

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA

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

GEMMA JULIO MORÁN

4. DISCUSIÓN

En este apartado hemos contrastado nuestros resultados con la literatura existente sobre el tema. El objetivo es proporcionar una explicación teórica plausible para las características morfológicas observadas en el epitelio corneal sano y para los cambios que el tiempo de apertura palpebral (TAP) desencadena en ellas.

En consecuencia, esta discusión está organizada en dos subapartados. En el primero discutiremos sobre la morfología de las células del epitelio corneal sano y en el segundo sobre los cambios que sufre dicho epitelio sometido a los diferentes TAP.

4.1. El epitelio corneal

En las observaciones realizadas en la presente tesis doctoral hemos descrito el estrato apical del epitelio corneal como una capa ininterrumpida con muy pocas células exfoliadas. Las imágenes obtenidas muestran una exfoliación del 0,2%, como comentamos en el capítulo de resultados. Esta cifra concuerda con la aproximación realizada por Doughty (1990 y 1991), según la cual, las células epiteliales en avanzado proceso de descamación representan menos del 0,5% del total de células fotografiadas con microscopía electrónica de barrido (SEM), en córneas de conejo sanas. En nuestro caso, al igual que Doughty, no hemos incluido este tipo de células en el estudio morfométrico, aunque si hemos descrito sus características morfológicas de *visu*.

Desde un punto de vista morfológico, las células descamadas o en avanzado proceso de descamación descritas en esta tesis presentan características similares a las observadas en trabajos anteriores (Renard et al 1983) (Doughty 1990b, 1996, 2003). El rasgo que identifica a este tipo de células es, lógicamente, la pérdida de las uniones intercelulares. Antes de desprenderse del epitelio la célula va perdiendo progresivamente sus uniones de modo que los bordes celulares se levantan y se observan más marcados, incluso en aquellas preparaciones a SEM que presentan dificultades para discernir los contornos celulares (Doughty 2004).

Como en nuestro caso, varios trabajos (Doughty 1990, 1996 y 1997) (Renard et al 1983) describen a las células descamadas como células situadas por encima del epitelio, de tonos claros y brillantes, bordes redondeados y aspecto liso a 500x. Sin embargo, estas mismas células a 5000x presentan un aspecto rugoso que Renard et al (1983) atribuyen a la presencia de microvellosidades y microvilli cortos y serrados mientras que nosotros pensamos, como Doughty (1997), que este tipo de células poseen escasas o ninguna prominencia en la membrana celular.

Para nosotros, el aspecto rugoso de la membrana parece deberse, más bien, a pequeños poros y arrugas, en consonancia con el proceso degradativo que han sufrido las células. Ren y Wilson (1996b) demostraron que las células inviabilizadas o terminalmente diferenciadas presentan una disminución de la actividad metabólica y un incremento en la permeabilidad de la membrana. Esto último concuerda con el hecho de que las células descamadas tengan una superficie marcadamente porosa.

Estamos también de acuerdo con Doughty (1990, 1996, 1997) y Renard et al (1983) en que las células en proceso de descamación (células que aún mantienen ciertas uniones intercelulares con sus vecinas) se presentan en pequeños grupos, son oscuras, no tan redondeadas como las células descamadas y a veces muestran un núcleo manifiesto.

Que aparezcan en grupos concuerda con los descubrimientos de Buschke et al (1943) quienes observaron que las mitosis ocurren en grupos celulares de tres a seis células. Además, Lu, Reinach y Kao (2001) afirman que las células hijas de las células amplificadoras de transición migran conjuntamente de forma ascendente cuando inician su diferenciación terminal. En consecuencia, al final de este proceso sería lógico encontrarlas en un estadio similar del proceso de descamación.

Además, Ren y Wilson (1996b) y Estil et al (2000) demostraron (como ya comentamos en la introducción) que existen varios mecanismos implicados en

la descamación de las células del epitelio corneal: la apoptosis (en sus diferentes categorías) y la diferenciación terminal. Todos ellos afectan a una célula individualmente o a pequeños grupos celulares, como aparecen en nuestras imágenes.

En cuanto al aspecto general del epitelio sano, en las imágenes obtenidas al microscopio electrónico de barrido (SEM), concuerda plenamente con la descripción consensuada como válida en la literatura. En general, el epitelio se presenta como un mosaico de células de diferentes tonalidades de gris, mayoritariamente tonos intermedios, con núcleos no manifiestos y uniones intercelulares intactas. El tamaño y la forma de las células son muy variados, aunque existe una mayoría de células pequeñas y de forma poligonal.

No obstante, en nuestros resultados hemos destacado, también, las diferencias de nitidez y contraste en las imágenes a 500x, causadas por la presencia de una fina película semitransparente que cubre total o parcialmente la imagen. A este respecto, Doughty (2004), trabajando con ojos de bovinos, estableció que dicha película desaparece si se realiza un lavado a presión con solución salina al 0,97%.

En dicho estudio no se establece de qué material está constituida la película semitransparente que desencadena las dificultades de visualización, aunque se propone que podría tratarse de células muertas. Las imágenes aportadas parecen demostrar que las córneas no se deterioran. Por lo tanto, pensamos que será necesario realizar nuevos estudios, con córneas de conejo, para comprobar la inalterabilidad de la muestra, siguiendo esta nueva técnica de lavado agresivo. Queda también por analizar la composición de la película semitransparente.

Por lo que respecta a las manchas negras (densas a los electrones) que aparecen sobre las células, podrían tratarse de restos de mucina. Como comentamos en la introducción, en las muestras fijadas mediante métodos convencionales (como es este el caso) la capa de mucina no se puede observar de forma obvia ni con TEM (Leuenberger 1978) (Beuerman y

Pedrosa 1996) ni con SEM (Doughty 1990a) (Collin y Collin 2000a) (Doughty 2002). Sin embargo, dicha capa no se elimina totalmente, aún realizando lavados con diferentes sustancias (Renard et al en 1983) (Doughty 1990a). En consecuencia, es probable que en nuestras imágenes se observen restos de mucina en forma de manchas o hebras.

Por otro lado, Doughty observó que si se baña el epitelio con solución salina preservada (Doughty 1994) o con solución salina equilibrada (BSS) no preservada (2003) antes de la fijación el epitelio muestra, de forma esporádica, hebras de moco poroso y denso a los electrones (idénticas a las manchas observadas en nuestras imágenes). Para dicho autor estas manchas son hebras de mucina desnaturalizada, similares a las que aparecen en la queratoconjuntivitis seca o el penfingoide cicatricial. La diferencia es que, en este caso, los agentes desencadenantes de la desnaturalización son, según Doughty, los cationes divalentes presentes en las soluciones de lavado.

En conclusión, podríamos decir que las manchas amorfas observadas son, muy probablemente, hebras de mucina, desnaturalizada durante el proceso de adecuación de la muestra para su observación al SEM.

En el apartado de resultados también hemos descrito ciertas zonas de la córnea C03i que presentaban una proporción de células en proceso de descamación mucho más alta que en el resto de las imágenes. Para interpretar estas diferencias, debemos recordar que el proceso de renovación del epitelio corneal es el resultado de un complejo equilibrio entre la síntesis y la descamación celular (como se comentó ampliamente en la introducción de esta tesis doctoral). Por otro lado, el índice mitótico del epitelio es muy variable, incluso entre las dos córneas de un mismo individuo y, además, está sujeto a un ritmo circadiano (Fogle et al 1980) (Layker et al 1991).

Basándonos en estas dos afirmaciones podríamos suponer que la velocidad de descamación es también muy variable, de modo que para compensar un periodo de elevado índice mitótico el epitelio aceleraría el proceso de descamación. Ello explicaría las diferencias entre unas córneas y otras.

Además, Ren y Wilson (1996b) han demostrado que la densidad de células inviables aumenta desde la periferia corneal hacia el centro con lo que dicha velocidad también variaría dependiendo de la zona en la que nos encontrásemos.

