



**Universidad del
Rosario**

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL CANAL DE POTASIO ACTIVADO POR CALCIO DE
CONDUCTANCIA INTERMEDIA (KCa3.1) EN EL ENDOTELIO DE LA CORNEA EN CONDICIONES
FISIOLÓGICAS Y EN AMBIENTES HIPERGLÚCIDOS**

Autor

Diana Patricia Amador Muñoz MD MSc

**Trabajo presentado como requisito para optar por el
título de Doctor en Ciencias Biomédicas y Biológicas.**

Director, Tutor

Luisa Marina Matheus Merina PhD

**Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biológicas
Universidad del Rosario
Bogotá D.C – Colombia
2021**

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	3
Índice de tablas	6
Índice de figuras	7
Resumen	9
Abstract	13
Introducción general	17
Objetivos y metodología	40
Agradecimientos	46
Capítulo 1. Caracterización de la influencia de la DM sobre el endotelio de la córnea.	47
Capítulo 2. Análisis <i>in-vitro</i> de las respuestas del endotelio corneal a concentraciones altas de glucosa.	65
Capítulo 3. Identificación de los canales activados por cationes en el endotelio corneal.	77
Capítulo 4. Efectos de la inhibición y la activación de KCa3.1 sobre la proliferación, la migración y la apoptosis del endotelio de la córnea.	100
Conclusiones generales	122
Difusión de resultados	125
Referencias	126

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP monofosfato de adenosina.

ADP difosfato de adenosina.

AGE productos de glicación avanzada

AQP1 Aquaporina 1

ATP trifosfato de adenosina.

ARVO Siglas provenientes del inglés Association for Research in Vision and Ophthalmology.

bFGF Factor de crecimiento de fibroblastos básico

BK Canal de potasio activado por calcio de conductancia alta. (Siglas provenientes del inglés- *Big Channel*).

CaCC Canal de cloro activado por calcio

CaM Calmodulina

cAMP AMP cíclico

Cav Canales de calcio activados por voltaje.

CCT Espesor central de la córnea.

CEC Células del endotelio corneal.

CFTR Regulador de conductancia transmembrana asociado a fibrosis quística

DEC Densidad del endotelio corneal.

DEG Genes expresados diferencialmente

DM Diabetes mellitus.

DMEM Medio de Eagle Dulbecco modificado

DMT1 Diabetes mellitus tipo 1

DMT2 Diabetes mellitus tipo 2

DPP4 Dipeptidil peptidasa 4

1-EBIO (1-etilbenzimidazolinona)

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

ENaC Canales epiteliales de sodio

eNOS Oxido nítrico sintasa

ET-1 endotelina 1

FBS Suero fetal bovino

FECD Distrofia endotelial de Fuchs

GAGs Glucosaminoglicanos

GGT γ -glutamil transpeptidasa

GLUT Transportadores de glucosa

GLP-1 péptidos similares al glucagón tipo 1

GLS1 Glutaminasa tipo 1

GLS2 Glutaminasa tipo 2

HAc Humor acuoso.

HCEC Células del endotelio de la córnea humano

IDF International Diabetes Federation

K2P canales de potasio con dos poros

KCa canales de potasio activados por calcio.

KCa3.1 Canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia.

Kir canales de potasio rectificadores internos

KCNN1 Canal de potasio activado por calcio de conductancia baja tipo 1.

KCNN2 Canal de potasio activado por calcio de conductancia baja tipo 2.

KCNN3 Canal de potasio activado por calcio de conductancia baja tipo 3.

KCNN4 Gen que codifica el canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia.

KCNT1 Canal de potasio activado por sodio tipo 1.

KCNT2 Canal de potasio activado por sodio tipo 2.

Kv canales de potasio activados por voltaje.

LLCR proteínas con una repetición rica en leucina

MCT Ácidos monocarboxílicos

MDS Análisis multidimensional

NKCC1 co-transportador basolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$

OMS Organización Mundial de la Salud (siglas en inglés WHO)

P2X Receptores purinérgicos

PIO Presión intraocular.

PKC Protein-quinasa C.

PPCD Distrofia corneal polimórfica posterior

RD Retinopatía diabética

ROCK Rho-quinasa

ROS radicales libres de oxígeno

RPKM Lecturas por kilobase por millón (siglas provenientes del inglés Reads Per Kilobase of transcript and Million mapped reads)

SGLT2 Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2

SLC4A2 intercambiador de aniones $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (también denominado AE2)

SLC4A4 cotransportador electrogénico $1\text{Na}^+:2\text{HCO}_3^-$ (también denominado NBCe1)

SLC4A11 Proteína similar a los transportadores de bicarbonato tipo 11

SLC9A6 intercambiador de Na^+/H^+ (también denominado NHE1)

SOC canales operados por almacenamiento

TEA Tetra-etil-amonio

TTX Tetrodotoxina.

TGF- β Factor de crecimiento transformante β

TRAM-34 (1-[(2-Clorofenil)difenilmetil]-1H-pirazol)

TRP Receptores de potencial transitorio

UPR Unfolded Protein Response

ZO-1 Zonula Occludens tipo 1

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
Tabla 1.1	Estudios incluidos en la meta-regresión para el análisis de pacientes con DMT1 versus controles.	52
Tabla 1.2	Estudios incluidos en la meta-regresión para pacientes con DMT2.	53
Tabla 1.3	Resultados de la meta-regresión para la DEC utilizando el estado de DMT1 y la edad promedio como moderadores.	55
Tabla 1.4	Resultados de la meta-regresión para la paquimetría utilizando el estado de DMT1 y la edad promedio como moderadores.	56
Tabla 1.5	Resultados de la meta-regresión para la DEC utilizando el estado de DMT2 y la edad promedio como moderadores.	58
Tabla 1.6	Resultados de la meta-regresión para la paquimetría utilizando el estado de DMT2 y la edad promedio como moderadores.	59
Tabla 2.7	Suplemento en el medio de insulina transferrina y selenio de acuerdo con la concentración de ITS utilizada en los experimentos.	68
Tabla 3.1	Clasificación general por conductancia de los canales de potasio activados por calcio.	77
Tabla 3.2	Secuencias de iniciadores directo e inverso y tamaños de productos de PCR esperados para los genes analizados por RT-PCR convencional.	82
Tabla 3.3	Descripción de las bases de datos incluidas en el análisis de la expresión de genes del endotelio corneal humano.	84
Tabla 3.4	Genes expresados en cada estudio y DEG identificados.	89
Tabla 3.5	Identificación de DEG	90
Tabla 3.6	Procesos biológicos sobrerrepresentados en los que intervienen los canales SK e IK.	91
Tabla 3.7	Células en las que se han encontrado SK1-3, IK y SLICK así como y el rol fisiológico descrito en cada una de ellas.	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Figura i.i	Estructura general del ojo humano.	21
Figura i.ii	Representación gráfica de las cinco capas de la córnea.	22
Figura 1.1	Gráfico de dispersión de la meta-regresión que representa la densidad del endotelio corneal (células/mm ²) versus la edad (años) en los pacientes con DMT1 de cada estudio y sus controles.	56
Figura 1.2	Gráfico de dispersión de la meta-regresión que representa la paquimetría (μm) versus la edad (años) entre los pacientes con DMT1 de cada estudio y sus controles.	57
Figura 1.3	Diagrama de bosque de la densidad del endotelio corneal (células/mm ²) en los pacientes con DMT2 de cada estudio y sus controles.	59
Figura 1.4	Diagrama de bosque de la paquimetría (μm) en los pacientes con DMT2 de cada estudio y sus controles.	60
Figura 2.1	Ensayo MTT en condiciones basales y con alta glucosa.	70
Figura 2.2	Ensayo de migración (<i>scratch assay</i>) para células en medio normal y con altas concentraciones de glucosa.	71
Figura 2.3	Detección de apoptosis en células de endotelio humano expuestas a concentraciones elevadas de glucosa.	73
Figura 3.1	Flujograma para la selección de las bases de datos con genes expresados en el endotelio corneal humano.	79
Figura 3.2	Análisis MDS para los datos de los estudios A, GSE41616; B, GSE90489; y C, GSE101872.	84
Figura 3.3	Mapa de calor de dos vías para los genes de los canales de interés.	85
Figura 3.4	Expresión de los genes de canales de baja conductancia y canales SLICK en células de una línea de endotelio corneal humano.	87
Figura 3.5	Expresión de los genes de los canales de baja conductancia y canales SLICK en células de endotelio corneal humano <i>ex vivo</i> .	88
Figura 3.6	Expresión de proteínas de los genes de los canales de conductancia pequeños en las células endoteliales de la córnea humana. Resultados del Western blot.	88

Figura 3.7	(A) Inmunofluorescencia del canal SLICK en un cultivo primario de células endoteliales de la córnea. (B) Inmunofluorescencia de canales SK2 en células de la línea de endotelio corneal humano (C) Inmunofluorescencia de canales SK3 en células de la línea celular.	89
Figura 3.8	Análisis de la vía de KEGG hsa04974: digestión y absorción de proteínas sobre representada en todas las bases de datos.	92
Figura 3.9	Análisis de la vía de KEGG hsa04970: secreción salival sobre representada en las muestras de pacientes respecto a los controles.	93
Figura 3.10	Análisis de interacción proteína-proteína (STRING).	94
Figura 4.1	Efecto de la sobre-activación de KCa3.1 con 1-EBIO sobre la proliferación.	106
Figura 4.2	Efecto de la estimulación de KCa3.1 en condiciones de alta glucosa (55mM).	107
Figura 4.3	Efecto de la inhibición funcional de KCa3.1 con TRAM-34 sobre la proliferación.	108
Figura 4.4	Efecto de la inhibición de KCa3.1 en condiciones de alta glucosa (55mM).	109
Figura 4.5	Cambios morfológicos de las células tras la exposición al medio con 1-EBIO.	111
Figura 4.6	Experimento de migración en cultivos con 1-EBIO 200 μ M.	112
Figura 4.7	Ensayo de migración para células en medio basal suplementado con 1-EBIO 100 μ M.	113
Figura 4.8	Ensayo de migración (<i>scratch assay</i>) para células con altas concentraciones de glucosa y 1-EBIO 100 μ M.	114
Figura 4.9	Ensayo de migración para células en medio basal suplementado con - 2 μ M, 4 μ M y 8 μ M de TRAM-34.	115
Figura 4.10	Imágenes representativas de la migración de las células expuestas a altas concentraciones de glucosa y TRAM-34 2 y 4 μ M.	117
Figura 4.11	Detección de apoptosis en células de endotelio humano expuestas a concentraciones de 1-EBIO 100 μ M o TRAM-34 4 μ M.	119

RESUMEN

La córnea es el lente que protege la superficie anterior del ojo y su transparencia es clave para permitir la visión. Esta característica en gran medida está determinada por la actividad de las células de su capa más profunda, el endotelio corneal. Una monocapa de células hexagonales cuyas características morfo-fisiológicas le permiten no solo compensar la tendencia a la sobrehidratación natural que tienen capas más superficiales de la córnea, especialmente el estroma, sino ser un punto clave para el ingreso y la distribución de nutrientes a nivel corneal.

Dado que tras el nacimiento el potencial proliferativo de las células endoteliales de la córnea humana es extremadamente limitado, la densidad celular se reduce progresivamente durante la vida, y para restaurar el tejido, las células adyacentes deben migrar y cubrir el área que se ha dañado. Las patologías que afecten, directa o indirectamente, al endotelio corneal aceleran la pérdida celular y generan una disfunción que, en última instancia, conlleva a la pérdida de la transparencia corneal haciendo casi imposible la visión, y en la actualidad el único tratamiento disponible es el trasplante.

En las últimas décadas, la diabetes mellitus (DM) se ha identificado como una de las enfermedades sistémicas que afectan el endotelio corneal. En estos pacientes se ha descrito un aumento de la paquimetría, una reducción del recuento de células endoteliales respecto a personas sanas de la misma edad y sexo, e incluso diferencias entre pacientes diabéticos de acuerdo con el tiempo de evolución de la enfermedad, además, tras procedimientos quirúrgicos, la alteración de la función de esta barrera ocular y el edema del estroma suelen ser persistentes. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos por los que la DM afecta el endotelio de la córnea están pobremente descritos.

La DM corresponde a un grupo de trastornos metabólicos cuya condición *sine qua non* es la hiperglicemia. Si bien no es la única causa de hiperglicemia en el ser humano, sí es la que se relaciona con un aumento persistente de la concentración de glucosa en la sangre y otros líquidos extracelulares. Esta situación lleva a complicaciones que afectan preferencialmente células que, como el endotelio corneal, internalizan la glucosa por medio de transportadores de glucosa tipo 1 (GLUT1), es decir por transportadores independientes de los niveles de insulina en sangre, así como ocurre en los eritrocitos, los astrocitos, las neuronas y las células renales, células con las que los tejidos oculares muestran cierta homología desde su origen embrionario (el endotelio deriva de la cresta neural), hasta la fisiopatología, puesto que clínicamente existe concordancia entre el compromiso renal y el ocular.

La exposición persistente de las células de todos los tejidos a niveles elevados de glucosa induce lesiones que, en general, están relacionadas con un desbalance en el que la glucosa, y otros metabolitos, se convierten en sustrato de vías metabólicas que usualmente no los utilizan y favorecen el desarrollo de alteraciones morfológicas y funcionales, que una vez se desarrollan son prácticamente irreversibles. Sin embargo, aunque para los tejidos nervioso, cardiovascular y renal la lesión mediada por un microambiente diabético está bien caracterizada, no sucede lo mismo para la córnea y menos aún para el endotelio corneal. Los estudios en diversas poblaciones que han

intentado evaluar el impacto de la enfermedad sobre el endotelio, aunque son consistentes en cuanto a los cambios morfológicos, reportan resultados discordantes en cuanto al recuento endotelial y la paquimetría.

Por lo anterior, se consideró relevante evaluar el impacto de la diabetes sobre el endotelio mediante modelos estadísticos que permitieran discriminar los cambios asociados a la edad descritos para estas células; en particular, para este análisis era importante identificar el efecto de la enfermedad sobre la densidad celular del endotelio y su capacidad para mantener la deshidratación relativa del estroma y controlar el espesor corneal. Así que se construyó un modelo estadístico con base en una meta-regresión que incluía los tipos de diabetes y la edad como moduladores, para evaluar el impacto real de cada tipo de DM (DM tipo 1 y DM tipo 2) sobre la densidad del endotelio corneal y el espesor de la córnea, determinado por la paquimetría. Este análisis evidenció que el recuento celular se reducía significativamente por la enfermedad, predominantemente en pacientes con DM tipo 1 en quienes el compromiso era independiente de la duración de la enfermedad, y que el aumento del espesor corneal en los pacientes diabéticos era superior al esperado por edad para ambos grupos, independientemente del tipo de diabetes. Estos resultados, que evidenciaban clínicamente el impacto de la hiperglicemia sobre el endotelio, sustentaron la necesidad de evaluar *in vitro* el efecto que tienen las concentraciones elevadas de glucosa sobre estas células. Particularmente sobre su capacidad de proliferación, su capacidad de migrar para cubrir un defecto y en la inducción de apoptosis, principal tipo de muerte celular identificado hasta el momento en estas células, y el cual ha sido descrito dentro de las respuestas de las células endoteliales frente al estrés oxidativo condición clave dentro de la fisiopatología diabética.

Para evaluar los cambios en la capacidad de proliferación de las células del endotelio, se utilizaron cultivos celulares de una línea inmortalizada, las cuales se expusieron al medio definido para ellas como basal y a medios con altas concentraciones de glucosa (55mM). y se hizo seguimiento de la tasa de cambio en la densidad celular mediante ensayos de reducción de MTT [bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio]. En estos experimentos, las células con metabolismo activo convierten el MTT en un producto de color púrpura que una vez solubilizado permite evaluar mediante colorimetría los cambios en la cantidad de células viables. Las pruebas realizadas permitieron evidenciar un aumento en la cantidad de células de los cultivos expuestos a altas concentraciones de glucosa (55mM), mostrando una diferencia significativa tras 24 horas; sin embargo, aunque la diferencia permanecía siendo significativa tras 48 horas, a partir de ese momento el recuento celular medido indirectamente por el método colorimétrico mostraba una reducción progresiva que igualaba la cantidad de células viables a los 5 días para las dos condiciones.

La influencia de las distintas concentraciones de glucosa en la capacidad del endotelio para cerrar un defecto de continuidad en la monocapa, se realizó utilizando el método descrito por Liang y colaboradores en 2007 (Liang et al., 2007), en el que se crea un rasguño ("*scratch*") en una monocapa celular, y se hace seguimiento imagenológico mediante fotografías tomadas desde el momento en que se genera la lesión y a intervalos regulares, hasta que la "herida" cierra. Esto permite comparar el tiempo que le toma a las células del endotelio cerrar el espacio de la lesión bajo diferentes condiciones y cuantificar la tasa de migración de las células. En estos experimentos,

se evidenció un retraso significativo de las células expuestas a elevadas concentraciones de glucosa para cerrar el defecto en comparación con células en medios basales. Mientras estas últimas tomaban aproximadamente 5-6 días para cerrar el defecto, para ese momento las células expuestas a niveles elevados de glucosa habían cerrado, en promedio, 50% de la distancia.

Por último, la evaluación de apoptosis se realizó mediante un kit comercial (*Cell Death Detection* ELISA PLUS (Roche)) que utiliza la técnica de ELISA (inmunoensayo enzimático) tipo sándwich con anticuerpos monoclonales para histonas con el fin de determinar mono y oligonucleosomas en la fracción citoplasmática de los lisados celulares de cada condición. Estos experimentos evidenciaron que la exposición a elevadas concentraciones de glucosa por 24 horas inducía apoptosis tres veces superior a la que se presentaba en las células en condiciones basales.

En la fisiopatología de los procesos deletéreos asociados a la diabetes recientemente se ha identificado la importancia de los procesos electrofisiológicos. En células renales y de la microglía se ha demostrado que los canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia (KCa3.1) parecen tener un papel relevante. Sin embargo, la familia de canales de potasio activados por calcio (KCa) no había sido descrita previamente en el endotelio corneal por lo que fue necesario inicialmente identificar cuales canales de esta familia se expresaban en estas células. Se partió de un análisis bioinformático que permitiera la identificación *in silico* de estos canales tras lo cual, se comprobó *in vitro* mediante PCR y en algunos casos Western blot e inmunomarcación la presencia de los canales de potasio activado por calcio de baja conductancia KCa2.2 y KCa2.3, el de conductancia intermedia KCa3.1 y el canal de potasio activado por sodio KNa2.1 (Slick) en las células del endotelio corneal. En el transcurso del desarrollo del presente trabajo, Anumanthan y colaboradores (2018) publicaron un artículo que evaluaba la actividad de KCa3.1 en el estroma de la córnea que incluyó microfotografías que permitían ver marcado el endotelio, lo que reforzó los resultados obtenidos. Se procedió a estudiar que funciones cumplía KCa3.1 en el endotelio en condiciones basales y si estas se modificaban ante la exposición de las células a concentraciones elevadas de glucosa. Estos experimentos que incluyeron la estimulación e inhibición química del canal permitieron identificar la participación de canales KCa3.1 en los procesos de migración, proliferación y apoptosis.

KCa3.1, el canal de conductancia intermedia de la familia de canales de potasio activados por calcio, puede ser activado por 1-1-Etil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-ona (benzimidazolona) (EBIO-1) y puede ser inhibido selectivamente por 1-[(2-Clorofenil) difenilmetil]-1H-pirazol (TRAM-34). Estos compuestos se utilizaron para probar el efecto de la estimulación e inhibición del canal en la proliferación, migración y apoptosis de las células del endotelio corneal expuesto tanto a condiciones basales como a condiciones hiperglúcidas. La estimulación del canal con EBIO-1 mostró un efecto inhibitorio significativo sobre la proliferación de las células del endotelio cuando se utiliza a concentraciones de 50, 100 y 200 μ M, suficiente para contrarrestar el efecto proliferativo identificado en condiciones de alta glucosa durante los primeros días. La inhibición del canal con TRAM-34 a concentraciones de 2, 4 y 8 μ M evidenció un efecto contrario, aumentó la proliferación de las células en condiciones basales, especialmente a las concentraciones más altas, y potenció el efecto proliferativo identificado en condiciones de alta glucosa, manteniendo una cantidad mayor

de células viables por un tiempo más prolongado. En cuanto a la migración, la estimulación con EBIO-1 redujo la tasa de migración aproximadamente un 50% en condiciones basales y potenció el efecto visto en las condiciones hiperglúcidas. Por el contrario, la inhibición de KCa3.1 con TRAM-34 a 2 μ M, aceleró la migración e incluso acercó la tasa de migración de las células en condiciones de alta glucosa a las de las células basales, los efectos son menores a concentraciones mayores. Finalmente, en condiciones basales ninguna de las concentraciones descritas para EBIO-1 y para TRAM-34 aumentaron la tasa de apoptosis; sin embargo, asociadas a medios con elevadas concentraciones de glucosa, EBIO-1 a concentraciones de 100 μ M y TRAM_34 a 4 μ M sí lo hicieron.

En conclusión, este trabajo permitió identificar el compromiso de la diabetes mellitus sobre el endotelio corneal mediante la determinación de su rol en la reducción de la densidad de esta monocapa más allá de la esperada fisiológicamente por la edad, y su impacto en el aumento de la paquimetría, además de identificar un compromiso más severo de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 respecto a los que cursan con el tipo 2. Adicionalmente, se describió por primera vez la presencia de canales de potasio activados por calcio de conductancia baja, además de confirmar la expresión del canal de conductancia intermedia, y se identificaron en el endotelio corneal los canales de potasio activados por sodio de alta conductancia tipo 2. Por último, se exploró la participación de KCa 3.1 en la proliferación, migración y apoptosis de estas células y se describió su papel como moduladores de estos procesos tanto en condiciones basales como en condiciones de alta glucosa lo cual es relevante tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas, no solo en el escenario de la diabetes sino probablemente en las respuestas ante otros eventos.

ABSTRACT

The cornea is the lens that protects the anterior surface of the eye and its transparent nature is a crucial part of the functioning of the eye. This characteristic is mainly determined by the activity of the cells of its deepest layer, the corneal endothelium. This is a monolayer of hexagonal cells whose morpho-physiological characteristics allow it not only to compensate the natural hyperhydration of the superficial layers of the cornea, especially the stroma, but also mean it can be a key point for the entry and distribution of nutrients in the cornea.

Since the proliferative potential of human corneal endothelial cells after birth is extremely limited, cell density progressively reduces during life, and to restore the tissue, adjacent cells must spread out and cover the area that has been damaged. Pathologies that directly or indirectly affect the corneal endothelium accelerate cell loss and generate dysfunction that ultimately leads to loss of corneal transparency, severely hampering vision, and the only treatment currently available is a transplant.

In recent decades, diabetes mellitus (DM) has been identified as one of the systemic diseases that affect the corneal endothelium. In these patients, the literature has described increases in pachymetry, reductions in the endothelial cell count with respect to healthy people of the same age and sex, and even differences between diabetic patients depending on the time of disease progression. Furthermore, the alteration of the function of this ocular barrier and the stromal edema often persists even after surgical procedures. However, the pathophysiological mechanisms by which DM affects the corneal endothelium are poorly described.

