la secreción de quimiocinas proinflamatorias (CCL1, CCL2, CCL5, CXCL-1, CXCL8 y CXCL10) y citocinas proinflamatorias (G-CSF e IL-6), además de promover un incremento del receptor antagonista de IL-1 (IL1ra) que es antiinflamatoria. Mediante RT-PCR se demostró que los transcritos de CCL1, CCL2, CXCL10 e IL-6 se encontraban disminuidos, generando un micro ambiente anti inflamatorio. Por otra parte también se determinó mediante citometría de flujo que la expresión de TLR3, RIG-1 y MDA5 en miofibroblastos disminuye tras su exposición con membrana amniótica por lo que es

posible que estas vías también pudieran estar implicadas en la inmunoregulación que ejerce MA cuando se coloca sobre la superficie ocular<sup>45</sup>. Además en otro estudio Bauer y cols. demostraron que la MA disminuye la expresión de NFκB y de la cinasa alfa y beta de IκB (IKKα e IKKβ), así como la fracción fosforilada de IKKβ (P-IKKβ), e IκB<sup>86</sup>.

### III.- JUSTIFICACIÓN

Una de las principales causas de ceguera a nivel mundial corresponden a casos de queratitis estromal herpética, en las que el virus del herpes tipo 1 y 2 infecta células constitutivas de la córnea como los queratocitos los cuales son capaces de activar la respuesta inmune innata a través de PRR desencadenando una intensa actividad inflamatoria; misma que forma parte de la patofisiología de la enfermedad provocando opacidad corneal, úlceras corneales y alteración de la estructura corneal con la consecuente disminución de la visión. Está demostrado que la MA mejora clínicamente el curso de la enfermedad ocular en humanos disminuyendo la inflamación y contribuyendo a la regeneración de la superficie ulcerada. En nuestro laboratorio se ha investigado el efecto de la membrana amniótica sobre los miofibroblastos aislados del limbo esclerocorneal bajo el estímulo de un análogo del ARNs (Poli I:C) simulando una infección viral. En dicho modelo se determinó que los miofibroblastos estando en contacto con MA disminuyen la expresión de RIG1, MDA5 y TLR3 y la secreción de citocinas pro inflamatorias en comparación con miofibroblastos igualmente estimulados sin MA. Por lo tanto es posible que la MA modifique las vías de señalización de TLR3, RIG1 y MDA5; las cuales convergen en la translocación de los factores transcripción NFκB, IRF3 e IRF7, que son fundamentales para la producción de citocinas pro inflamatorias (principalmente a través de la translocación de NFκB) y de preparar a las células para responder a la infección viral por medio de los interferones (promovido por la translocación de IRF3 e IRF7). Es posible que MA suprima o modifique la translocación de estos factores.

## **IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se tiene evidencia de que la MA inhibe la expresión de los PRR; TLR3, RIG1 y MDA5 y la producción de citocinas proinflamatorias en MFBLEC estimulados con poli I:C, sin embargo se desconoce el efecto que pudiera tener en la translocación nuclear de NFκB, IRF3 e IRF7.

## **V.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Es capaz la MA de modificar la translocación nuclear de NFκB, IRF3 e IRF7 en MFBLEC estimulados con poli I:C inhibiendo algún factor de transcripción en particular o bien favoreciendo la supresión o activación de la translocación de los 3 factores?

## **VI.- HIPÓTESIS**

La MA modifica la respuesta inflamatoria de MFBLEC estimulados con poli I:C modificando la translocación de NFκB, IRF3 e IRF7.

## **VII.- OBJETIVO GENERAL**

Analizar la translocación de NFκB, IRF3 e IRF7 en MFBLEC estimulados con poli I:C en contacto con MA.

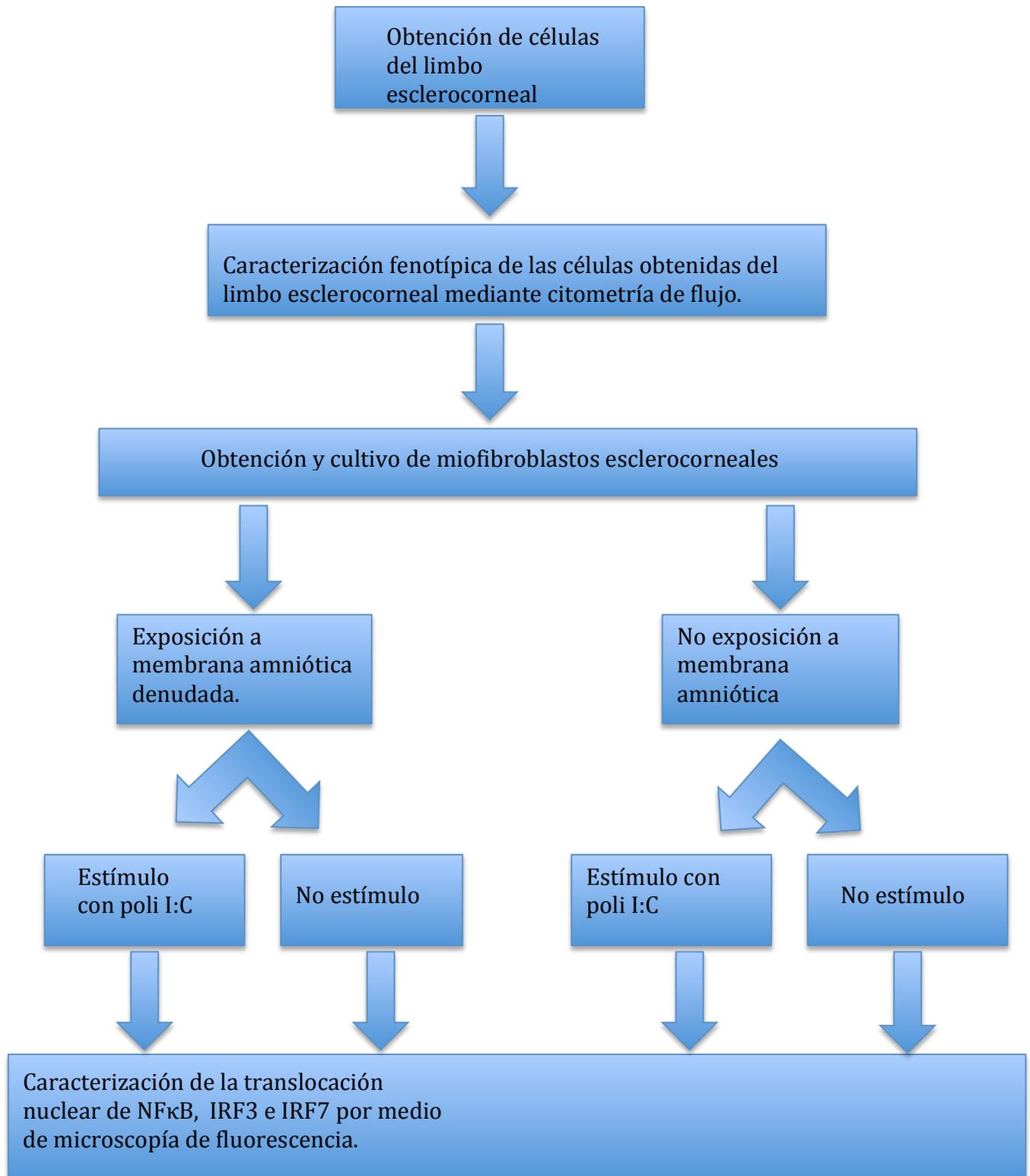
## **VIII.- OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Identificar los patrones de translocación de NFκB, IRF3 e IRF7 en MFBLEC estimulados con poli i:C.
- 2.- Comparar los niveles de translocación nuclear en MFBLEC estimulados con poli I:C en presencia o no de MA.

## **IX.- DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO**

Se trata de un estudio de investigación experimental in vitro.

## X.- DISEÑO EXPERIMENTAL



# **XI.- METODOLOGÍA**

## **1.0 Procesamiento de la membrana amniótica.**

La MA es procesada bajo estrictas condiciones asépticas, obtenida de donadoras en las que se realizó cesárea electiva con el correspondiente consentimiento informado de la paciente y con una evaluación serológica para enfermedades potencialmente transmisibles como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC) y sífilis. La placenta obtenida a partir de parto vaginal no es útil para nuestros propósitos por la potencial contaminación de la flora vaginal normal y la posible activación de las metaloproteasas.

Se eliminaron restos de sangre y remanentes del tejido mediante lavado con solución salina estéril, empleando penicilina (50µg/ml), estreptomicina (50 µg/ml), anfotericina B (100 µg/ml) (Sigma ®) y gentamicina (100 µg/ml) (Gibco®) para reducir riesgos de contaminación. Por medio de disección roma se separó el amnios del corion, se colocó sobre papel de nitrocelulosa de diferentes tamaños, teniendo cuidado de colocar el lado estromal en contacto con la porción de nitrocelulosa del papel. Se colocó en frascos con medio de conservación (medio Eagle-Dulbecco y glicerol 50% v/v) a -80 °C. Este procedimiento denominado criopreservación de MA permite la conservación de la MA hasta por un periodo de 1 a 2 años, además el glicerol del medio de conservación es antiviral y antibacterial. Para los ensayos realizados se descongeló la membrana durante 30 minutos y se lavó con solución salina estéril.

## **1.2 Aislamiento de las poblaciones celulares.**

De los rodetes empleados para trasplantes de córnea realizados en el Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana I.A.P", previamente donados y bajo los estatutos del CENATRA (Centro Nacional de Trasplantes) se obtuvieron los rodetes sobrantes donados por el Banco de Ojos del mismo Instituto para la unidad de Investigación. Cada rodete esclerocorneal se

proceso bajo medidas asépticas y de esterilidad en una campana de seguridad biológica Clase IIA/B3 (Forma Scientific®). Fueron incubados con dispasa 1.7 UI/ml durante 1 hora a 37°C. Se retiró con bisturí los restos uveales y el exceso de esclera del rodete y se lavó con solución salina de fosfatos (PBS). Posteriormente los rodetes fueron desepitelizados mediante raspado y nuevamente se lavaron con PBS. Se colocaron en colagenasa 0.75 mg/ml durante 24 horas a 37°C. Los restos sólidos después del proceso enzimático fueron retirados mecánicamente, el resto se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C. Eliminado el sobrenadante se suspendió el sedimento de células en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM F12) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y penicilina-estreptomina se sembraron en botellas de cultivo celular de 25 cm<sup>3</sup> y se incubaron a 37°C con una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta alcanzar una confluencia celular del 80 al 90% de células.

### **1.3 Caracterización de MFBLEC por citometría de flujo y microscopía de inmunofluorescencia.**

Se caracterizaron las poblaciones celulares obtenidas mediante inmunomarcaje para proteínas específicas de miofibroblastos y células epiteliales. Para preparar las suspensiones celulares se agregó PBS-EDTA (ácido etileno-diamino-tetra acético) tripsina 0.25% a monocapas de MFBLEC con una confluencia del 90% durante 10 minutos y se detuvo la reacción enzimática agregando DMEM/F12 suplementado con SFB al 10%. Posteriormente las células fueron recolectadas y contadas en hemocitómetro determinando viabilidad celular con azul de tripano al 0.1%. Se agregaron 300 µl de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos y se realizó un lavado con PBS. Se agregaron 200 µl de amortiguador (PBS-BSA, 0.1%-saponina 1%) durante 15 minutos y se realizó un lavado con PBS.

Para la identificación de citoqueratina, las células fueron incubadas con un anticuerpo anti citoqueratina humana (DakoCytomation®) durante 20 minutos a 4°C, usando como anticuerpo secundario un anti IgG de ratón biotinado (Jackson ImmunoReserch®) 20 minutos a 4°C y finalmente incubadas con estreptavidina-ficoeritrina/Cy5 (SavPE-Cy5) durante 15 minutos a 4°C. Para la identificación de vimentina, las células

se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti vimentina humana conjugado a isotiocinato de fluoresceína (FITC) (Santa Cruz, California ®) durante 20 minutos a 4°C. Todas las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Bioscience ®). Se adquirieron 10 000 eventos por cada muestra.