Es importante señalar que, la velocidad del proceso de exfoliación celular (o tasa de exfoliación) en el epitelio corneal no se conoce con exactitud. Los resultados de los estudios realizados son bastante dispersos, hecho que apunta también hacia la ausencia de homogeneidad en dicha tasa. Según una recopilación de diferentes estudios, realizada por Ren y Wilson (1996a), la tasa de exfoliación espontánea del epitelio corneal de conejo *in vivo* es de 5 a 15 células/minuto/córnea (si se considera un valor medio de 10 células correspondería aproximadamente a un 2,6% cada hora). Dicho valor es mucho más bajo que el estimado para los métodos de recolección *in vitro* (100 células/minuto/córnea, o sea un 26% cada hora).

Por otro lado, estas divergencias podrían ser debidas a las diferentes condiciones del epitelio, *in vivo* e *in vitro*. No obstante, para Burstein y Klyce (1977) la tasa de exfoliación *in vitro* es de 0,5% cada hora. Esta última tasa implica que el epitelio corneal de conejo se renueva completamente cada 8 días, igual que en el hombre, según Hanna et al (1961). Por su parte, Rigal (1993) considera que la renovación completa del epitelio humano se realiza en 7 días mientras que Oyster (1999) sostiene que el proceso completo es de 10 días.

En todo caso, es probable que la velocidad de descamación del epitelio corneal en el conejo sea diferente a la del hombre ya que la frecuencia de parpadeo en este animal es muchísimo más baja. (Según Maurice (1995), el conejo parpadea una media de tres veces a la hora.) Como ya comentamos en la introducción, el parpadeo es un factor que regula la renovación del epitelio corneal ya que, mediante la fricción mecánica, facilita el desprendimiento de las células. En definitiva, la tasa de descamación es un aspecto que está aún por resolver.

En cuanto a la morfología de los cráteres o holes, decir que nuestra descripción es análoga a la realizada anteriormente por otros autores (Pfister y Renner en 1977, Francois et al en 1977 y 1980, Dormans y Van Logten en 1982 y Doughty (1990a,b,c). Pfister (1973) postula que estas estructuras formarían parte del fenómeno de descamación fisiológica. Sin embargo, Renard et al (1983) no comparten dicha hipótesis. Ellos consideran que los cráteres son fruto de una particular disposición de las microproyecciones. Para rebatir la propuesta de Renard y sus colaboradores diremos que los *holes* pueden ser de dimensiones bastante grandes, bordes claros y sobresalientes y superficie interior sin microproyecciones (oscura y lisa). Por tanto, es bastante inverosímil que las microproyecciones del interior hayan podido situarse en la periferia formando el anillo exterior, sin que ello suponga un deterioro de las mismas.

En nuestra opinión, los cráteres son zonas donde la membrana celular se ha roto. Dicha rotura se originaría debido al contacto directo de las células apicales con el medio externo. En concreto, las células subyacentes que aparecen en la superficie inician la reabsorción del citoplasma y el retraimiento de la membrana celular. Este último proceso se enfrentaría a las fuerzas que mantienen unidas unas células con otras, generando tensiones en la membrana que, finalmente, se rompería, formando *holes*. La aparente distribución al azar de estas estructuras sería consecuencia de las diferentes tensiones de retraimiento, según la forma de cada célula.

Pfister (1973) observó que los cráteres eran más frecuentes en el conejo que en las ratas, monos, gatos o perros. Quizás esto sea debido a la baja frecuencia de parpadeo del lepórido (una media de 3 parpadeos cada hora), que dificultaría el mantenimiento de una película lagrimal sin roturas, lo que supone un mayor contacto con el medio externo.

No obstante, no estamos plenamente de acuerdo con la hipótesis de Pfister ya que, creemos que la descamación propiamente dicha se inicia en el momento en el que las fuerzas de retraimiento superan a las fuerzas que mantiene unidas unas células con otras. Es entonces cuando empezarían a romperse las uniones intercelulares, perdiendo progresivamente su capacidad de adherencia

y liberando, así, tensiones de la membrana. Por lo tanto, en dicho estadio no se formarían *holes*. Es más, la propia retracción ocultaría los que existieran con anterioridad. En resumen, los cráteres o holes formarían parte de la diferenciación terminal pero ya se habrían formado cuando el proceso descamativo se inicia.

Este podría ser el motivo por el que las células en avanzado proceso de descamación no presentan cráteres en su superficie. Tampoco suelen presentar cráteres aquellas células que han sufrido un marcado deterioro superficial, como es el caso de algunas de las células sometidas a tiempos de apertura palpebral largos. Ello podría deberse a la pérdida de elasticidad, grosor y otras propiedades de la membrana, como consecuencia de las condiciones adversas a las que ha sido expuesto ese epitelio corneal.

Por su parte, Collins y Collins (2000) (como ya comentamos en la introducción) observaron estructuras similares a los cráteres en el epitelio corneal de peces y apuntaron que podrían ser poros externos de las células caliciformes porque estos se hallaban, frecuentemente, en la zona de unión de tres o más células.

Es importante puntualizar que en el epitelio corneoconjuntival del conejo existen diversos tipos de poros u orificios, que morfológicamente son diferentes a los cráteres (Doughty 1997) y algunos de ellos se consideran poros glandulares. Por otro lado, la posición de los cráteres o *holes*, que nosotros hemos observado en el epitelio corneal, es muy variada (como se puede observar en nuestras imágenes) y tanto pueden encontrarse entre células como en medio de la superficie celular. En consecuencia, no parece que Collins y Collins estén hablando de las mismas estructuras a las que nosotros nos referimos.

Con nuestros estudios hemos demostrado que no existe una tendencia clara hacia la ausencia o presencia de holes en las células control. Además, gracias a los resultados morfométricos, hemos avanzado en el conocimiento de dichas estructuras. Ahora sabemos que no poseen relación con ninguna de las características celulares analizadas en el epitelio sano.

Dicho de otro modo, la ausencia o presencia de cráteres no parece estar relacionada ni con la densidad de microproyecciones ni con las variables tonales (tono de la célula, tomo medio de las microproyecciones o tono medio de la membrana), ni con una forma o talla celular determinada, ni, aparentemente, con las uniones intercelulares. Respecto a esta última variable, cabe señalar de nuevo que, las células descamadas o en proceso de descamación avanzado no se han incluido en el estudio morfométrico.

También hemos podido establecer que, la presencia o ausencia de cráteres se ve afectada por las condiciones de sequedad extremas provocadas por la falta de parpadeo. Como lo demuestra el hecho de que, la variable *holes* está presente en todos los modelos predictivos del TAP como una de las variables significativas. Sin embargo, el carácter binario de *holes* proporciona una información restringida. Por ello, pensamos que son necesarios nuevos estudios con una nueva variable de carácter numérico, que permita concluir más sobre este tema.

Otro aspecto del epitelio sano, que es importante comentar, es la morfología de las microproyecciones de la membrana. En el apartado de resultados hemos comentado que, en general, la forma y densidad de las microproyecciones es uniforme a nivel intracelular pero variable si se comparan unas células con otras. A este respecto, existe un consenso en la literatura, con el que concuerdan nuestros resultados (Rigal 1993).

No obstante, hemos encontrado algunas células, sobre todo oscuras, que presentan bordes celulares con una densidad de microproyecciones menor que en el área celular central. Otros autores también mostraron estas diferencias intracelulares (Doughty 1996) (Rigal 1993) en epitelios sanos. En consecuencia, se han considerado normales.

Respecto a la polémica de si las microproyecciones son microvilli o microplícae, estamos de acuerdo con la hipótesis de Pfister (1973) según la cual los supuestos micropliegues podrían ser microvilli doblados sobre la superficie corneal. En ninguna de nuestras imágenes aparecen micropliegues, de forma

clara y definitiva, como sucede en las imágenes de epitelios corneales de peces, presentadas por otros autores (Collins y Collins 2000) (Harding et al 1974). Por el contrario, si aparecen microvilli adoptando diferentes posiciones en el espacio. En concreto, hemos observado (como expusimos en los resultados) que algunos de los supuestos micropliegues parecen ser el resultado de la unión en filas de varios microvilli erectos.