DM is one of a group of metabolic disorders whose *sine qua non* is hyperglycaemia. Although it is not the only cause of hyperglycaemia in humans, it is the one that is related to a persistent increase in glucose levels in the blood and other extracellular liquids. This leads to complications that disproportionately affect cells that, like the corneal endothelium, absorb glucose through glucose transporter 1 (GLUT1), that is to say through transporters that are independent of blood insulin levels, as occurs in erythrocytes, astrocytes, neurons and renal cells, cells which show certain similarity to eye tissue in terms not only of their embryonic origin (the endothelium derives from the neural crest), but also in their physiopathology, since there are clinical similarities between renal and ocular involvement

Persistent exposure of cells in all tissues to high levels of glucose induces lesions that, in general, are related to an imbalance in which glucose and other metabolites become substrates for metabolic pathways that usually do not use them, favoring the development of morphological and functional alterations that, once they have occurred, are practically irreversible. However, although lesions related to diabetic microenvironments are well characterized for nervous, cardiovascular and renal tissues, the same is not true for the cornea and even less so for the corneal endothelium. Studies in various populations that have attempted to evaluate the impact of the disease on the endothelium, while consistent in terms of morphological changes, give discordant results in terms of endothelial count and pachymetry.

Therefore, we considered it important to evaluate the impact of diabetes on the endothelium by means of statistical models that make it possible to discriminate the age-associated changes described for these cells; in particular, for this analysis it was important to identify the effect of the disease on endothelial cell density and its ability to maintain relative stromal dehydration and control corneal thickness. So, a statistical model was constructed, based on a meta-regression that included type of diabetes and age as modulators, to evaluate the real impact of each type of DM (type 1 DM and type 2 DM) on corneal endothelial density and corneal thickness, as determined by pachymetry. This analysis showed that the cell count was significantly reduced by the disease, especially in patients with type 1 DM in whom the compromise was independent of the duration of the disease, and that the increase in corneal thickness in diabetic patients was greater than expected by age, regardless of the type of diabetes. These results, which clinically demonstrated the impact of hyperglycemia on the endothelium, supported the need to evaluate *in vitro* the effect of high glucose concentrations on these cells, particularly on their proliferation capacity, their ability to migrate to cover a defect and in the induction of apoptosis, the main type of cell death identified so far in these cells, which has been described within the responses of endothelial cells to oxidative stress, a key condition in diabetes pathophysiology.

To evaluate changes in the proliferation capacity of endothelial cells, cell cultures from an immortalized line were exposed to a medium defined for them as basal and to a medium with a high concentration of glucose (55mM). The rate of change in cell density was monitored by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assays. In these experiments, cells with active metabolisms convert MTT into a purple-colored product which, once solubilized, enables any change in the number of viable cells to be evaluated by colorimetry. The tests performed showed an increase in the number of cells in the cultures exposed to high concentrations of glucose (55mM), with a significant difference after 24 hours; however, although the difference remained after 48 hours, after that time the cell count measured indirectly by the colorimetric method progressively reduced until, after 5 days, it equaled the number of viable cells of the other group.

The influence of different glucose concentrations on the capacity of the endothelium to close a scratch in the monolayer was performed using the method described by Liang et al. in 2007 (Liang et al., 2007), in which a scratch is created in a cell monolayer, and photographs are then taken at regular intervals from the moment the lesion is generated until the "wound" closes. This makes it possible to compare the time it takes for the endothelial cells to close the wound under different conditions and to quantify the rate of cell migration. In these experiments, there was a significant delay in closing the defect in cells exposed to high concentrations of glucose compared to cells in basal media. While the latter took approximately 5-6 days to close the scratch, by that time cells exposed to high glucose levels had closed, on average, 50% of the distance.

Finally, the evaluation of apoptosis was performed using a commercial kit (Roche Cell Death Detection ELISA PLUS) that uses the sandwich ELISA (enzyme immunoassay) technique with monoclonal antibodies for histones to determine mono- and oligonucleosomes in the cytoplasmic fraction of the cell lysates in each medium. These experiments demonstrated that exposure to high

concentrations of glucose for 24 hours induced three times more apoptosis than that occurring in cells under basal conditions.

In the pathophysiology of the deleterious processes associated with diabetes, the importance of electrophysiological processes has recently been identified. In renal and microglial cells, it has been shown that calcium-activated potassium channels of intermediate conductance (KCa3.1) seem to play an important role. However, the calcium-activated potassium channel (KCa) family had not previously been described in corneal endothelium and it was necessary to identify which channels of this family were expressed in these cells. We started with a bioinformatic analysis that allowed the *in silico* identification of these channels, after which the presence of the small conductance calcium-activated potassium channels KCa2.2 and KCa2.3, the intermediate conductance one KCa3.1 and the sodium-activated potassium channel KNa2.1 (Slick) in corneal endothelial cells was verified *in vitro* by PCR and in some cases by Western blot and immunolabeling. While the present work was being produced, Anumanthan et al. (2018) published a paper evaluating KCa3.1 activity in the corneal stroma that included microphotographs showing KCa3.1 expression in the endothelium, which backed up the results obtained. We proceeded to study what functions KCa3.1 has in the endothelium under basal conditions and whether these were modified when the cells were exposed to high concentrations of glucose. These experiments, which included chemical stimulation and inhibition of the channel, allowed us to identify the involvement of KCa3.1 channels in the processes of migration, proliferation and apoptosis.

KCa3.1, the intermediate conductance channel of the calcium-activated potassium channel family, can be activated by 1-ethylbenzimidazol-2-one (EBIO-1) and can be selectively inhibited by 1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole (TRAM-34). These compounds were used to test the effect of channel stimulation and inhibition on the proliferation, migration and apoptosis of corneal endothelial cells exposed to both basal and hyperglycemic conditions. Channel stimulation with EBIO-1 had a significant inhibitory effect on endothelial cell proliferation when used at concentrations of 50, 100 and 200 μ M, sufficient to counteract the proliferative effect identified under high glucose conditions during the first few days. Inhibition of the channel with TRAM-34 at concentrations of 2, 4 and 8 μ M had the opposite effect, increasing cell proliferation under basal conditions, especially at the higher concentrations, and enhancing the proliferative effect identified under high glucose conditions, maintaining a higher number of viable cells for a longer time. As for migration, stimulation with EBIO-1 reduced the migration rate by approximately 50% under basal conditions and potentiated the effect seen under hyperglycemic conditions. In contrast, inhibition of KCa3.1 with TRAM-34 at 2 μ M accelerated migration and even brought the migration rate of cells under high glucose conditions closer to those of basal cells, with smaller effects at higher concentrations. Finally, under basal conditions none of the concentrations described for EBIO-1 and for TRAM-34 increased the rate of apoptosis; however, this does happen in media with high glucose concentrations, EBIO-1 at concentrations of 100 μ M and TRAM_34 at 4 μ M.

In conclusion, this work allowed us to identify the involvement of diabetes mellitus in the corneal endothelium by determining its role in the reduction of the density of this monolayer more than that physiologically expected by age, and its impact on the increase in pachymetry, in addition to

identifying a more severe involvement in patients with type 1 diabetes mellitus compared to those with type 2. Additionally, we described for the first time the presence of small conductance calcium-activated potassium channels, the expression of the intermediate conductance channel and the existence of type 2 high conductance sodium-activated potassium channels in the corneal endothelium. Finally, we explored the participation of KCa 3.1 in the proliferation, migration and apoptosis of these cells and described their role as modulators of these processes in both basal and high glucose conditions, which is relevant in both physiological and pathological conditions, not only in relation to diabetes but probably in responses to other events.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica con una prevalencia mundial muy alta. Para el año 2017, 425 millones de personas entre 20 y 79 años, es decir, aproximadamente al 10% de la población adulta, se habían diagnosticado con la enfermedad, y a esta cifra se le suman, 1.106.200 niños y adolescentes con diagnóstico de diabetes tipo 1 (International Diabetes Federation, 2019). La *International Diabetes Federation* (IDF) calcula que en promedio 212 millones de personas aún están sin diagnosticar y, además, si el aumento de personas afectadas por la enfermedad mantiene la tasa de crecimiento de los últimos dos años, para el año 2045, 629 millones de personas, en el rango de 20 a 79 años, tendrán diabetes; y el aumento será particularmente rápido en las regiones en donde la economía está pasando del nivel de ingresos bajos al de ingresos medios (International Diabetes Federation, 2019).

En la actualidad hay 326,5 millones de personas en edad laboral (20 a 64 años) con esta enfermedad, y este número aumentará aproximadamente a 438,2 millones en 2045, lo que implica un impacto social muy elevado y un costo monetario aún mayor, ya que la muerte prematura, la discapacidad y las limitaciones funcionales secundarias a la DM también van asociadas a un impacto económico negativo para los países (International Diabetes Federation, 2019). Aunque la prevalencia de DM tipo 1 y tipo 2 está aumentando en todo el mundo, la prevalencia de la DM tipo 2 está creciendo mucho más rápido, probablemente debido al aumento de la obesidad, la reducción de los niveles de actividad a medida que los países se industrializan y el envejecimiento de la población (Powers, 2015). En Colombia, el escenario epidemiológico se aproxima a lo descrito, ya que la prevalencia de DM corresponde al 8,1% de la población, representada en 2'671.400 adultos afectados por DM y 1.740 niños con DM tipo 1 (International Diabetes Federation, 2019) y de acuerdo con el informe publicado por la OMS en 2016, más del 50% de la población tiene riesgos conexos para desarrollar la enfermedad, como el sobrepeso (56%) y la inactividad física (64%) (*WHO | Diabetes country profiles 2016*, s. f.).

La DM se presenta de varias formas debido a la compleja interacción de factores genéticos y ambientales, pero cuya condición *sine qua non* es la hiperglicemia (Powers, 2015). Se ha clasificado de acuerdo con la etiología definiendo dos categorías generales: La DM tipo 1, que se caracteriza por la deficiencia de insulina completa o casi total, y la DM tipo 2, que incluye un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por grados variables de resistencia a la insulina, disminución de la secreción de insulina y aumento de la producción de glucosa. Tanto la DM de tipo 1, como la de tipo 2, están precedidas por una fase de homeostasis anormal de la glucosa en la que se incluyen la glucosa anormal en ayunas y la intolerancia a la glucosa (Powers, 2015).

La DM es una enfermedad fuertemente asociada a complicaciones de las cuales, las más comunes, corresponden a enfermedades cardiovasculares y oculares, por esto, el aumento desmedido en el número de personas afectadas con DM es grave en términos de salud visual (International Diabetes Federation, 2019). La retinopatía diabética (RD) es la afección más estudiada, y constituye la

principal causa de pérdida de la visión en adultos en edad laboral (de 20 a 65 años); aproximadamente, una de cada tres personas que viven con diabetes tiene algún grado de RD, y una de cada diez desarrollará alguna forma de esta enfermedad que pondrá en riesgo su capacidad visual (Yau et al., 2012).

Aunque la córnea en los diabéticos suele parecer libre de enfermedad, se ha determinado que el 70% de los pacientes tiene algún grado de queratopatía (Vieira-Potter et al., 2016) secundaria a anormalidades bioquímicas y ultra estructurales que suelen ser evidentes solo cuando dan origen a lesiones más grandes como la queratitis puntiforme superficial, las erosiones corneales recurrentes, o una queratitis neurotrófica que puede llevar a la ulceración (Skarbez et al., 2010). Adicionalmente, se ha descrito que el espesor corneal total y el recuento de células endoteliales difiere entre sujetos diabéticos con menos de un año evolución y aquellos con diabetes de larga data (Calvo-Maroto et al., 2015); y que, las personas diabéticas suelen desarrollar edema persistente en el estroma después de procedimientos quirúrgicos intraoculares (Kudva et al., 2020), lo que sugiere una menor capacidad de recuperación funcional que podría ser secundaria a los cambios generados por la enfermedad. A pesar de la evidencia clínica de lesión endotelial en los pacientes diabéticos, los estudios en ciencias básicas relacionados con la fisiopatología de estas alteraciones son escasos. Sin embargo, algunos trabajos han realizado aproximaciones tanto *in vitro* como *in vivo* en aras de identificar las vías de señalización alteradas en la córnea de esos pacientes (Goldstein et al., 2020; Skarbez et al., 2010).

Las células del endotelio corneal tienen transportadores GLUT1 cuya función es independiente de la presencia de insulina lo que permite el flujo a favor de los gradientes de concentración, y por tanto, no facilita que las células puedan prevenir la acumulación intracelular excesiva, lo cual favorece el desacople de los mecanismos productores de ATP, y promueve el estrés oxidativo y el aumento del calcio intracelular (Forbes & Cooper, 2013). La elevación crónica de la glucosa en sangre, es decir la hiperglicemia, es la condición principal en todas las formas de DM y se ha identificado como el inductor primordial de lesión celular, de hecho, la forma más efectiva de reducir el riesgo de complicaciones en la diabetes es lograr el control de los niveles séricos de glucosa el mayor tiempo posible durante el curso de la enfermedad (Powers, 2015).

Cuando aumenta el estrés oxidativo por hiperactividad de la cadena de transporte de electrones o disminución de los antioxidantes, la concentración de todos los intermedios glucolíticos que están corriente arriba de gliceraldehído-3 fosfato aumentan y se metabolizan por vías alternas que se han considerado piezas clave en el proceso de la lesión por hiperglicemia: La ruta del poliol, el aumento de actividad en la vía de hexosamina, la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE) y la activación de las proteínas quinasas C (PKC) (Brownlee, 2005).

En primer lugar, la vía del poliol se ha visto involucrada en complicaciones diabéticas que incluyen retinopatía, nefropatía y neuropatía. Fundamentalmente ocurre porque la aldosa reductasa, que normalmente tiene la función de reducir los aldehídos tóxicos en la célula a alcoholes inactivos, también reduce la glucosa cuando su concentración en la célula se vuelve demasiado alta. En este proceso se produce sorbitol que luego se oxida a fructosa, lo cual puede inducir estrés osmótico

secundario al acumulo de sorbitol o aumentar la glucosilación de proteínas por el acumulo de fructosa. Adicionalmente, en el proceso de reducir la glucosa intracelular a sorbitol, la aldosa reductasa consume el cofactor NADPH el cual, también es esencial para la regeneración de glutati6n reducido, un antioxidante intracelular importante. Todos estos procesos contribuyen a la producci6n de ROS y el estr6s oxidativo intracelular (Brownlee, 2005; Thomas et al., 2015). Los productos de la vía del poliol han sido identificados en células epiteliales y endoteliales de la córnea en modelos animales alimentados con galactosa, y la inhibici6n farmacol6gica de la actividad de la aldosa reductasa en ratas diab6ticas retrasa la perdida de sensibilidad corneal, mejora la cicatrizaci6n epitelial y reduce el nivel de dismorfia endotelial (Hasan, 2010; Kaji, 2005; Matsuda et al., 1987).

En segunda instancia, la vía de las hexosaminas se activa gracias al acúmulo de fructosa-6-fosfato y su posterior metabolismo por acci6n de la enzima GFAT (glutamina: fructosa-6 fosfato aminotransferasa), la cual le transfiere un grupo el grupo amino de la glutamina y la convierte en glucosamina-6 fosfato y posteriormente en uridina difosfato (UDP) N-acetil glucosamina. Este producto terminal tiene alta afinidad por los grupos hidroxilo de la serina y la treonina, entonces, cuando se une a ellos en proteínas que funcionan como factores de transcripci6n, modifica patol6gicamente la expresi6n g6nica (Brownlee, 2005). La activaci6n de esta vía en particular no ha sido reportada en las corneas diab6ticas, ni en los estudios *in vitro*; sin embargo, dado el uso relevante de la glucosamina para el metabolismo del endotelio y el elevado contenido de glucosaminoglicanos a nivel corneal, así como la evidencia de la activaci6n de TGF- β en la fisiología y la patología de la córnea (Tandon et al., 2010), eventualmente podría ser un mecanismo involucrado en la queratopatía diab6tica.

En tercer lugar, al aumentar el gliceraldehido 3-fosfato, se incrementa la síntesis de diacilglicerol, un cofactor de activaci6n crítico para las isoformas clásicas de la proteína-quinasa-C (PKC). Cuando la PKC se activa por la hiperglucemia intracelular, tiene una variedad de efectos sobre la expresi6n g6nica, generando disfunci6n vascular gracias a la reducci6n del efecto vasodilatador medido por la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) y el efecto vasoconstrictor de un aumento de la endotelina-1. Además, es otro mecanismo involucrado con el aumento del TGF- β y el aumento de la síntesis y depósito de colágeno y fibronectina mediados por él. Activa el NF- κ B y sus reacciones proinflamatorias a la vez que, por aumento directo de las enzimas NADPH oxidasas favorece el estr6s oxidativo (Brownlee, 2005). Si bien no todas las vías de activaci6n específicas de la PKC han sido estudiadas, existen publicaciones que evidencian un aumento de la NF- κ B; sin embargo, la activaci6n de este mecanismo ha sido asociada preferencialmente a un efecto secundario del aumento de productos de glicaci6n avanzada (AGEs) (Kim et al., 2011).

Los AGEs parecen dañar las células por tres mecanismos. El primero, es la modificaci6n de proteínas intracelulares particularmente aquellas involucradas en la regulaci6n de la transcripci6n g6nica; el segundo, es la modificaci6n de las proteínas que constituyen la matriz extracelular, lo que cambia la señalización entre la matriz y la célula y favorece la disfunci6n celular, y el tercero, es la activaci6n de respuestas inflamatorias por proteínas modificadas que interactúan con receptores de AGE o la disfunci6n de proteínas circulantes en la sangre, como la albúmina (Brownlee, 2005). En los ojos de

animales diabéticos se ha detectado un aumento de los niveles de AGE y la acumulación de ellos en la membrana basal del epitelio de la córnea hace que se activen vías pro-apoptóticas y antiproliferativas, aumenta el estrés oxidativo y la inflamación (Kim et al., 2011). Adicionalmente, la inflamación puede favorecer la activación de las células de Langerhans y las células dendríticas, las principales células presentadoras de antígenos en la superficie ocular, agregadas alrededor de las fibras nerviosas de la córnea lo que favorece un compromiso neuropático que compromete la sensibilidad de la superficie corneal (Kim et al., 2011; Shih et al., 2017).

La DM se ha descrito asociada a mayor espesor de la córnea y se ha especulado que la acumulación de AGE en el estroma de la córnea de los diabéticos, junto con la glicación no enzimática de las moléculas de colágeno y los proteoglicanos, puede generar un efecto osmótico con una sobrehidratación secundaria. Esta condición induce cambios de la conformación de la red del estroma podría explicar, al menos parcialmente, el aumento de la rigidez y el engrosamiento. Además, el hecho de que el espesor corneal se eleve en los niños con DM que no tienen otras complicaciones, sugiere que los AGE puede afectar a la córnea antes que a otros órganos así que eventualmente serviría como un indicador temprano de morbilidad (Shih et al., 2017). Los AGEs, además, inducen el factor nuclear κB (NF- κB), un factor de transcripción que participa activamente en la generación de estrés oxidativo, en la producción de citoquinas inflamatorias y en la inducción de vías pro-apoptóticas, por lo tanto, su activación excesiva en córneas diabéticas sugiere que participa en los mecanismos inductores de la lesión de la córnea, probablemente por mecanismos similares a los que se han identificado en la retinopatía diabética (Kim et al., 2011).

En la actualidad se ha identificado la participación de mecanismos iónicos involucrados con la fisiopatología de las lesiones diabéticas. En particular, el canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia KCa3.1 se ha descrito como modulador de múltiples mecanismos de lesión asociado al microambiente diabético (Huang et al., 2014b). Para el caso de la enfermedad renal diabética, las células epiteliales de los túbulos son las células más abundantes en el parénquima renal, y constituyen un epitelio no vascular, con baja capacidad de proliferación *in vivo*. Se ha descrito que pueden verse afectadas por el acumulo de AGEs y ROS induciendo cascadas de señalización pro-inflamatorias y profibróticas mediadas por citoquinas y quimiocinas que conducen a daño túbulo-intersticial, inflamación intersticial y eventualmente insuficiencia renal. Estas células, además, pueden experimentar cambios fenotípicos determinados por una transición epitelial-mesenquimatosa que contribuye a la lesión, respuesta que también se ha visto en células endoteliales de la córnea aunque no se han descrito específicamente asociado a diabetes (Huang et al., 2014b).

En los túbulos renales, el canal KCa3.1 se expresa típicamente en la membrana basolateral y facilita la secreción de Cl^- apical por un mecanismo que comparte con las células epiteliales del colon y los bronquios cuyo fin último es el transporte de agua hacia la cara apical. En los pacientes diabéticos y en modelos animales con nefropatía diabética, el canal se ha encontrado sobre-expresado. Sin embargo, este no es el único escenario en el que ha sido descrito, KCa3.1 está involucrado en la apoptosis de los linfocitos al modular la respuesta inducida por aumento del Ca^{2+} intracelular, y se cree que adicionalmente contribuye a la migración, activación y la proliferación de células

inmunológicamente activas, por lo tanto, se ha propuesto como un objetivo para reducir la infiltración de células T y macrófagos en las primeras etapas de rechazo crónico del trasplante renal (Huang et al., 2014b). Adicionalmente, la inhibición de la actividad de KCa3.1 con TRAM-34 en ratas con cetoacidosis diabética disminuyó la activación microglial y redujo la astrogliosis reactiva, lo que sugiere una menor respuesta inflamatoria que mejora la supervivencia neuronal (Glaser et al., 2017).

Varios estudios han evaluado la morfología, el número y la función del endotelio corneal en pacientes diabéticos, con resultados variables. Aun así, algunos autores han sugerido la evaluación del endotelio corneal dentro del protocolo de cuidado de los pacientes diabéticos (Shenoy et al., 2009), en consideración a los cambios morfológicos y la menor densidad celular encontrada en varias publicaciones. Sin embargo, la Federación Internacional de Diabetes (IDF), una de las principales instituciones involucradas con las iniciativas a nivel mundial para avanzar en la prevención, el tratamiento, los servicios y la educación, con el fin de mejorar los resultados para las personas con DM, aun no incluye la queratopatía en el capítulo de “enfermedad del ojo diabético”. Por lo que es importante trabajar en esta área del conocimiento, con el propósito de hacer evidente el estado del endotelio en el paciente diabético con el objetivo de mejorar en las políticas de prevención, realizar diagnósticos más tempranos, efectuar un mejor seguimiento clínico y mejorar la calidad de vida para el paciente, además de reducir los costos secundarios al compromiso de la salud visual.

Todas las estructuras que forman el ojo están diseñadas para cumplir con el propósito de ver, la córnea, es el lente que cubre la superficie anterior y hace parte de los medios ópticos que sirven para enfocar y transmitir la luz hacia los fotorreceptores ubicados en la retina (Figura i.i).

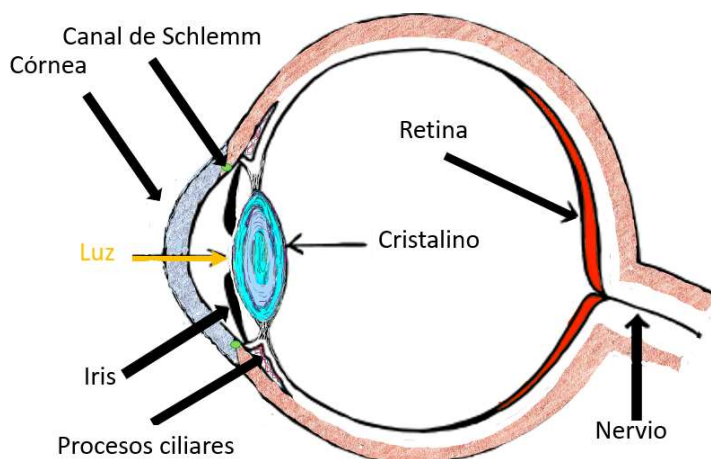


Figura i.i Estructura general del ojo humano.