En el ensayo de microscopía de Inmunofluorescencia se colocaron 5,000 MFBLEC sobre cubreobjetos de vidrio para microscopio (Fisher Scientific®) cargados con poli L-lisina, se dejaron incubando a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con DMEM F12 y SFB al 10%, posteriormente se cambió el medio con DMEM F12 no suplementado, se fijaron con PFH al 4% y se realizó un inmunomarcaje para  $\alpha$  actina de músculo liso ( $\alpha$  SMA) utilizando un anticuerpo anti  $\alpha$  SMA ( $\alpha$  SMA rabbit polyclonal abcam® ab5694). Después de múltiples lavados con solución PBS, se agregó el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 (Goat Anti-Rabbit IgG). Las imágenes fueron analizadas con el microscopio Apotome.2 Imager.Z2 (Zeiss®).

#### **1.4 Cinética de translocación de NF $\kappa$ B, IRF3 E IRF7.**

Se realizaron ensayos en MFBLEC para determinar el tiempo en que se presenta la translocación de NF $\kappa$ B, IRF3 e IRF7 mediante microscopía de inmunofluorescencia al ser estimulados con poli I:C. Se colocaron 5,000 MFBLEC en placas de cultivo de 24 pozos (Costar®) sobre cubreobjetos de vidrio para microscopio (Fisher Scientific®) cargados con poli L-lisina, se dejaron incubando a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con DMEM F12 y SFB al 10%, posteriormente se cambió el medio con DMEM F12 no suplementado. Trascorridas 12 h fueron estimulados con poli I:C 10 $\mu$ g/ml (InvivoGen ®) también se mantuvieron células no estimuladas como control. Se mantuvieron en incubación durante 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 min. Posteriormente fueron sometidos a fijación con PFH al 4% durante 10 minutos a 4°C, lavados y sometidos a agitación por 5 minutos 3 veces con PBS, finalmente se dejaron en solución de bloqueo con los respectivos anticuerpos contra NF $\kappa$ B (NF $\kappa$ B goat polyclonal sc-1191 Santa Cruz Biotechnology ®), IRF3 (mouse monoclonal IgG1 sc-33641 Santa Cruz Biotechnology®) e IRF7 (IRF7 rabbit polyclonal abcam® ab62505) durante toda la noche (Tabla2), fueron lavados

nuevamente con PBS y se les agregó los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 3) dejándolos en agitación durante 2 horas y en obscuridad. Después de ser lavados con PBS por última vez cada portaobjetos fue colocado en laminillas con 10  $\mu$ l con solución 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Vectashield  $\text{\textcircled{R}}$  Vector Laboratories, Inc.). Las laminillas fueron observadas y analizadas con el microscopio Apotome.2 Imager .Z2 (Zeiss).

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios utilizados para la cinética de NF $\kappa$ B, IRF3 e IRF7.

Anticuerpo	Tipo	Isotipo	Reactividad	Especie
NF $\kappa$ B	Policlonal	IgG	NF $\kappa$ B p50 y p105 Humano	Cabra
IRF3	Monoclonal	IgG	IRF3 Humano	Ratón
IRF7	Policlonal	IgG	IRF7 Ratón, Rata, Humano	Conejo

**Tabla 3.** Anticuerpos secundarios utilizados para la cinética de NF $\kappa$ B, IRF3 e IRF7.

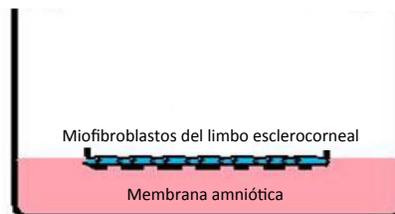
Anticuerpo	Isotipo blanco	Reactividad	Especie
Vector Laboratories Inc. $\text{\textcircled{R}}$	IgG	Cabra	Ratón
Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 594	IgG	Ratón	Cabra
Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 488	IgG	Conejo	Asno
Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 488	IgG	Cabra	Asno

### 1.5 Efecto de la membrana amniótica sobre la translocación de NF $\kappa$ B, IRF3 E IRF7.

Para realizar este ensayo se tomaron en cuenta los tiempos en los que se observó mayor translocación de los factores de traducción determinados por medio de la cinética de inmunofluorescencia.

Se depositaron 5,000 MFBLEC en placas de cultivo de 24 pozos (Costar $\text{\textcircled{R}}$ ) sobre cubreobjetos de vidrio para microscopio (Fisher Scientific $\text{\textcircled{R}}$ ) cargados con poli L-lisina, se dejaron incubando a 37 $^{\circ}$ C con una atmosfera de CO $_2$  al 5% con medio DMEM F12 con SFB al 10%, cuando los MFBLEC se adhirieron a los cubreobjetos se cambió el

medio a DMEM F12 no suplementado. Trascorridas 12 horas fueron estimulados con poli I:C 10µg/ml (InvivoGen®) teniendo su correspondiente control no estimulado. Se mantuvieron en incubación durante 60, 90, 120 y 180 minutos, y se colocaron en conjunto con membrana amniótica en un modelo Transwell durante 60 minutos. Posteriormente fueron sometidos a fijación con PFH 4%, múltiples lavados con PBS, finalmente se dejaron en solución de bloqueo con los respectivos anticuerpos primarios contra NFκB (NFκB goat polyclonal ab-16502 Abcam ®), IRF3 (rabbit polyclonal ab 25950 abcam ®) e IRF7 (IRF7 rabbit polyclonal abcam ® ab62505) durante 24 horas, fueron lavados nuevamente con PBS y se les agregó el anticuerpo secundario correspondiente, manteniéndose en agitación durante 2 horas y en oscuridad. Después de ser lavados con PBS por última vez cada portaobjetos fue colocado en laminillas con 10 µl de solución de DAPI (Vectashield ® Vector Laboratories, Inc.). Las laminitas fueron observadas y analizadas con el microscopio Apotome.2 Imager.Z2 (Zeiss®).



**Figura 7.-** Modelo Transwell. En las placas de cultivo se colocó la membrana amniótica en el fondo de los 6 pozos, sobre ésta se depositaron laminillas con miofibroblastos adheridos en medio DMEM.

**Tabla 4.** Anticuerpos primarios utilizados para ensayo de MFBLEC con y sin exposición a MA.

Anticuerpo	Tipo	Isotipo	Reactividad	Especie
<b>NFκB</b>	Policlonal	IgG	NFκB p65 Ratón, gallina, humano.	Conejo
<b>IRF3</b>	Policlonal	IgG	IRF3 Ratón y humano.	Conejo
<b>IRF7</b>	Policlonal	IgG	IRF7 Ratón, Rata y humano.	Conejo

**Tabla 5.** Anticuerpo secundario utilizado para ensayo de MFBLEC con y sin exposición a MA.

Anticuerpo	Isotipo blanco	Reactividad	Especie
<b>Alexa Fluor® 488</b>	IgG	Conejo	Asno
<b>Vector</b>	IgG	Cabra	Ratón

**Laboratories Inc.**  
®

## 1.6 Análisis de Imágenes

El análisis de las imágenes se realizó utilizando el software ImageJ® de uso libre, la metodología empleada se basó en la publicada por Burges et al<sup>87</sup>. Por cada campo de 40x se seleccionó con la herramienta predeterminada por el software el área correspondiente al núcleo celular de todas las células del campo, el área seleccionada fue analizada tomando en cuenta los siguientes parámetros del analizador de imágenes: área, densidad integrada y valor medio de grises. Los resultados obtenidos organizados en una tabla fueron copiados a una hoja de Excel®. Se realizó la misma operación tomando como controles 7 áreas adyacentes a las células seleccionadas para identificar los mismos valores del fondo. Se empleó la fórmula para identificar el valor de la fluorescencia celular total corregida (CTCF) siguiente:

CTCF = Densidad integrada - (Área de la célula seleccionada X Fluorescencia media del fondo obtenida).

De los resultados obtenidos se obtuvo el promedio de la fluorescencia de los núcleos celulares por campo expresada en CTCF por cada ensayo realizado. Se promediaron los resultados obtenidos por el total de los ensayos.

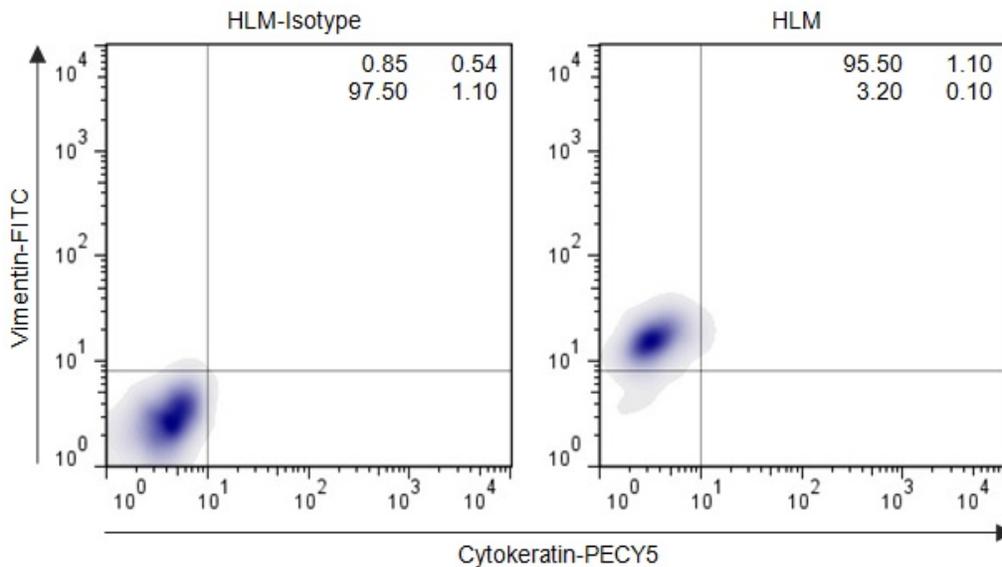
Para determinar el tiempo de translocación de cada uno de los factores se graficaron los promedios obtenidos de todos los ensayos realizados y se seleccionaron los tiempos en los que se identificó mayor fluorescencia.

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS® se realizó ANOVA de un solo factor.

## XII.- RESULTADOS

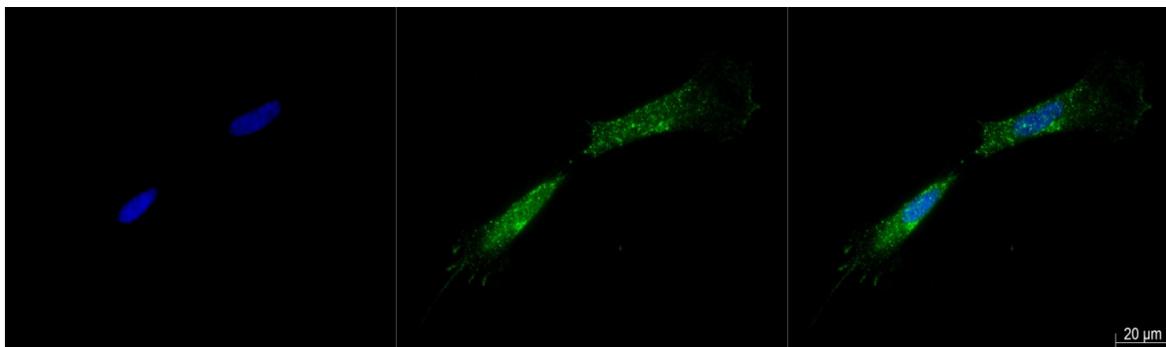
### 1.1 Las poblaciones celulares aisladas del limbo esclerocorneal expresan vimentina y $\alpha$ -SMA.

Los miofibroblastos limbocorneales se caracterizaron midiendo la expresión de vimentina y citoqueratina. En la figura 6 se observan gráficas de puntos que representan en el eje de las abscisas la expresión de citoqueratina y en el de las ordenadas la expresión de vimentina, resultando el 95% de las células positivas para vimentina mientras que solo el 1% fueron citoqueratina positivas. Por lo que las células utilizadas en los ensayos corresponden a miofibroblastos limbocorneales con un alto porcentaje de pureza del cultivo (Figura 8).



**Figura 8.-** Caracterización de miofibroblastos aislados del limbo esclerocorneal. Grafica de puntos que representa a la izquierda los MFBLEC con el control de isotipo y a la derecha los MFBLEC vimentina positivos.