Al igual que Doughty (1990) pensamos que la complejidad de la distribución espacial de estas estructuras impide hacer medidas fiables de sus dimensiones, con imágenes al SEM. Además, no podemos saber con certeza por qué las microproyecciones adoptan estas diferentes disposiciones. La causa podría ser el peso de la mucina, como argumentó Pfister (1973), el propio crecimiento longitudinal que, por acción de la gravedad, doblaría el microvilli, o, quizás, las presiones entre células que al tensionar más o menos la membrana celular dejarían a los microvilli tensos y erectos o flácidos y curvados.

En lo que respecta a la caracterización de los diferentes tipos celulares, nuestros resultados concuerdan con la idea, ampliamente aceptada en la literatura, según la cual las células pequeñas son, en general, las más claras mientras que las grandes son las más oscuras. En cuanto al grupo de células de áreas intermedias, presentan tonos intermedios, como algunas de las células pequeñas y grandes. También en consonancia con lo descrito en la literatura hemos observado que los tonos intermedios son los más frecuentes. Pero, desde un punto de vista estadístico no hemos podido diferenciar tres tipos celulares en base al tono ya que sólo aparecen diferencias significativas en la tendencia central de las células pequeñas frente a las grandes.

En base a nuestros resultados, la forma de las células parece ser el único rasgo diferencial que, asociado al factor *área*, distingue claramente tres grupos. De este modo, las células pequeñas poseen una clara tendencia hacia la poligonalidad, las intermedias serían, mayoritariamente, pseudopoligonales y las grandes circulares. Además, las dos variables, *área* y *forma*, son las que

poseen un coeficiente de correlación mayor, por lo que parecen estar íntimamente relacionadas.

Estos resultados concuerdan con los de Doughty (1990b) en varios aspectos. En primer lugar, estamos de acuerdo con este autor en que el epitelio muestra una elevadísima variabilidad en sus características celulares que, a veces, dificulta la obtención de resultados concluyentes. En segundo lugar, confirmamos que la distribución de áreas celulares en las células control no es normal y en tercer lugar, y más importante, pensamos como Doughty que, para poder diferenciar los tipos celulares el factor área es más idóneo que el factor tono celular.

El tono de las células es un factor relacionado con ciertas características morfológicas celulares. Sin embargo, está demasiado influenciado por las condiciones de preparación y observación de la muestra como para ser utilizado, con éxito, en la clasificación de una población, con tanta variabilidad, como la que nos ocupa. No obstante, se ha venido empleando como tal, de forma general, durante muchos años.

Nosotros proponemos utilizar una combinación de área y forma para establecer los tres tipos celulares presentes en el epitelio corneal sano, puesto que, estos son los rasgos más discriminantes, como ha quedado demostrado con nuestros resultados estadísticos.

No podemos obviar que, gracias a los trabajos de Doughty (1990 a 2004) nos decidimos a utilizar el área celular para clasificar inicialmente a las células, en contra de una mayoría de estudios que empleaban el tono celular. Aunque en muchos de sus trabajos Doughty también emplea el tono para clasificar, siempre compara áreas y formas para diferenciar un grupo de otro.

Las áreas celulares medidas en esta tesis poseen un amplio rango que va desde 4,97 a 1285,83 μm^2 . Este rango es muy similar al hallado por Doughty en sus trabajos (entre 4,2 y 1582 μm^2)

Hasta ahora hemos discutido todas las características morfológicas analizadas en esta tesis, excepto las uniones intercelulares y la densidad de microproyecciones. Esta última, la hemos podido cuantificar mediante la variable *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)* que representa el % de la superficie celular ocupada por dichas prominencias. A su vez, hemos obtenido la variable binarizando la imagen y calculando el porcentaje del área celular que ocupan las microproyecciones de la membrana (ver más detalles en el capítulo de material y métodos).

La variable *SOM* es, quizás, una de las claves de esta tesis doctoral pues nos ha permitido establecer un parámetro objetivo y cuantificable para comparar las características de las microproyecciones entre células. Hasta el momento, nadie había podido cuantificar, de forma rigurosa, la cantidad de microproyecciones por unidad de superficie que presenta una célula.

Pfister (1973) estableció unos valores (26 microvilli/ μm^2 para las células oscuras y 13 microvilli/ μm^2 para las claras), utilizando imágenes de microscopía electrónica de barrido tomadas bajo diferentes ángulos. Sin embargo, dicho autor no indicó el método utilizado (suponemos que fue una aproximación después de contar visualmente los microvilli de una zona celular de tamaño determinado). Los resultados de Pfister indican, claramente, que las células con más densidad de microproyecciones son las oscuras (el doble que en las claras), aunque estas prominencias se muestran, según dicho autor, más cortas (0,25 μm de longitud en las células oscuras y 0,6 μm en las células claras).

Sin embargo, estos datos se oponen a los hallazgos de otros autores (Hazlett 1980) (Doughty 1990a) (Doughty 1996), en estudios posteriores a los realizados por Pfister. En ellos, se afirma que las microproyecciones son más abundantes en las células claras que en las oscuras. A decir verdad, la mayoría de autores asumen que la densidad de las microproyecciones es mayor en las células claras. Además, atribuyen el tono celular a esa mayor presencia de prominencias de la membrana celular.

A este respecto, nosotros hemos comprobado que la densidad de las microproyecciones visibles al SEM (con las técnicas de fijación convencionales) es mayor en las células pequeñas (que suelen ser las más claras) y en las clasificadas como de tamaño intermedio (cuyos tonos de gris son intermedios) que en las grandes (oscuras). De este modo, el epitelio control posee una elevada densidad de microproyecciones, que se muestra relativamente menor en las células grandes.

No hemos encontrado diferencias en la tendencia central de la variable *SOM* entre las células pequeñas y las medianas. Así mismo, las gráficas de dispersión muestran una población de células medianas con valores de *SOM* muy semejantes a los de las células pequeñas, sin ninguna tendencia general diferencial. Estos resultados podrían ser debidos a una falta de sensibilidad de la variable. No obstante, nuestras observaciones visuales van en la misma dirección, ya que, sólo hemos podido establecer inequívocas diferencias entre las células claras y las oscuras.

Por otro lado, el cálculo de la *SOM*, puede estar influenciado no sólo por la densidad de las microproyecciones sino también por la disposición espacial que adoptan dichas prominencias en la superficie celular, aunque esta última característica no parece ser tan determinante.

Hipotéticamente, una disposición paralela (horizontal) a la superficie celular aumentaría el valor de la *SOM* mientras que una disposición perpendicular (vertical) disminuiría dicho valor. Sin embargo, una célula con elevada densidad de microproyecciones (como sucede en casi todas las células control) tendrá siempre una *SOM* elevada, sea cual sea la disposición de las mismas, tal y como hemos comprobado en esta tesis.

En el caso de que la célula presente una densidad bastante, o muy baja, las microproyecciones (según los resultados de la descripción morfológica de nuestras imágenes) ya no presentan formas vermiformes sino puntiformes. Su relativamente pequeña longitud y su posición erecta (a juzgar por el tono claro que muestran) imposibilitan una disposición horizontal con lo que el efecto

distorsionante de la variabilidad en la disposición no afectaría al cálculo de la densidad.

Por el contrario, las células con densidades intermedias podrían presentar una sobreestimación de la SOM, por efecto de la disposición espacial de las microproyecciones y, de hecho, es probable que así haya sucedido. En este caso, las prominencias celulares mantienen su aspecto vermiforme y suelen doblarse y disponerse horizontalmente. Dicho efecto podría ser el causante de la falta de diferencias significativas entre la SOM de las células pequeñas y las medianas, si es que en realidad existen.