La córnea es un lente de 540-570 μm de espesor, 11mm de diámetro y un radio de curvatura promedio de 7.8mm (Dawson et al., 2011; Eghrari et al., 2015). En el centro de esta estructura ocurre la interfaz aire-tejido de la luz y es por esto que, en compañía de la película lagrimal, constituye el principal elemento dióptrico del ojo (Mannis & Holland, 2016). Esto implica que la característica primordial en la córnea es que sea transparente, y esta propiedad está determinada particularmente por dos condiciones morfológicas; por un lado, no tiene vasos sanguíneos, y por

otro, su estructura está determinada por una red de proteínas fibrilares ubicadas en su capa media (el estroma) que se acomodan perfectamente para evitar que los rayos de luz se desvíen, adicionalmente, esto mismo favorece que la córnea sea lisa y regular en la superficie. La disposición organizada de estos componentes extracelulares y celulares, depende del estado de hidratación, el metabolismo y la nutrición de los elementos del estroma, condiciones que están directamente relacionadas con la capa más profunda de la córnea denominada endotelio corneal (figura i.ii) (Forrester et al., 2016a; Mannis & Holland, 2016). Mientras la capa más externa, el epitelio, está en contacto con la película lagrimal, el endotelio está en contacto con el humor acuoso (Riordan-Eva, 2017).

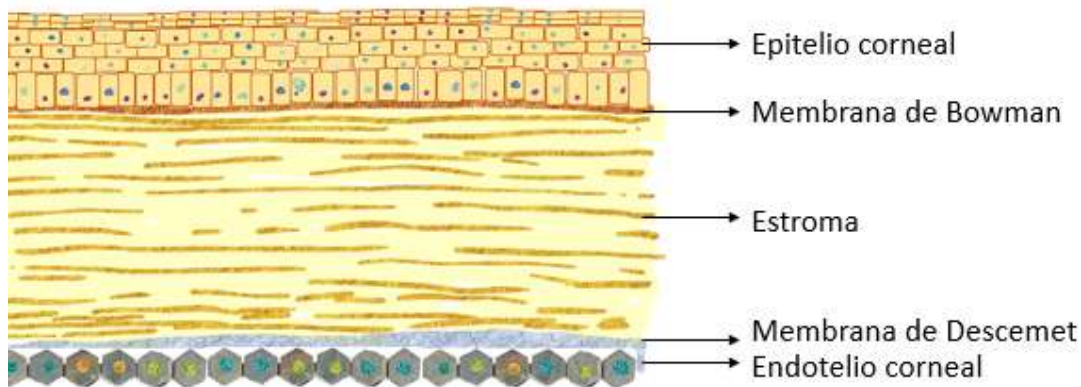


Figura i.ii Representación gráfica de las cinco capas de la córnea. En la parte superior de la figura se encuentra representada la cara anterior.

El **epitelio corneal** es una capa de aproximadamente 50 μm de espesor y está constituido por un epitelio estratificado, escamoso, no queratinizado, continuo con el epitelio de la conjuntiva bulbar. Está formado por cinco o seis capas de células de tres tipos diferentes: células superficiales, células aladas y células columnares (Mannis & Holland, 2016). Todas tienen en promedio una vida media de 7-14 días, ya que regularmente se pierden por apoptosis y descamación, y se recuperan por dos mecanismos: uno vertical, por mitosis de las células basales, y uno horizontal, mediado por células madre del limbo corneal que se modifican (células de amplificación transitoria) y migran hacia el centro de la córnea (Eghrari et al., 2015). Cuando ocurre una lesión en el epitelio, los mecanismos de recuperación celular se amplifican, las células pierden sus uniones adherentes y migran para cubrir el defecto. Una vez que la continuidad se restablece, se sintetizan proteínas de la membrana basal, y se restituyen las uniones intercelulares. Además, habrá una mayor proliferación y migración de las células del limbo (Fernández et al., 2008).

Las células más superficiales constituyen las 2-4 capas más anteriores del epitelio, son células planas que en su cara apical poseen uniones de alta resistencia dadas por una capa de Zonula Occludens tipo 1 (ZO-1), uniones adherentes y desmosomas, cuya continuidad puede ser evaluada clínicamente usando la tinción con fluoresceína y la de la cual depende en parte un factor de protección importante, evitar el ingreso de químicos, polvo y microorganismos al resto de la cavidad, función que está apoyada por glicoproteínas denominadas mucinas (MUC), que estas

células aportan sea asociadas a la membrana o secretadas. En los seres humanos, se ha demostrado MUC1, MUC4 y MUC16, cuya secreción es determinante para mantener la capa mucosa de la película lagrimal (Dawson et al., 2011).

La capa intermedia está constituida por 2-3 capas de células poliédricas y con procesos laterales interdigitados por lo que se les ha denominado, células aladas. Estas células se encuentran en un proceso de diferenciación intermedio entre las células de la capa basal y las de la capa superficial, y están unidas entre sí principalmente por desmosomas y uniones GAP, las cuales son muy importantes en el nivel de permeabilidad del epitelio y en los procesos de diferenciación celular, en los que, la vitamina D y su receptor, han mostrado un nivel de modulación significativo (Lu, 2006).

Las células basales constituyen una monocapa de células columnares unidas entre sí por desmosomas, uniones GAP y ZO. Como estas células son la fuente de reposición celular del epitelio, y además de su membrana basal, por un lado, tienen actividad mitótica, ya que sus células hijas se diferenciarán en células de los estratos intermedio y superficial; y en segunda medida, secretan activamente colágeno IV, laminina, heparán sulfato y fibronectina, y se anclan a la membrana basal, que ellas mismas secretan, por complejos de unión compuestos por integrina $\alpha 6\beta 4$ en el citoplasma, hemi-desmosomas en la membrana y fibrillas de colágeno VII que penetran la córnea hasta alcanzar el estroma en donde se unen con el colágeno I, lo que le permite al epitelio también fijarse a la membrana de Bowman (Dawson et al., 2011; Mannis & Holland, 2016).

Se ha descrito que éstas células de la capa basal también cumplen una función inmunológica importante ya que expresan receptores *toll-like* y tienen la capacidad de secretar citoquinas pro inflamatorias como la IL1B, IL -6, IL-8 y TNF- α que además, participan en la apoptosis y diferenciación de las células (Goel et al., 2010). Como apoyo en la función de defensa, en la capa basal periférica, pero no en la central, existen macrófagos especializados que expresan constitutivamente moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y se han catalogado como células de Langerhans, las cuales responden a la secreción de citoquinas por parte del epitelio y presentan antígenos a los linfocitos T (Liesegang, 2002)

La **membrana de Bowman**, en la que se apoya el epitelio, es una porción acelular de 8 -14 μm de espesor, exclusiva de los primates, está constituida por fibras de colágeno dispuestas al azar en una matriz mucoproteica que contiene condroitina y sulfato de dermatano. La superficie anterior está bien delineada y está separada del epitelio por la delgada lámina basal, mientras que el límite posterior se fusiona con el estroma (Forrester et al., 2016a; Stepp, 2006). Entre sus funciones se encuentra dar soporte y forma a la córnea, absorber radiación UV, modular el efecto de los factores producidos por las células del epitelio sobre la función de los queratocitos, y proteger el plexo nervioso subepitelial que viene del estroma anterior (Remington, 2011).

El **estroma o sustancia propia** tiene un espesor promedio de 500 μm , es decir que constituye aproximadamente el 90% del espesor de la córnea, y es una parte fundamental de su soporte estructural (Forrester et al., 2016a). Se compone de fibrillas de colágeno I (50-55%), III (1-2%), V (10%) y VI (40-30%), que se organizan con un patrón laminar, regular, y paralelo a la superficie; y esta uniformidad, es la que permite que sean ópticamente claras (Forrester et al., 2016b).

El colágeno tipo V se asocia con el colágeno I para formar laminillas que se disponen ortogonalmente, denominadas lamelas, cuyo tamaño y disposición son claves en la transparencia, ya que no dispersan significativamente la luz gracias a que la distancia que las separa produce dispersión en direcciones predecibles y opuestas, que tienden a cancelarse mutuamente, excepto a lo largo del eje visual primario (teoría de Maurice (1957) de la "interferencia destructiva"). Solo cuando la distancia entre las regiones de índice de refracción diferente llega a ser superior a 200 nm se produce la dispersión de la luz (Forrester et al., 2016b).

En esta distancia, además de las dimensiones de las laminillas, influye la matriz en la que se encuentran, la cual está constituida fundamentalmente por glucosaminoglucanos (GAGs) (especialmente queratan sulfato y condroitin sulfato) y proteoglicanos, que forman puentes para mantener una distancia corta entre las fibras de colágeno, y disminuir la refracción de la luz (Forrester et al., 2016a). En términos generales, la organización de las fibras de colágeno dependerá del grado de hidratación de los proteoglicanos ya que son sustancias que por naturaleza atraen agua con una presión neta de imbibición cercana a 60 mmHg; esta presión debe ser contrarrestada para mantener una hidratación igual o menor a 3,5 mg H₂O / mg de tejido seco, ya que este es el punto en que el estroma es más transparente porque se genera un nivel de tensión interfibrilar que se cree, puede ser el mecanismo biofísico por el que las fibrillas se mantienen en su disposición normal (Bonanno, 2003). Pero, sí ocurre disrupción del patrón laminar, por hidratación o por depósito de materiales anormales, esta condición se perderá (Dawson et al., 2011).

Para evitar el depósito de materiales y elementos que interfieran ópticamente, el estroma es alifático y avascular, y mantiene factores anti-angiogénicos como el receptor soluble tipo 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (sVEGFR-1 o sflt-1), que atrapa al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e impide la interacción de este con su receptor. Algunos factores presentes en el estroma, como el factor de crecimiento básico de fibroblastos, las trombospondinas y las metaloproteinasas de membrana tipo 1, pueden cumplir una función angiogénica, y eventualmente inducir neo vascularización, si interactúan con receptores expresados en los angioblastos cercanos al estroma (Forrester et al., 2016a; Goel et al., 2010).

Las células más abundantes en la matriz son los fibroblastos corneales (queratocitos), estos sintetizan los colágenos del estroma y los proteoglicanos, y modulan las enzimas que participan en el ensamblaje de la matriz. Los queratocitos también cumplen una función inmunológica, gracias a la producción de citoquinas (IL-1 e IL-6) y defensinas ante estímulos como el TNF- α (Hejtmancik & Nickerson, 2015). Adicionalmente, en el estroma hay precursores de células dendríticas en la parte central, células dendríticas derivadas de la médula ósea en las porciones periféricas y macrófagos que se encuentran en la parte posterior (Forrester et al., 2016a).

Detrás del estroma se encuentra la **membrana de Descemet**, la cual constituye la lámina basal del endotelio de la córnea y tiene aproximadamente 10-12 μ m de espesor en la edad adulta (Hejtmancik & Nickerson, 2015). Está constituida por glicoproteínas de la membrana basal, laminina y colágeno tipo IV, V y VI, estos dos últimos son los que la mantienen unida a la capa posterior del estroma (Forrester et al., 2016a). La continuidad y el nivel de hidratación de la membrana de Descemet son

importantes para la transparencia de la córnea, por ello debe mantener un estado de deshidratación adecuado, de la misma forma que el estroma (Hejtmancik & Nickerson, 2015)

Finalmente, el **endotelio corneal** está constituido por una monocapa de células polarizadas de 5-6 μm de altura y 18-20 μm de diámetro, que constituyen la barrera entre la cámara anterior y el estroma corneal. Su buen funcionamiento permite conservar la nutrición de las células corneales y el equilibrio hídrico del estroma, para que se mantenga la disposición uniforme y el diámetro de las fibras de colágeno, de tal forma que la córnea pueda transmitir la luz causando una distorsión mínima (Forrester et al., 2016b; Güell, 2015). Dado que estas son las células en las que se fundamenta este estudio se hará una profundización de las características estructurales, fisiológicas y fisiopatológicas de estas.

i.i Características morfológicas

Al nacimiento, la densidad celular del endotelio corneal es cercana a 6.000 células/ mm^2 , pero de forma natural hay una pérdida de 10.92 células/ mm^2 por año, y en consecuencia, en el adulto se alcanza un promedio 2,000 a 3,000 células/ mm^2 (Dawson et al., 2011; Eghrari et al., 2015). Estas células son poligonales, la mayoría (70-80%) hexagonales, ya que este tipo de morfología permite construir una cubierta con patrón de mosaico en la que se garantiza la cobertura con la menor cantidad de espacios entre las células. Es por ello que, tanto la densidad celular como la hexagonalidad, son parámetros morfométricos del estado del endotelio y esta evaluación clínica se puede llevar a cabo *in vivo* con la ayuda del microscopio especular (Remington, 2011).

Para mantener la forma hexagonal y aumentar el tono en la superficie celular que resiste la presión intraocular (PIO), las células del endotelio corneal (CEC) en su porción apical, tienen ligamentos de actina y miosina Ila organizados en bandas periféricas, este soporte es complementado por filamentos intermedios de vimentina que llenan el citoplasma y protegen a la célula de la compresión (Mendez et al., 2014). Cerca del ápice, en la cara sub-apical, también se encuentran uniones GAP asociadas a conexina-43; uniones estrechas, a las cuales se encuentra asociada la proteína ZO-1, que además, es usada universalmente como marcador morfológico de las CEC y la N-cadherina, una proteína transmembrana dependiente del calcio que se ubica en la membrana con tanta frecuencia que su tinción permite delinear las células (Harrison et al., 2016) (He et al., 2016). La cara lateral de las CEC está dotada de interdigitaciones que se hacen cada vez más numerosas y largas en la medida en que se acercan a la base de la célula, esto determina un aumento neto de la superficie lateral de al menos 1.6 veces lo cual es importante para aumentar el área en la que se ubica la bomba Na^+/K^+ ATPasa, cuya participación es más funcional que morfológica. La integrina $\alpha 3\beta 1$ es la única proteína descrita exclusivamente en la superficie basal, en la que da la forma desigual de la membrana de Descemet (He et al., 2016).

La aquaporina 1 (AQP1), es una proteína exclusiva del endotelio a nivel corneal, que participa en la función de deshidratación que este cumple y en la regulación del volumen celular, ya que constituye una ruta importante en el transporte de agua impulsado osmóticamente ante la variación tónica de las soluciones que entran en contacto con el endotelio (Kuang et al., 2004; Verkman, 2002), es decir el humor acuoso (HAc), el cual participa en el intercambio de sustancias con el endotelio, bien sea

para favorecer los mecanismos de deshidratación corneal o para aportar nutrientes para las células corneales en general.

El HAc es un derivado del plasma que se forma a una tasa de 2-3 $\mu\text{L} / \text{min}$ en los procesos ciliares, y circula a través de la pupila hacia el ángulo de la cámara anterior, donde drena a través del canal del Schlemm hacia las venas episclerales (ver Figurai.i). Se estima que la tasa de recambio del humor acuoso es del 1.0% al 1.5% del volumen de la cámara anterior por minuto (Goel et al., 2010). Tiene dos funciones fisiológicas primordiales, la primera, es mantener la PIO (presión intraocular) entre 10-20 mmHg, lo cual representa el equilibrio entre el flujo de entrada y el flujo de salida, y la segunda, es proporcionar una fuente de metabolitos para los tejidos avasculares, lo que es fundamental para el mantenimiento de las necesidades de la córnea (Dawson et al., 2011).

La composición del HAc difiere de la del plasma, ya que además de las sustancias que toma de él durante su proceso de formación en el cuerpo ciliar, el líquido intraocular recibe sustancias secretadas desde el endotelio corneal, el iris y el cristalino (39). En términos generales, el HAc se compone principalmente de agua, electrolitos, carbohidratos, glutatión, urea, aminoácidos y proteínas, oxígeno y dióxido de carbono (36). Pero también contiene esteroides, hormonas sexuales, enzimas como la anhidrasa carbónica y lisozima, factor activador del plasminógeno, factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), transferrina, bajos niveles de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina), prostaglandinas, y GAGs, particularmente, ácido hialurónico, el cual desempeña un papel relevante en la regulación de la PIO (Forrester et al., 2016b).

La mayor diferencia entre la composición del HAc y el plasma, está en las concentraciones de ácido ascórbico (20 a 50 veces mayor), un antioxidante que ayuda en la protección ante el daño inducido por la luz. El lactato también suele tener un exceso en el medio acuoso, probablemente como resultado de la actividad glucolítica de la córnea y otras estructuras oculares; sin embargo, las concentraciones de glucosa, urea y nitrógeno no proteico son ligeramente menores a las del plasma y se regulan acorde a ellas (Gabelt & Paul L. Kaufman, s. f.). El HAc tiene una concentración de proteínas 200 veces menor que la del plasma, de las cuales la mayoría son glicoproteínas del vítreo. En común está la albúmina, aunque en concentraciones mucho menores en el HAc respecto al plasma, e inmunoglobulinas, de las cuales predomina la IgG en comparación con los niveles de IgM e IgA (Forrester et al., 2016b; Goel et al., 2010).

i.ii Fisiología del endotelio corneal

Para que el endotelio corneal funcione adecuadamente, se requiere un número mínimo de 700 a 1000 células/ mm^2 , pero, contrario al epitelio, las células de esta capa tienen una escasa capacidad proliferativa ya que tras el nacimiento permanecen quiescentes en la fase G1 del ciclo celular. Así pues, el reemplazo de células que se dañan o mueren, se hace habitualmente por migración o expansión de las células adyacentes, lo que produce cambios en la morfología corneal que hace que estas células se vuelvan más grandes e irregulares (Joyce, 2003; Ljubimov & Saghizadeh, 2015). De hecho, en corneas normales la densidad paracentral y periférica de la córnea es mayor a la de la porción central y, aunque no se conoce la razón por la cual ocurre este fenómeno en el patrón de

distribución, se cree que puede ser secundario a un efecto de la dinámica de fluidos o a un proceso particular de proliferación no entendido hasta este momento (Eghrari et al., 2015; Wörner et al., 2011).

Aunque la comprensión de las funciones electrofisiológicas y el control metabólico del endotelio de la córnea ha aumentado mucho en la última década, el papel que varios iones podrían desempeñar en el transporte de agua y nutrientes, o en otros procesos fisiológicos, no se han entendido por completo. Se han descrito diferentes mecanismos de transporte pasivo y activo, tanto primario como secundario, para cumplir las dos funciones principales del endotelio: (1) favorecer la absorción de nutrientes y la eliminación de residuos mediante difusión facilitada y transporte activo secundario (por ejemplo, el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1) y los co-transportadores lactato/H⁺ y lactato/Na⁺) y (2), generar la fuerza necesaria para que, a pesar de la presión de imbibición en el estroma, exista un movimiento de agua neto hacia el humor acuoso, por acción de mecanismos de transporte iónicos (Bonanno, 2003).

A excepción del oxígeno, todos los nutrientes para la córnea provienen del HAc y llegan a las células a través del endotelio, la glucosa es uno de ellos, y constituye una fuente energética fundamental para los procesos metabólicos de la córnea. El HAc tiene una concentración de glucosa ligeramente inferior a la del plasma (índice plasma/ humor acuoso en el humano 1.17), y estas células tienen GLUT1, tanto en las membranas apicales como en las basolaterales, que permiten el flujo transcelular de este monosacárido hasta el estroma (Kumagai et al., 1994; Redbrake et al., 1999; Reim et al., 1967). En condiciones normales, el 85% de la glucosa es metabolizada por glucólisis anaeróbica para producir lactato, y el 15% restante se metaboliza por el ciclo del ácido cítrico y otras rutas oxidativas que pueden variar de acuerdo a la disponibilidad de oxígeno (Redbrake et al., 1999). Todas estas vías son necesarias para regenerar ATP y también ADP y AMP, que se requieren para diferentes funciones de la célula, y que, para el caso del endotelio, son claves para el bombeo que favorece la generación de gradientes electroquímicos que permiten mantener la claridad de la córnea (53).

En el espesor de la córnea se mantiene un gradiente de concentración de glucosa que favorece su paso hacia el estroma, ya que se obtiene de la cámara anterior y los queratinocitos la consumen rápidamente, determinando las condiciones que tienden a mantener la difusión. La mayoría de la glucosa que entra a la córnea se convierte en ácido láctico (Nguyen & Bonanno, 2012a; Riley et al., 1997), por cada molécula de glucosa que ingresa se producen 1.70 moléculas de lactato, pero el epitelio es impermeable a este compuesto, lo que facilita que se acumule en el tejido corneal en concentraciones cercanas a 13 mM las cuales prácticamente duplican las del humor acuoso (aproximadamente 7 mM). Esto genera una gran diferencia de concentración de lactato e hidrogeniones entre la córnea y la cámara anterior, que favorece la salida de lactato de las CEC por actividad del co-transportador lactato/H⁺ apical y, en menor medida, por transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT), de los cuales se han encontrado en el endotelio corneal de conejo las isoformas MCT1, MCT2 y MCT4, y las isoformas MCT2 y MCT4 han sido descritas en el endotelio de bovinos, con diferente distribución entre las membranas apical y basolateral (Bonanno, 2012; Nguyen & Bonanno, 2012a).

La generación del gradiente iónico para favorecer el movimiento de líquido a través del endotelio corneal requiere de mucha energía. De hecho, el endotelio consume dos veces más oxígeno que el epitelio corneal por unidad volumen, y la densidad de mitocondrias en el endotelio corneal es superada solo por la de los fotorreceptores (Harvitt & Bonanno, 1998). Recientemente se demostró que la glutaminólisis es una fuente adicional de energía metabólica en el endotelio que le proporciona a la célula incluso más energía que la oxidación de glucosa, ya que una vez se incorpora en forma de α -cetoglutarato al ciclo de Krebs, aumenta la producción de ATP y potencia la función fisiológica de bombeo que cumple el endotelio (W. Zhang et al., 2017). La glutamina es el aminoácido libre más abundante en el plasma y uno de los más concentrados en el HAc (0.6–0.8 mM) (Hu et al., 2012), las CEC la captan mediante co-transportadores y contra-transportadores Na^+ /glutamina para luego metabolizarla con enzimas tales como las glutaminasas tipo 1 y 2 (GLS1 y GLS2) y la γ -glutamil transpeptidasa (GGT)(W. Zhang et al., 2017). El producto final del catabolismo de la glutamina induce la producción de amonio/amoniaco y este último, dada su baja lipofiliidad, es eliminado a través de la proteína similar a los transportadores de bicarbonato tipo 11 (SLC4A11). La acumulación intracelular de amoniaco funciona como un regulador indirecto de la glutaminólisis, al reducir la expresión de enzimas involucradas en la vía, pero su acumulación podría ser tóxica para las células del endotelio (W. Zhang et al., 2015, p. 4).

Como se ha mencionado, la función de bombeo del endotelio es la que permite la deshidratación constante del estroma, ya que este tiende a sobre-hidratarse de manera natural, y esta predisposición aumenta en circunstancias como el cierre ocular durante la noche, el uso de lentes de contacto, o por la exposición a soluciones hipotónicas durante el baño (Bonanno, 2003). Para ejercer esta función, el endotelio es altamente permeable al agua y a solutos hidrofílicos, condición que se da particularmente por la discontinuidad de las uniones intercelulares tipo ZO-1, con cierta participación de AQP1. Pero, además, las células están dotadas de proteínas que funcionan como bombas, como transportadores, o como canales iónicos, cuya actividad genera un potencial electrosmótico que dirige el agua hacia el interior del globo ocular. El estado ideal ocurre cuando la actividad de las bombas endoteliales favorece el movimiento del agua hacia el humor acuoso, con igual magnitud a la tendencia que tiene el agua de moverse hacia el estroma por la atracción de los proteoglicanos; a lo que se ha denominado equilibrio del mecanismo de "Bombeo-Fuga"(Bonanno, 2012).