Para demostrar la expresión de  $\alpha$ -SMA en los MFBLEC se realizó un ensayo de microscopía de inmunofluorescencia. Los MFBEC fueron fijados y se les agregó un anticuerpo contra  $\alpha$ -SMA, posteriormente se agregó un anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488®). Las imágenes analizadas con el microscopio Apotome.2 Imager.Z2 (Zeiss®) revelaron la presencia de este marcador en las células analizadas (Figura 9).



**Figura 9.-** Imágenes de Inmunofluorescencia de la expresión de  $\alpha$ -SMA en MFBLEC. Se observó mediante microscopía de Inmunofluorescencia que los MFBLEC expresan el marcador  $\alpha$ -SMA de manera constitutiva (la escala de la barra representa 20 $\mu$ m).

Estos hallazgos confirmaron que las células empleadas en nuestros ensayos son miofibroblastos.

## **1.2 Determinación del tiempo en el que ocurre la translocación nuclear de NFκB, IRF3 E IRF7 en MFBLEC cuando se estimulan con poli I:C.**

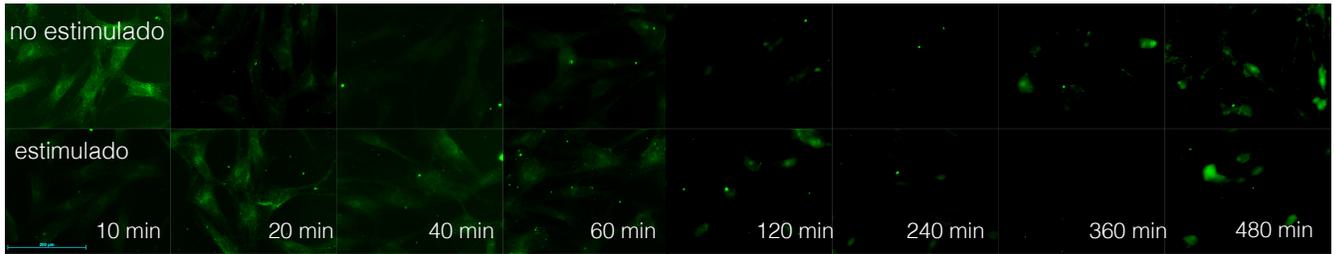
Con el objeto de determinar cual es el tiempo ideal en el que se observa la translocación nuclear de NFκB, IRF3 e IRF7 en los MFBLEC cuando se estimulan con poli I:C se realizó este ensayo. Los MFBLEC fueron colocados sobre cubreobjetos de vidrio poli-L lisinados en medio DMEM F12 no suplementado posteriormente fueron estimulados con poli I:C (10μg/ml) manteniéndose el respectivo control no estimulado, después de diferentes intervalos de tiempo los MFBLEC fueron sometidos a un proceso de fijación y aplicación de anticuerpos contra los diferentes factores de transcripción para poder ser analizados posteriormente mediante microscopía de inmunofluorescencia.

### **a) NFκB se transloca al núcleo celular de los MFBLEC a los 120 minutos posteriores al estímulo con poli I:C:**

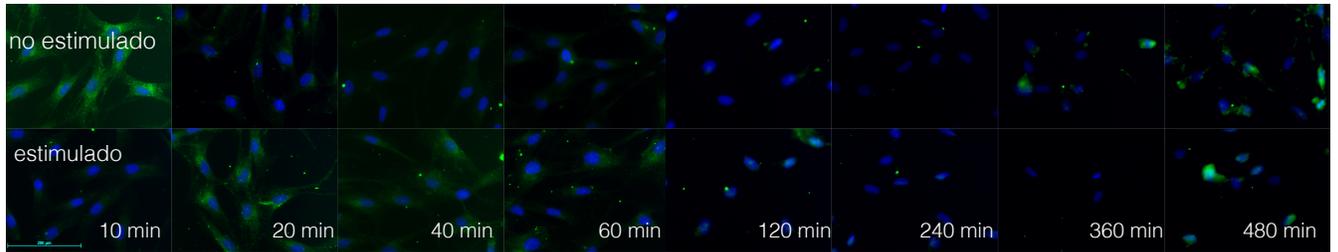
La activación de MDA5, RIG-1 y TLR3 por PAMP's como ARNds o poli I:C estimulan la fosforilación de los inhibidores de NFκB, promoviendo la translocación de las sub unidades transcripcionales de éste último permitiendo la expresión de citocinas pro inflamatorias, para determinar el tiempo en el que ocurre el fenómeno de translocación de NFκB en los MFBLEC estimulados con poli I:C se realizó este ensayo, donde observamos que la translocación nuclear de NFκB ocurre inicialmente a los 20 minutos, incrementándose a los 120 minutos siendo esto estadísticamente significativo tal como lo muestra la gráfica lineal (Figura 7 C).

En este ensayo se observó que a los 20 minutos después del estímulo con poli I:C la proteína NFκB se encontró distribuida homogéneamente en vesículas en el citoplasma, después de 40 minutos la distribución de NFκB fue principalmente perinuclear, a los 90 minutos una mayor cantidad de NFκB se observó en el núcleo celular incrementándose de manera sustancial a los 120 minutos, tiempo en el que los núcleos celulares de los MFBLEC presentaron la mayor fluorescencia para posteriormente disminuir abruptamente y presentar un nuevo pico a los 480 minutos (Figura 7 A y B).

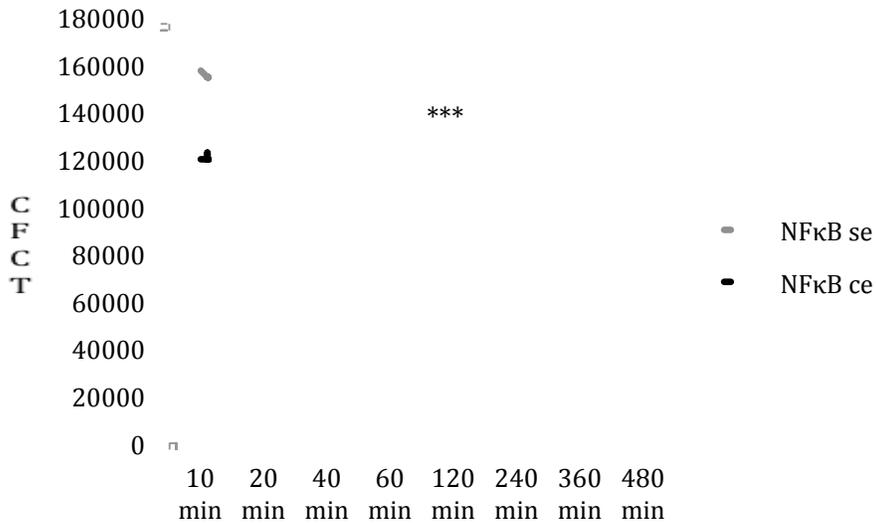
A



B



C



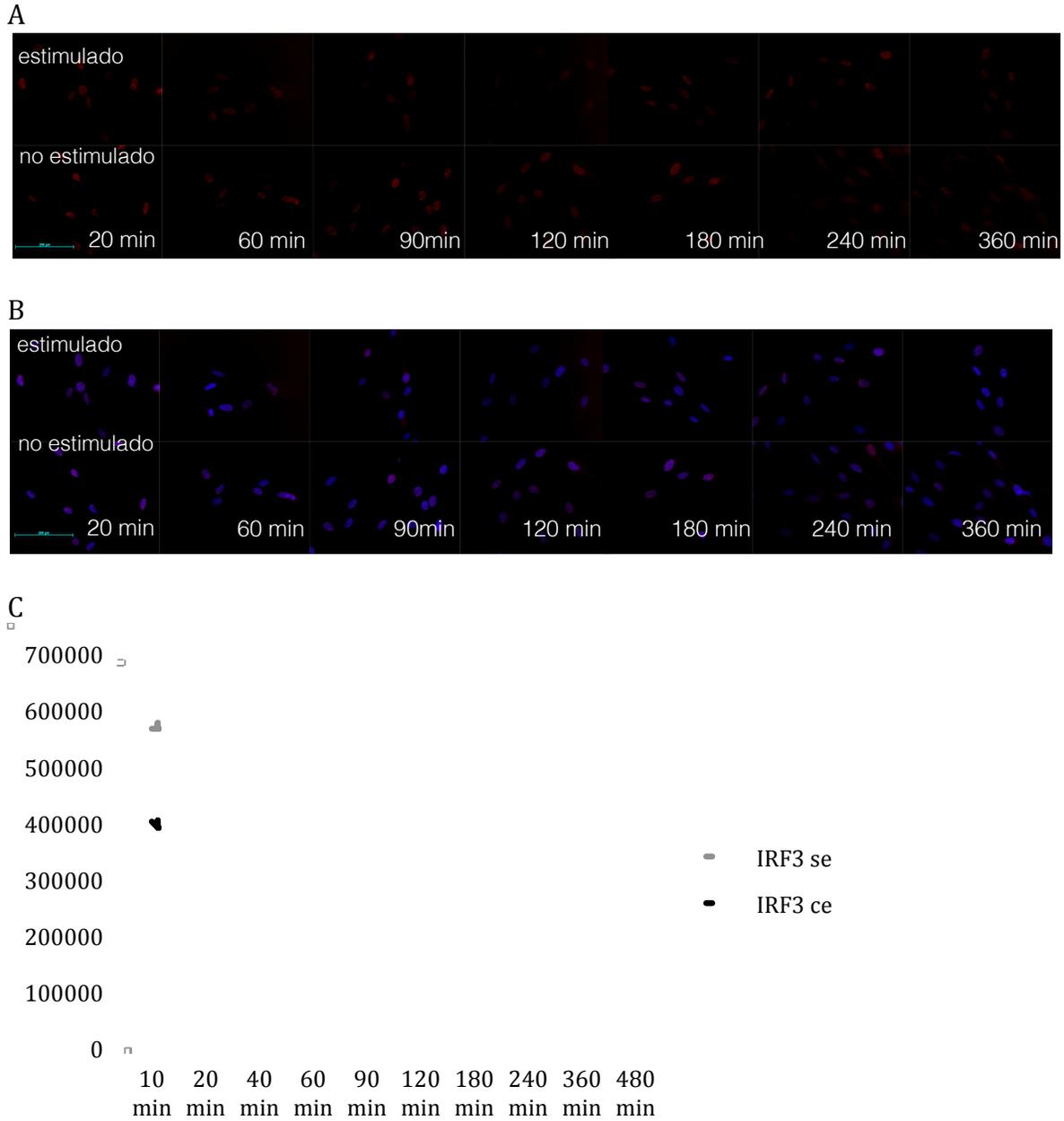
**Figura 10** .- Translocación nuclear de NFκB en MFBLEC estimulados con poli I:C y no estimulados. Los MFBLEC fueron estimulados con poli I:C durante diferentes intervalos de tiempo (10, 20, 40, 60, 120, 240, 360 y 480 min.) Posteriormente las células fueron marcadas con anticuerpos anti-NFκB realizándose posteriormente una microscopía por inmunofluorescencia. A) Microscopía por inmunofluorescencia en la que se observa NFκB marcado con Alexa Fluor 488® (verde), la tinción dentro del núcleo de los MFBLEC se incrementa principalmente a los 120 min después de ser estimulados. B) Microscopía de Inmunofluorescencia en la que se observan los núcleos de los MFBLEC en color azul (DAPI) y NFκB en verde. Imágenes representativas de 3 experimentos. C) Gráfica lineal de la translocación nuclear de NFκB. Gráfica lineal en la que se observa un incremento de la translocación nuclear de NFκB en MFBLEC estimulados con poli I:C principalmente a los 120 minutos. CFCT (Fluorescencia celular total corregida). \*\*\* Estadísticamente significativo 0.001. La escala de la barra representa 200 μm.

**b) IRF3 se encuentra en los núcleos de los MFBLEC en todos los tiempos analizados, no se encontraron cambios significativos cuando se estimulan con poli I:C.-**

IRF3 comparte junto con NFκB a través de RIG-1, MDA5 y TLR3 la vía de transducción que es estimulada por poli I:C para la expresión de IFN tipo I. Por un lado NFκB promueve la expresión de citocinas pro inflamatorias que fomentan la respuesta inmune innata, mientras que IRF3 a través de los IFN tipo I promueve la expresión de proteínas que inhiben la replicación viral y la activación de células asesinas naturales.