En resumen, podemos afirmar que a partir de cierto tamaño existe una tendencia a la disminución del número de microproyecciones. Si las células medianas poseen una densidad de microproyecciones igual o algo menor que las pequeñas deberá ser confirmado en posteriores estudios.

Por lo que respecta a la adherencia entre células vecinas, nuestros resultados demuestran que la mayoría de las uniones intercelulares del epitelio corneal sano están intactas, como era de esperar. Además, hemos comprobado que los diferentes tipos celulares (células pequeñas, medianas y grandes) no presentan diferencias en la tendencia central de la variable *uniones intercelulares*.

Ello nos lleva a afirmar que, la descamación no parece ser patrimonio de un tipo celular u otro, como cabría esperar atendiendo a la hipótesis de Pfister (1997), según la cual, los tipos celulares se corresponderían con diferentes estadios de madurez celular. Las células claras serían las más jóvenes y las oscuras las más viejas.

A este respecto, la comunidad científica nunca se ha puesto de acuerdo ya que diferentes autores, en trabajos anteriores y posteriores al de Pfister, opinan igual que el o matizan que las células claras son las más viejas (ver introducción).

Por su parte, Doughty (1996), basándose en la heterogeneidad de las células claras, propone (como ya se comentó en la introducción) que los diferentes tipos celulares serían el resultado de tres fenotipos diferentes que madurarían de forma paralela en la superficie celular. Nuestros resultados apoyarían esta hipótesis.

Es obvio que, las imágenes de microscopía electrónica de barrido sólo pueden aportar indicios que ayuden a confirmar o rebatir alguna de estas hipótesis y, en ningún caso, serán absolutamente concluyentes. Por lo tanto, el origen de los tres tipos celulares queda por resolver.

En otro orden de cosas, parece lógico pensar que, las diferentes uniones intercelulares observadas (sobre todo al impedir el parpadeo en el conejo) se corresponden con progresivos estadios del proceso de descamación celular. De este modo, una célula con uniones intactas (categoría 1) no habría iniciado el proceso descamativo mientras que otra que hubiera perdido gran parte de sus uniones intercelulares (categoría 0,2) estaría en las fases finales de la descamación. A su vez, las uniones de categoría 0,8 iniciarían un proceso de pérdida de adherencia mostrando sus bordes celulares perfectamente unidos pero elevados respecto de la superficie celular, razón por la que aparecen más claros y marcados.

En el epitelio control la variabilidad de las uniones intercelulares es mínima. Además, las células descamadas o en avanzado proceso de descamación (<0,5%) no producen discontinuidades en dicho tejido, al contrario de la descamación causada por una evaporación excesiva de lágrima (como comentaremos más adelante). Todo ello confirma que, la descamación fisiológica es paulatina, de modo que, permite una regeneración completa antes de la total descamación de las células más superficiales, como se describe en la literatura (Duane y Jaeger 1990) (Remington 1998).

Queda un último aspecto del epitelio corneal que debemos discutir. Este es el origen de los diferentes tonos que muestran sus células. En nuestro estudio partimos de la premisa de que la imagen celular, visualizada bajo técnicas de

microscopía electrónica de barrido, consta de dos elementos: la imagen de las microproyecciones y la imagen de la membrana celular desnuda, que aparece entre dichas prominencias. Para calcular las variables se han desestimado aquellas zonas de la célula en las que aparecían artefactos. En consecuencia, el tono celular, en nuestras imágenes, sólo puede ser originado por el tono de las microproyecciones y por el de la membrana.

Nosotros hemos demostrado que el tono de la membrana apical de las células del epitelio corneal es un valor casi constante, por lo que no puede ser el causante de los cambios de tonalidad intercelular. Este resultado concuerda con la idea de que el epitelio sano es una superficie lisa y uniforme. Si alguna célula estuviera en un plano marcadamente superior su membrana celular aparecería, en las imágenes al SEM, con un tono más claro.

En cambio, la tonalidad media de las microproyecciones varía de unas células a otras. Ello quiere decir que algunas células poseen microvilli más erectos que otras o que el microvilli se está degradando (cambiando su composición). En nuestros resultados se observa como la variable *tono medio_{mcp}* disminuye, por término medio, y presenta mayor variabilidad a medida que la célula aumenta de tamaño.

Este comportamiento es análogo al que presenta la variable *tono* que cuantifica el tono de una célula a 500x. Además, las dos variables, *tono medio_{mcp}* y *tono* poseen una de las más altas correlaciones encontradas en la muestra de células. Por lo tanto, todo parece indicar que el tono de una célula a 500x depende claramente del tono de sus microproyecciones.

Por otro lado, existe otra característica de las microproyecciones que podríamos considerar artífice del tono celular, esta es su densidad (número de prominencias por unidad de superficie). La variable utilizada para cuantificarla, *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)*, se comporta como la variable *tono* y la variable *tono medio_{mcp}* adquiriendo valores más bajos y más dispersos a medida que el área celular aumenta. En cuanto a las correlaciones, *SOM* también posee una, relativamente, alta correlación con *tono*.

Así, podemos considerar que el diferente tono que muestran las células en las imágenes al SEM, es el resultado de, por un lado, la mayor o menor verticalidad de las microproyecciones o su degradación y, por otro, de la cantidad de dichas prominencias por unidad de superficie. De este modo, confirmamos cuantitativamente lo que algunos autores habían apuntado de forma cualitativa (Dormans y van Logten 1982) (Lohman et al 1982) (Doughty 1990a) (Collin y Collin 2000a). El tono celular depende de la densidad de microproyecciones y de su morfología en toda su longitud.

No obstante, somos conscientes de que, la mucina podría ser un factor determinante del tono celular (Waggone y Philip 1981) (Renard et al 1983) Hazlett (1984). Por tanto, nuestros resultados serán válidos para aquellas imágenes de muestras sometidas a una fijación convencional, como la que nosotros hemos realizado. Ahora bien, si más adelante se descubre un método para eliminar eficazmente la totalidad de la capa mucínica, también se podrá aplicar el cálculo de nuestras variables tonales y de la variable SOM para establecer las relaciones pertinentes.

En otro orden de cosas, se podría suponer que las tres características de las microproyecciones, densidad, posición vertical y composición, de las cuales depende el tono celular, están relacionadas. De este modo, un mayor número de microproyecciones conduciría a un tono medio de las mismas más alto, o al revés. Sin embargo, de nuestros resultados se deduce que una mayor o menor densidad de microproyecciones no está relacionada con una mayor o menor verticalidad de las mismas. Por ejemplo, una célula que posea una elevada densidad de microproyecciones puede presentar microproyecciones erectas o dispuestas horizontalmente (tal y como se observa en algunas de nuestras imágenes), aunque el tono celular será distinto en cada caso.

Quizás, la desconexión entre estas dos características propias de la microproyección indique que existe un factor externo a la célula (como podría ser la mucina) influenciando sobre una de ellas. En todo caso esta afirmación pertenece al terreno de las conjeturas.

Para complementar esta discusión se debe puntualizar que, en las imágenes de los diferentes TAP se observa como la sequedad puede modificar la densidad de las microproyecciones y, también su forma. Por lo tanto, es posible que las relaciones entre las variables *tono*, *tono medio_{mcp}* y *SOM* sean diferentes. Esto último es, de nuevo, una suposición ya que los datos sobre el tono medio de la membrana y el de las microproyecciones se han obtenido, exclusivamente, del grupo de células control.

Probablemente, también será diferente la relación entre el tono celular y el tono medio de la membrana ya que, en estos casos, la presencia escasa de microproyecciones hace que la membrana desnuda ocupe casi toda la imagen celular. Dicha membrana presenta, bajo condiciones de evaporación excesiva, numerosas discontinuidades que se traducen en variaciones del tono, variaciones que contrastan con la uniformidad observada en el tono de la membrana de las células control. En todo caso, será necesario comprobarlo con nuevos estudios.