Existen dos modelos que explican como la actividad electrofisiológica endotelial dirige el agua hacia el humor acuoso. El primero, denominado de secreción aniónica, en el que el cloro y el bicarbonato son protagonistas, y el transporte de estos iones constituye el mecanismo principal de deturgescencia corneal; y el segundo, el modelo de electro-ósmosis, en el que el actor principal es la recirculación de Na^+ inducida por un estímulo eléctrico, y mediada por las bombas Na^+/K^+ -ATPasa baso-laterales y los canales de sodio apicales, que crean un gradiente osmótico de sodio hacia el humor acuoso, con el cual, ocurre un flujo de agua. Sin embargo, existe controversia en el funcionamiento de los gradientes y su influencia en el mecanismo de deshidratación en el que participa el endotelio, por lo que han surgido otras teorías en paralelo como el agonismo hídrico y el transporte facilitado de lactato (Bonanno, 2012).

i.ii.i Modelo de secreción aniónica

Este modelo parte de la premisa de que el movimiento de líquido depende del flujo de iones (cloro y bicarbonato) que se crea por mecanismos de transporte activo y produce gradientes osmóticos locales.

En el endotelio corneal, aunque la permeabilidad de la membrana basolateral al bicarbonato es alta, la de la membrana apical no lo es. La superficie basolateral está dotada de dos transportadores de bicarbonato: El cotransportador electrogénico $1\text{Na}^+:2\text{HCO}_3^-$ (SLC4A4/ NBCe1) y el intercambiador de aniones $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (SLC4A2/AE2); además, tiene un intercambiador de Na^+/H^+ (SLC9A6/NHE1) cuya actividad favorece la eliminación de protones, e indirectamente estimula la formación de H^+ y HCO_3^- a partir de la disociación del ácido carbónico (H_2CO_3) formado a partir de la hidratación de CO_2 , reacción que es catalizada por la anhidrasa carbónica II citoplasmática. La entrada directa de HCO_3^- a través de la actividad de SLC4A4 y la generación de un HCO_3^- a partir de ácido carbónico aumentan la concentración del bicarbonato intracelular, el cual es liberado parcialmente en la cara basolateral de la célula mediante el intercambio por Cl^- a través de SLC4A2 (Bonanno, 2012).

La concentración del Cl^- intracelular también aumenta por la actividad del co-transportador basolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC1), el cual ayuda a aumentar la concentración de cloruro a 40 mM, es decir, por encima del equilibrio electroquímico (12 mM); esto, sumado al potencial de membrana negativo (aproximadamente -55 mV) secundario a la actividad de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ basolateral y la actividad de canales de potasio (Watsky & Rae, 1991), constituye un estímulo eléctrico para el flujo de Cl^- y HCO_3^- hacia el exterior de la célula (Bonanno, 2012). Las proteínas presentes en la cara apical privilegian el transporte de Cl^- respecto al de HCO_3^- ya que allí se encuentran el regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y el canal de cloro activado por calcio (CaCC), y ambos son más permeables al cloro que al bicarbonato en una relación de 4:1. En este escenario, hay una ganancia neta de bicarbonato intracelular que debe convertirse en ácido carbónico (H_2CO_3), y luego en CO_2 y difundir a través de las membranas. El CO_2 que pase por la cara apical, en donde se expresa la enzima anhidrasa carbónica IV, puede convertirse nuevamente en HCO_3^- por la acción catalítica de esta enzima, y es así como el Cl^- que ha salido, puede atraer eléctricamente el Na^+ que sale de la célula por las bombas de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ basolaterales y, de esta forma en conjunto generar un gradiente osmótico para el agua que es entonces atraída hacia la membrana apical (Bonanno, 2012).

Este mecanismo se considera parte de un mecanismo más complejo ya que el bloqueo de algunas de las proteínas involucradas, particularmente el transportador NKCC1, no compromete en forma importante el flujo de agua hacia la cámara anterior (F. P. Diecke et al., 2005; Riley et al., 1997). Incluso se ha sugerido que NKCC1 y CaCC, están relacionados más directamente con las respuestas a cambios del volumen celular y éste último en particular, ha surgido como una vía de interés para comprender las respuestas ante estímulos nocivos del endotelio (Srinivas et al., 1998).

i.ii.ii Modelo de electro-ósmosis

Este modelo surgió en un intento por comprender mejor los vacíos que dejaba el modelo anterior y considera tanto diferencias de carga eléctrica como osmóticas. Adicionalmente, el flujo de agua se realiza de modo transcelular a través de acuaporinas así como de manera paracelular a través de las uniones del endotelio (Fischbarg, 2010).

En este proceso, la elevada concentración de aniones (HCO_3^- y Cl^-) en la cara apical de las CEC genera un potencial negativo (-0.5 mV) en este lado de la célula con respecto a la cara basal, lo que favorece la recirculación del Na^+ , liberado al espacio paracelular por las bombas de Na^+/K^+ ATPasa, a través de canales apicales de Na^+ (ENaC). La movilidad de iones secundaria a los cambios eléctricos genera gradientes osmóticos que impulsan flujos acuosos a través de las uniones intercelulares gracias a su baja resistencia (20-25 Ωcm^2). Este mecanismo es potenciado aproximadamente en un 20% por el flujo de agua a través de las acuaporinas AQP1, en respuesta a fluctuaciones de la presión osmótica (Bonanno, 2012; Fischbarg, 2010).

El movimiento de fluidos a través de la membrana está relacionado con la dirección y la magnitud de las corrientes eléctricas, y con la integridad endotelial, ya que si desaparece el gradiente eléctrico o no hay continuidad del endotelio, el flujo cesa, e incluso puede revertirse si las cargas se invierten (Fischbarg, 2010; Sánchez et al., 2002). Una vez se genera el gradiente eléctrico que permite el acople electro-osmótico, y el flujo paracelular de agua, la recirculación de sodio además permite ajustar la osmolaridad permitiendo que el fluido transportado sea isotónico. Si el acumulo apical de aniones no ocurre, el flujo se reduce aproximadamente un 70%, y el transporte de fluido restante se reducirá a cero solo si adicionalmente se inhiben los canales ENaC (F. P. J. Diecke et al., 2007), lo que demuestra la importancia de estos dos componentes en el modelo de deshidratación de la córnea. Sin embargo, se sabe por experimentos en los que se bloquean simultáneamente los ENaCs y la bomba Na^+/K^+ ATPasa, que esta no es la única vía para el movimiento de Na^+ , ya que la concentración intracelular aumenta a pesar de este doble bloqueo. La entrada de sodio a través de ENaCs constituye aproximadamente el 70% del influjo de este ion, y se cree que el 30% restante entra por co-transportadores que utilizan el gradiente para impulsar otras sustancias, que pueden ser nutrientes o productos metabólicos, pero cabe la posibilidad de un influjo a través de canales de sodio diferentes a los ENaCs (Kuang et al., 2004).

En 1991 se describieron en el endotelio corneal de conejo canales sensibles a la neurotoxina del pez globo japonés, la tetrodotoxina (TTX), que además podían ser bloqueados con quininas, un descubrimiento interesante, ya que por lo general estos canales no se encuentran en células no excitables (Watsky & Rae, 1991). Como estos canales usualmente están inactivos por debajo de -60mV, se planteó la posibilidad de una pequeña ventana en la que al llegar a valores menos negativos, los canales permitan la entrada de sodio e influyan en las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las células, o generen un gradiente transendotelial que favorezca la deshidratación del estroma (Mergler & Pleyer, 2007; Rae & Watsky, 1996), situación que puede corresponder a la descrita en cultivos de endotelio bovino, en las que un canal de Na^+ apical dependiente del voltaje influye sobre la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa y el flujo de Na^+ asociado a ella (Kuang et al., 2004). Sin embargo, no está claro si este canal es el mismo canal de Na^+ sensible a TTX descrito por Watsky et al. en 1991.

En general, se ha sugerido que la regulación de la función endotelial depende de sustancias presentes en el humor acuoso, o que se producen en las células del endotelio en respuesta a cambios morfológicos y fisiológicos. Dentro de los mecanismos que estimulan el flujo a través del endotelio se encuentran aquellos que aumentan el número o la actividad de los canales ENaC, y/o la concentración de AMP cíclico (cAMP) o de ATP, así como algunos eventos metabólicos normales del endotelio.

La quinasa sérica estimulada por glucocorticoides (SGK1) aumenta la densidad de los canales ENaC en la membrana apical, y estimula la actividad de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa basolateral del endotelio corneal de ratones y humanos (Hatou et al., 2009; Rauz et al., 2003). El cAMP, por su parte, además de activar vías antiapoptóticas en células endoteliales de la córnea tratadas con estaurosporina, un fuerte inhibidor de protein-cinasas e inductor de apoptosis, fosforila y estimula la actividad del canal CFTR apical, lo que aumenta el flujo de Cl⁻ y HCO₃⁻ (S. Li et al., 2011; Sun et al., 2003). Los receptores purinérgicos P2X también funcionan como agonistas de la actividad electrosmótica endotelial ya que responden al ATP extracelular abriendo canales iónicos que aumentan el calcio intracelular, y secundariamente incrementan la salida de Cl⁻ a través de CaCC, además el aumento de ATP, puede estimular el flujo por los mecanismos descritos para el cAMP, ya que las células endoteliales pueden descomponerlo, en adenosin-di-fosfato (ADP) y un fosfato de alta energía, por la presencia de ecto-ATPasas. En este grupo de agonistas de la actividad de los mecanismos electrosmóticos también se encuentra la adenosina, la que a través de receptores tipo A2b asociados a proteína Gs aumenta el AMPc e induce la concentración apical de aniones por los mecanismos ya descritos (Bonanno, 2012; Sun et al., 2003).

Los gradientes de concentración de glucosa y lactato también estimulan el flujo a través del endotelio (Chhabra et al., 2009). Cualquier proceso que facilite el flujo de lactato desde la córnea hacia el humor acuoso, ayudará a mantener la deshidratación del estroma y, por el contrario, cualquier interferencia con el flujo de salida de lactato tiende a edematizar la córnea. Dentro de los facilitadores del eflujo de lactato a través del endotelio, se encuentran el HCO₃⁻, la actividad de la anhidrasa carbónica, el SLC4A4 y el NHE1. El tamponamiento del hidrogenión es importante para la deturgescencia de la córnea, y puede mantenerse en ausencia de HCO₃⁻ solo si hay una concentración alta de otros amortiguadores (S. Li et al., 2016), esto facilita el flujo de lactato y, además, está directamente relacionado con la salida de agua, lo que indica que es un componente importante de la función de bomba del endotelio corneal; incluso recientemente se ha sugerido que es el lactato, y no el HCO₃⁻, el principal componente de la bomba aniónica descrita previamente (Nguyen & Bonanno, 2012b).

Además de la importancia de las bombas y canales descritos en el mecanismo electrosmótico que favorece la deshidratación del estroma de la córnea. Los canales son fundamentales para otras funciones del endotelio corneal. La mayoría de ellos pertenecen a la familia de canales activados por voltaje o ligando, o a la familia de receptores de potencial transitorio (TRPs). Los primeros, son proteínas transmembrana permeables a un ion particular (sodio, potasio, cloruro o calcio) que se abren en respuesta a cambios en el voltaje transmembrana o por la unión de una sustancia. Los

segundos, incluyen canales de calcio o canales inespecíficos para cationes, que funcionan como sensores a nivel endotelial (Mergler & Pleyer, 2007).

Los canales para iones de potasio representan la familia más diversa de proteínas de membrana y son unos de los más conservados evolutivamente. Dependiendo del principio de funcionamiento y la estructura primaria, estas proteínas se subdividen en canales con dos poros (K2P), canales activados por Ca^{2+} (KCa), canales rectificadores internos (Kir), y canales activados por voltaje (Kv); y de ellos, se han descrito en las CEC, únicamente canales clasificados dentro de los dos últimos grupos (Grizel et al., 2014; Rae & Watsky, 1996; Yang et al., 2003). Sin embargo, en una tinción realizada en el artículo de Anumanthan y colaboradores con el fin de evaluar las propiedades fibróticas en el estroma mediadas por el canal KCa3.1, es posible observar la marcación del canal también en el endotelio corneal (Anumanthan et al., 2018).

Los canales Kir tienen un rol particular en el mantenimiento de los potenciales de reposo, en la duración del potencial de acción y en el control de la excitabilidad celular (Kew & Davies, 2010). Los Kir2.1, unos de los rectificadores más fuertes, fueron descritos en CEC de bovinos como un componente importante de la conductancia al K^+ en estas células, en las que parece tener una función relevante para el establecimiento del potencial de la membrana, además de ser mediador del volumen celular (Yang et al., 2003). Este mismo grupo de investigadores además demostró que la quinidina, un potente bloqueador de Kir2.1, pero también de los Kv, favorece el edema corneal de forma similar a como lo hace el inhibidor de la ATPasa (ouabaína), lo que sugiere que uno, o quizás ambos tipos de canales de K^+ , desempeñan un papel importante en relación con los procesos de transporte activo que subyacen a la función de bomba en el endotelio corneal (Watsky et al., 1992; Yang et al., 2003). La explicación para este efecto puede ser abordada de dos formas; en primera instancia, en el endotelio corneal, al igual que en otras células, la actividad Na^+/K^+ ATPasa depende críticamente de la presencia de una vía que le permita reciclar K^+ , y es probable que los canales Kir2.1 funcionen en este sentido. La otra explicación se basa en su efecto sobre las fuerzas de conducción electroquímicas que influyen sobre el transporte de Cl^- y HCO_3^- , ya que los canales Kir2.1 contribuyen al potencial de membrana, y su activación en estados de hiperpolarización puede promover la salida de aniones en la membrana apical (Watsky & Rae, 1991; Yang et al., 2003).

En el año de 1996, se encontraron en células del endotelio corneal de conejo, corrientes de K^+ similares a las corrientes A registradas en las células excitables. Eran corrientes de inactivación rápida que se presentan por debajo del umbral de excitación, por lo que se sugirió que hacen parte de los mecanismos que mantienen el estado estable de las CEC entre -50 y -60 mV, y participan en la función de deshidratación corneal (Mergler & Pleyer, 2007; Rae & Watsky, 1996). Estas corrientes, en investigaciones posteriores, se asociaron funcionalmente con canales Kv3.3 encontrados en células endoteliales corneales de conejo; sin embargo, dado que los experimentos se hicieron mediante la expresión del canal en otros tejidos y usando constructos que variaban en la región 5' del primer codón, los patrones de activación e inactivación fueron inconstantes (Rae & Shepard, 2000).

Los canales KCa tienen una estructura general equivalente a la de los canales Kv, ya que están formados por una estructura tetramérica de subunidades α , y cada una de ellas está constituida a su vez por seis segmentos transmembrana (para los canales de conductancia baja (SK) e intermedia (IK)) o 7 en el caso de los KCa de conductancia alta (BK). Estos últimos, además de la subunidad α principal, tienen subunidades reguladoras adicionales β o γ . Hay cuatro subunidades β (codificadas por *KCNMB1-4*) que modulan la cinética de inactivación del canal, así como su rectificación interna, la sensibilidad al Ca^{2+} y la unión a toxinas. La subunidad β_4 , es la que predomina en sistema nervioso central y permite que la activación del canal BK por Ca^{2+} sea más sensible (Ha et al., 2004), en cambio, la presencia de subunidades β_2 y β_3 favorecen la inactivación rápida de las corrientes BK (Guéguinou et al., 2014). Las subunidades γ , consisten en proteínas con una repetición rica en leucina (LRRC) cuya actividad determina cambios sustanciales en la función del canal asociados a cambios en el voltaje (Dong et al., 2016; Guéguinou et al., 2014).

Los canales BK se activan por cambios en el potencial de membrana (despolarización) y por aumentos en la concentración de Ca^{2+} intracelular, mientras que los SK e IK no dependen del voltaje, y responden particularmente a cambios en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular gracias al acople de calmodulina en su extremo C terminal. Los KCa están ampliamente expresados en diversos tejidos, incluidos epitelios, músculo liso, neuronas y endotelio vascular. La activación de SK e IK, particularmente en células no excitables, está asociada al aumento del Ca^{2+} intracelular y participa en restaurar la concentración intracelular de este ion, proteger frente a ambientes ricos en radicales libres y se han vinculado a la regulación de la migración celular (Guéguinou et al., 2014).

Las toxinas son herramientas farmacológicas útiles para discriminar la actividad de los canales de la familia KCa. BK es bloqueado por la iberotoxina pero no por la apamina, que bloquea específicamente los canales de SK (a concentraciones de 60–200 pM). El BK también es bloqueado por Tetra-etil-amonio (TEA) a bajas concentraciones (0.14 mM), y se activa por NS1608 y NS1619 (Wei et al., 2005). Los canales IK, no son sensibles a la apamina ni a la iberotoxina, pero son bloqueados por la caribdotoxina (5 nM) o por un inhibidor selectivo, el TRAM-34 (Wei et al., 2005). También se activan por la concentración de Ca^{2+} intracelular, con participación de la calmodulina (CaM) unida al extremo C-terminal, y se han visto relacionados con el ingreso de calcio direccionado por los niveles de las reservas intracelulares de este ión (Chandy et al., 2004).

El canal IK (KCa3.1, también conocido como SK4, IK, IKCa1) recientemente se encontró expresado en las CEC, pero su función en estas células no se ha descrito. Este canal desempeña un papel importante en la regulación de la hiperpolarización de la membrana y la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en otras células, lo que de forma secundaria modifica la progresión en el ciclo celular y por tanto la proliferación celular y la apoptosis. Además, se ha relacionado con cambios en los patrones de migración de varios tipos celulares, y en particular, se ha visto regulado a la alta simultáneamente con genes pro-fibróticos (Anumanthan et al., 2018; Begenisich et al., 2004; Dong et al., 2016; Wulff et al., 2009). La pérdida de la expresión del gen de KCa3.1 en ratones-knock out o el bloqueo con TRAM-34, disminuye la expresión de genes que codifican para diferentes tipos de colágeno y factor de crecimiento transformante β_1 (TGF β_1) (Anumanthan et al., 2018).

En el epitelio corneal, la hiperpolarización de la membrana por los KCa da como resultado una mayor afluencia de Ca^{2+} (Gees et al., 2010). Las corrientes de calcio, moduladoras de las respuestas mediadas por los KCa, pueden estar asociadas a canales calcio activados por voltaje (Cav) o a canales operados por almacenamiento (SOC), estos últimos están regulados por el contenido de Ca^{2+} en las reservas intracelulares y se activan cuando estas se reducen. Experimentos en corneas usando antagonistas de los Cav tipo L del grupo de las fenilalquilaminas (verapamilo) o de las dihidropiridinas (nifedipino y nisoldipina), o iones divalentes como el cadmio (Cd^{2+}), sugieren que la modulación del Ca^{2+} intracelular tiene efectos marcados en la función del endotelio corneal. A excepción del verapamilo, todas las respuestas inducidas por fármacos son bifásicas, es decir, que además de una respuesta inicial, ocurren cambios secundarios en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . En la actualidad, se considera que las corrientes de calcio que fluyen a través de canales tipo L intervienen en el potencial de reposo de las CEC, participan en el aumento del calcio intracelular que sigue al incremento de los radicales libres de oxígeno (ROS), y contribuyen al papel protector mediado por factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). El EGF, gracias a su secreción autocrina, estimula la migración de las CEC y la reparación de la monocapa, al regular a la alta vías dependientes de protein-quinasa-C (PKC) que favorecen la extensión de filopodios (Meeting, 1997; Mergler et al., 2005). EL FGF, fundamentalmente el bFGF, actúa como un modulador directo del endotelio corneal induciendo su migración proliferación y diferenciación, probablemente, a través del receptor tipo 1 (FGFR1), el cual interactúa con los canales de tipo L (Mergler et al., 2003).

Algunos péptidos, como la endotelina 1(ET-1), también han mostrado respuestas que involucran gradientes de calcio en las CEC. La ET-1, se ha encontrado en el humor acuoso, y favorece el aumento de la concentración de calcio intracelular y fosfoinosítoles, la acumulación intracelular de cGMP y cAMP, la síntesis de fibronectina y la proliferación celular. Se cree que media su efecto a través de su receptor de alta afinidad tipo 1 presente en las CEC y, aunque el mecanismo por el cual la ET-1 induce el aumento del Ca^{2+} en estas células no está completamente descrito, es claro que ocurre de una manera dosis-dependiente, en la que participa un influjo de calcio a través de Cav, probablemente canales tipo L, y la liberación de Ca^{2+} desde las reservas intracelulares (Hong et al., 2003).

Los SOC dado que no dependen del voltaje, pueden funcionar a potenciales de membrana en los que los Cav están inactivos, lo que aumenta sus posibilidades de modulación funcional (Prakriya & Lewis, 2015). Estas características de las corrientes condujeron a la asociación con la superfamilia de canales de cationes receptores de potencial transitorio (TRP), reconocida por su diversidad en los mecanismos de activación y selectividad, su participación en la fisiología sensorial y en la detección, por parte de las células, de los cambios en su entorno local (Venkatachalam & Montell, 2007). A nivel ocular, la modulación de la actividad de los canales TRP se ha relacionado fisiológicamente con la regulación del crecimiento celular, la secreción de proteínas, la diferenciación y la proliferación secundarias a cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular y, patológicamente, con la inducción de muerte celular (Reinach et al., 2015). Específicamente en el endotelio corneal, los cambios en la actividad de los canales TRP afectan su capacidad para

mantener la transparencia corneal (Mergler & Pleyer, 2007) e inducen apoptosis por aumento excesivo del calcio intracelular (Q. J. Li et al., 2001; Mergler et al., 2003). Rae y Watsky describieron en el endotelio corneal una corriente termosensible rectificadora externa junto con una corriente selectiva de K⁺ (Rae & Watsky, 1996), con la caracterización posterior de los canales TRPV1-4 en células endoteliales corneales humanas, se consideró que eventualmente el componente termosensible podía ser atribuible a ellas (Mergler et al., 2010). Los canales TRPV4, además de su capacidad de termo activación, han sido descritos como parte del mecanismo de respuesta ante el edema hipotónico probablemente en asociación con las AQP1 (Mergler, Valtink, et al., 2011). También se ha demostrado experimentalmente, en células de endotelio corneal humano, la expresión funcional del canal TRPM8 activado por mentol o icilina, o por temperaturas por debajo de los 23-28°C, cuya actividad se relaciona con un aumento reversible de los niveles de Ca²⁺ intracelular secundarios a una reducción del potencial de membrana, o a cambios osmolares determinados por el nivel de hidratación de la córnea (Mergler, Garreis, et al., 2011; Mergler, Valtink, et al., 2011; Robbins et al., 2012). Otra característica de los TRP es que son capaces de modular las condiciones que median la entrada de Ca²⁺, especialmente en células no excitables, a través de la despolarización, o la hiperpolarización, secundarias a la activación de otros canales iónicos dependiente de Ca²⁺, como los canales de K⁺, logrando un ajuste muy fino de las concentraciones de calcio intracelular y las respuestas mediadas por este (Gees et al., 2010).

i.iii Fisiopatología de la córnea.

Un amplio espectro de condiciones patológicas puede alterar la estructura de la córnea e interferir con su función normal. El problema radica en la respuesta limitada de esta estructura a la lesión, ya que además de la reducción celular esperada con la edad la densidad celular puede reducirse a tasas más altas en los pacientes que cursan con enfermedades en las que un aumento de la apoptosis de las células del endotelio determina una pérdida adicional de células (Cho et al., 1999; Q. J. Li et al., 2001). Cuando la densidad llega a valores tan bajos como 500 cel/mm², su capacidad de deshidratar el estroma se ve muy comprometida y el agua que se retiene produce el desalineamiento de las fibras, generando una opacidad suficiente para limitar de forma significativa la visión (Murphy et al., 1984).