El factor de transducción IRF3 se encontró translocado prácticamente en todos los tiempos analizados tanto en los MFBLEC estimulados con poli I:C como en los no estimulados siendo mayor la translocación en los núcleos de los MFBLEC no estimulados. IRF3 se encontró homogéneamente distribuido en los núcleos de los MFBLEC conformando micro vesículas en todos los tiempos estudiados, en el citoplasma prácticamente no se encontró IRF3 (Figura 8 A y B).

Al analizar la gráfica lineal de la CFCT en los núcleos de los MFBLEC se observa una semejanza muy importante entre la del grupo estimulado y la del grupo no estimulado, confirmando la observación previa de que la fluorescencia fue mayor en el grupo no estimulado (Figura 8 C). Los datos no fueron estadísticamente significativos al ser analizados con la prueba ANOVA de una sola vía con el programa SPSS.



**Figura 11** .- Translocación nuclear de IRF3 en MFBLEC estimulados con poli I:C y no estimulados. Los MFBLEC fueron estimulados con poli I:C durante diferentes intervalos de tiempo (10, 20, 40, 60, 120, 240, 360 y 480 min.) Posteriormente las células fueron marcadas con anticuerpos anti-IRF3 realizándose posteriormente una microscopía por inmunofluorescencia. A) Microscopía por inmunofluorescencia en la que se observa IRF3 marcado con Alexa Fluor 594® (rojo), la tinción dentro del núcleo de los MFBLEC se mantiene en el núcleo celular prácticamente en todos los tiempos tanto en el grupo estimulado como en el no estimulado. B) Microscopía de Inmunofluorescencia en la que se observan los núcleos de los MFBLEC en color azul (DAPI) e IRF3 en rojo. Imágenes representativas de 4 experimentos. C) Gráfica lineal de la translocación nuclear de IRF3. Gráfica lineal en la que se observa un incremento de la translocación nuclear de IRF3 en MFBLEC no estimulados con poli I:C en la totalidad de los tiempos analizados (datos no estadísticamente significativos). CFCT (Fluorescencia celular total corregida). La escala de la barra representa 200  $\mu$ m

**c) IRF7 se encuentra translocado al núcleo de los MFBLEC a los 90 minutos cuando se estimulan con poli I:C.-**

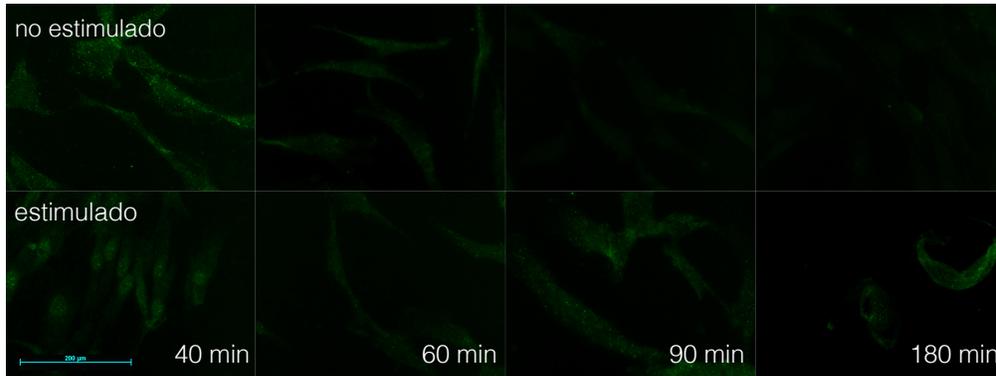
Se ha descrito que la expresión de IFN tipo alfa está determinado fundamentalmente por la translocación de IRF7 al núcleo celular, observación hecha en células dendríticas. IRF7 se homodimeriza o se heterodimeriza con IRF3 y otros IRF's como IRF5 para activar la transducción de los IFN alfa que están implicados en la inmunomodulación y en un efecto antiviral.

En este ensayo se determinó que IRF7 se transloca al núcleo de los MFBLEC cuando se estimulan con poli I:C principalmente a los 40 y 90 minutos. Los tiempos analizados fueron 20, 40, 60, 90, 120 y 180 min.

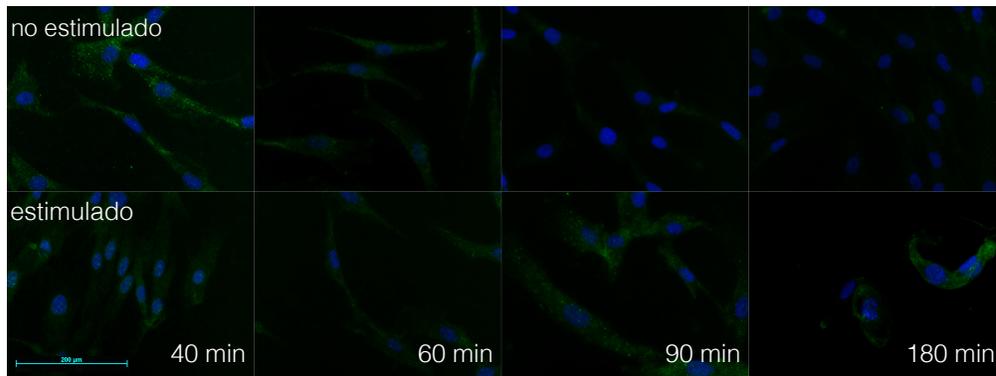
IRF7 se encontró distribuido homogéneamente en el citoplasma de los MFBLEC a los 20 min posteriormente; a los 40 min se encontró distribuido en micro vesículas en el núcleo celular en 2 de 4 ensayos que se realizaron, encontrándose prácticamente ausente del núcleo de los MFBLEC a los 60 min en todos los ensayos, observamos nuevamente un incremento de la fluorescencia en los núcleos celulares a los 90 min en 3 de los 4 ensayos realizados, para nuevamente decaer en el resto de los tiempos examinados (Figura 13 A y B).

En la gráfica lineal de la figura 13 C se representa la translocación nuclear de IRF7, se observa que en los MFBLEC estimulados con poli I:C la fluorescencia en los núcleos celulares presenta dos picos a los 40 y 90 minutos. Los datos analizados mediante ANOVA de una sola vía ( $p < 0.05$ ) no fueron significativos.

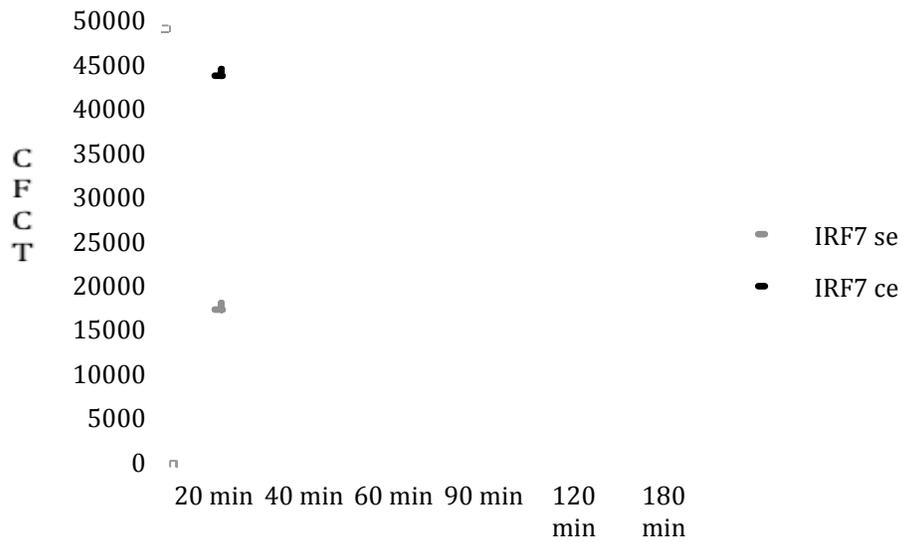
A



B



C



**Figura 12.-** Translocación nuclear de IRF7 en MFBLEC estimulados con poli I:C y no estimulados. Los MFBLEC fueron estimulados con poli I:C durante diferentes intervalos de tiempo (20, 40, 60, 90, 120 y 180 min.) Posteriormente las células fueron marcadas con anticuerpos anti-IRF3 realizándose posteriormente una microscopía por inmunofluorescencia. A) Microscopía por inmunofluorescencia en la que se observa IRF7 marcado con Alexa Fluor 488® (verde) donde la tinción dentro del núcleo de los

MFBLEC se incrementa principalmente a los 90 min después de ser estimulados. B) Microscopía de Inmunofluorescencia en la que se observan los núcleos de los MFBLEC en color azul (DAPI) e IRF7 en verde. Imágenes representativas de 4 experimentos. C) Gráfica lineal de la translocación nuclear de IRF7. Gráfica lineal en la que se observa un incremento de la translocación nuclear de IRF7 en MFBLEC estimulados con poli I:C principalmente a los 90 minutos. CFCT (Fluorescencia celular total corregida). La escala de la barra representa 200  $\mu$ m.

El objetivo de estos ensayos fue determinar el tiempo en el que se observa la translocación nuclear de NF $\kappa$ B, IRF3 e IRF7 en los MFBLEC cuando se estimulan con poli I:C para poder continuar con la segunda fase de la investigación que es determinar si la MA modifica esta translocación. En base a los hallazgos observados y al análisis realizado de las imágenes de Inmunofluorescencia, establecimos que el tiempo de mayor translocación de NF $\kappa$ B es a los 120 minutos y de IRF7 a los 90 minutos. Para el caso concreto de IRF3, que no mostró un realce en la translocación cuando fue estimulado con poli I:C, optamos por tomar el tiempo de 120 minutos arbitrariamente para realizar los siguientes ensayos.

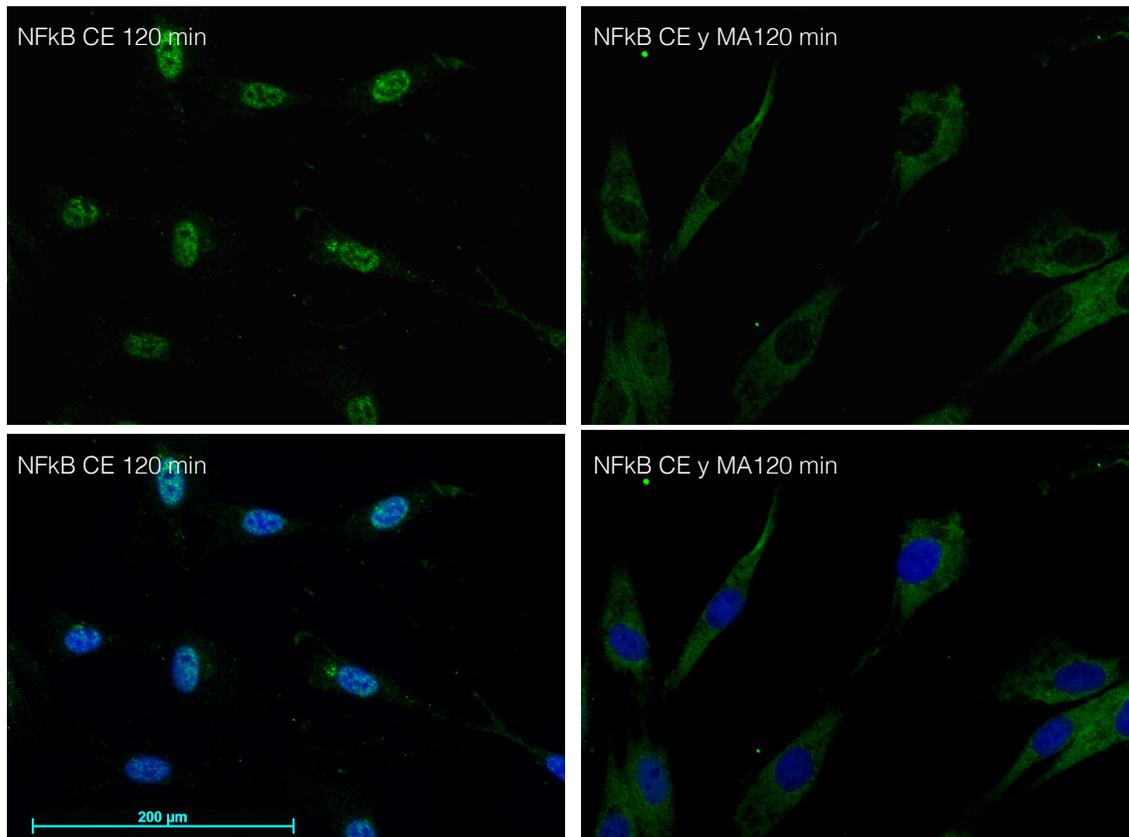
### **1.3 Efecto de la membrana amniótica sobre la translocación nuclear de NFκB, IRF3 E IRF7.**

El objetivo de este ensayo fue determinar si la translocación de los diferentes factores de transducción estudiados (NFκB, IRF3 e IRF7) en los MFBLEC es modificada por la presencia de MA desnuda. Para realizar este ensayo se colocaron los MFBLEC en cubreobjetos posteriormente fueron expuestos durante un máximo de 60 min a MA utilizando un modelo tipo Transwell donde el fondo del pozo fue recubierto por MA y sobre ésta se colocó el cubreobjetos con los MFBLEC. El cubreobjetos fue removido y los MFBLEC fijados para posteriormente ser analizados mediante microscopía de Inmunofluorescencia utilizando los respectivos anticuerpos primarios y secundarios para NFκB, IRF3 e IRF7.