4.2. El epitelio corneal sometido a diferentes TAP

El epitelio corneal, sometido a una evaporación excesiva de la lágrima, muestra una degradación progresiva, a medida que aumenta el tiempo de apertura palpebral (TAP). Dicha degradación se manifiesta, principalmente, en la alteración y disminución de las microproyecciones presentes en la membrana celular y la pérdida de adherencia de las uniones intercelulares. Aunque, también aparecen cambios en la tonicidad de la membrana celular, el tamaño, la forma y el tono de gris de las células a 500x.

Cabe señalar que, hasta la fecha, no se han realizado estudios en los que se describan las alteraciones morfológicas que provoca este modelo de ojo seco en el epitelio. Aunque algunos autores lo han empleado anteriormente en sus estudios (Fuhijara et al 1995 y 1998, Nakamura et al 1997), tan sólo han valorado la integridad de la barrera epitelial (como se comenta más abajo), sin especificar los cambios que el modelo desencadena en el epitelio corneal. La finalidad de estos trabajos era la de poner en evidencia las propiedades

beneficiosas de algunas sustancias en el tratamiento del ojo seco. A nuestro entender, el conocimiento y cuantificación de todas las alteraciones morfológicas permitirá una valoración más completa de los posibles beneficios o perjuicios.

Nuestros resultados describen un patrón de deterioro epitelial desigual. De este modo, el modelo genera zonas alteradas frente a otras de apariencia normal. Dichas alteraciones se inician a partir del TAP 2 (1 a 2h de apertura palpebral) y son más frecuentes a medida que el TAP aumenta.

Ello concuerdan con los trabajos de Fujihara et al (1995) que fueron los primeros en utilizar este modelo de ojo seco, basado en impedir el parpadeo del animal. En su estudio, realizado también en conejos, valoraban las alteraciones del TAP mediante la tinción con azul de metileno. Una vez muerto el animal extraían el colorante de la córnea y medían su absorbancia a 660 nm, para cuantificar la cantidad absorbida por el tejido. Dicha cantidad era proporcional a la pérdida de las uniones estrechas en cada epitelio.

Fuhijara y sus colaboradores encontraron que el incremento de colorante absorbido por el tejido era significativo a partir de las dos horas de apertura palpebral, comparándolo con los ojos control. En nuestro caso, el TAP 2 incluye córneas que han estado sometidas a un tiempo de apertura palpebral de 1h y 25 minutos, 1h y 40 minutos y 1h y 45 minutos. Teniendo en cuenta que Fuhijara hacía sus mediciones cada hora y no cada media hora, nuestros resultados son concordantes.

El hecho de que el deterioro del epitelio no sea uniforme es debido, probablemente, a la falta de parpadeo del animal. Sin parpadeo la película lagrimal no se puede extender por toda la córnea homogéneamente (Doane 1980) (Rigal 1993). Hemos de recordar que, la glándula lagrimal no ha sido extirpada, por lo tanto, el animal sigue segregando lágrima durante todo el período de apertura palpebral.

Sin embargo, como se comentó en la introducción, la falta de parpadeo intensifica la evaporación de la lágrima y disminuye la velocidad de renovación

de la misma. Ello provoca, a su vez, una disminución en la producción del fluido lagrimal. Esta afirmación está basada en los trabajos de Tomlinson et al (1998), según los cuales existe un mecanismo de retroalimentación entre la renovación y la producción de lágrima.

Por su parte, el aumento de la evaporación de la lágrima se debe a un efecto directo, ocasionado por la apertura palpebral constante, y a un efecto indirecto, a causa de una disminución en la secreción de lípidos. Bron y Tiffany (1998) afirman que la presión que el parpadeo ocasiona sobre la parte terminal de los conductos excretores sería uno de los desencadenantes de la liberación de los lípidos de la lágrima. Además, una menor secreción lipídica incrementa la acción desestabilizante que este modelo ejerce sobre la película lagrimal (Korb et al 1994).

De este modo, al impedir el parpadeo del animal aumentamos la evaporación de la lágrima, disminuimos la velocidad de renovación y producción de la misma y desestabilizamos la película lagrimal. Lo cual desencadenaría las alteraciones morfológicas observadas a partir del TAP 2.

Por el contrario, el epitelio sometido a un tiempo de apertura palpebral menor de una hora (TAP 1) no presenta diferencias remarcables respecto del control. Sin embargo, se ha observado una proporción de células descamadas o en proceso de descamación del 0,5%, valor más alto que el hallado en el epitelio control (0,2%). Para Doughty (1990, 1991), como ya se ha comentado anteriormente, los valores normales deben ser menores del 0,5%, por lo que la descamación del TAP 1 estaría justo por encima del valor normal más alto. No obstante, lo hemos considerado dentro de la normalidad, teniendo en cuenta que el límite apuntado por este autor es un valor aproximado y que, además, nuestros resultados, tanto morfológicos como estadísticos, no muestran diferencias importantes entre el TAP 0 y el TAP 1.

En cuanto a la variedad morfológica de las células descamadas o en proceso de descamación (observada tanto en las córneas control como en las del TAP 1), podría ser el resultado de los diferentes procesos implicados en la

exfoliación fisiológica (apoptosis clásica, apoptosis no clásica y diferenciación terminal) (Ren y Wilson 1996b).

Existe otra explicación plausible, si consideramos la teoría de Doughty (1996) sobre el origen fenotípico de los tres tipos celulares observados en el epitelio. En base a esta teoría las células pequeñas (las más claras) sufrirían un proceso madurativo independiente del que presentan las células medianas o las grandes. En consecuencia, las células descamadas mostrarán diferentes rasgos morfológicos dependiendo de si son células claras, intermedias u oscuras, en el último estadio de su ciclo vital.

Queda por resaltar un último aspecto del epitelio sometido al TAP 1. Este es la observación de dos tipos de *holes*. Unos con los bordes dispuestos hacia arriba, por lo tanto blancos en las imágenes al SEM, y otros con bordes hacia adentro. En los trabajos de, entre otros autores, Pfister (1973), Renard et al (1983) y Doughty (1990b), sobre el epitelio corneal sano, aparecen, también, estos dos tipos de cráteres. Nosotros creemos que podrían ser el resultado de diferentes tensiones generadas en la membrana celular, según la morfología de la célula en cuestión y de sus vecinas. Dichas tensiones se originarían por la existencia de dos fuerzas opuestas como son las de retraimiento y las de unión intercelular (hipótesis que ya hemos expuesto anteriormente). Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que los dos tipos de cráteres sean estructuras celulares diferentes.

Doughty (1997) observó unas estructuras muy parecidas a los cráteres con los bordes hundidos localizadas a lo largo de toda la conjuntiva palpebral del conejo y las identificó como poros glandulares. Por otro lado, Gipson et al (1992) demostraron que las células del epitelio corneal también producen y secretan glicoproteínas en su superficie, con lo que, no sería de extrañar que algunos de los cráteres fueran poros excretorios.

En cuanto a los TAP más altos (TAP 2, 3 y 4), muestran un patrón de deterioro idéntico con la única diferencia de que, a medida que el TAP aumenta, aumenta, también, la proporción de zonas gravemente alteradas. De este

modo, en el TAP 2 (entre 1 y 2h de apertura palpebral) podemos encontrar algunas células con características necróticas similares a las que presentan muchas de las células del TAP 3 (de 2 a 3h de apertura palpebral) ó del TAP 4 (mayor o igual a tres horas de apertura palpebral).

No obstante, el TAP 4 posee una peculiaridad que le distingue de los otros dos TAP que es el desprendimiento de grandes zonas de la capa superficial del epitelio. Ello deja al descubierto células de la capa subyacente que presentan una apariencia normal (como se comentará más adelante con detalle). De este modo, tal y como confirman los resultados estadísticos, los epitelios que muestran más similitudes son los sometidos al TAP 0 y TAP 1 (como ya se ha comentado) y los del TAP 2 y 3.