Las lesiones agudas del endotelio suelen ser causadas por accidentes o durante procedimientos quirúrgicos, y las crónicas, ocurren por distrofias o se asocian a ciertas patologías. En cualquier caso, el endotelio se repara en primera instancia por migración e hipertrofia de las células y, eventualmente, por proliferación celular estimulada por la lesión. Este último mecanismo es más eficiente en niños y en adultos jóvenes, pero su intervención es mínima en el proceso de reparación en personas mayores, puesto que la inhibición del ciclo celular es mayor a medida en que la edad aumenta (Murano et al., 2008). La variación en el tamaño y la forma de las células se considera un reflejo de la severidad de la lesión, ya que, en condiciones normales, el 50-90% de las células endoteliales es hexagonal, pero esta proporción disminuye cuando hay reparación gracias al aumento de tamaño de las células adyacentes para cubrir el defecto (Mannis & Holland, 2016).

Se ha descrito modulación de la migración mediada por dos factores. En primera instancia, para que ocurra la migración de las células del endotelio, es preferible, pero no indispensable, que la membrana de Descemet esté intacta, ya que esto acelera la cobertura del área lesionada. En segundo lugar se ha identificado la participación de la vía RhoA, específicamente de la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK), una serina / treonina quinasa que participa en la regulación de la morfología celular, la motilidad y la polaridad gracias a la reorganización del citoesqueleto de actomiosina, el aumento de las uniones célula-célula, y el aumento de las interacciones de la célula con la matriz extracelular celular, y cuya inhibición, mediada por Y-27632 o por H1152, ha demostrado que podría mejorar la migración endotelial (Cui et al., 2018; Shenoy et al., 2009).

Aunque la reducción del recuento endotelial ocurre de manera “natural”, puede verse acelerada por aumento en la presión intraocular (Gagnon et al., 1997); por aumento de radicales libres secundario a trauma, siendo el más común la cirugía intraocular, particularmente el proceso de facoemulsificación, el impacto directo con lentes intraoculares, las burbujas de aire y las lesiones por calor (Nita & Grzybowski, 2016); por reacciones inflamatorias (Sagoo et al., 2004); por enfermedades sistémicas, entre las que se ha considerado la diabetes mellitus (Calvo-Maroto et al., 2015) y enfermedades respiratorias crónicas (Margo et al., 2017); por distrofias endoteliales, como la distrofia endotelial de Fuchs, la enfermedad genética que causa el tipo más prematuro de lesión y pérdida endotelial por daño oxidativo y apoptosis (Jurkunas et al., 2010; Q. J. Li et al., 2001). Cualquier condición que reduzca la densidad celular a niveles cercanos a 700 células/mm², permitirá la sobre-hidratación del estroma, con la consiguiente pérdida de la estructura laminar, el aumento del espesor de la córnea y las alteraciones de la superficie, lo cual es reversible si se recupera el estado de des-hidratación ideal (Dawson et al., 2011). Sin embargo, si el edema se vuelve crónico, se favorece la cicatrización, los infiltrados inflamatorios y la neovascularización, lo que altera permanente la claridad de la córnea por la opacidad que provocan los vasos, no solo por su presencia, sino porque permiten el depósito de lípidos y favorecen la migración de melanocitos desde el limbo. En este punto, no queda otra alternativa que practicar un trasplante para mejorar la visión (Dawson et al., 2011).

En consideración a que la córnea se expone toda la vida al oxígeno atmosférico y a la radiación ultravioleta, de manera natural ha desarrollado mecanismos de defensa antioxidantes de bajo y alto peso molecular, cuya función es controlar el nivel de ROS. Entre estos se incluyen las vitaminas C y E, el β -caroteno, el glutatión reducido (GSH), la ferritina, y varias enzimas, como la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Senoo & Joyce, 2000). Pero algunas condiciones como una producción excesiva de ROS, la disfunción mitocondrial, el deterioro del sistema antioxidante, o una combinación de estos factores, genera un desequilibrio entre los factores pro-oxidantes y los antioxidantes, que conduce a la acumulación de ROS y al estrés oxidativo (Lou & Chen, 2006). En el endotelio corneal, esta condición se produce con el envejecimiento, ya que con la edad, los mecanismos antioxidantes se vuelven ineficientes, y el poco control oxidativo favorece la reducción del recuento de células endoteliales por apoptosis, pero además, induce una forma de senescencia prematura independiente de la longitud de los telómeros (Joyce et al., 2009).

Existe una amplia evidencia experimental de que el daño oxidativo afecta los lípidos de las membranas celulares, las proteínas y el ADN. La 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) es un marcador de daño oxidativo al ADN y predomina en lesiones inducidas por radicales libres. La evaluación de sus niveles en CEC ha permitido evidenciar que, aunque su distribución es similar en toda la córnea, en la periferia el daño oxidativo es mayor en el ADN mitocondrial (ADNmt) que en el ADN nuclear, y lo contrario ocurre para el área central, especialmente en personas de mayor edad (C. Zhu & Joyce, 2004). Además, la intensidad relativa de la lesión por oxidación parece variar de una célula a otra, lo que sugiere que la extensión del daño en el ADN difiere en las células de manera individual. Lo anterior, puede reflejar diferencias intrínsecas en la actividad metabólica general, la actividad antioxidante y la capacidad de reparación del ADN (Joyce et al., 2009). La respuesta al daño del ADN parece mantenerse activa en las células senescentes, lo que sugiere que las señales de lesión persisten y la inhibición del ciclo celular se mantiene mientras el ADN no se haya reparado adecuadamente; esto indica, que la baja capacidad proliferativa de las células endoteliales puede deberse, al menos en parte, al daño oxidativo del ADN nuclear (Joyce et al., 2009).

Un hallazgo importante en experimentos con concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es la similitud encontrada en el patrón de daño oxidativo en CEC humanas ex vivo y en cultivo, ya que apoya el uso de CEC cultivadas como un modelo experimental confiable para estudiar el efecto del estrés oxidativo (Joyce et al., 2009). Adicionalmente, es importante destacar que las curvas de crecimiento resultantes en células tratadas con H_2O_2 de donantes jóvenes se parecen mucho a las curvas de crecimiento obtenidas en otros estudios utilizando CEC de donantes más viejos en un modelo de herida corneal ex vivo (Schmedt et al., 2012) y en cultivo (Vedana et al., 2016) lo que evidencia la utilidad de este método in vitro para los estudios de proliferación y migración.

Dentro de las lesiones endoteliales se consideran las endoteliopatías primarias, en las que ocurre una degeneración intrínseca del endotelio, y las endoteliopatías secundarias en las que el deterioro del endotelio obedece a una respuesta local frente a una injuria sistémica. En las primeras, ocurre una degeneración endógena, lenta y progresiva del endotelio de la córnea, y que se deben, al menos en parte, a cierta predisposición genética (Jurkunas et al., 2008). En el grupo de distrofias endoteliales primarias se encuentran tres patologías que no se asocian a inflamación ocular o enfermedades sistémicas: la distrofia endotelial de Fuch, la distrofia endotelial congénita hereditaria y la distrofia polimorfa posterior. Todas cursan con tres alteraciones características: el engrosamiento de la membrana de Descemet por el depósito de colágeno, la disrupción del patrón normal en mosaico del endotelio y la disfunción de las bombas endoteliales (Baratz et al., 2010).

La distrofia endotelial de Fuchs (FECD) es la más común, con una prevalencia aproximada del 7%, afecta personas entre la 5° y la 6° década de la vida, predominantemente mujeres. Los pacientes pierden la visión por el compromiso de la transparencia corneal asociado a la irregularidad de las capas corneales, en la enfermedad temprana, y el edema de la córnea en la enfermedad avanzada (Hopfer et al., 2005). Estas alteraciones de la visión corresponden con la pérdida progresiva de las células endoteliales, principalmente por apoptosis, lo que reduce la densidad celular del endotelio y favorece el desarrollo de pleomorfismo, polimegatismo y una transición de las células hacia un

fenotipo activado fibroblástico o epitelial (Hopfer et al., 2005). Esta última característica contribuye al engrosamiento e irregularidad de la membrana basal que se evidencia en una alteración denominada “guttae”, la cual constituye su principal característica clínica (Okumura et al., 2015).

El estrés oxidativo se ha identificado en la FECD como uno de los inductores más importantes de apoptosis. La regulación a la baja de enzimas con funciones antioxidantes tales como las peroxiredoxinas, que convierten el H_2O_2 en agua; la superóxido dismutasa tipo 2 (SOD2) mitocondrial; la metalonina tipo 3 (MT3) involucrada en la eliminación de radicales libres de oxígeno, y la tiorredoxina 1 (TXNRD1) involucrada en restaurar los equivalentes reducidos para la actividad enzimática de las peroxiredoxinas, favorece un ambiente pro-oxidativo que daña el ADN (Jurkunas et al., 2008). El ADN mitocondrial es el más comprometido, y se ha identificado una reducción en el número de mitocondrias y de la actividad de la citocromo-oxidasa, que se consideran secundarios a la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial interna (Jurkunas et al., 2010). Otra alteración a nivel celular encontrada en los pacientes con FECD, es el aumento del número de bombas iónicas en los estadios tempranos y su reducción posterior con la progresión de la enfermedad, y aunque la pérdida de células endoteliales compromete la permeabilidad de la barrera, la evidencia sugiere que la disminución progresiva de las bombas es más importante en el deterioro funcional del endotelio (Vedana et al., 2016). Por último, se han descrito cambios en la función celular que favorecen el depósito de matriz extracelular (Baratz et al., 2010; Okumura et al., 2015), la reacción inflamatoria modulada por NF- κ B, células presentadoras de antígenos y linfocitos (Cui et al., 2018), y la apoptosis (Q. J. Li et al., 2001), y se han identificado reducciones en la expresión de proteínas claves en las uniones intercelulares, como la claudina10, que reducen el flujo de iones a través de las uniones estrechas favoreciendo el edema corneal (Cui et al., 2018).

El Dr. Kinoshita, publicó en el 2012, una opción mediante transferencias de cDNA en células endoteliales de pacientes con endoteliopatía de Fuch para inducir proliferación o modular la apoptosis (Kampik et al., 2012) pero a la fecha no ha sido llevada a la clínica como una opción terapéutica de rutina y no existen tratamientos que frenen de manera significativa la progresión de la enfermedad.

En la fisiopatología de las distrofias secundarias, entre las que se encuentran las asociadas a enfermedades sistémicas, los casi 500 millones de personas afectadas por DM (que tendrían en un 70% de los casos un compromiso de la córnea) y sus médicos tratantes, tienen aún información un tanto general para abordar la salud visual desde el componente de la córnea y particularmente el endotelio que limita las oportunidades de prevención y promoción, manejo y seguimiento. Este trabajo parte del interés en aportar al conocimiento disponible no solo en cuanto al compromiso clínicamente evidenciado en los pacientes diabéticos, tratando de dilucidar si existen diferencias en el compromiso de los pacientes con DM tipo 1 y los que cursan con el tipo 2, sino también ahondar en cómo se comportan estas diferencias con el paso del tiempo en relación con la enfermedad y la discriminación de los eventos asociados con el envejecimiento en estas células. Desde una perspectiva fisiológica, se pretende hacer un aporte a la comprensión de las repuestas proliferativas, migratorias y de muerte celular por apoptosis en estas células y su modificación en entornos hiperglúcidos, esto con la intención de identificar nuevos mecanismos electrofisiológicos

relacionados con ellos y la participación de estos en las diferencias encontradas en la córnea diabética. Al reconocer y entender mejor los factores que afectan en mayor grado la capacidad de proliferación y migración, así como los que favorecen la pérdida de células, será posible identificar blancos de injerencia clínica y terapéutica durante la formación del ojo y la proliferación posnatal, por ejemplo, entender y manejar mejor el posoperatorio del paciente diabético reduciendo el retraso en el proceso de recuperación post quirúrgica de las personas afectadas por esta enfermedad. Por último, teniendo en cuenta que no tenemos en la actualidad mecanismos disponibles para inducir la proliferación controlada del tejido y que es necesario abordar el daño crítico del mismo con trasplantes, hacer el seguimiento y la prevención del impacto de la DM sobre el endotelio permite prolongar al máximo el periodo de calidad visual de los millones de pacientes que la padecen.

II. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

ii.i Objetivo general:

Evaluar la presencia y participación de los canales de potasio activados por calcio (KCa) de conductancia intermedia (KCa3.1) en la proliferación, migración y apoptosis del endotelio corneal en condiciones basales y en un modelo experimental de hiperglicemia.

ii.ii Objetivos específicos:

1. Identificar el compromiso clínico del endotelio de la córnea en la diabetes mellitus como principal causa de hiperglicemia en el ser humano, discriminándolo de los cambios propios del envejecimiento corneal.
2. Determinar la expresión de canales iónicos de potasio activados por calcio en un modelo de endotelio corneal.
3. Determinar el efecto del tratamiento con altas concentraciones de glucosa en los procesos de migración, proliferación y apoptosis del endotelio corneal.
4. Determinar el rol de los canales KCa3.1 en la proliferación, la migración y la apoptosis de las células de endotelio corneal en condiciones basales y en un modelo experimental de hiperglicemia.

ii.iii METODOLOGÍA

ii.iii.i Estudio *in silico* del impacto de la hiperglicemia sobre el endotelio corneal.

El primer paso fue hacer una revisión sistemática y con los datos recolectados en los estudios, evaluar el compromiso del endotelio utilizando una meta-regresión en la que se considera una medida morfológica, la densidad del endotelio corneal, y un parámetro funcional, la medida del espesor corneal (paquimetría). Estos datos se analizaron de manera independiente en cada tipo de diabetes, y se separó el compromiso por edad y por enfermedad.

La meta-regresión se hizo con base en la metodología propuesta por Konstantopoulos (Konstantopoulos, 2011) implementándola en el paquete *metafor* (Viechtbauer, 2010) para el software R versión 4.0.4 (R Core Team (2020), s. f.).

Se utilizó la media como tamaño del efecto obteniendo una media para casos y otra para controles. Esto permite incluir la media de la edad como variable moderadora para explicar la heterogeneidad en el tamaño del efecto observado tanto en el interior como entre los estudios.

Se usó un modelo de efecto mixto, con un efecto aleatorio asociado a las medias para casos y controles de cada estudio. Los efectos fijos se especificaron mediante un modelo de regresión lineal donde se incluyeron el estado del caso y el control, así como la edad.

Se plantea, a modo de explicación un ejemplo del modelo para DEC:

$$E(\text{DEC}_{ij} | \text{Estado} = x_{ij}, \text{Edad} = z_{ij}) = \beta_0 + \beta_1 x_{ij} + \beta_2 z_{ij} + \beta_3 (x_{ij}z_{ij})$$

Donde $E(\text{CCT}_{ij} | \text{Estado} = x_{ij}, \text{Edad} = z_{ij})$ representa el valor esperado de DEC para el estudio i y el grupo j , con las características correspondientes x_{ij} (caso de estado: $x_{ij} = 1$ y control $x_{ij} = 0$) y edad media z_{ij} . En la práctica, el grupo j es cualquier caso o control y está completamente determinado por la variable Estado

Este modelo se basa en dos regresiones lineales (de Edad vs DEC) una para casos y otra para controles. El parámetro β_1 son las diferencias en el intercepto y β_3 es la diferencia en pendientes entre casos y controles respectivamente.

Si β_3 no es significativamente diferente de 0, implicaría que el efecto de la edad en la DEC es el mismo para los casos y los controles. Si el parámetro β_1 no es significativo, entonces el valor esperado de DEC para una edad media no es diferente entre casos y controles. Finalmente, si los parámetros β_2 y β_3 no difieren significativamente, eso implica que la edad no tiene un efecto importante en la DEC.

ii.iii.ii Análisis in vitro en un modelo experimental de hiperglicemia sobre el endotelio corneal.

Una vez evaluado el componente clínico, se procedió a utilizar un modelo *in vitro* para la evaluación del impacto de la hiperglicemia sobre una línea celular de endotelio humano. Esta línea celular corresponde a un modelo morfológico y funcional de endotelio utilizado en múltiples estudios desde 1999 cuando fue descrito por Griffin y colaboradores (Griffith et al., 1999). Fue desarrollada a partir de endotelio corneal humano aislado e inmortalizado tras la infección con un retrovirus recombinante que contiene los genes E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV 16). La cual fue obtenida gracias a la generosa donación del Dr Mitchell Watsky PhD.

ii.iii.ii.i Determinación de la concentración de glucosa para los medios considerados como hiperglúcidos.

Los cultivos definidos como basales o control de cada experimento tenían el medio descrito los investigadores (DMEM / F12 + FBS (20%) + 1 mg/ml de insulina, 0.55 mg/ml de transferrina y 0.067 mg/ml de selenio +40 μg / ml de gentamicina) y los cultivos que asemejaron las condiciones de hiperglicemia tenían este medio con una adición de glucosa para una concentración final de 55mM. Para definir esta concentración se tomaron en consideración los experimentos de Deardorff y colaboradores publicados en el 2018, quienes hicieron cultivos con insertos de epitelio y estroma de la córnea por un mes en un medio, con una concentración basal de glucosa 5mM, y determinaron que las condiciones experimentales óptimas para la evaluación de cambios por hiperglicemia correspondían a tratamientos suplementados con glucosa con una diferencia de 40 mM respecto al basal (45 mM) (Deardorff et al., 2018) lo que para las células del modelo experimental usado en este trabajo correspondería a 57,7 mM. Adicionalmente, se tomó en consideración la diferencia de concentración de glucosa en sangre en una persona diagnosticada como diabética, de acuerdo con un modelo matemático que se basa en el seguimiento a pacientes diabéticos tipo 1 y tipo 2 por un mes con tres registros de glucosa al día, que considera en el paciente no controlado, una medida de variabilidad calculada de acuerdo con el promedio diario como un aumento aproximado de 1.8

veces por encima del valor de los controles (Kovatchev et al., 2006), es decir, lo que correspondería a 49 mM ((17,5mM del basal*1.8)+17.5mM) para las células de la línea celular usada en estos experimentos. Tomando en consideración los dos estudios se definió un valor intermedio de 55 mM para el modelo experimental.

Con este modelo *in vitro* se realizaron experimentos comparando los cambios en células expuestas al medio basal en comparación con células expuestas al medio definido como hiperglucido, esto con el fin de identificar cambios significativos en la proliferación, la migración y la magnitud de células que entran en apoptosis bajo las diferentes condiciones.

ii.iii.ii.ii Ensayos de proliferación.

Los experimentos de proliferación se basaron en la reducción de MTT por la succinato-deshidrogenasa de las células viables y la solubilización secundaria de las sales de formazán que formaron, con estos medios cuya intensidad del color dependía de la cantidad de células metabólicamente activas, espectrofotométricamente se leyó la absorbancia a 590 nm y 650 nm en el equipo Cytation 3 (BioTek Instruments). Finalmente, se corrigió el valor de absorbancia restando para cada muestra el valor medido a 650 nm del valor obtenido con 590 nm.

ii.iii.ii.iii Ensayos de migración.

Los experimentos de migración se realizaron utilizando el método "In vitro scratch assay" descrito por Liang y colaboradores en el año 2007 (Liang et al., 2007) utilizando medios reducidos en estimulantes de la proliferación. Tras realizar cultivos con suero fetal bovino (SFB) al 20%, 15%, 10% y 5% e Insulina-transferrina-Selenio (ITS) al 1%, 0,7%, 0,5% y 0,3% se utiliza como control el medio con SFB al 10% e ITS 0,5% (DMEM / F12 + FBS (10%) + 0,5 mg/ml de insulina, 0.275 mg/ml de transferrina y 0.067 mg/ml de selenio +40 µg / ml de gentamicina) por ser las mínimas concentraciones de suplementos a las cuales la monocapa permaneció morfológicamente estable, redujo su tasa proliferativa respecto al medio basal y el cultivo mantuvo una viabilidad superior al 95% determinada utilizando ensayos con azul tripán en el equipo Countess II (Thermo Fisher Scientific). Los cultivos se realizaron a 37 ° C, en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂, y una vez el cultivo llegó a una confluencia del 80% se realizó una disrupción de la monocapa con una punta para micropipeta p200 µl y se hizo seguimiento imagenológico cada 24 horas hasta el cierre del defecto. En cada momento se tomaron 3 fotografías por microscopía del mismo campo visual para cada pozo, y se analizó la tasa de cierre haciendo seguimiento del área del defecto determinada mediante el software ImageJ. Para cada imagen se promediaron las 3 áreas calculadas para cada pozo por día y los promedios se usaron para definir los porcentajes de cierre entre días consecutivos.

ii.iii.ii.iv Ensayos de apoptosis

La identificación de apoptosis se realizó utilizando el kit *Cell Death Detection* ELISA PLUS (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este kit se basa en una técnica de inmunoensayo enzimático en el que los cambios de coloración medidos por fotometría permiten hacer un análisis

cuantitativo del nivel de apoptosis. La magnitud del color varía de acuerdo con la determinación de fragmentos de ADN asociados a histonas citoplasmáticas (mono y oligonucleosomas).

ii.iii.iii Identificación de la familia de canales de potasio activados por calcio en el endotelio corneal.

ii.iii.iii.i Análisis in silico

La identificación en el endotelio humano de la familia de canales de potasio activados por calcio, a la cual pertenece KCa3.1, como paso inicial para identificar si el mecanismo electrofisiológico en que participa este canal en la lesión renal del paciente diabético podría presentarse en el endotelio de la córnea. Se realizó una aproximación inicial por bioinformática con datos obtenidos a partir de endotelio corneal humano. Se utilizó principalmente GEO OMNIBUS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) como repositorio de microarreglos para buscar conjuntos de datos de expresión génica obtenidos con tecnologías de última generación, haciendo la consulta a través de NCBI *E-utilities*. La razón de usar solo las bases secuenciadas con métodos de nueva generación radica en la posibilidad de identificar los niveles de expresión de cada gen. Se realizó una gráfica de componentes multidimensionales que evidencia la relación natural de acuerdo con los componentes de mayor variabilidad dentro de los datos de forma no supervisada, con el fin de evidenciar la correcta segregación de las muestras por sus componentes biológicos. Con el fin de combinar en el análisis los conjuntos de datos primero se normalizaron y luego se identificaron los cambios de expresión tomando como base un cambio de expresión de 1.5 veces al alta o a la baja entre las diferentes condiciones. Con los genes diferencialmente expresados se hizo un análisis de sobre-representación de vías moleculares, con énfasis particular en aquellas en las que estuviera anotado *KCNN4*, el gen que codifica para el canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia KCa3.1 y se hizo un análisis exploratorio de las condiciones fisiológicas y fisiopatológicas en las que participaba en esas vías mediante la construcción de una red de proteínas con los genes que estuvieran diferencialmente expresados y anotados con *KCNN4* en cada una de ellas.

ii.iii.iii.ii Análisis in vitro y ex vivo.

Se procedió a identificar en tejido corneal humano la expresión de los genes que codifican para los canales de la familia de canales de potasio activados por calcio identificados en el análisis bioinformático. Para esto se obtuvieron muestras de endotelio corneal humano durante procedimientos quirúrgicos de reemplazo corneal por causas diferentes al compromiso del endotelio, siguiendo todos los protocolos de ética definidos por el comité institucional (CEI-ABN026-000138).

ii.iii.iii.ii.i Extracción de material genético y RT-PCR convencional.