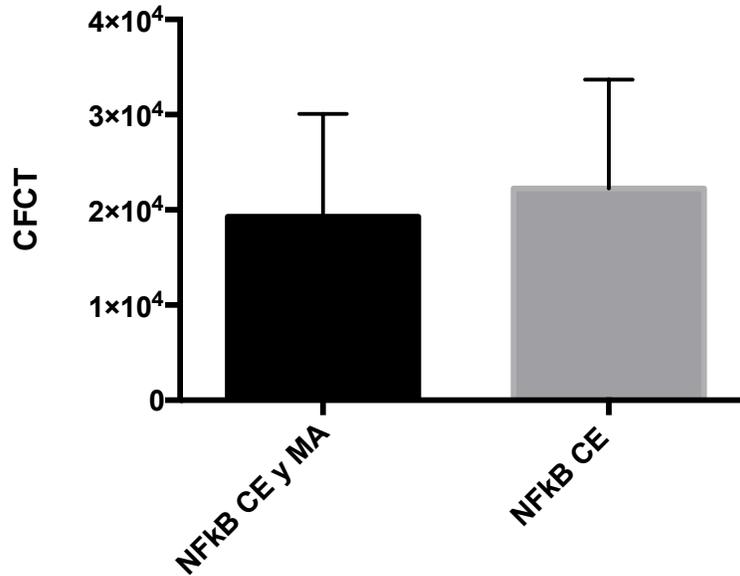
#### **a) La membrana amniótica inhibe la translocación nuclear de NFκB en MFBLEC cuando se estimulan con poli I:C .-**

Se ha demostrado que la expresión de citocinas pro inflamatorias dependen de la translocación de NFκB cuando se estimulan los PRR's: TLR 3, MDA5 y RIG1 a partir de PAMP's como ARNs producido durante la replicación viral del VHS1. Clínicamente la membrana amniótica ha demostrado un efecto anti inflamatorio e inmunomodulador cuando se aplica sobre corneas con QE. Para determinar el efecto que posee la membrana amniótica en un evento clave para la producción de citocinas pro inflamatorias como es la translocación nuclear de NFκB, los MFBLEC cultivados sobre placas de vidrio fueron estimulados con poli I:C y expuestos a MA durante 60 min, a los 120 min posteriores a la estimulación, tiempo en el que se determinó una mayor presencia de NFκB en el núcleo de los MFBLEC estimulados, las placas fueron procesadas agregándoles anticuerpos contra NFκB y el anticuerpo secundario correspondiente para ser analizados mediante microscopía por Inmunofluorescencia. En los MFBLEC estimulados y en presencia de MA se observó una disminución de la translocación de NFκB, presentando una concentración elevada en el citoplasma de

las células, hecho que sugiere que la MA inhibe la translocación de este factor al interior del núcleo celular, mientras que en el grupo no estimulado NFκB permaneció en el interior del núcleo celular (Figura 16). Al analizar la CFCT del interior de los núcleos celulares de los MFBLEC se refleja lo observado en las microfotografías, en los 3 ensayos realizados se observa una disminución de la fluorescencia en el interior del núcleo celular de los MFBLEC expuestos a MA de alrededor de 3000 unidades en comparación con el grupo no expuesto a MA (Figura 17).



**Figura 13.-** Imagen representativa de 3 ensayos de Inmunofluorescencia de MFBLEC con marcaje para NFκB estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA. Fotografías de microscopía por Inmunofluorescencia con marcaje para NFκB a los 120 minutos después de ser estimulado con poli I:C, expuestos y no expuestos a MA. Marcaje de NFκB con Alexa Fluor 488 (verde). Se observa que en los MFBLEC estimulados con poli I:C y expuestos a MA NFκB se encuentra fundamentalmente en el citoplasma celular y no ingresa al núcleo, mientras que en el grupo estimulado sin MA la mayor parte del NFκB se encuentra en el interior del núcleo celular. La escala de la barra representa 200 μm.

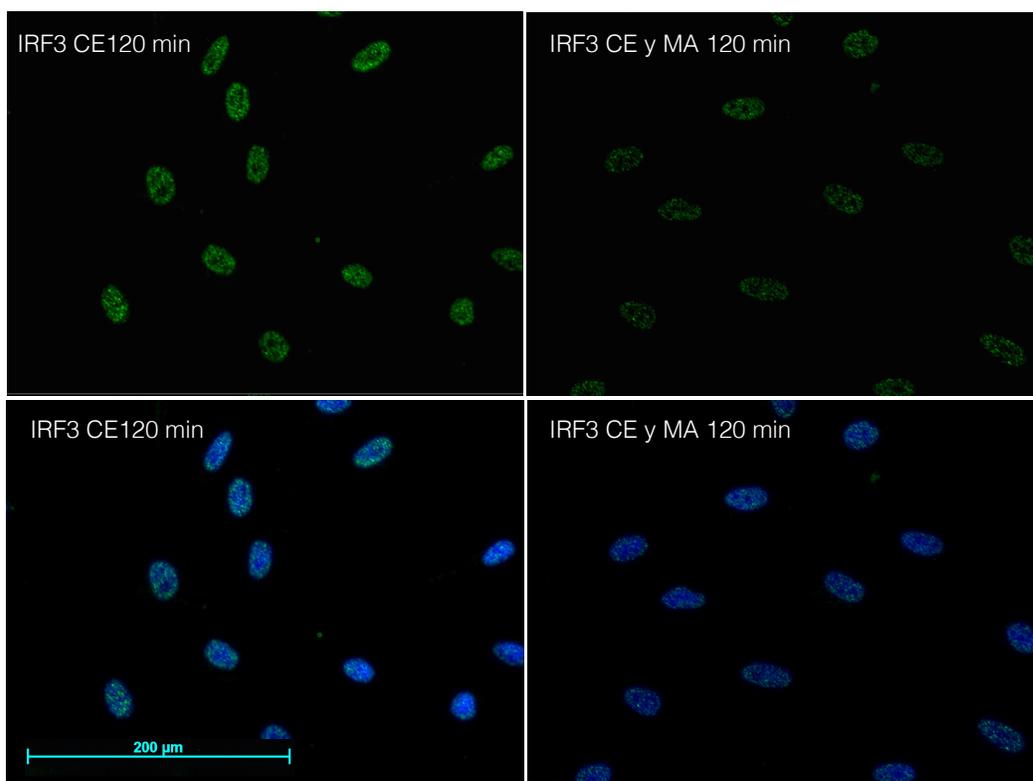


**Figura 14.-** Gráfica de barras de la CFCT de los núcleos celulares de 3 ensayos con MFBLEC estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA con inmunomarcaje para NFκB a los 120 minutos. Análisis de la CFCT en núcleos de MFBLEC con y sin exposición a MA para NFκB. Gráfica de barras en la que se representa la fluorescencia celular total corregida (CFCT) de los núcleos de MFBLEC estimulados con poli I:C cuando se estimulan con poli I:C con marcaje para NFκB. Se observa una disminución en los MFBLEC que fueron expuesto a MA.

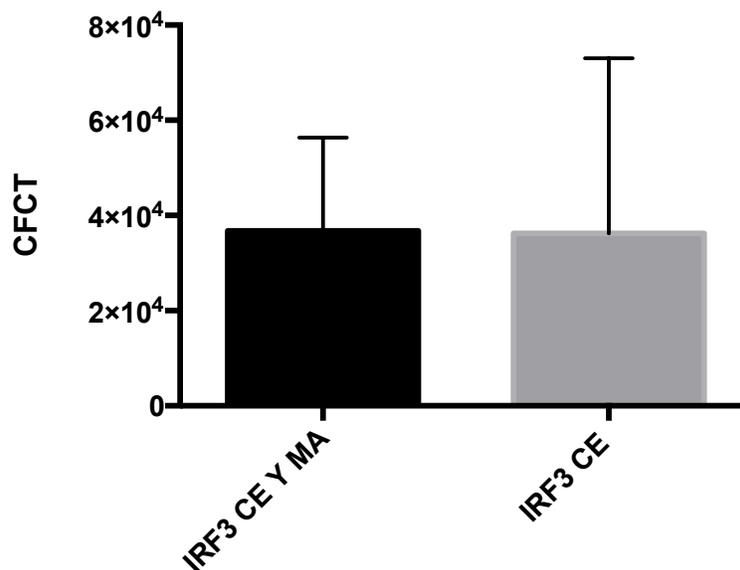
**b)La membrana amniótica no modifica la translocación nuclear de IRF3 en MFBLEC cuando se estimulan con poli I:C.-**

IRF 3 es un factor de transducción que para translocarse al interior del núcleo celular primero se homodimeriza cambiando su conformación después de ser fosforilado a través de la activación de PRR (TLR3, MDA5 y RIG-1) cuando éstos se unen a ARNs. Una vez en el interior del núcleo celular promueven la expresión de IFN tipo I, principalmente interferón tipo beta el cual está implicado en la inmunoregulación (activación de células NK e inhibición de citocinas TH1) y la expresión de proteínas anti virales. En la QEH la expresión de citocinas pro inflamatorias que activan la respuesta inmune innata favorece el daño ocasionado a las estructuras corneales, la MA modifica el curso clínico habitual de este proceso favoreciendo la disolución de la infección viral y por otro lado disminuye la expresión de citocinas pro inflamatorias. Para determinar el efecto que tiene la MA en la

translocación nuclear de IRF3 en MFBLEC se llevaron a cabo 3 ensayos en los que los MFBLEC fueron estimulados con un análogo sintético de ARNs (poli I:C) y posteriormente se dividieron en dos grupos uno expuesto a MA durante 60 min y otro no expuesto. Los MFBLEC fueron analizados por medio de microscopía de Inmunofluorescencia con inmunomarcaje para IRF3. En las microfotografías de los 3 ensayos analizados no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, IRF3 permanece en el interior del núcleo celular de los MFBLEC aun en presencia de la MA, lo que propone que la MA no afecta la translocación nuclear de IRF3 en los MFBLEC cuando se estimulan con poli I:C (Figura 18). El análisis de CFCT de los 3 ensayos representados en la gráfica de barras de la figura 19 expone una diferencia de alrededor de 500 unidades en el grupo expuesto a MA.



**Figura 15.-** Imagen representativa de 3 ensayos de Inmunofluorescencia de MFBLEC con inmunomarcaje para IRF3 estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA. Microfotografías de microscopía por Inmunofluorescencia con marcaje para IRF3 a los 120 minutos después de ser estimulado con poli I:C, expuestos y no expuestos a MA. Inmunomarcaje para IRF3 con Alexa Fluor 488 (verde). Se observa que en los MFBLEC estimulados con poli I:C y expuestos a MA IRF3 se encuentra en el interior del núcleo celular muy semejante a como aparece en el grupo control no expuesto a MA. La escala de la barra representa 200  $\mu\text{m}$ .