El deterioro del epitelio sometido a un tiempo de apertura palpebral mayor de una hora (TAP2, 3 y 4) se caracteriza, entre otras alteraciones, por una pérdida de tonicidad de la membrana celular. Ello puede ser la causa de que los núcleos de las células sean, a veces, evidentes, a pesar de no presentar signos de descamación. Según Rigal (1993) una mejor visibilidad de los núcleos, frecuentemente observadas en los epitelios anormales, podría indicar un sufrimiento moderado de la superficie ocular. Cabe recordar que el ángulo de observación de la muestra ha sido siempre de 90° por lo que no ha influido en la presencia o ausencia de núcleos manifiestos (Doughty 1990a).

La pérdida de tonicidad de la membrana denota una pérdida brusca del contenido citoplasmático debido al desequilibrio entre la presión osmótica fuera y dentro de la membrana. Dicho desequilibrio se origina a medida que la lágrima se va evaporando y, por consiguiente, va aumentando su concentración en sales. De este modo, pasa de ser un líquido isotónico a hacerse, progresivamente, más hipertónico. La hiperosmolaridad se instaura a pesar de las aportaciones de nueva lágrima isotónica, secretada por el animal.

Es más, a medida que se mantiene la falta de parpadeo la osmolaridad del fluido secretado por la glándula lagrimal principal, también, aumenta. Ello es debido a que la baja velocidad de flujo origina una mayor absorción de agua a

nivel de los conductos lagrimales, como se afirma en los trabajos de Gilbard y Dartt (1982), lo que, en definitiva, vendría a incrementar las condiciones de hiperosmolaridad de la película lagrimal.

Se ha comprobado que la hiperosmolaridad es una característica constante en el ojo seco y se la considera como un indicador con excelente sensibilidad y especificidad para diagnosticar la existencia de una queratoconjuntivitis seca (QCS) (Lucca et al 1990), como ya hemos comentado en la introducción.

En los párrafos anteriores hemos hablado de la falta de tonicidad celular como una manifestación visible del aumento de la concentración salina de la lágrima. Por lo tanto, y en consonancia con las afirmaciones de otros autores (Gilbard et al (1984) y Huang et al (1989)) creemos que la hiperosmolaridad causa un efecto nocivo directo sobre el epitelio corneal. Además, Ciprandi et al (1994) y Baudouin (2001) afirman que una elevada concentración de sales puede desencadenar un proceso inflamatorio.

Una vez instaurado dicho proceso, se inicia un círculo vicioso de autodestrucción, amplificando, así, el daño que la evaporación excesiva ha iniciado sobre el tejido corneal, como muestran los trabajos de Stern et al (1998), Mathers (2000) y Ronaldo y Zierhut (2001). En base a ellos podríamos afirmar que, la hiperosmolaridad de la lágrima, juntamente con la aparición de citoquinas inflamatorias serían los causantes de las lesiones en la membrana celular, que hemos observado, sobre todo, en los TAP más altos.

Por otro lado, sería lógico pensar que la evaporación excesiva de lágrima alterará, también, el crítico nivel de los factores de crecimiento presentes en la lágrima. Es más, Ohashi et al 2003 demostraron que existe una disminución en la concentración de EGF (epithelial growth factor) en el ojo seco y en otras muchas enfermedades oculares. Creemos que los cambios de concentración en los factores de crecimiento pueden haber contribuido, también, al deterioro del epitelio. Máxime si se tiene en cuenta que dichas sustancias sólo necesitan de 30 a 60' para incidir en el programa del ciclo celular, tal y como han establecido Jones y Kazlauskas (2000).

Otra de las alteraciones observadas es la que conduce a una uniformidad del tono intercelular, por la que desaparece el mosaico de grises típico de los epitelios sanos observados al SEM. Esta homogenización del tono parece estar muy relacionada con la disminución en el número de microproyecciones de la superficie celular. De modo que, una incipiente pérdida de microvilli, como la que muestran algunas células en el TAP 2, origina un epitelio de aspecto granuloso, en las imágenes a 500x, y un tono celular irregular con pequeños puntos. Sin embargo, a medida que la disminución en el número de microproyecciones es mayor, el tono se va uniformizando. Un caso extremo, en este proceso de pérdida de microvilli, aparece en aquellas zonas en proceso de desprendimiento masivo, como sucede en el TAP 4. Estas presentan un tono gris, absolutamente uniforme, y sus células han perdido totalmente las microproyecciones.

Todo ello viene a corroborar la estrecha relación entre el tono que presenta una célula y la densidad de microproyecciones de la misma. (Hipótesis que hemos comentado y confirmado al discutir sobre las características del epitelio corneal sano.)

El área y la forma de las células también sufren cambios debido al medio adverso que se origina por la falta de parpadeo. Bajo un análisis estrictamente visual no hemos observado grandes diferencias, seguramente debido a la elevada variabilidad celular. Sin embargo, los resultados estadísticos confirman que existe una leve tendencia al aumento de las áreas y las formas circulares a medida que el TAP aumenta. En concreto, las células de tamaño mediano son cada vez más frecuentes, en detrimento de las más pequeñas (ver figura 3.39). De este modo, la variabilidad se muestra algo más baja que en la muestra control.

Las diferencias en la media de *área* y *forma* al hacer comparaciones interTAP se observan, sobre todo, entre el control y el resto de tiempos de apertura. Ello hace suponer que los cambios de área y forma se iniciarían de forma temprana, posiblemente como defensa para contrarrestar la elevada

descamación que este ambiente hostil produce. Dichos cambios se mantienen mientras persisten las condiciones adversas.

Que el tamaño y la forma celular se alteren paralelamente está de acuerdo con la elevada correlación positiva hallada entre ellos (ver tabla 3.20 en resultados estadísticos).

No obstante, los resultados de los diferentes análisis estadísticos realizados (véase especialmente las regresiones logísticas) demuestran que los dos rasgos más característicos del deterioro epitelial por falta de parpadeo son: la disminución del número de microproyecciones y la pérdida progresiva de las uniones intercelulares (ver modelos predictivos y correlaciones de las variables con el TAP).

Estas últimas, se van perdiendo lenta pero inexorablemente a medida que se alarga el tiempo de apertura palpebral. De este modo, en las imágenes de los TAP 2 y 3 se observa como las células pierden algunas de sus uniones, como parte de un proceso que parece bastante restringido a pequeñas zonas del epitelio. Sin embargo, en el TAP 4, la pérdida de la adherencia entre las células se presenta como un proceso masivo que elimina grandes zonas del estrato más superficial del epitelio.

Los resultados estadísticos, también, confirman estos datos. La variable *uniones intercelulares* presenta mayor dispersión hacia valores más bajos y su media va disminuyendo a medida que el TAP aumenta. Afirmar que la pérdida de las uniones intercelulares progresa con el tiempo de apertura palpebral viene, también, avalado por el hecho de que, existen diferencias significativas entre todos los pares de TAP no sólo entre el control y el resto sino también, por ejemplo, entre el TAP 2 y el 4.

Cabe añadir que la descamación patológica que se desencadena con este modelo de modelo de ojo seco es, probablemente, el resultado de una necrosis del tejido, a diferencia de la descamación fisiológica que, como ya se ha

comentado con anterioridad, obedece a una diferenciación terminal o una apoptosis.

Las alteraciones descritas corroboran esta idea pues la necrosis es un proceso masivo, con pérdida brusca del contenido citoplasmático celular y, según Ren y Wilson (1996b) y Estil et al (2000), origina la pérdida de parte de la capa epitelial más externa, como sucede en las córneas del TAP 4, donde dicha necrosis estaría plenamente instaurada. No obstante, en este TAP también existen zonas con una descamación pseudofisiológica. Esta podrían ser el resultado de una mayor implicación de la apoptosis en la descamación, debido al estrés que sufren las células, tal y como demostraron Nakamura et al (2003) y Ren y Wilson (1996b).

Cabe señalar que, la discontinuidad del epitelio se debe, como exponemos a continuación, tanto a la pérdida de las uniones estrechas como a la incapacidad para generarlas.