Una vez que las células de los cultivos de la línea celular alcanzaron una confluencia del 70%, se utilizó TRIzol y un kit comercial (RNeasy (Qiagen)) para extraer el RNA. Para recolectar las células, se añadió 1 mL de TRIzol (Invitrogen) al cultivo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se pasó a un eppendorf, se añadieron 270 µl de cloroformo, y la muestra se mezcló vigorosamente durante 15 segundos. La muestra se centrifugó durante 5 min a 12.000 g, a 4 ° C. La

fase acuosa fue recolectada cuidadosamente y se mezcló en una proporción de 1: 1 con etanol al 70%. Posteriormente, se realizó una centrifugación adicional durante 30 segundos a 12.000 g a 4 ° C para pasarlo a través de una columna del kit RNeasy (Qiagen) puesta sobre un tubo recolector. Esto fue seguido por un paso de centrifugación durante 30 s, a 12.000 g, a 4 ° C con 700 µl de tampón RW1 y dos etapas de centrifugación durante 30 s y 1 min, respectivamente, a 12.000 g, a 4 ° C, con 500 µl de tampón RPE. Después de la última centrifugación por 1 minuto a 12.000 g con 30 µl de agua libre de RNAsas se eluyó el RNA, y la concentración total y la pureza se determinó espectrofotométricamente a relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm usando NanoDrop. Una proporción cercana a 2,0 en las relaciones de absorbancia se consideró adecuada.

Para obtener RNA de endotelio corneal humano no cultivado, siete muestras de endotelio de siete donantes se almacenaron en TRIzol a -80 ° y tras la pulverización del tejido se siguió el mismo protocolo de extracción de RNA descrito para la línea celular.

El RNA obtenido de la línea celular o de los tejidos de los donantes, se trató con DNasa I (Invitrogen) para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico y se transcribió de forma inversa a cDNA utilizando el Kit de transcriptasa inversa Invitrogen™ SuperScript™ III (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La reacción de RT-PCR convencional se realizó en el termociclador Thermo Fisher Scientific (Arktik Thermal Cycler) iniciando con la pre-desnaturalización a 95 ° C durante 5 min, seguida de 40 ciclos a 95 ° C cada uno de 40 s, y luego uno con la temperatura óptima de anillamiento para cada iniciador durante 40 s, seguido de 72 ° C durante 45 segundos y para finalizar una reducción de temperatura hasta 4 ° C. Todos los productos amplificados fueron enviados a secuenciación externa con el objetivo de comprobar por un mecanismo diferente su coincidencia con los canales de interés.

ii.iii.iii.ii.ii Western Blot

Después de la extracción de ARN de la línea celular o del endotelio corneal ex vivo, la fase orgánica se mezcló con isopropanol para precipitar proteínas, y el sedimento se disolvió en tampón optimizado. Las muestras de proteínas se trataron con inhibidores de proteasas y fosfatasas, y la concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteína de Bradford. Las muestras se diluyeron con 2X tampón de Laemmli y se separaron en gel de acrilamida al 7,5% durante 50 min a 140 mV y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). La eficacia de la transferencia se comprobó con colorante Rojo Ponceau. Las membranas se bloquearon con Blocker™ BSA en TBS (Thermo Scientific) durante 1 h a temperatura ambiente (TA), luego la membrana se incubó durante 4 h TA con el anticuerpo primario a una dilución 1: 500. Después de la incubación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T, seguido de una incubación de 1 h con anticuerpos secundarios a TA. El inmunocomplejo se detectó utilizando Novex® ECL del Kit de reactivos de sustrato quimioluminiscente (INVITROGEN / NOVEX).

ii.iii.iii.ii.iii Inmunofluorescencia

A los cultivos de la línea celular y a los cultivos primarios se les retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con Paraformaldehído al 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la

fijación, las células se lavaron con PBS y se permeabilizaron usando Triton X 100 al 0,2% en PBS y luego se enjuagaron e incubaron con tampón de bloqueo (1% albúmina de suero bovino en PBS) durante 1 h para evitar la unión inespecífica. La incubación con anticuerpos primarios se realizó durante la noche a 4 ° C. Al día siguiente, las células fueron incubadas en la oscuridad con los anticuerpos secundarios unidos a los fluoróforos durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, las muestras se tiñeron con DAPI para visualizar el ADN nuclear. Las imágenes se obtuvieron utilizando Cytation 3. La especificidad de los anticuerpos se validó mediante un ensayo de pre-absorción con un control negativo (péptido inmunizante) proporcionado por el fabricante o probando la tinción de células para las que se ha informado previamente en la literatura que carecen de la expresión canal en estudio.

ii.iii.iv Estudios funcionales del canal KCa3.1 mediante el uso de moduladores químicos.

Tras la identificación genética y morfológica de KCa3.1 se utilizaron moduladores químicos, 1-EBIO (50 μ M, 100 μ M y 200 μ M) como estimulador y TRAM-34 (1 μ M, 2 μ M, 4 μ M y 8 μ M) como inhibidor, para evaluar el efecto de estos cambios en la proliferación, migración y apoptosis de las células del endotelio utilizando el modelo experimental de la línea celular y los experimentos de reducción de MTT, "scratch assay" y el kit comercial de apoptosis descritos previamente. Los experimentos se repitieron después incluyendo pozos en condiciones hiperglúcidas utilizando el modelo experimental ya descrito. Esto se realizó con el objetivo de determinar el impacto de las diferencias funcionales dadas por la modulación del canal tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas similares a las que tendría el endotelio de un paciente diabético in vivo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a quienes fueron mis supervisores, el doctor José Antonio Ramírez La Torre y la doctora Luisa Matheus. A José Antonio por su aliento constante, su motivación inspiradora, su apoyo incondicional y su siempre forma optimista de ver la vida. A Luisa, por seguir alentando el proceso a pesar de las desavenencias, por su guía constante, su exigencia metodológica y su rigurosidad que permitió que el objetivo de este proyecto se cumpliera.

Quiero agradecer de forma sincera, profunda y cargada del mayor afecto y admiración al doctor Alberto Vélez, director del grupo NEUROS, por su fortaleza y respaldo e innumerables votos de confianza; fue sin duda una de las fortalezas más preciadas en este camino. En el grupo NEUROS además, tuve la fortuna de encontrar consejo en académicos que además de su prestigio tengo el privilegio de llamar amigos, rol que cumplieron indudablemente de manera incondicional, y quiero agradecer especialmente a la doctora Claudia Talero, el doctor Leonardo Palacios, la doctora Silvia López, la doctora Alejandra de la Torre, el doctor Alejandro Velásquez y el doctor Juan Sebastián Botero. Al doctor Cesar Payán que, aunque no hace parte del grupo se involucro académica y personalmente con la mayor dedicación.

Aprecio la contribución física y técnica de la Universidad del Rosario y el Instituto Barraquer de América. Sin su apoyo y financiación, este proyecto no podría haber alcanzado su objetivo. A los diferentes grupos de investigación GENIUIROS, MICRO y CREA que me abrieron sus puertas para el desarrollo de mis experimentos. Al apoyo técnico de Lorena e Ibeth y su gran disposición para desarrollar su trabajo. Quiero agradecer de manera especial a la Doctora Angela María Gutiérrez, oftalmóloga del Instituto por su gran disposición apoyo y gestión técnica.

Deseo agradecer el apoyo y el gran amor de mi núcleo familiar; mi abuela, mi madre y mi padre, y los demás miembros de mi familia, quienes me mantuvieron en marcha y, sin lugar a duda, no habría llegado a este punto sin su acompañamiento. A todos mis amigos que me apoyaron y alentaron siempre Mónica R, Carolina S, Ricardo L y Mónica A, a todos de verdad GRACIAS.

CAPÍTULO 1

Caracterización de la influencia de la Diabetes Mellitus sobre el endotelio de la córnea.

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que afecta a las personas que la sufren de acuerdo con la magnitud de la desregulación metabólica y la hiperglucemia secundaria, ya que se ha determinado un papel clave de estos componentes en la dimensión del compromiso en los tejidos y por lo tanto, en el grado de disfunción tisular y sistémica (International Diabetes Federation, 2019).

La diabetes tipo 1 (DMT1) afecta al 5-10% de las personas diabéticas en todo el mundo. Es causada por una reacción autoinmune que afecta a las células β del páncreas y, en consecuencia, se produce poca o ninguna insulina. Esta enfermedad podría afectar a personas de cualquier edad, pero es más prevalente en niños, en quienes la combinación de susceptibilidad genética y un desencadenante ambiental (por ejemplo, virus, toxinas, factores dietéticos) inician la reacción autoinmune (Powers et al., 2018). No existen medidas preventivas para esta enfermedad y una vez que se produce, el paciente requiere la aplicación de una dosis diaria de insulina para mantener la homeostasis metabólica. Incluso en países con cobertura sanitaria universal, el diagnóstico de DMT1 puede retrasarse y los factores económicos pueden afectar la continuidad del tratamiento (Fang et al., 2020; Lindner et al., 2018). Mantener o no los valores de glucosa plasmática en límites fisiológicos está estrechamente relacionada con la incidencia de problemas de salud graves, discapacidad y muerte prematura (Federación Internacional de Diabetes, 2019).

La diabetes tipo 2 (DMT2) afecta a alrededor del 90% de las personas diabéticas en todo el mundo (International Diabetes Federation, 2019). En estos pacientes, la hiperglucemia es el resultado de la incapacidad de las células del cuerpo para responder adecuadamente a la señalización de la insulina. La eficacia hormonal reducida provoca un aumento en la producción de insulina y, con el tiempo, conduce a una falla de las células β pancreáticas una vez que se agotan al tratar de mantener la alta demanda (Cernea & Dobreanu, 2013). La DMT2 afecta a personas de cualquier edad, pero actualmente es más común en personas más jóvenes debido al aumento de los niveles de obesidad, inactividad física y una dieta inadecuada. Dado que la diabetes tipo 2 tiene una presentación silenciosa, a menudo el período de prediagnóstico es largo, y se considera que entre el 30% y el 50% de las personas con diabetes tipo 2 en la población mundial pueden no haber sido diagnosticadas (International Diabetes Federation, 2019). El tratamiento se inicia con la prescripción de un estilo de vida más saludable y metformina mientras sea posible mantener los objetivos en los niveles de glucemia; pasado este punto, será necesario combinar tratamientos con sulfonilureas, inhibidores del cotransportador sodio-glucosa 2 (SGLT2), inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) o implementar el uso de péptidos similares al glucagón tipo 1 (GLP-1) según las características del paciente (American Diabetes Association, 2020). A veces, debido a la naturaleza progresiva de la diabetes tipo 2, a pesar de la terapia oral, la hiperglucemia es severa y es necesario comenzar tratamiento con insulina. En pacientes con DMT2, el control glucémico también es crucial para evitar complicaciones (International Diabetes Federation, 2019).

Si bien, la retinopatía diabética es la complicación ocular más descrita en los pacientes diabéticos y se reconoce como una causa importante de discapacidad visual y ceguera, no es la única complicación ocular asociada a esta enfermedad. En estos pacientes se han descrito anomalías de la córnea que particularmente se asocian al compromiso del epitelio y predisponen a los pacientes a erosiones corneales recurrentes y pérdida de la sensibilidad corneal asociada a la neuropatía diabética (Jeganathan et al., 2008). Adicionalmente, se ha reportado un aumento en el tiempo de resolución y la magnitud del edema corneal post quirúrgico (Tang et al., 2017). Sin embargo, las alteraciones en el endotelio corneal han sido menos estudiadas y los resultados clínicos han descrito resultados que no son consistentes al comparar el endotelio de las córneas diabéticas con controles no diabéticos.

La evaluación del endotelio se basa en el análisis de sus características morfológicas y funcionales (Dawson et al., 2011). Las primeras consideran la densidad, que normalmente en el adulto alcanza un promedio 2,000 a 3,000 células/mm² tras la pérdida de aproximadamente 1.92 células/mm² por año a partir de los 20 años, y la característica distribución en mosaico de la monocapa, en la que se espera que 70-80% de las células tengan una forma hexagonal, ya que este tipo de morfología permite construir una cubierta en la que se garantiza una mayor cobertura con la menor cantidad de espacios entre las células (Eghrari et al., 2015).

Gracias a la posibilidad de evaluar el endotelio *in vivo* utilizando microscopia, clínicamente se utilizan parámetros morfométricos tales como la densidad celular del endotelio corneal (CED) (células / mm²), el área celular (μ 2), el coeficiente de variación e indicadores funcionales como el espesor corneal central (CCT). Cuando se presenta una densidad anormal de células endoteliales junto con un aumento del grosor corneal se considera que se presenta una disfunción endotelial que compromete la transparencia corneal en algún grado (Eghrari et al., 2015). Por esta razón, la relación entre una CED específica y el compromiso reversible o irreversible de la transparencia corneal son factores pronósticos para la visión, especialmente porque los estresores aceleran la pérdida esperada por la edad y, una vez que la córnea se vuelve opaca, la única opción terapéutica involucra un trasplante de córnea (Goldstein et al., 2020).

Varios autores han realizado estudios en diferentes poblaciones para evaluar el impacto de la diabetes sobre el endotelio corneal utilizando parámetros morfométricos y en ocasiones funcionales y han reportados resultados contradictorios. Algunos de estos estudios no encontraron disparidades entre la DEC de pacientes con DM en comparación con los controles no-diabéticos (Larsson et al., 1996; Storr-Paulsen et al., 2014) mientras que otros sí hallaron diferencias estadísticamente significativas (Sudhir et al., 2012). En algunas investigaciones en las que compararon por separado a los pacientes con DMT1 o DMT2, con grupos controles pareados por edad, encontraron diferencias con un tipo de diabetes, pero no en el otro (Módís et al., 2010; Roszkowska et al., 1999). Adicionalmente, se ha sugerido que algunos de los resultados pueden estar influenciados por el proceso de envejecimiento normal tomando en consideración el inicio más tardío de la DMT2 respecto a la DMT1 (Goldstein et al., 2020).

Con el fin de estudiar el efecto de la DM discriminando el impacto de la edad y separando la DMT1 de la DMT2, se realizó una revisión sistemática y, se construyeron dos modelos de meta-regresión, uno para la densidad celular y el segundo, para la paquimetría (CCT). En estos modelos se incluyen la edad y el tipo de diabetes como moderadores puesto que se ha descrito que un aumento del grosor corneal podría ser uno de los primeros marcadores de disminución de la función de las CEC (Busted et al., 1981).

Este capítulo está asociado al primer objetivo específico de la tesis de identificar el compromiso clínico del endotelio de la córnea en la diabetes mellitus como principal causa de hiperglicemia en el ser humano, discriminándolo de los cambios propios del envejecimiento corneal.

1.1 Métodos

1.1.1 Estrategia de búsqueda

En PubMed, Proquest EMBASE y el Registro Central Cochrane de Ensayos Controlados (CENTRAL) se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando el “Medical Subject Heading” (MeSH), “Corneal Endotelium” o “cornea” Y “Diabetes mellitus”. Se utilizaron los descriptores de ciencias de la salud (DeCS) “endotelio corneal” Y “diabetes mellitus” para la búsqueda en español en la base de datos BVS-Lilacs. En ambos casos, la búsqueda se limitó a estudios realizados en humanos. No se consideraron límites en cuanto a idioma, tipo de publicación o período de publicación hasta el 26 de junio de 2020 cuando se realizó la búsqueda.

1.1.2 Selección de estudios

Primero, se evaluaron los títulos y resúmenes para seleccionar los estudios que cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- ✓ Los casos incluyen pacientes claramente definidos como pacientes DMT1 o DMT2 y el estudio incluye controles no diabéticos emparejados.
- ✓ Se informa la densidad de células endoteliales corneales (células / mm²) y la paquimetría (CCT) en micras.

Se excluyeron estudios con estos criterios:

- ✗ Los casos incluyeron individuos con diabetes mellitus tipo 1 y 2 sin que sea posible discriminar los resultados para cada tipo de diabetes.
- ✗ Los controles no fueron pareados por edad.
- ✗ No hay un control no diabético como fuente de comparación.
- ✗ Los pacientes o controles han tenido, o tienen, enfermedades oculares o han sido sometidos a cirugías oculares.
- ✗ Los pacientes o controles tienen enfermedades diferentes a la diabetes.

1.1.3 Extracción de datos y evaluación de la calidad

Se aplicó un formato de datos estandarizado para recopilar la información de los estudios elegibles: autor y año de publicación, diseño del estudio, número de participantes y sus características como país de origen, edad, tipo y duración de la diabetes, niveles de hemoglobina glicada, equipo utilizado para la evaluación corneal, parámetros del endotelio corneal tales como DEC, coeficiente de variación (CV), porcentaje de hexagonalidad celular (HEX) y la medida de CCT como medida de paquimetría e indicador indirecto de la función del endotelio corneal.

Tomando en consideración que los estudios elegidos eran observacionales, se evaluó la calidad interna de cada estudio con la Escala de Newcastle-Ottawa (NOS) (*Ottawa Hospital Research Institute*, s. f.). La NOS asigna hasta un máximo de nueve puntos, lo que corresponde al menor riesgo de sesgo en tres dominios: 1) selección de grupos de estudio (cuatro puntos); 2) comparabilidad de grupos (dos puntos); y 3) determinación de la exposición y los resultados (tres puntos). La asignación de puntos depende de una encuesta que permite evaluar independientemente cada dominio por medio de preguntas que corresponden a la forma en que la que fue llevado a cabo y reportado cada estudio. Dado que los estudios encontrados elegibles eran de casos y controles, se realizó la evaluación con la encuesta diseñada para este tipo de estudios.

1.1.4 Meta-regresión

Los datos obtenidos para la revisión sistemática se analizaron utilizando el modelo de meta-regresión descrito en el capítulo de “objetivos y metodología” en el que se prueba el impacto de cada tipo de diabetes por separado para la DEC como variable morfológica, y el CCT como indicador funcional. Además, considerando que la reducción progresiva de la DEC con la edad está bien documentada, también se consideró en el modelo la edad de los individuos.

Para la evaluación del modelo ajustado se utilizaron los siguientes índices:

- Tau: medida de heterogeneidad entre estudios
- rho: la correlación intra-estudio
- I^2 : el estadístico de heterogeneidad y
- R^2 : el coeficiente de determinación generalizado para modelos mixtos.

1.2 Resultados

Utilizando la estrategia de búsqueda se encontraron 752 registros de los cuales 664 se descartaron después de la verificación de duplicación. La selección por título y resumen permitió identificar 29 artículos como estudios potencialmente elegibles. Dos estudios fueron excluidos por no tener texto completo y no poder conseguir acceso a ellos a pesar de escribir a los autores y solicitar búsqueda por convenio bibliotecario. Otros dos por ser pacientes que tenían otra enfermedad ocular. En este punto los artículos seleccionados fueron usados para una revisión cualitativa y tras la revisión de los textos completos, aquellos que no cumplían completamente con los criterios de inclusión y exclusión preespecificados fueron retirados y 17 estudios fueron utilizados para la meta-regresión. Ocho estudios presentados en siete publicaciones fueron usados para el análisis de DMT1 con un

total de 367 pacientes; y 14 estudios reportados en 13 publicaciones fueron incluidos en el análisis de DMT2 con un total de 2136 pacientes.

1.2.1 Características de los análisis incluidos en la meta-regresión.

Los estudios que examinan la asociación entre la DMT1 y las características de la córnea se muestran en la tabla 1.1. Incluye tres estudios realizados en Europa (Hungría, Italia y Polonia), dos en los EE. UU., uno en África (Egipto) y uno en Asia (India). Los estudios seleccionados para DMT2 se muestran en la tabla 1.2. Corresponde a seis estudios realizados en Europa (Hungría, Italia, España, Lituania y Dinamarca), uno en los EE. UU. y seis en Asia (Turquía, Malasia, Arabia Saudita, Japón e India). Los reportados por Anbar et al. (Anbar et al., 2016) toman medidas independientes de cada ojo.

La evaluación de calidad utilizando la escala NOS (*Ottawa Hospital Research Institute, s. f.*) evidenció un buen grado de calidad (G) para los estudios con excepción de uno de ellos que se calificó con calidad límite (F=*fair*) porque en el componente de selección no se especifica una validación independiente de la condición diabética de los pacientes y no se describe para la elección de los casos incluidos en el estudio una selección consecutiva (Módís et al., 2010). La ausencia de estas estrellas en el componente de selección corresponde a una calidad F incluso si obtuvieron todas las estrellas para los componentes de comparabilidad y exposición.

Estudio (año)	NOS	Lugar País (Continentes)	Estrategia para medir DEC	Estrategia usada para la paquimetría	Pacientes							Controles						
					Participantes (M/F)	Edad (años) Media±SD	Duración Enfermedad (año) Media±SD	HbA1c (%) Media±SD	Densidad celular (células/mm ²) Media±SD	Hexagonalidad (%) Media±SD	Paquimetría (µm) Media±SD	Participantes (M/F)	Edad (años) Media±SD	HbA1c (%) Media±SD	Densidad celular (células/mm ²) Media±SD	Hexagonalidad (%) Media±SD	Paquimetría (µm) Media±SD	
Anbar et al. 2016 (OI) (Anbar et al., 2016)	G	Egypt (Africa)	Topcon SP-1P.	Topcon SP-1P	81 (32/48)	8,22±3,12	3,51±2,24	8,33±2,32	3142,13±416,74	49,67±6,87	539,91±30,49	40 (14/26)	7,83±2,49	4,33±0,83	3315,25±100,16	55,14±10,27	501,63±15,77	
Anbar et al. 2016 (OD)	G	Egypt (Africa)	Topcon SP-1P	Topcon SP-1P	80 (32/48)	8,22±3,13	3,51±2,23	8,33±2,31	3149,84±343,75	48,73±5,43	537±33,41	40 (14/26)	7,83±2,49	4,33±0,83	3308,78±99,33	56,46±9,64	504,7±23,99	
Fernandes et al. 2019(Fernandes & Nagpal, 2019)	G	India (Asia)	Topcon SP-1P	Topcon SP-1P	50 (24/26)	12,16±2,63	3,91±1,65	10,9±2,3	3039,64±292,84	NS	525,16±33,14	50 (28/22)	12,28±3,00	NS	2495 ± 191	NS	513,44 ± 29,46	
Keoleian et al. 1992(KeGoleian et al., 1992)	G	USA (América)	microscopio especular	microscopio especular	14 (NS/NS)	33±12	22±11	10±1,4	2883±280	68±8	560±20	14 (NS/NS)	33±10	NS	3131±483	74±8	560±40	
Larsson et al. 1996(Larsson, 1996)	G	USA (América)	Microscopio especular	microscopio especular	49 (NS/NS)	36±12	20±11	10,4±2,1	2722±313	59±8	580±50	20 (NS/NS)	36±12	NS	2805±368	64±7	550±30	
Módis et al. 2010(Módis et al., 2010)	F	Hungary (Europe)	Tomey EM-1000	Tomey EM-1000	21 (13/9)	40,97±15,46	10,88±8,06	8,55±1,83	2428±219	NS	570±40	22 (12/9)	40,45±15,16	NS	2495±191	NS	504,7 ± 23,99	
Roszkowska et al. 1999(Roszkowska et al., 1999)	G	Italy (Europe)	Konan 580 Keeler	Konan 580 Keeler	30 (NS/NS)	29,76±3,43	15,3±1,2	NS	2141,44±78,01	NS	580±20	30 (NS/NS)	29,5±3,11	NS	2405,5±116,49	NS	540±30	
Urban et al. 2013(Urban et al., 2013)	G	Poland (Europe)	Topcon SP-2000P	Topcon SP-2000P	123 (60/63)	15,34±3,06	8,02±3,9	8,02±3,9	2435,55±443,43	NS	550±30	124 (66/58)	14,58±2,01	NS	2970,75±207,1	NS	530±33	

Tabla 1.1 Estudios incluidos en la meta-regresión para el análisis de pacientes con DMT1 versus controles. NS = No está especificado. OD = ojo derecho. OI = ojo izquierdo.