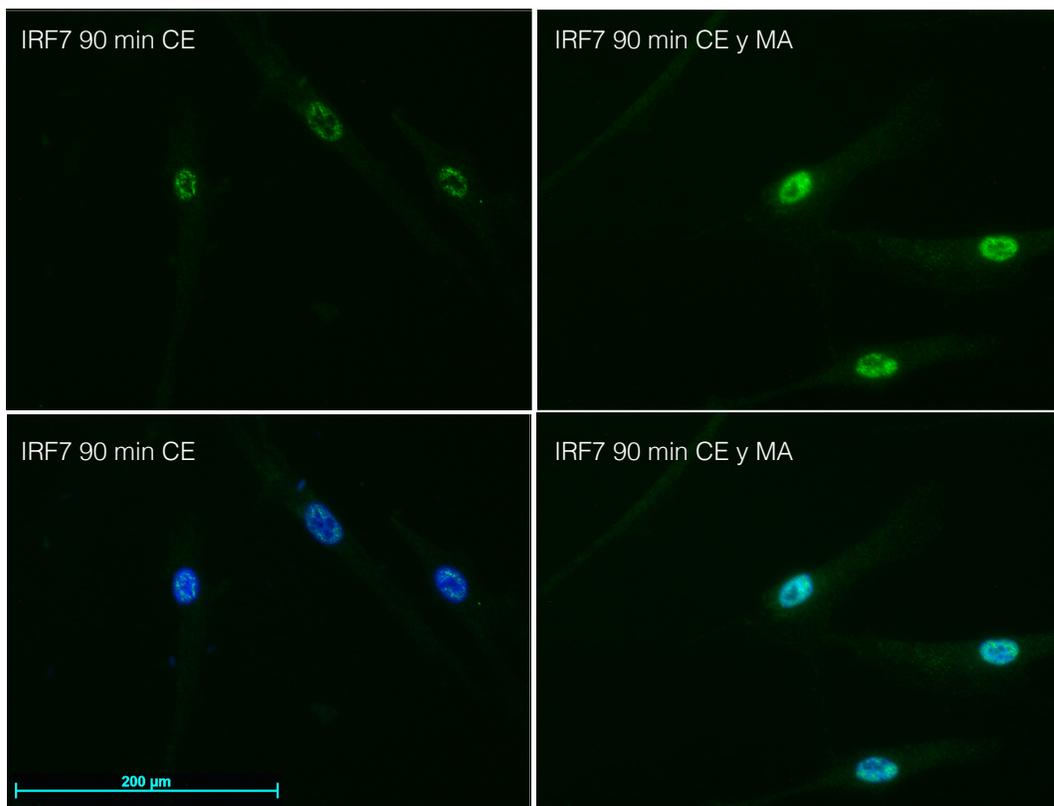


**Figura 16.-** Gráfica de barras de la CFCT de los núcleos celulares de 3 ensayos con MFBLEC estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA con inmunomarcaje para IRF3 a los 120 minutos. Gráfica de barras en la que se representa la fluorescencia celular total corregida (CFCT) de los núcleos de MFBLEC estimulados con poli I:C cuando se estimulan con poli I:C con marcaje para IRF3 en la que se observa un leve incremento de la fluorescencia en los núcleos de los MFBLEC de aproximadamente 500 unidades cuando se exponen a MA.

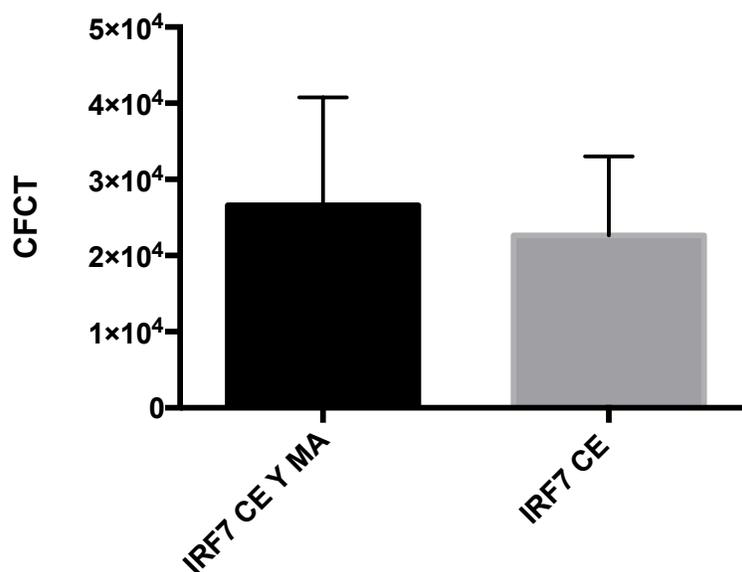
### **c) La membrana amniótica incrementa levemente la translocación nuclear de IRF7 en MFBLEC cuando se estimulan con poli I:C.-**

La MA modifica el curso de la QEH al favorecer la disminución de la infección viral en la córnea y disminuir la actividad inflamatoria. IRF7 es un factor de transducción que en células dendríticas plasmocitoides favorece la expresión de IFN alfa promoviendo un efecto antiviral e inmunomodulación con la disminución de citocinas TH1 y promoviendo la activación de células NK que a su vez participan en la destrucción de células infectadas por virus. Para estudiar el efecto de la MA sobre la translocación de IRF7 en MFLEC, se realizaron 3 ensayos donde los MFBLEC fueron estimulados con poli I:C y expuestos y no expuesto a MA, se realizó una Inmunofluorescencia con inmunomarcaje para IRF7 a los 90 min después del estímulo, tiempo en el que se determinó la mayor translocación de IRF7 cuando los MFBLEC son estimulados con poli I:C. En las microfotografías se observó un

incremento de la fluorescencia tanto en el citoplasma como en el interior del núcleo celular siendo mayor en esta última localización en ambos grupos estimulado y no estimulado agrupados en micro vesículas. Sin embargo la fluorescencia nuclear en el grupo expuesto a MA fue mayor en el grupo expuesto a MA. Lo que sugiere que la translocación nuclear de IRF7 en MFBLEC estimulados con poli I:C es favorecida por la MA (Figura 20). Al analizar la CFCT (Gráfica de barras de la figura 21) se verifica que la translocación nuclear de IRF7 en los MFBLEC expuestos a MA fue aproximadamente 400 unidades mayor que aquellas no expuestas.



**Figura 17.-** Imagen representativa de 3 ensayos de Inmunofluorescencia de MFBLEC con inmunomarcaje para IRF7 estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA. Microfotografías de microscopía por Inmunofluorescencia con marcaje para IRF7 a los 90 minutos después de ser estimulado con poli I:C, expuestos y no expuestos a MA. Inmunomarcaje para IRF3 con Alexa Fluor 488 (verde). Se observa que en los MFBLEC estimulados con poli I:C y expuestos a MA IRF7 se encuentra incrementado en los núcleos celulares de los MFBLEC en comparación con el control no expuesto a MA. La escala de la barra representa 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18.-** Gráfica de barras de la CFCT de los núcleos celulares de 3 ensayos con MFBLEC estimulados con poli I:C expuestos y no expuestos a MA con inmunomarcaje para IRF7 a los 90 minutos. Gráfica de barras en la que se representa la fluorescencia celular total corregida (CFCT) de los núcleos de MFBLEC estimulados con poli I:C cuando se estimulan con poli I:C con marcaje para IRF7 en la que se observa un incremento de la fluorescencia en los núcleos de los MFBLEC de aproximadamente 400 unidades cuando se exponen a MA.

## XIII.- DISCUSIÓN

Nuestros resultados indican que la membrana amniótica inhibe la translocación nuclear de NFκB, promueve la translocación de IRF7 y no afecta la translocación de IRF3 en MFBLEC cuando se estimulan con poli I:C.

La MA ha sido utilizada para el tratamiento de córneas con QEH ya que promueve un efecto antiinflamatorio, suprime la actividad linfocítica, atrapa e induce la apoptosis de neutrófilos y macrófagos que infiltran el tejido corneal, disminuye la expresión de citocinas pro inflamatorias, promoviendo la resolución de la infección viral y disminuyendo el proceso lítico de la estructura corneal<sup>27, 74, 83, 84</sup>. Varios mecanismos han sido propuestos que explican parte de estas observaciones, recientemente en nuestro grupo de investigación se ha explorado el papel que tienen los PRR's en MFBLEC cuando se estimulan con un análogo de RNAs (el material genético del herpesvirus) como poli I:C, que es reconocido por PRR's (RIG-1, MDA5 y TLR3) que promueven la expresión de citocinas pro inflamatorias fundamentales en la activación de la respuesta inmune innata a través de NFκB, pero por otra parte participan también en la secreción de interferones que promueven un efecto inmunoregulator y antiviral favoreciendo la resolución de la infección a través de IRF3 e IRF7<sup>88, 89</sup>. Los MFBLEC expresan de manera constitutiva TLR3 y bajo el estímulo de poli I:C son capaces de expresar RIG1 y MDA5 este último en menor medida sin modificarse las concentraciones de TLR3<sup>45</sup>. Además los MFBLEC responden al estímulo de poli I:C produciendo citocinas pro inflamatorias mismas que disminuyen después de ser expuestos a MA <sup>90,45</sup>.

En los MFBLEC se evidenció por medio de microscopía de Inmunofluorescencia que el factor de transcripción NFκB es expresado de manera constitutiva en el citoplasma, hallazgo que coincide con lo publicado en otras estirpes en donde se ha estudiado, con excepción de células de músculo liso vascular donde se ha identificado constitutivamente expresado en el núcleo celular<sup>92,93</sup>. En las microfotografías de Inmunofluorescencia tomadas de MFBLEC estimulados con poli I:C NFκB se transloca al interior del núcleo de manera progresiva, a los 10 minutos se observó que el factor se encuentra en el citoplasma para luego a los 20 minutos

translocarse al interior del núcleo para salir de éste nuevamente de éste a los 40 minutos, situación que se repite cíclicamente, observando al menos a los 120 y 480 minutos nuevamente una internalización del factor nuclear, lo que sugiere en primer lugar que poli I:C en MFBLEC estimula la cascada de señalización de RIG1, MDA5 y TLR3, lo que coincide con la literatura revisada y en segundo lugar que este factor posiblemente este recirculando o bien reciclándose, patrón de translocación consistente con lo observado en otros modelos donde se estudió NFκB por medio de inmunofluorescencia en otros tipos celulares (células de musculo liso, fibroblastos, HeLa, monocitos de sangre periférica, células humanas umbilicales epiteliales) en donde se encontró que NFκB presenta una translocación progresiva teniendo un primer incremento a los 30 min y en algunas células hasta los 60 min, situación similar a lo que se observó en nuestros MFBLEC, cabe mencionar que algunas diferencias importantes con respecto a nuestro estudio es que en ninguno de estos ensayos se utilizó poli I:C, si no otros compuestos (LPS , IL 1, TNFα etc.) que activan PRR diferentes a los que se estudiaron <sup>93,94,95</sup>. El hecho de observar una respuesta tan temprana como son a los 20 minutos con poli I:C sugiere que éste puede ser un agente con mayor capacidad estimuladora en la translocación de NFκB.

Las microfotografías de inmunofluorescencia para NFκB, revelaron que este factor permanece en el citoplasma de los MFBLEC disminuyendo su translocación al interior del núcleo celular cuando los MFBLEC se expusieron a MA, lo que significa que la MA evita por algún mecanismo aún desconocido la translocación de NFκB hacia el núcleo celular, y por lo tanto evita la expresión de genes promovidos por este factor de transcripción como citocinas pro inflamatorias y quimiocinas. Varios fármacos anti inflamatorios modifican la vía de activación de NFκB, los salicilatos inhiben la fosforilación y el catabolismo de IκB (el inhibidor que forma un heterodímero con NFκB) y por lo tanto la translocación de este factor al núcleo celular, por su parte los glucocorticoides promueven la transcripción y síntesis de nuevas moléculas de IκB y también interactúan directamente con NFκB inhibiendo su translocación <sup>95,96,97</sup>. Rossi et al. publicaron recientemente un artículo en el que analizan medio condicionado derivado de MA humana determinando que ésta es una fuente de factores solubles posiblemente de naturaleza no proteica capaces de ejercer efectos

inmunomoduladores e inmunosupresores, siendo las prostaglandinas (PG) las moléculas candidatas que ejercerían este efecto<sup>98</sup>. Se han identificado algunas PG capaces de inhibir la fosforilación de I $\kappa$ B, evitando de esta manera la translocación nuclear de NF $\kappa$ B<sup>99</sup>, por lo tanto la hipótesis de que alguna molécula semejante a prostaglandinas sea liberado por MA e inhiba la fosforilación de I $\kappa$ B debe ser considerada. Por otra parte otro mecanismo propuesto para explicar este fenómeno de inhibición de la translocación puede ser la alteración que se ha observado en MFBLEC en la estructura de las cadherinas cuando estos se exponen a MA, al parecer es posible que la MA modifique la estructura del citoesqueleto celular, que participa en el transporte de algunos factores de transducción como son NF $\kappa$ B al interior del núcleo<sup>45</sup>. En nuestra publicación previa se determinó que MA inhibe la secreción de las quimiocinas CCL1, CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL8 y CXCL10 y de las citocinas G-CSF e IL6 que son pro inflamatorias en MFBLEC que son estimulados con poli I:C<sup>45</sup>, al menos CCL5, CXCL1 e IL6 son promovidos por NF $\kappa$ B<sup>108,109,110</sup>, por lo que la reducción de estos mediadores en nuestro modelo de MFBLEC expuestos a MA puede ser explicado en parte por la inhibición de la translocación de NF $\kappa$ B.