Un aumento de la tasa de descamación, equivalente al observado en nuestras imágenes, conduciría a un índice mitótico más alto, para mantener constante la masa celular. En dichas condiciones de extremo gasto energético, el proceso de la diferenciación celular no podrá mantenerse completo, durante mucho tiempo.

Dicho de otro modo, se podrán formar nuevas uniones intercelulares, que mantengan la continuidad epitelial, siempre y cuando el tejido pueda contrarrestar la elevada descamación sin que el proceso de diferenciación celular resulte afectado.

Como ya comentamos en la introducción, para que se formen las uniones estrechas, típicas de la capa más externa del epitelio, es necesaria la presencia de una serie de componentes proteicos. Dichos componentes van aumentando a medida que la célula se va diferenciando, tal y como lo demuestran los trabajos de Ban et al. (2003) y Remington (1998). Ello concuerda con los estudios de Lou et al (2001) donde se afirma que sólo las células plenamente diferenciadas son capaces de generar o reestablecer las uniones estrechas.

Es más, según Ban et al (2003), las células en cultivos epiteliales totalmente sumergidos en un medio líquido poseen las proteínas que constituyen las uniones estrechas pero, estas, no están situadas en las membranas laterales, como cabría esperar. De este modo, las uniones estrechas no se pueden formar. En cambio, si el cultivo celular se sumerge intermitentemente en el medio líquido, semejando las condiciones de humectación fisiológicas, las proteínas se sitúan lateralmente y las uniones estrechas se forman, manteniendo su función de barrera.

Por otro lado, a nuestro entender, la pérdida de integridad de las membranas celulares, también, dificulta la formación de unas uniones estrechas estables. Si la membrana ha perdido continuidad y está más deteriorada, disminuirán sus propiedades de flexibilidad y las tensiones de retraimiento serán mayores. De este modo, las uniones intercelulares soportarán más tensión y será más difícil mantener la adherencia.

Debemos recordar, aquí, que la falta de uniones estrechas origina opacidades en la córnea y dificulta el flujo de sustancias desde el humor acuoso hacia el epitelio corneal. (Chen et al 2002) (Kim et al 2002) Ello significa que el aporte de aminoácidos, glucosa y otros nutrientes disminuiría, en un momento de máximo requerimiento. Además, con la masiva evaporación de lágrima, el oxígeno atmosférico no podría absorberse correctamente. Esta falta de oxígeno generaría más dificultades para la obtención de energía y una situación de hipoestesia (Millodot 1984) que disminuiría la lagrimación refleja.

Por otro lado, Gipson et al (1992) consideran que la liberación del glucocálix desde las vesículas intracitoplasmáticas de las células epiteliales se desencadena con la formación de las uniones estrechas, cuando dichas células entran en contacto con la película lagrimal. En consecuencia, la falta de uniones estrechas impediría que el glucocálix pudiera cubrir la superficie celular, quedando aún más expuesta a la deshidratación.

Zrihan-Licht et al (1994) y Carraway et al (1999) consideran que las glucoproteínas, que forman el glucocálix, están implicadas en la transmisión de

ciertas señales y formarían parte del receptor celular para el factor de crecimiento epitelial (EGF), participando, también, en su regulación. De este modo, el deterioro del tejido se haría irreversible.

En nuestros resultados se observa, también, que la variable *uniones intercelulares* sólo se correlaciona con la variable *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)*. Esta relación vendría a corroborar la conexión entre las uniones intercelulares y el deterioro de la superficie celular, comentada en los párrafos anteriores.

Como hemos podido observar (tanto en las imágenes como en los resultados estadísticos), la disminución en el número de las microproyecciones es una de las primeras alteraciones que aparecen en la superficie epitelial. Esta, es anterior a la pérdida evidente de tonicidad y continuidad de la membrana celular ya que las células muy arrugadas muestran una membrana desnuda, con ausencia total, o casi total de microvilli.

Los resultados estadísticos demuestran que, a medida que el TAP aumenta la densidad de las microproyecciones se hace más variable y, en general tiende a ser menor. Además, la disminución en el número de las microproyecciones es la alteración que posee una relación más clara con el tiempo de apertura palpebral (ver tabla 3.23 de resultados estadísticos). Este deterioro cuantitativo, aumenta progresivamente, hecho que viene corroborado por las diferencias significativas de la variable *SOM* entre todos los TAP (excepto en el par TAP 0/ TAP 1)

Pero los cambios en las microproyecciones, por acción del tiempo de apertura palpebral, no son sólo cuantitativos. También se altera la forma de dichas estructuras, con lo que se pierde la homogeneidad que muestra la superficie de cada una de las células del epitelio sano. Igualmente, Xie y Zhang (1993) describen estas alteraciones en condiciones de sequedad ocular, con otro modelo de ojo seco.

Las alteraciones en la distribución y forma de estas prominencias se inician, más frecuentemente, en aquellas células que poseen una menor densidad de microproyecciones (o sea, las células grandes, si partimos de una córnea sana). Sin embargo, a partir del TAP 3, también, aparecen formas irregulares y distribuciones poco homogéneas en células con un elevado número de microvilli en su superficie. Hecho que podría indicar que el proceso de deterioro está totalmente instaurado.

Las microproyecciones de las células del TAP 4 merecen una mención especial. En concreto, nos referimos a los microvilli de las células de la capa subyacente, que ha sido expuesta a la superficie por acción de la descamación masiva de amplias zonas del epitelio. Estas microproyecciones poseen un aspecto diferente aunque cuantitativamente son semejantes a las observadas en las células control, como lo demuestra la recuperación que la variable *SOM* muestra en dicho TAP.

Recordaremos que los microvilli son, en este caso, formas con un carácter marcadamente granuloso, incluso en ocasiones aparecen adheridas entre ellas formando grumos. Por otro lado, la membrana celular y los bordes de los cráteres presentan, también, ese aspecto que los diferencia del control.

En nuestra opinión, podrían ser el resultado de una combinación de inmadurez y deterioro producido por las condiciones de elevada sequedad. La inmadurez, es evidente, ya que son capas celulares que, en condiciones fisiológicas, aún no habrían entrado en contacto con el medio externo.

En cuanto al deterioro, es una suposición plausible. Se sabe que un medio externo adverso, como el que aparece en la queratoconjuntivitis seca, puede generar alteraciones en las capas subyacentes (Rigal 1993). Además, ya hemos comentado que, la pérdida de uniones estrechas puede afectar al trasiego de nutrientes desde el humor acuoso. Pero el desequilibrio entre la descamación masiva y la limitada capacidad de regeneración es, quizás, la razón definitiva por la que el proceso de deterioro afectará, tarde o temprano, a todas las capas del epitelio.

Los resultados obtenidos agrupando a las células según su tamaño y tiempo de apertura palpebral concuerdan, plenamente, con todo lo comentado hasta ahora y confirman, desde un punto de vista estadístico, algunos puntos.

Según este estudio, los signos de deterioro celular son los mismos en todos los grupos de tamaño, aunque la progresión de las alteraciones presenta diferencias. En concreto, la disminución en el número de microproyecciones se confirma más marcada en las células que inicialmente presentaban una densidad menor, o sea, las células grandes. Ello vendría a establecer que, la observación de este tipo de células es la que proporciona un diagnóstico precoz de alteración epitelial. (Como ya se ha comentado antes, la variable *SOM* parece ser la primera en modificarse ostensiblemente)

En todo caso, la confirmación de que las células epiteliales sometidas a diferentes tiempos de apertura palpebral muestran marcadas diferencias en el número de microproyecciones es, quizás, el aspecto más relevante de este estudio celular por tamaños. Hemos de recordar que, la inmensa mayoría de las células del epitelio control presentaban una densidad de microproyecciones muy elevada. Pero, a medida que el TAP aumenta también lo hace la dispersión, hacia valores bajos, de la variable *SOM*. La variabilidad en el número de microproyecciones, incluso dentro de un grupo de tamaño determinado, se incrementa enormemente. En definitiva, según nuestros resultados para realizar un diagnóstico precoz de un posible deterioro epitelial se debe estudiar tanto la densidad de las microproyecciones en las células grandes como la variabilidad de esta característica, en el conjunto de células epiteliales.