Estudio (año)	N O S	Lugar País (Continente)	Estrategia para medir DEC	Estrategia para paquimetría	Pacientes							Controles						
					Participantes (M/F)	Edad (años) Media ±SD	Duración Enfermedad (año) Media ±SD	HbA1c (%) Media ±SD	Densidad celular (células/mm ²) Media ±SD	Hexagonalidad (%) Media ±SD	Paquimetría (µm) Media ±SD	Participantes (M/F)	Edad (años) Media ±SD	HbA1c (%) Media ±SD	Densidad celular (células/mm ²) Media ±SD	Hexagonalidad (%) Media ±SD	Paquimetría (µm) Media ±SD	
Calvo-Maroto 2014 (CP)(Calvo-Maroto et al., 2015)	G	Spain (Europa)	Topcon SP-3000P	DGH 5100E	37 (16/21)	45,5±2,5	0,38±0,12	7,66±0,78	2581±175	NS	546±13	38 (20/18)	45,3±2,1	NS	2603±155	NS	545±11	
Calvo-Maroto 2014 (LP)	G	Spain (Europa)	Topcon SP-3000P	DGH 5100E	40 (17/23)	52,2±1,8	10,2±0,8	7,78±0,66	2205±194	NS	569±11	43 (22/21)	52,3±2,6	NS	2554±254	NS	547±11	
Cankurtara et al. 2018(Cankurtaran & Tekin, 2019)	G	Turkey (Asia)	Topcon SP-3000P	US 4000	153 (76/77)	54,9±6,6	11,5±6,3	8,7±1,8	2482,7±325,9	54,2±10	534,1±34,2	146 (71/75)	53,9±7,3	5,2±0,2	2530,2±275,5	53,3±9,5	522,7±34,5	
Choo et al. 2010(Choo et al., 2010)	G	Malaysia (Asia)	Topcon SP-3000P	Topcon SP-3000P	100 (NS/NS)	NS	NS	NS	2541,6±516,4	45,2±20,6	517,3±53,4	101 (NS/NS)	NS	NS	2660,1±515,5	41,1±19,7	510,8±71,9	
Durukan et al. 2019(Durukan, 2020)	G	Turkey (Asia)	Topcon SP-3000P	US 4000	120 (67/53)	59,5±8,1	11,5±6,2	9,2±1,5	2295±311	49,1±10,2	544,2±38	112 (60/52)	57,3±7,2	5±0,3	2501±302	55,2±10	521,5±31,5	

El-Agamy et al. 2017(El-Agamy &Alsubaie, 2017)	G	Saudi Arabia (Asia)	EM-3000	EM-3000	57 (27/30)	57,08±8,37	12,87±8,03	8,57±2,09	2491,98±261,08	33,24±10,25	545,61±30,39	45 (22/23)	50,8±8,39	N S	2629,68±293,45	34,24±8,73	539,42±29,22
Galgauskas et al. 2016(Galgauskas et al., 2016)	G	Lithuania (Europe)	SP-9000	SP-9000	62 (31/31)	45,5±13,5	9,3±6,6	9,8±2,3	2721,8±264,1	60,3±11,4	566,7±35,7	65 (32/33)	45,4±19,5	N S	2967,3±264,1	59,4±11,2	550±56,4
Inoue et al.2002(Inoue et al., 2002)	G	Japan (Asia)	Noncon Roboca	AL-2000	99 (53/46)	65,5±7,5	9,1±8,2	6,9±1,3	2493±330	56,1±8,5	538±36	97 (52/45)	67,6±7,3	N S	2599±278	56,7±6,3	537±38
Larsson et al. 1996(Larsson, 1996)	G	USA (America)	Microscopio especular NS	Bio-Optics	60 (NS/NS)	60±10	13±8	9,9±2,1	2457±367	57±8	570±50	20 (NS/NS)	59±12	N S	2604±385	61±6	560±30
Modis et al. 2010(Módis et al., 2010)	G	Hungary (Europe)	Tomey EM-1000	Tomey EM-1000	30 (10/20)	64,36±10,47	13,61±6,5	8,79±2,01	2330±251	NS	560±30	30 (15/15)	62,69±15,38	N S	2354±186	NS	560±40
Roszkowska et al. 1999(Roszkowska et al., 1999)	G	Italy (Europe)	Konan 580 Keeler	Konan 580 Keeler	45 (NS/NS)	49,6±6,16	17,2±2,2	NS	1915,47±69,83	NS	570±20	32 (NS/NS)	49,75±7,01	N S	2032,55±82,1	NS	550±30
Sanchi-Gimeno 2017 (Sanchi-Gimeno et al., 2017)	G	Spain (Europe)	Orbscan Topography System II	Orbscan Topography System II	35 (17/18)	33,8±3,2	5,9±1,2	6,7±0,3	2101±184	NS	567,4±10,9	48 (23/25)	33,4±3	N S	2505±182	NS	542±12,9

Tabla 1.2. Estudios incluidos en la meta-regresión para pacientes con DMT2. NS = No está especificado. CP = diabetes a corto plazo. LP = diabetes a largo plazo (10 años).

1.2.2 Meta-regresión para pacientes con DMT1 frente a controles

La Tabla 1.3 muestra los resultados de la meta-regresión para la DEC utilizando el estado de DMT1 y la edad media como moderadores. A los 22,82 años (la edad media combinada de los estudios en la meta-regresión), la DEC estimada es de 2900 células/mm² (IC95% 2712,11-3089,01) para los pacientes con DMT1. Tomando como referencia la misma edad, hay una reducción de 193,29 células/mm² respecto a los controles (IC 95%: -254,54, -132,05; p <0,00001). El modelo calcula que los pacientes con DMT1 pierden en promedio 16,33 células/mm² (IC 95%: -32,34, -0,31; p = 0,046) más por año que la población no diabética; sin embargo, la tasa de pérdida celular esperada por la edad es similar entre los pacientes con DMT1 y los controles (p = 0,253) (tabla 1.3 y figura 1.1).

	Valor estimado	CI95%. LI	CI95%.LS	Valor de p
Intercepto	2900,56	2712,11	3089,01	
Efecto neto de la enfermedad	-193,30	-254,54	-132,05	<0,00001
Cambio anual por la enfermedad	-16,33	-32,34	-0,31	0,0457
Cambio anual por la edad	2,75	-1,96909	7,465788	0,2535
Tau	267,32	174,772	481,2666	
Rho	0,97	0,845631	0,995472	
I²	98,99			
R²	0,44			

Tabla 1.3. Parámetros de meta-regresión definidos por el modelo para CED incluyendo DMT1 y edad. CI.LI= Límite inferior del intervalo de confianza. CI.LS = Límite superior del intervalo de confianza.

La heterogeneidad entre los estudios es alta (I² = 98,99). Todos los estudios incluidos en el análisis son estudios transversales excepto el estudio de Choo et al., que es un estudio de casos y controles. Este modelo que incluye DMT1 y la edad de los participantes explica el 44% de la varianza en la DEC reportada en los estudios.

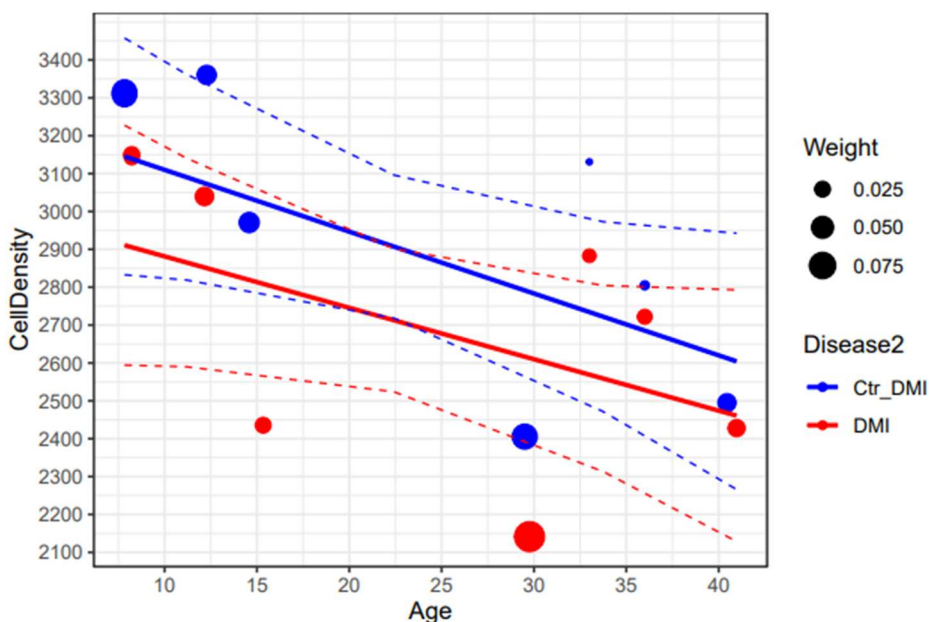


Figura 1.1. El gráfico de dispersión de la meta-regresión muestra la correlación entre la densidad de células endoteliales (células / mm²) y la edad (años) entre los pacientes con DMT1 de cada estudio (rojo) y sus controles (azul). Cada círculo representa la DEC para la edad promedio de cada grupo. El tamaño del círculo es proporcional a la ponderación del estudio. Las líneas continuas representan las regresiones ajustadas por el modelo. Las líneas discontinuas muestran el intervalo de confianza (IC) del 95% alrededor de las líneas de regresión.

La Tabla 1.4 muestra los resultados de la meta-regresión para la CCT como medida de paquimetría, utilizando el estado de DMT1 y la edad promedio como moderadores.

	Valor estimado	CI95%. LI	CI95%.LS	Valor de p
Intercepto	531,21	524,92	537,49	
Efecto neto de la enfermedad	24,11	15,37	32,84	<0,00001
Cambio anual por la enfermedad	1,56	1,06	2,07	<0,00001
Cambio anual por la edad	-0,21	-0,92	0,50	0,563
Tau	58,82	16,97	147,55	
Rho	7,67	4,12	12,15	
I²	81,30			
R²	0,88			

Tabla 1.4. Resultados de la meta-regresión para la paquimetría utilizando el estado de DMT1 y la edad promedio como moderadores.

A los 22,82 años (la edad media combinada de los estudios) en la meta-regresión se estima que la córnea mide en promedio 531,21 μm (IC del 95%: 524,92, 537,49) y debido a la enfermedad, se calcula que en los pacientes la córnea es aproximadamente 24,11 μm más gruesa que en los controles (IC del 95%: 15,37, 32,84; $p < 0,00001$). La DMT1 explica un aumento anual de 1,56 μm (IC del 95%: 1,06, 2,07; $p < 0,00001$) en quienes la padecen respecto con sus controles no diabéticos, ya que este el cambio en la paquimetría esperado por edad fue similar entre DMT1 y controles para los diferentes grupos analizados ($p = 0,563$) y se evidencia en la figura 1.1 por el paralelismo de las líneas de regresión.

Al igual que para el modelo de evaluación de la DEC, los moderadores fueron la enfermedad y la edad, y se evidenció una alta heterogeneidad entre los estudios. A pesar de ello, es interesante que el modelo explica el 88% de la varianza en la CCT reportada en los estudios (Tabla 1.4).

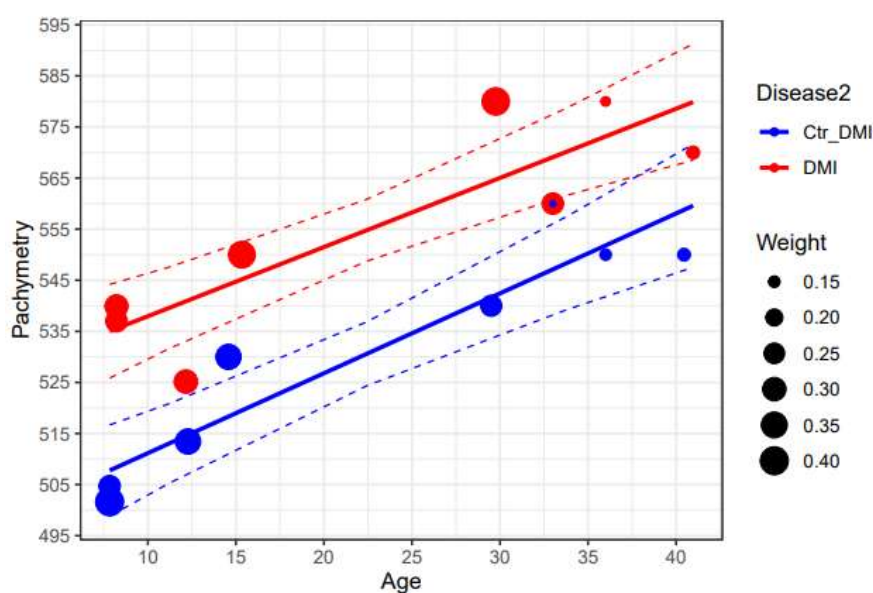


Figura 1.2. El gráfico de dispersión de la meta-regresión muestra la correlación entre la paquimetría (μm) y la edad (años) entre los pacientes con DMT1 de cada estudio (rojo) y sus controles (azul). Cada círculo representa la CCT para la edad promedio de cada grupo. El tamaño del círculo es proporcional a la ponderación del estudio. Las líneas continuas representan las regresiones ajustadas por el modelo. Las líneas discontinuas muestran el intervalo de confianza (IC) del 95% alrededor de las líneas de regresión.

1.2.3 Meta-regresión para pacientes con DMT2 frente a controles

La meta-regresión para la DEC que involucra el estado de DMT2 y la edad media como moderadores estima una reducción de -151,14 células / mm^2 para los pacientes con DM2 respecto a los controles (IC 95%: -229,92, -72,36; $p = 0,0002$). Se determinó que la inclusión de la edad promedio en el análisis del impacto debido a la enfermedad no era significativo en este caso ($p = 0,357$), a pesar de encontrar en los pacientes diabéticos tipo 2 una pérdida con la edad significativamente mayor respecto a los controles ($p = 0,048$). Los parámetros se muestran en la Tabla 1.5.

La heterogeneidad entre los estudios incluidos en la meta-regresión que comparan DMT2 y controles es alta ($I^2 = 99,35$). La varianza en la DEC se explica en un 14% por el modelo que incluye la enfermedad de DM2 y la edad. Lastimosamente, los estudios no aportan de en todos los casos datos como la duración, el grado de control glucémico, los tratamientos u otras variables que pudieran haberse incluido en el modelo para mejorar el porcentaje de explicación de la varianza y reducir la heterogeneidad, solo pueden considerarse como posibles factores de confusión residuales.

	Valor estimado	CI95%. LI	CI95%.LS	Valor de p
Intercepto	2554,46	2445,32	2663,60	
Efecto neto de la enfermedad	-151,14	-229,92	-72,36	0,0002
Cambio anual por la enfermedad	-4,58	-14,33	5,17	0,357
Cambio anual por la edad	7,20	0,038	14,36	0,048
Tau	200,86	147,80	305,70	
Rho	0,82	0,48	0,95	
I2	99,35			
R2	0,14			

Tabla 1.5 Resultados de la meta-regresión para la DEC utilizando el estado de DMT2 y la edad promedio como moderadores.

Dado que varios artículos habían reportado diferentes conclusiones a favor o en contra de una asociación entre los cambios de DMT2 y la DEC, y los resultados de la meta-regresión evidenciaron que los cambios de la enfermedad asociados con la edad no tienen un efecto significativo en el modelo para explicar la diferencia, se condicionó el uso de un diagrama de bosque para mostrar las diferentes poblaciones para la condición de enfermedad en un solo conjunto de ejes (figura 1.3). El resultado de la figura evidencia gráficamente la reducción de la DEC en personas con DMT2 versus controles.

La meta-regresión para la paquimetría que involucra el estado de DMT2 y la edad promedio como moderadores, evidenció que si bien hay una diferencia entre pacientes con DMT2 y los controles determinada por una ganancia $12,85 \mu\text{m}$ en el espesor de la córnea de los primeros respecto a los segundos (IC 95%: 6,62, 19,08; $p < 0,0001$), los cambios por la edad no son una variable significativa para explicar esta diferencia (valor de p relacionado con los parámetros de edad: $p = 0,742$ y $p = 0,093$). Los parámetros de la meta-regresión se muestran en la Tabla 1.6, y la figura 1.4 evidencia gráficamente el aumento de la paquimetría en personas con DMT2 ($539 \mu\text{m}$ CI95%: 532, 547) versus controles ($552 \mu\text{m}$ CI95%: 544, 559).

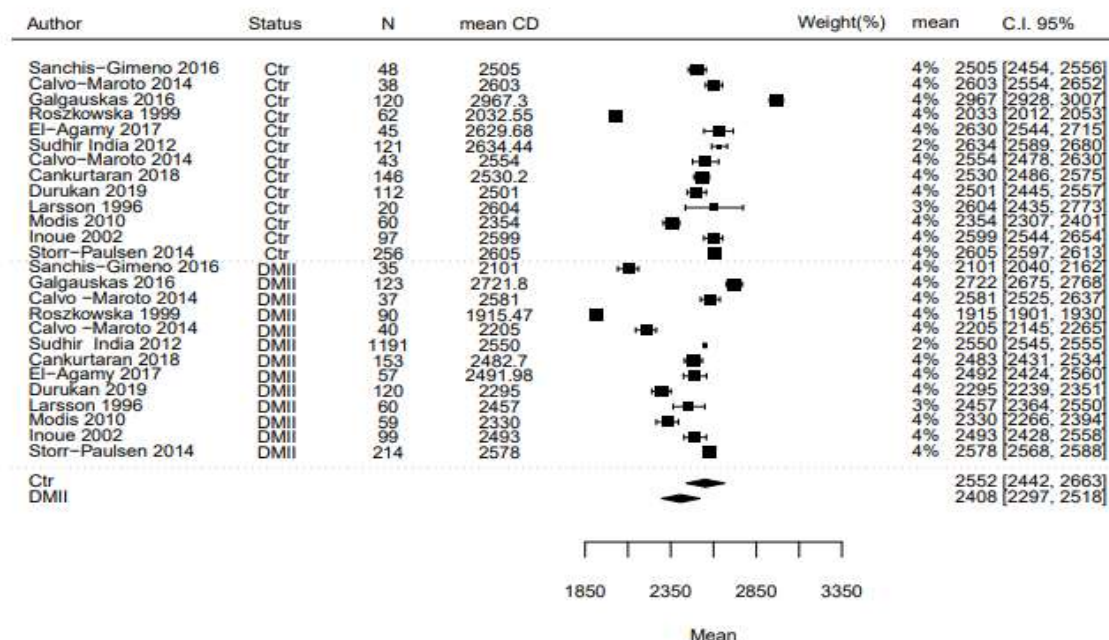


Figura 1.3. Diagrama de bosque de la DEC en DMT2 y controles. La media de la densidad endotelial corneal se muestra para los pacientes con DMT2 (DMII) y para los controles (Ctr) usando la medida promedio para cada estudio. Los diamantes representan la media para cada grupo.

La heterogeneidad entre los estudios incluidos en la meta-regresión que comparan la paquimetría en pacientes con DMT2 y controles es alta ($I^2 = 96,95$) y el modelo que incluye el estado de DMT2 y la edad solo explica en un 15% de la varianza.

	Valor estimado	CI95%. LI	CI95%.LS	Valor de p
Intercepto	539,19	531,71	546,68	
Efecto neto de la enfermedad	12,85	6,62	19,08	0,0001
Cambio anual por la enfermedad	0,11	-0,56	0,78	0,742
Cambio anual por la edad	-0,47	-1,01	0,08	0,093
Tau	13,36	9,67	20,52	
Rho	0,77	0,27	0,94	
I2	96,95			
R2	0,15			

Tabla 1.6 Resultados de la meta-regresión para la paquimetría utilizando el estado de DMT2 y la edad promedio como moderadores.

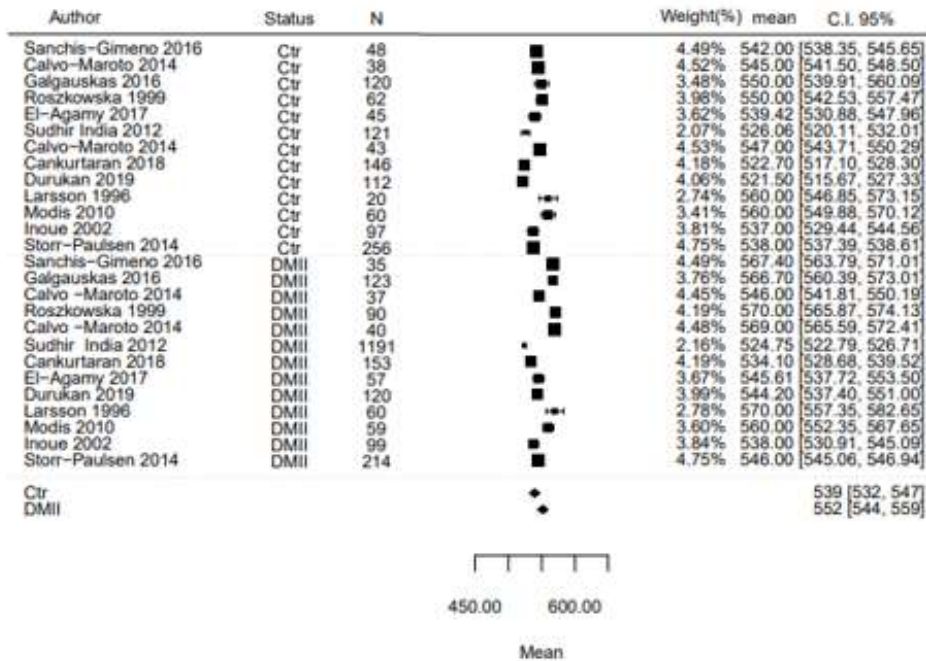


Figura 1.4. Diagrama de bosque de la paquimetría en DMT2 y controles. La media de la paquimetría se muestra para los pacientes con DMT2 (DMII) y para los controles (Ctr) usando la medida promedio para cada estudio. Los diamantes representan la media para cada grupo.

1.3 Discusión de los resultados

Un endotelio sano debe tener una densidad de 3200 a 3500 células/mm² en un adulto joven, y presentar una morfología relativamente homogénea predominando al menos en un 60% de las células (McCary et al., 2008). Este valor de densidad celular corresponde al esperado tras la pérdida de células en el periodo posnatal, la cual ocurre a mayor velocidad hasta los 25 años (1% al año aproximadamente), para luego estabilizarse en un valor cercano 0,5% al año (Niederer et al., 2007; Tuft & Coster, 1990), lo que corresponde en promedio a 10,92 células/mm² por año (Gambato et al., 2015), a menos que por alguna condición particular, enfermedad o trauma se acelere la pérdida (Eghrari et al., 2015).

Los meta-análisis realizados por Zhang et al. (K. Zhang et al., 2021) y por Tang et al. (Tang et al., 2017) sugieren que la DM puede ser una de las causas de reducción acelerada de la DEC. Estos estudios incluyen pacientes diabéticos de cualquier tipo, por lo que no es posible ver el impacto de cada clase de diabetes por separado, una individualización sería útil considerando las variaciones en la fisiopatología, la diferencia en la edad de inicio de la enfermedad y el alto y rápido compromiso metabólico en la DMT1 en comparación con el curso progresivo de la DMT2. Además, Tang et al, examinaron pacientes con cataratas y encontraron deterioro en el endotelio corneal, resultado que incluye las posibles alteraciones asociadas a la patología ocular, adicionales a las determinadas por la condición diabética en sí misma. El análisis de cada tipo de diabetes por separado brinda información adicional para comprender mejor el impacto de los diferentes tipos de DM en la DEC; y la inclusión de la edad en el modelo, permite discriminar los cambios propios del envejecimiento de

los causados por la enfermedad. Así pues, este estudio añade al conocimiento disponible la estimación independiente de la DEC y la paquimetría para cada tipo de diabetes (es decir, tipo 1 y tipo 2). Esto ayuda a comprender el impacto de la enfermedad discriminándola de la reducción de la DEC esperada con el proceso natural de envejecimiento así como el aumento de la paquimetría con la edad (Abib & Barreto Junior, 2001; Costantini et al., 2009).