La translocación de IRF3 no se ve modificada en los MFBLEC cuando se estimulan con poli I:C, este factor está contenido en el interior de los núcleos de los MFBLEC de manera constitutiva tal como lo demuestran las microfotografías de inmunofluorescencia, lo que coincide con varias publicaciones que determinan que este factor se encuentra expresado en todas las células humanas y de los animales<sup>99,100,101</sup>, sin embargo, en estas publicaciones se refiere que la localización celular de IRF3 es el citoplasma y que bajo un estímulo infeccioso viral se transloca al núcleo, no en los núcleos celulares como lo observado en MFBLEC aún sin ser estimulados con poli I:C, no encontramos ninguna referencia de algún tipo celular que exprese de manera constitutiva IRF3 nuclear, células como algunos tipos de linfocitos B y T expresan de manera constitutiva la forma activada de NF $\kappa$ B localizado en el núcleo celular, lo que le permite a estas células mantener un estado permanentemente activado sobre expresando continuamente citocinas y sus receptores<sup>102</sup>. Una posible hipótesis de la localización de IRF3 en el interior del núcleo celular en los MFBLEC, es

que éstos expresen constitutivamente proteínas blanco del factor de transducción IRF3 homodimerizado o bien conformando un heterodímero con otros IRF's u otras proteínas como ATF-2/c-jun, promoviendo la activación continua de IFN o bien de otros genes estimulantes de interferón (ISG), principalmente ISG54 que está relacionado con la activación de la apoptosis, cabe mencionar que en nuestro modelo la translocación del factor de transducción NFκB, es inhibido por MA, ya que IRF3 forma un heterodímero con NFκB y promueve la transcripción de IFN β y otras proteínas, es posible que MA disminuya la expresión de IFN β<sup>103,104</sup>.

En nuestro modelo poli I:C no modifica la translocación de IRF3, una explicación probable es que en los MFBLEC IRF3 se active por otras vías que no son dependientes de TLR3, RIG 1 y MDA5 que son activados por poli I:C.

IRF7 se transloca al interior del núcleo de los MFBLEC cuando son estimulados con poli I:C lo que indica que responden a la activación de PRR's como TLR3, MDA5 y RIG1, como se describe en la literatura en otros tipos celulares<sup>56</sup>, además las microfotografías de inmunofluorescencia revelan que se encuentra constitutivamente expresado en el citoplasma de los MFBLEC en bajas cantidades, Prakash et al. en su artículo del 2006 sostiene que algunos tipos celulares presentan en su citoplasma bajas concentraciones de IRF7, pero que en general es inducido por estímulos virales<sup>106</sup>, situación que concuerda con lo observado en MFBLEC. De manera muy semejante a lo que se observó en la cinética de NFκB, IRF7 presenta un recirculamiento del citoplasma al núcleo celular, en la cinética realizada observamos 3 puntos en el tiempo donde la translocación es mayor que en el control no estimulado, a los 40, 90 y 180 min, siendo la respuesta mas tardía con respecto a NFκB, pues con este último factor la translocación inicial ocurrió a partir de los 20 minutos. Además la mayor translocación nuclear de NFκB dada a los 120 min rebasaba las 120,000 unidades CFCT, en el caso de IRF7 el mayor pico de translocación en unidades CFCT fue de 50,000, lo que sugiere que poli I:C incrementa en mayor medida la translocación de NFκB comparativamente con IRF7. La familia de IRF han coevolucionado con la familia de NFκB, ambos comparten las mismas características evolutivas, ambas familias son activadas por las mismas vías de señalización (PRR) y

por la misma familia de cinasas (IKK's), juntas representan los principales reguladores de la respuesta inmune innata<sup>105</sup>, este estudio revela un comportamiento en la translocación nuclear muy semejante entre dos miembros de cada una de estas familias en los MFBLEC estimulados con poli I:C; NFκB e IRF7 se reciclan constantemente, siendo aparentemente mayor la translocación en p50-RelA miembro de la familia NFκB. Estos hallazgos apuntan a que es posible que los MFBLEC sean productores importantes de citocinas e interferones, actores clave en la activación de la respuesta inmune innata de la superficie ocular.

IRF7 es un factor que a diferencia de su más cercano miembro IRF3, permanece en bajas concentraciones en la mayoría de los tipos celulares a excepción de las pDC, células B y monocitos,<sup>106</sup> su función y activación ha sido ampliamente descrita en células dendríticas plasmacitoides, que son las células productoras de interferón por excelencia<sup>58</sup>, bajo un estímulo viral infeccioso, la activación de algunos PRR desencadena la translocación de IRF3 y de NFκB, que en conjunto activan la transcripción de los genes *ifna* e *ifnb*, que conlleva la expresión de IFN β y de IFNα 1 mismos que estimula los receptores de interferón de la misma célula o de células vecinas que activan una vía de señalización dependiente de cinasas Janus que en conjunto con transductores de señal 1/2 e IRF9 se unen al promotor de IRF7 induciendo la síntesis de IRF7, el recién sintetizado IRF7 induce la expresión de más interferones y más IRF7<sup>105</sup>, mientras que IRF3 que es el inductor inicial de interferones es degradado IRF7 se caracteriza por mantener e incrementar la producción de interferones y de otros genes inducibles por IFN. La MA incrementa la translocación de IRF7, la fluorescencia en el núcleo de los MFBLEC cuando se expusieron a MA incrementó en promedio alrededor de 3,000 unidades CFCT, por lo tanto es posible que la expresión de interferones principalmente IFNα y de otros genes relacionados a interferón se encuentre incrementada en los MFBLEC cuando éstos se exponen a MA.

En conjunto los resultados derivados de esta investigación apuntan a que la MA ejerce un efecto inmunomodulatorio en la translocación de 3 factores que son cruciales para definir la activación de la respuesta inmune innata por una parte

inhibe la translocación de NFκB que promueve la expresión de citocinas, quimiocinas y péptidos pro inflamatorios que en el contexto de una QEH promovería la infiltración de linfocitos y monocitos activados favoreciendo la destrucción del tejido corneal, y por otra parte promoviendo la translocación de IRF 3 y 7 permitiendo la expresión de IFN que actúan limitando la infección viral, promoviendo la apoptosis de las células infectadas y expresando proteínas anti virales. Al parecer MA favorece la expresión de IFN pero se requieren nuevos estudios para corroborar si la expresión de interferones se encuentra incrementado cuando los MFBLEC estimulados con poli I:C se exponen a MA, también se requiere investigar la naturaleza de el o los mediadores que ejercen este efecto, finalmente la utilización de un modelo en el que se empleen varios PRR derivados de el VHS1 o bien la utilización del propio virus infectante, nos permitiría analizar el efecto neto de la MA en la producción de interferones, citocinas, quimiocinas y péptidos pro inflamatorios en MFBLEC.

## **XIV.- CONCLUSIONES.**

- La MA es capaz de inhibir la translocación nuclear de NF $\kappa$ B en MFBLEC estimulados con poli I:C.
- IRF3 e IRF7 se expresan constitutivamente en los MFBLEC.
- La translocación nuclear de IRF3 no parece ser alterado por MA, mientras que IRF7 incrementa su translocación cuando los MFBLEC se encuentran asociados a MA.

## **XV.- BIBLIOGRAFÍA**

1.-Mishima S, Gasset A, Klyce SD Jr, Baum JL. Determination of tear volumen and tear flow. Invest Ophthalmol. 1966 Jun; 5(3):264-76.

2.-Rolando M, Zierthut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. Surv. Ophthalmol. 2001 Mar;45 Suppl 2:S203-10.

3.-Nelson J, Cameron J: The conjunctiva: anatomy and physiology. Cornea: fundamentals, diagnosis and management. 3rd ed 2011 Elsevier-Mosby Philadelphia 25-31.

4.-Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC Niche regulation of epithelial stem cells at the limbus. Cell Res 2007 17:26-36 .

5.-Lambiase A, Micera A, Sacchetti M, Mantelli F, Bonini S. Toll-like receptors in ocular surface disease: overview and new findings. Clin Sci (Lond). 2011 May;120(10):441-50.

6.-Kulkarni BB, Tighe PJ, Mohammed I, Yeung AM, Powe DG, Hopkinson. Comparative transcriptional profiling of the limbal epithelial crypt demonstrates its putative stem cell niche characteristics. BMC Genomics 2010; 11:526.

7.-Dravida S, Pal R, Khanna A, Tipnis SP, Ravindran G, Khan F. The transdifferentiation potential of limbal fibroblast-like cells. Brain Res Dev Brain Res 2005;160:239-251

8.-Li GG, Zhu YT, Xie HT, Chen SY, Tseng SC. Mesenchymal stem cells derived from human limbal niche cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Aug 17;53(9):5686-97.

9.-Holland E, Mannis M, Barry Lee M. Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film.

10.-Chakravarti, S., Wu, F., Vij, N., Roberts, L., and Joyce, S. Microarray studies reveal macrophage-like function of stromal keratocytes in the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; QR, 3475-3484.

11.-Villa C, Santodomingo J. La córnea. Parte I Estructura, función y anatomía microscópica. *Gaceta Óptica*. Diciembre 2012. Vol. 454. Pags. 112-119.

12.-Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol.* 1982 Dec;100(12):1942-7.

13.-Clout NJ et al. A model of FAS1 domain 4 of the corneal protein  $\beta$ ig-h3 gives a clearer view on corneal dystrophies. *Mol Vis*, 2003; 9:440-448.

14.-Nahmias AJ, Lee FK, Beckman-Nahmias S. Seroepidemiological and sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1990;69:19-36.

15.-Brijacak N, Dekaris I, Gagro A, Gabrić N. Therapeutic effect of amniotic membrane in persistent epithelial defects and corneal ulcers in herpetic keratitis. *Coll Antropol.* 2008 Oct;32 Suppl 2:21-5

16.-Barker H. Ocular herpes simplex. *Clin Evid (Online)*. 2008 jul 23;2008.

17.-Pepose JS, Leib DA, Stuart M, et al. Herpes simplex virus disease: anterior segment of the eye. In: Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR, eds. *Ocular Infection and Immunity*. St. Louis, MO: Mosby; 1996:905–932.

- 18.-Nahmias AJ, Lee FK, Beckman-Nahmias S. Seroepidemiological and sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1990;69:19-36.
- 19.- A. Rowe, A. St. Leger, R.L. Hendricks. Herpes Keratitis. *Prog Retin Eye Res.* Jan 2013; 32C:88-101.
- 20.-Vinagre del P.C. y col. Rol del virus Herpes simple en la queratitis inmune estromal. *Rev. Med. Chile* v.129 n.3 Santiago mar.2001.
- 21.-Kaye SB, Baker E, Bonshek R, et al. Human herpes viruses in the cornea. *Br J Ophthalmol.* 2000;84:563–571.
- 22.-Knickelbein JE, Buela K, Hendriks RL. Herpes Stromal Keratitis: Erosion of Ocular Immune Privilege by Herpes Simplex Virus. *Future Virology.* 2010;5 (6):699-708.
- 23.-Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ: Herpes simplex viruses. In: *Fields' Virology.* Knipe DM, Howley PM (Eds). Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA. 2007; 2503–2602.
- 24.-Wilson NS, Villadangos JA: Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol. Cell Biol.* 2004; 82(1), 91–98.
- 25.-Allan RS, Waithman J, Bedoui S et al.: Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 2006; 25(1), 153–162.
- 26.-Frank GM, Buela KA, Maker DM, Harvey SA, Hendricks RL. Early responding dendritic cells direct the local NK response to control herpes simplex virus 1 infection

within the cornea. *J Immunol.* 2012;188:1350–1359.