Por el contrario, las células grandes son las que, en general, parecen conservar mejor sus uniones intercelulares y las células medianas las que más fácilmente las pierden. Estas diferencias en la solidez de las uniones, que no se observan en las células control, podrían ser originadas por el incremento brusco del área celular desencadenado por el TAP.

En condiciones de evaporación masiva de la lágrima las células del epitelio tienden a aumentar su área en un intento de minimizar las discontinuidades generadas por la excesiva descamación. Este mecanismo ha sido descrito, ampliamente, en caso de heridas (Robb y Kuwabara 1962) (Kuwabara et al 1976) y también en procesos descamativos (Doughty 1992).

De este modo, el grupo de células más numeroso pasa a ser el de las células medianas, en detrimento de las pequeñas (ver tablas de resultados morfométricos en apartado de descripción morfológica y figura 3.39 de resultados estadísticos). Pero el esfuerzo realizado, posiblemente, debilita sus uniones intercelulares, máxime si se tiene en cuenta que el medio externo sigue siendo adverso. La constante falta de lágrima marcaría diferencias entre el intento de regeneración epitelial frente a un ojo seco o frente a una lesión traumática.

En las heridas el proceso regenerativo puede prosperar con más garantías de éxito debido a que las condiciones oculares son las adecuadas. Los estudios de exfoliación inducida de una monocapa de células epiteliales con un detergente biológico indican que, la recuperación de la barrera celular y de la resistencia eléctrica transepitelial se alcanza en aproximadamente una hora (Wolosin 1988), en condiciones fisiológicas.

En definitiva, para valorar la progresión de un epitelio deteriorado por una evaporación excesiva de lágrima debe analizarse, sobre todo, como ha evolucionado el proceso de rotura de las uniones intercelulares, especialmente entre las células grandes.

Hasta aquí el comentario de los resultados obtenidos con los datos celulares. Estos resultados nos han permitido establecer, con detalle, los cambios que la falta de parpadeo desencadena en la morfología de las células superficiales del epitelio corneal.

Por su parte, el estudio zonal no mejora la descripción de las alteraciones epiteliales, realizada con los datos celulares. El motivo es obvio. Los datos

zonales se obtienen agrupando los valores de las variables de células vecinas, por lo que, la información descriptiva pierde parte de sus matices, aún existiendo una lógica concordancia entre los dos tipos de datos.

Sin embargo, el estudio zonal ha sido, también, productivo. Con el, hemos confirmado que para valorar el estado global de un epitelio es más conveniente establecer un análisis por zonas. Ello era de esperar, si tenemos en cuenta la gran variabilidad celular que muestra la capa más externa de la córnea y la manifiesta falta de homogeneidad en el deterioro epitelial, causado con este modelo de ojo seco. Tanto las correlaciones de las variables con el TAP como el porcentaje de aciertos de los modelos predictivos avalan el uso de los datos zonales como mejor opción para la evaluación global del epitelio.

Una vez discutidos todos los resultados, cabe señalar que, en la literatura existen diferentes trabajos en los que se observan cambios similares a los descritos en esta tesis doctoral. La pérdida y alteración de las uniones intercelulares y la elevada descamación por falta de adherencia entre las células aparecen en las descripciones epiteliales realizadas por otros autores en casos de hiperosmolaridad (Gilbard et al 1984) y en estudios sobre la disminución de la impermeabilidad del epitelio corneal en QCS (Göbbels y Spitznas 1992) (Puy et al 1998).

Por su parte, el aumento de tamaño celular es uno de los signos patológicos a destacar en las citologías de impresión del epitelio corneconjuntival de pacientes con ojo seco (Shalaby et al 1998) (Murube y Rivas 2002). No obstante, respecto a los cambios de tamaño celular existe cierta controversia en la literatura. Lemp et al (1984) cuantificaron el tamaño celular y observaron que la proporción de células de talla mediana disminuía a favor de las tallas pequeña y grande. Para Lemp et al (1984) igual que para Tsubota et al (1991) el tamaño celular predominante sería el pequeño mientras que para Maréchal-Courtois y Delcourt (1986) y Serdarevic y Koester (1985) existiría un predominio de células grandes poco brillantes y de textura heterogénea. De todas formas, cabe señalar que la técnica de observación empleada en todos

estos casos es la microscopía especular, técnica que no posee una alta resolución con lo que las mediciones se hacen muy difíciles.

Por otro lado, el epitelio corneal también muestra una pérdida de microproyecciones y de uniones intercelulares cuando se le somete a la acción de diversos fármacos oculares (Pfister y Burstein 1976) (Stroobants et al 2000) (Noecker et al 2004) (Herrygers et al 2005), soluciones humectantes (Begley et al 1991), soluciones con diferente composición de sales (Doughty 1995) o el efecto de ciertas sustancias, como el alcohol, usadas en cirugía oftálmica para eliminar el epitelio corneal (Kim et al 2002). Ello demuestra que Waring y Rodríguez (1987) están en lo cierto cuando afirman que la respuesta del epitelio frente a un proceso patológico es limitada y de expresión poco específica.

Sin embargo, nadie hasta ahora había cuantificado dichas alteraciones. De modo que, para establecer el estado de salud de un epitelio se han utilizado diversas escalas basadas en criterios semicuantitativos (sistemas de puntuación empíricos) (Doughty 2003) (Burstein 1980a) (Stroobants et al 2000) (Berdy et al 1992). Nuestro método para cuantificar el número de microproyecciones permite establecer unos límites de normalidad objetivos y definir los diferentes estadios del proceso degradativo de estas prominencias de la membrana celular, de una forma más exacta.

Gracias a que este modelo de ojo seco desencadena unas alteraciones muy parecidas a las que presentan los pacientes con QCS (queratoconjuntivitis seca) creemos que nuestro método puede ayudar a sistematizar el diagnóstico de la enfermedad. Sobre todo teniendo en cuenta que, las variables subordinadas que hemos utilizado (*cat SOM*, *cat tamaño*, *cat forma*, *cat tono*) son fieles, en esencia, a la información que se trasluce de sus correspondientes variables principales (*SOM*, *área*, *forma* y *tono*) y, además, son capaces de predecir el tiempo de apertura al que ha sido sometido un epitelio. Por lo tanto, se podrá considerar que dichas variables subordinadas son una buena herramienta clínica para valorar el estado del epitelio corneal en condiciones de excesiva evaporación.

Según Barabino (2004) ninguno de los modelos animales que se han utilizado, hasta el momento, son un método óptimo para estudiar la patogénesis del ojo seco, dada su complejidad. A pesar de que este no ha sido nunca nuestro objetivo, creemos que el modelo de ojo seco empleado en esta tesis doctoral activa los mismos mecanismos que están implicados en la instauración clínica de la enfermedad, como se ha analizado a lo largo de toda esta discusión. Aunque los mecanismos desencadenantes son los mismos la progresión es, definitivamente, más rápida. Sin embargo, debemos insistir en el hecho de que las alteraciones que hemos descrito en nuestros resultados son muy parecidas a las observadas en una QCS. (A excepción de la pérdida de grandes zonas epiteliales en el TAP 4)

De cualquier forma, creemos que nuestra principal aportación con esta tesis doctoral es en el ámbito de la valoración fármaco-toxicológica de diferentes sustancias aplicadas por vía tópica ocular. Hemos cuantificado las características del epitelio sano y del epitelio sometido a una evaporación excesiva. Ello nos permitirá evaluar en el futuro, de forma sistemática, los beneficios y los riesgos de lágrimas artificiales u otros productos para tratar el ojo seco, además de valorar objetivamente la toxicidad de cualquier fármaco de aplicación tópica e, incluso, el deterioro que una técnica quirúrgica pueda ocasionar en el epitelio corneal.