27.- Knickelbein JE, Buella K, Hendriks RL. Antigen-Presenting Cells Are Stratified Within Normal Human Corneas and Are Rapidly Mobilized During Ex Vivo Viral Infection. *Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(2):1118-23

28.-Hong, J.W., Liu, J.J., Lee, J.S., Mohan, R.R., Mohan, R.R., Woods, D.J., He, Y.G., and Wilson, S.E. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001: 2795- 2803.

29.-Seo, S.K., Gebhardt, B.M., Lim, H.Y., Kang, S.W., Higaki, S., Varnell, E.D., Hill, J.M., Kaufman, H.E., and Kwon, B.S. Murine keratocytes function as antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 2001; 33:318-3328.

30.-Babu JS, Thomas J, Kanangat S, et al. Viral replication is required for induction of ocular immunopathology by herpes simplex virus. *J Virol.* 1996;70:101–107.

31.-Zheng M, Schwarz MA, Lee S, et al. Control of stromal keratitis by inhibition of neovascularization. *Am J Pathol.* 2001;159:1021–1029.

32.-McBride BW, Ward KA. Herpes simplex specific IgG subclass response in herpetic keratitis. *J Med Virol.* 1987;21:179–189.

33.-McGill J. The enigma of herpes stromal disease. *Br J Ophthalmol.* 1987; 71 (2):118-125.

33.-Braaten, D. C., Sparks-Thissen, R. L., Kreher, S., Speck, S. H. & Virgin, H. W. An optimized CD8<sup>+</sup> T-cell response controls productive and latent gamma herpesvirus infection. *J. Virol.* 2005; 79, 2573–2583.

34.-Dupuis, S. et al. Impaired response to interferon- $\alpha/\beta$  and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nature Genet.* 2003; 33, 388–391.

35.-Rager-Zisman, B., Quan, P. C., Rosner, M., Moller, J. R. & Bloom, B. R. Role of NK

cells in protection of mice against herpes simplex virus-1 infection. *J. Immunol.* 1987; 138, 884–888.

36.-Takeuchi, O. Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140, 805–820.

37.-Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett.* 2003;85:85–95.

38.-Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5:987–995

39.-Herbst-Kralovetz M, Pyles R. Toll-like receptors, innate immunity and HSV pathogenesis. *Herpes.* 2006;13:37–41.

40.-Lund J, Sato A, Akira S, et al. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;198:513–520.

41.-Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003; 198, 513–520.

42.-Honda, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005; 434, 772–777.

43.-Zucchini, N. et al. Cutting edge: overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection. *J. Immunol.* 2008; 180, 5799–5803.

44.-Yamamoto, M. et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; 301, 640–643.

45.-Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I. & Matikainen, S. IFNs activate Toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun.* 2001; 2, 349–355.

46.-Dominguez-López A, Bautista de Lucio VM, Serafin López J, Robles Sánchez E, Garfias Y. Amniotic membrane modulates innate immune response inhibiting PRRs

expression and NF- $\kappa$ B nuclear translocation on limbal myofibroblasts. *Exp Eye Res.* 2014; 127:215-23.

47.-Matsumoto M, Seya T. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C) *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008; 60: 805–812.

48.-M. Matsumoto, S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, T. Seya, Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2002; 239: 1364–1369.

49.-Yoneyama, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunol.* 2004; 5, 730–737.

50.-Pichlmair A. et al. *Innate Recognition of Viruses Immunity* 2007; 27: 370-383.

51.-Melchjorsen J, et al. Early Innate Recognition of Herpes Simplex Virus in Human Primary Macrophages Is Mediated via the MDA5/MAVS-Dependent and MDA5/MAVS/RNA Polymerase III-Independent Pathways. *J Virol.* 2010; 84 (21): 11350–11358.

52.-Rasmussen, et al. Herpes simplex virus infection is sensed by both Toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene-like receptors, which synergize to induce type I interferon production. *J. Gen. Virol.* 2009; 90:74–78.

53. Rasmussen, et al. Type I IFN production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type specific viral recognition through TLR9, the MAVS pathway, and novel recognition systems. *J. Virol.* 2007; 81:13315–13324.

54.- Søren R. Paludan, et al. Recognition of herpesvirus by innate immune system. *Nat Rev Immunol* 2011;11 (2): 143 - 154.

55.-Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front Immunol.* 2014; Jul 23;5:342.

56.-S. Ningt, JS Pagano, GN Barber. IRF7: Activation, Modulation and Function. *Genes*

and Immunity 2011;12:399-414.

57.-Chen W, Royer W. Structural insights into interferón regulatory factor activation. Cell Signal 2010; 22: 883-887.

58.-P.M. Pitha, M.S. Kungsi Type I Interferon: The Ever Unfolding Story. CTMI 2007; 316: 41-70.

59.-Lin F, Young H. Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. Cytokine & Growth Factor Reviews 2014; 25: 369-376

60.-Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. Immunity 2006;25:373-81.

61.-Pasparakis M. Regulation of tissue homeostasis by NFkB signalling: implications for inflammatory disease. Nature Reviews Immunology 2009; 9; 778-788.

62.-Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. Nat Rev Immunol. 2008 Nov;8(11):837-48.

63.-Dirk Bauer et al. Amniotic membrane induces peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  positive alternatively activated macrophages. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53 (2): 799-810.

64.-Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nat Rev Immunol. 2005 Oct;5(10):749-59.

65.-A.C. Mamede et al. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. Cell Tissue Res. 2012; 349: 447-458.

66.-Boume G. The microcopic anatomy of the human amnion and chorion. Am J Obstet Gynecol. 1960; 79:1070-1073.

67.-Adinolfi M, Akle C, McColl I, Fensom A, Tansley L, Connolly P, His B, Faulk W, Travers P, Bodmer W. Expression of HLA antigens, beta 2 microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 1982; 295(5847): 325-327.

68.-Burman S, Tejwani S, Vemuganti G, Gopinathan U, Sangwan V. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: A review of current indications. *Cell Tissue Bank* 2004; 5: 161-175.

69.-De Roth. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch. Ophthalmol*, 1940; 23: 522-525.

70.-Sorsby A, Simons H.M. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br. J. Ophthalmol.* 1946; 30:337-345.

71.-Kim J.C. and Tseng S.C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995 14: 473-484.

72.-Parabjasawat P, Kosrirukvongs P, Booranapong W, Vajaradul Y. Application of preserved human amniotic membrane for corneal surface transplantation. *Cell Tissue Bank.* 2000; 1(3): 213-222.

73.-Tsai RJ, Li L, Chen J. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *Am J Ophthalmol.* 2000; 130:543

74.-Heiligenhaus A, Li H, Hernandez Galindo EE, et al. Management of acute ulcerative and necrotising herpes simplex and zoster keratitis with amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(10):1215-9

75.-Shi W, Chen M, Xie L. Amniotic membrane transplantation combined with antiviral and steroid therapy for herpes necrotizing stromal keratitis. *Ophthalmol.* 2007;114(8): 1476—81.

76.-Kurpakus-Wheater M. Laminin-5 is a component of preserved amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2001; 22(5):353–357

77.-Lee SB, Li DQ, Tan DT, et al. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblast by amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000;20:325-334.

78.-Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:1539-1546.

79.-Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the AM, cornea and conjunctiva. *Cornea.* 1999; 18: 73-79.

80.-Hao Y, Ma D, Hwang D, Kim W, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human AM. *Cornea.* 2000; 19:348-352.

81.-Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, et al. Suppression of interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol.* 2001;85:444-449.

82.-Garfias Y, Jimenez-Martínez M C. Amniotic membrane is an Immunosuppressor of Peripheral Blood Mononuclear Cells *Immunol Invest.* 2011; 40(2):183-96.

83.-Heiligenhaus A, Li HP, Yang Y, et al. Transplantation of amniotic membrane in murine herpes stromal keratitis modulates matrix metallo proteinases in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:4079–4085

84.-Bauer D, Wasmuth S, Hennig M, Baehler H, Steuhl KP, Heiligenhaus A. Amniotic membrane transplantation induces apoptosis in T lymphocytes in murine corneas with experimental herpetic stromal keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009 Jul;50(7):3188-98.

85.-Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, et al. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001; 20:408–413

86.-Dirk Bauer et al. Amniotic membrane induces peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  positive alternatively activated macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53 (2): 799-810.

87.-Andrew Burgess, Suzanne Vigneron, Estelle Brioude, Jean-Claude Labbé, Thierry Lorca, Anna Castro. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(28): 12564–12569.

88.-Ueta M, Kawai T, Tokoi N, Akira S, Kinoshita S. Contribution of IPS-1 to poly I:C induced cytokine production in conjunctival epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 404: 419-423.

89.-Kawai, T., Takahashi, K., et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol*. 2005. 6 (10), 981e988.

90.-Liu, T., Zhai, H., et al. Amniotic membrane traps and induces apoptosis of inflammatory cells in ocular surface chemical burn. *Mol. Vis*. 2012.18, 2137e2146.

91.-Andersen J, Van Scoy S, Cheng TF, Gomez D, Reich NC. IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection. *Genes Immun*. 2008 Mar;9(2):168-75. Epub 2007 Dec 20.

92.-Lucia Nikolaia López-Bojorquez. La regulación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Rev Invest Clín* 2004; Vol. 56(1):83-92.

93.-O. Joseph Trask, Jr, BS. Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening.

94.-Mahdad Noursadeghi,a, Jhen Tsang,a Thomas Haustein,a Robert F. Miller,b

Benjamin M. Chain,<sup>a</sup> and David R. Katza. Quantitative imaging assay for NF- $\kappa$ B nuclear translocation in primary human macrophages. *J Immunol Methods*. Jan 1, 2008; 329(1-2): 194–200.

95.-Fusler et al. Analysis and Quantitation of NF- $\kappa$ B Nuclear Translocation in Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) Activated Vascular Endothelial Cells *Microsc. Microanal.* 12, 269–276, 2006

96.-D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol Interv* 2002 Feb;2(1):22-35.

97.-Cronstein BN, Montesinos MC, Weissmann G. Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NF $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 25;96(11):6377-81.

98.-Daniele Rossi, Stefano Pianta, Marta Magatti, Peter Sedlmayer, Ornella Parolini. Characterization of the Conditioned Medium from Amniotic Membrane Cells: Prostaglandins as Key Effectors of Its Immunomodulatory Activity. *PLoS One*. 2012;7(10):e46956.

99.-Brian Poligone and Albert S. Baldwin. Positive and Negative Regulation of NF- $\kappa$ B by COX-2: roles of different prostaglandins. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):38658-64

100.-Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- $\alpha$ /beta gene induction. *Immunity* 2000; 13: 539–548.

101.-Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005; 434: 772–777.

102.-Kaltschmidt C., Katchmidt B; Neumman H; Wekerle H; Baeuerle P. ConstitutiveNF-KB ActivityinNeurons. Mol Cel Biol. 1994; 14 (6): 3981-3992.

103.-Andersen J, VanScoy S, Chang TF, Gómez D, Reich NC. IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection. Genes Immun. 2008 Mar;9(2):168-75. Epub 2007 Dec 20.

104.-J Andersen, S VanScoy, T-F Cheng, D Gomez and N C Reich. IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection. Genes Immun (2008) 9, 168–175.

105.-Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. Immunity 2006; 25: 349–360.

106.-Prakash A, Levy DE. Regulation of IRF7 through cell type- specific protein stability. Biochem Biophys Res Commun 2006; 342: 50–56.

107.-Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. Nat Rev Immunol 2006; 6: 644–658.

108.-Wickermasinghe M, Thomas LH, O’Kane CM, Uddin J, Friedland JS. Transcriptional mechanisms regulating alveolar epithelial cell-specific CCL5 secretion in pulmonary tuberculosis. J Biol Chem. 2004 Jun 25;279(26):27199-210.

109.-Anisowicz A, Messineo M, Lee SW, Sager R. An NF-kappa B-like transcription factor mediates IL-1/TNF-alpha induction of gro in human fibroblasts. J. Immunol1991 Jul 15;147(2):520-7.

110.-Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through

the NF-kappa B transcription factor. Mol Cell Biol 1990 May;10(5):2327-34.

\*