La meta-regresión para DMT1 se realizó con siete estudios transversales e incluyó 448 casos y 340 controles de Europa, EE. UU., África y Asia. El modelo mostró para la DEC una reducción significativa de 193,30 células / mm² en los pacientes respecto a los controles. La diferencia en la DEC es causada por la enfermedad dado que la pérdida por el proceso natural de envejecimiento es similar en ambos grupos. La meta-regresión para DMT2 incluyó 1064 casos y 1026 controles de Europa, Asia y EE. UU. El modelo estimó una reducción significativa de 151,14 células / mm² para los pacientes con DMT2 con respecto a los controles, lo que evidencia un impacto menor al identificado en el grupo de DMT1. En DMT2 la reducción de la DEC por edad también es similar entre diabéticos y no diabéticos, y se evidencia que las personas incluidas en estos estudios (con una edad promedio de 54,6 años) tienen una tasa de pérdida celular anual en el endotelio menor a la de las personas las más jóvenes.

La reducción de la DEC encontrada en ambos grupos, al no implicar un descenso del recuento celular por debajo del límite funcional de las 700 células/mm² (Dawson et al., 2011), no representa un problema fisiológico en sí mismo, sin embargo, pone a los pacientes diabéticos en una situación desfavorable, especialmente a los pacientes con DMT1 que presentan la mayor reducción. El descenso del recuento celular asociado a la condición diabética en ambos grupos podría coexistir y sumarse con otras condiciones que también afectan a la DEC. Hábitos asociados con el estilo de vida como fumar (Cankurtaran & Tekin, 2019) o usar lentes de contacto continuamente (Magdum et al., 2013), enfermedades sistémicas como la enfermedad pulmonar crónica (Margo et al., 2017) o enfermedades oculares como el ojo seco (Kheirkhah et al., 2015) e incluso tratamientos no oculares como la ventilación mecánica (Margo et al., 2017) también pueden provocar pérdida endotelial.

En condiciones normales, el endotelio corneal mantiene la deshidratación relativa del estroma mediante un gradiente electro-osmótico que contrarresta la fuerza de imbibición generada por los proteoglicanos en el estroma (Eghrari et al., 2015). La actividad coordinada de las bombas y canales de iones induce una fuga de líquido a la cámara anterior que debe mantenerse para conservar el grosor y la transparencia corneal (Bonanno, 2012). Se ha descrito que la DM también puede determinar alteraciones funcionales en el endotelio, como la disfunción mitocondrial (Aldrich et al., 2017) y la reducción de la función de bomba de Na⁺/K⁺-ATPasa (Hatou et al., 2010; Whikehart, 1995) lo que podría favorecer el edema. Dada la disparidad en la DEC entre cada tipo de diabetes, evaluar la CCT para cada una permite determinar si esas diferencias se reflejan en este parámetro de manera similar según el tipo de diabetes y la edad. Esto será importante para la evaluación clínica debido al impacto de la CCT en la presión intraocular (Doughty & Zaman, 2000) y la asociación descrita para la diabetes mellitus con un aumento de la presión intraocular (PIO) y un mayor riesgo relativo de glaucoma primario de ángulo abierto en comparación con los pacientes no diabéticos (D. Zhao et al., 2015).

La meta-regresión de la paquimetría considerando el estado de diabetes y la edad promedio, evidencia un aumento significativo de 24,11 μm en los pacientes con DMT1 respecto a los controles, y el modelo estadístico explica el 88% de esta diferencia. Para la DMT2 se estima un aumento significativo de 12,85 μm en los pacientes con DMT2 respecto a los controles. Diferencias que corresponden a una ganancia en el espesor por el estado diabético ya que el aumento de paquimetría por edad en ambos casos fue similar. Estudios previos realizados por Tang y colaboradores habían evaluado el CCT sin encontrar una diferencia significativa entre pacientes diabéticos y no diabéticos (Tang et al., 2017). Sin embargo, ese estudio reveló una CCT ligeramente mayor en pacientes con DM a pesar del escaso número de estudios disponibles en ese momento. Adicionalmente, Lee y colaboradores habían sugerido una fuerte correlación entre la CCT y la duración de la enfermedad diabética (Lee et al., 2006).

La pérdida acelerada de células en los pacientes diabéticos y el aumento de la paquimetría encontrado particularmente en los pacientes con DMT1 respecto al tipo 2 y de estos a la vez con los controles, se considera secundaria al entorno de alto índice glucémico y la cantidad reducida o nula de insulina. Las células como las del endotelio corneal, en las que la entrada de glucosa no depende de la hormona insulina sino de un gradiente de concentración, se vuelven particularmente propensas a complicaciones ante un exceso de glucosa (Forbes & Cooper, 2013). La carga oxidativa que induce la glicolisis exagerada somete a las células a un estado de estrés metabólico que reduce la actividad de la enzima gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y favorece el aumento de todos los metabolitos intermedios de la glucólisis que están corriente arriba del gliceraldehído-3 fosfato. El metabolismo de estos por vías no convencionales como la vía del poliol, la vía de la hexosamina y la consecuente modificación de proteínas por N-acetilglucosamina, la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE) y la activación de proteína-quinasa C (PKC), favorece el acumulo de productos que se han identificado como promotores de daño en múltiples tejidos. Entretanto, el déficit de insulina reduce la actividad de $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ del endotelio corneal, la cual tiene un rol crítico en la generación de gradientes electro-osmóticos para la deshidratación (Hatou et al., 2010). En conjunto, todas las condiciones fisiopatológicas descritas contribuyen al deterioro estructural, funcional y bioquímico del endotelio corneal.

Dado que todos los pacientes diabéticos están expuestos a estos inductores de daño, se plantea la hipótesis de que las diferencias entre DMT1 y DMT2 están relacionadas con el impacto de la enfermedad en diferentes etapas de la vida en cada una de las poblaciones diabéticas o con aspectos directamente relacionados con la fisiopatología de los diferentes tipos de DM. La lesión mediada por las condiciones diabéticas podría tener un mayor impacto en la DMT1 porque se inicia en el momento de la vida donde la pérdida de células es mayor y podría potenciarla, además, el trastorno metabólico agudo y extremo al que se exponen las células dada la ausencia rápida de insulina propia la enfermedad podría causar un daño mayor que el deterioro progresivo de la DMT2. Desde el punto de vista fisiopatológico, adicionalmente, la DMT1 tiene antecedentes inmunológicos que podrían afectar el nivel de pérdida a lo largo del tiempo. Los análisis genéticos de DMT1 han relacionado el complejo HLA con la susceptibilidad a desarrollar DMT1 en al menos el 50% de los pacientes (Iwata et al., 1992; Morran et al., 2015). Los HLA de clase I (HLA-A, -B y -C) se expresan constitutivamente

en el endotelio corneal (Treseler et al., 1984) y los HLA de clase II (-D) se pueden expresar en el endotelio corneal cuando se expone a un desencadenante inflamatorio (Donnelly et al., 1985; Iwata et al., 1992), como infecciones o alteraciones inflamatorias, condiciones que se han identificado como desencadenantes de la reacción autoinmune determinante de la enfermedad diabética tipo 1 (Powers et al., 2018). Esto es posible considerando que la discordancia del HLA-DR se ha descrito como un inductor potencial del rechazo del aloinjerto corneal, lo que sugiere que podría determinar algún grado de susceptibilidad en las células endoteliales de la córnea de pacientes con DMT1.

Aunque no encontramos diferencias estadísticas entre la tasa de pérdida celular por edad en los pacientes con respecto a los controles, el análisis mostró que, para cualquier edad, la densidad celular es siempre menor en DMT1 que en los controles, y que en ellos la enfermedad determina una pérdida anual mayor. Teniendo en cuenta que la persistencia de autoanticuerpos puede caracterizar cambios de larga data en la diabetes, pensamos que también podrían afectar a otros tejidos como la córnea. La descarboxilasa del ácido glutámico es una enzima altamente expresada en las células del endotelio corneal (Crotti & Selmi, 2014) y los anticuerpos contra ella se reconocen en el 65% de los pacientes con DMT1. La importancia de la alteración de esta enzima para el endotelio, se evidencia en que las mutaciones en el gen que la codifica están relacionadas con el desarrollo y progreso de la distrofia corneal más prevalente en todo el mundo, la distrofia endotelial de Fuchs (J. Zhang et al., 2019; W. Zhang et al., 2017).

La reducción del número de células y cualquier condición que afecte su capacidad funcional, reduce la efectividad del endotelio corneal en el control de la sobrehidratación del estroma y aumenta la paquimetría. En este estudio la CCT es mayor en la población DMT1, la misma en la que encontramos el mayor impacto en la CED. Esto los pone en mayor riesgo de daño porque además de la reducción celular, la hidratación excesiva promueve el plegamiento de la membrana de Descemet lo que aumenta aún más el grosor del estroma reduciendo en consecuencia la transparencia. Además, la persistencia de estas condiciones también predispone a la vascularización, infección y cicatrización corneal (Feizi, 2018).

La proporción de la varianza para la DEC y la paquimetría que se explica por la meta-regresión con el modelo que incluye las variables tipo de DM y edad promedio, es mayor para DMT1 (CED-R2 = 44% y CCT-R2 = 88%) que para DMT2 (CED-R2 = 14% y CCT-R2 = 15%). Esto indica que para la DMT1 la condición de enfermedad diabética y edad son modificadores importantes para explicar las diferencias encontradas respecto a los controles. Sería interesante evaluar los cambios en la DEC y la paquimetría, en primer lugar, en poblaciones más jóvenes a las incluidas en los estudios disponibles para esta regresión con el fin ampliar el conocimiento acerca del momento en el que se produce el mayor grado de pérdida; en segundo lugar, estudios en poblaciones en la séptima u octava década de vida serían de utilidad con el fin de evaluar el efecto a largo plazo de la mayor pérdida anual calculada para los pacientes con DMT1 respecto a los controles. Indiscutiblemente, en el grupo DMT2 existen otros factores involucrados en la reducción de células o el aumento de la CCT que sería ideal identificar y evaluar para mejorar así las intervenciones respecto a las condiciones que tengan un impacto mayor.

La elevada heterogeneidad (I^2) encontrada en todos los casos puede explicarse en parte porque los estudios utilizados para el análisis fueron estudios transversales y de casos y controles. Estos dan información de diferentes poblaciones en un momento específico de la vida de los pacientes y del curso de la enfermedad que no es consistente entre los estudios y aumenta la variabilidad una vez que estos se agrupan para el análisis. Las diferentes poblaciones en los que se realizan, tanto desde el punto de vista geográfico como por la edad de los participantes, podrían incrementar la variabilidad. Se ha descrito que el promedio de la DEC para una edad específica no es el mismo en todas las áreas geográficas y la tasa de cambio es diferente a lo largo del tiempo, incluso en la misma población (Abib & Barreto Junior, 2001; Islam et al., 2017). Los estudios incluidos para el análisis de pacientes con DMT1, en donde la heterogeneidad es menor, presentan una diferencia de aproximadamente 20 años entre la población más joven y la de mayor edad, mientras que para los estudios de DMT2 el rango se acerca a los 40 años.

Este análisis evidencia que la DMT 1 y la DMT2 se asocian con una reducción de la DEC y un aumento de la paquimetría. Estas diferencias son mayores en pacientes con DMT1 que con DMT2 independientemente de la reducción de la densidad endotelial y el aumento de la paquimetría esperado por el proceso natural del envejecimiento, lo que confirma que, además de los mecanismos fisiopatológicos que comparten, existen otros en cada tipo de diabetes mellitus que contribuyen de una manera diferente al compromiso del endotelio corneal.

CAPÍTULO 2

Efecto de las concentraciones elevadas de glucosa sobre la proliferación, la migración y la apoptosis del endotelio de la córnea.

En todos los pacientes diabéticos la hiperglicemia es una condición altamente frecuente, particularmente en quienes no se ha establecido una terapéutica adecuada. Tras la demostración de una afectación del endotelio en estos pacientes con la meta-regresión presentada en el capítulo 1, se hace relevante estudiar el efecto de la exposición a concentraciones elevadas de glucosa sobre los principales mecanismos para la formación, reparación e inducción de muerte celular en las células del endotelio de la córnea.

La literatura dirigida a estudiar los cambios en las células del endotelio corneal cuando se exponen a condiciones asociadas a la DM es escasa y puede ser abordada desde dos perspectivas, primero el impacto de los cambios en la insulina y segundo, la hiperglicemia que se produce secundariamente. Los factores de crecimiento similar a la insulina (IGF) tipo 1 (IGF-1) y 2 (IGF-2) y la insulina activan con diferente afinidad el receptor del IGF tipo 1 (IGF-1R), el receptor del IGF tipo 2 (IGF-2) y el receptor para la insulina (INSR). En el endotelio corneal se ha descrito la presencia de los tres receptores. La insulina a través de su receptor y la activación de PKC aumenta la actividad de la bomba de Na^+ / K^+ ATPasa favoreciendo de forma transitoria la actividad funcional del endotelio y, particularmente en el endotelio de modelos animales, el IGF-1R se expresa aproximadamente 25 veces más que el INSR y una vez es estimulado promueve la síntesis de ADN. Estos efectos podrían inhibirse por la presencia de proteínas extracelulares que clivan los factores estimulantes impidiendo que cumplan su función. Las proteínas de unión a IGF (IGFBP) han sido encontradas a nivel ocular, y se han descrito que se elevan en las lágrimas de pacientes diabéticos y que su síntesis es estimulada por la hiperglicemia. La IGFBP-2 ha sido identificada en el endotelio aunque aún no se ha identificado claramente su función (Stuard et al., 2020); sin embargo, IGFBP3 reduce la señalización del IGF en el epitelio de la córnea y favorece la apoptosis y el daño oxidativo (Wu et al., 2012), probablemente la IGFBP-2 en el endotelio esté involucrado en la reducción de la proliferación, teniendo en cuenta que esa es la principal función descrita para IGF-1 en esta capa.

En cuanto a la glucosa, el endotelio normalmente está expuesto a las concentraciones del humor acuoso, las cuales son ligeramente inferiores a las del plasma (índice plasma/ humor acuoso en el humano 1.17), y dado que éstas células tienen transportadores de glucosa (GLUT) tipo 1, tanto en las membranas apicales como en las basolaterales, la glucosa no necesita de insulina para ingresar, por lo tanto, hay un flujo transcelular de este monosacárido hasta el estroma siguiendo un gradiente de concentración (Kumagai et al., 1994; Reim et al., 1967). Al parecer, las células del endotelio tienen mecanismos que les permiten reducir la captación de glucosa cuando la cantidad extracelular aumenta. Un estudio realizado con células endoteliales humanas expuestas a diferentes concentraciones de glucosa evidenció que la captación de este azúcar se redujo gradualmente a medida que la concentración de glucosa aumentaba en el medio de cultivo, por una vía dependiente de cAMP, y que el efecto era independiente de la presencia de insulina (H. Z. Wang et al., 1997).

Adicionalmente, estudios en corneas humanas y modelos murinos diabéticos han determinado que los GLUT-1 no se sobre expresan en condiciones diabéticas (Kumagai et al., 1994; Takahashi et al., 2000).

A pesar de estos factores protectores, los estudios publicados en relación con los efectos de la hiperglicemia en el endotelio han permitido identificar en estas células cierto grado de disfunción metabólica y estructural. En particular, se ha descrito una reducción en la reserva respiratoria mitocondrial tanto *in vivo* como *in vitro* (Aldrich et al., 2017), una menor actividad de las bombas $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa tras la exposición a polioles (Whikehart, 1995) y un desarreglo de la N-cadherina que involucra al complejo de unión apical y reduce secundariamente la continuidad en las uniones estrechas (Vassilev et al., 2012). Los productos terminales de glicación avanzada (AGE) (por sus siglas del inglés *advanced glycation end products*) asociados a la lesión tisular en DM, se han identificado en el endotelio de la córnea en condiciones diferentes a la diabetes, como el queratocono (Dawczynski et al., 2002) y el envejecimiento (Amano et al., 2010; Kaji et al., 2003), siempre asociados al deterioro del endotelio, ya que pueden causar daño directamente al depositarse en la células, o indirectamente cuando se unen al receptor específico para AGE (RAGE) y modifican la síntesis y la funcionalidad de las proteínas o la capacidad de la célula para degradarlas eficientemente. Esta resistencia a la autofagia favorece un desbalance metabólico que induce la alteración mitocondrial y deriva en estrés oxidativo, daño del DNA y apoptosis (Kase et al., 2011). La alteración en la síntesis, el depósito y la resorción de proteínas por parte de las células del endotelio, también compromete la membrana de Descemet reduciendo su resistencia frente a la tensión y favoreciendo la inestabilidad de la monocapa (H. Zhao et al., 2019).

La pérdida de un trasplante de córnea secundaria al colapso del endotelio es casi dos veces más probable en los pacientes diabéticos respecto a los que no lo son (Price et al., 2003; A. L. Yu et al., 2014), y aquellos pacientes diabéticos a quienes se les realiza queratoplastia endotelial de membrana de Descemet (DMEK) (por sus siglas del inglés *descemet membrane endothelial keratoplasty*) suelen requerir mayores inyecciones de aire para lograr la adherencia adecuada del injerto (Price et al., 2017). Adicionalmente, en procedimientos diferentes al trasplante, como la facoemulsificación, se han identificado diferencias significativas en la densidad de las células endoteliales y en las condiciones morfológicas de las mismas en los pacientes con DM respecto a los pacientes no diabéticos, incluso desde el primer día del posoperatorio (Tang et al., 2017).

Todo lo anteriormente descrito sugiere que las córneas de las personas diabéticas son más vulnerables al estrés y a los traumatismos, pero faltan estudios para establecer los mecanismos no inflamatorios que directamente afectan al endotelio y favorecen esta diferencia. Por esta razón se evalúa la respuesta proliferativa, la capacidad de migración y la tendencia a la apoptosis de las células del endotelio corneal en medios expuestos a concentraciones elevadas de glucosa, como se propuso en el tercer mecanismo específico de la tesis.

3.1 Métodos

El medio de cultivo basal considerado como control (a menos que se indique lo contrario) corresponde a Medio de Eagle Dulbecco modificado (DMEM) / F12 (Gibco) suplementado con suero

fetal bovino (FBS) (20%), insulina-transferrina-selenio (ITS) al 1% (BD Biosciences, Bedford, MA) que corresponde a una concentración de 1 mg/ml de insulina, 0.55 mg/ml de transferrina y 0.00067 mg/ml de selenio; y 40 µg / ml de gentamicina (Gibco). La concentración de glucosa del medio DMEM/F12 es 17,5 mM y el suplemento de ITS, aporta con el selenio una reducción de los niveles de radicales de oxígeno y peróxido (Tinggi, 2008), y con la transferrina, protección antioxidante adicional al ser un cofactor para la peroxidasa de glutatión (Bresgen & Eckl, 2015; Olaniyan & Babatunde, 2016). Los medios altos en glucosa corresponden a medio de cultivo basal suplementado para una concentración final de glucosa de 55 mM.

2.1.1 Experimentos de proliferación.

Se sembraron células de la línea de endotelio corneal humano a una densidad de 6250 células/cm² (2000 células/pozo) en placas de cultivo de 96 pozos para realizar comparaciones de la proliferación en condiciones basales y en condiciones de alta glucosa. Se sembraron seis platos de cultivo con tres pozos para cada una de las condiciones de experimentación y se incubaron a 37 ° C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Cada 24 horas, a un plato de cultivo sembrado en el momento cero del experimento se le retiro el medio, se lavó con PBS y se incubó con reactivo MTT [bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio] a una concentración de 1mg/ml en DMEM durante 1h, al cabo de este tiempo se retiró el medio, se lava con PBS 1X y se solubilizan los cristales. Se realizaron cinco experimentos independientes, cada uno con tres replicas biológicas.

La proliferación celular se controló desde las 24 horas hasta las 96 horas. El cambio en el número de células metabólicamente activas en las diferentes condiciones se correlacionó con la intensidad de cambio por ensayo colorimétrico. Las células metabólicamente activas gracias a la succinato-deshidrogenasa convierten la sal de tetrazolio en sales de formazán (violeta) que al solubilizarse con el isopropanol generan un medio coloreado, cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de sales de formazán. Se midió espectrofotométricamente la absorbancia a 590 nm y 650 nm utilizando el equipo Cytation 3 (BioTek Instruments).

Para la interpretación de los resultados se corrigió el valor de absorbancia restando para cada muestra el valor medido a 650 nm del valor obtenido con 590 nm. Y luego se utilizó la siguiente fórmula para calcular la diferencia de la muestra respecto al control:

$$\text{Número de células (\% del control)} = \frac{\text{Absorbancia corregida de la muestra}}{\text{Absorbancia corregida del control}} \times 100$$

2.1.2 *In vitro* ensayo de rasguño (*scratch assay*)

Se utilizó el método “*In vitro scratch assay*” descrito por Liang y colaboradores en el año 2007 (Liang et al., 2007). Se sembraron células de la línea de endotelio corneal humano a una densidad de 5000 células/cm² (20000 células/pozo) en placas de cultivo de 12 pozos para realizar comparaciones de la tasa de cierre tras realizar un defecto con una punta para micropipeta p200 µl, en una monocapa al 80% de confluencia. Las condiciones para el control de referencia se compararon con células

expuestas a un medio con una concentración de glucosa 55 mM. Tras realizar cultivos con diferentes concentraciones de SFB (20%-15%-10%-5%) e ITS (tabla 2.7) (1%, 0,7%, 0,5%, 0,3%) se utiliza como control el medio con la mínima concentración de suplementos para mantener una monocapa morfológicamente normal con una viabilidad superior al 95% determinada utilizando ensayos con azul tripán en el equipo Countess II (Thermo Fisher Scientific) (resultado no mostrado)

Concentración de ITS probada	Concentración de insulina (mg/ml)	Concentración de transferrina (mg/ml)	Concentración de selenio (mg/ml)
1%	1	0.55	0.0067
0,7%	0.7	0.385	0.00469
0.5%	0.5	0.275	0.00335
0.3%	0.3	0.165	0.00201

Tabla 2.7 Suplemento en el medio de insulina transferrina y selenio de acuerdo con la concentración de ITS utilizada en los experimentos. Se resaltan en rojo los valores escogidos para el medio de referencia (control).

Tras estos análisis, el medio de cultivo utilizado en las células control correspondió a Medio de Eagle Dulbecco modificado (DMEM) / F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (10%), insulina-transferrina-selenio (ITS) al 0.5% (BD Biosciences, Bedford, MA) y 40 µg / ml de gentamicina (Gibco) a 37 ° C, en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Las pruebas *in vitro* evidenciaron una tasa de proliferación menor a la del cultivo con suplementación completa (SFB 20% e ITS 1%) lo que reduce el efecto negativo de la proliferación sobre el ensayo de migración.

Una vez realizado el rasguño (*scratch*), las células se lavaron con PBS 1X para eliminar todos los detritos generados durante el procedimiento y se llenó el pozo con 1.5 ml de medio de acuerdo con las condiciones de ensayo. Este era el punto cero del experimento y se obtuvieron 3 imágenes de cada pozo con magnificación 10X como punto de partida de cada condición. Los días subsiguientes se adquirieron tres imágenes de cada pozo utilizando el microscopio invertido Axio Vert.A1 (Zeiss Microscopy), con una cámara adaptada de 12 megapíxeles (f/1.8) DLSR. Para obtener el mismo campo visual en cada imagen se usaron las coordenadas de la placa del microscopio y como doble factor de referencia se crearon señales con un marcador de punta ultrafina en la caja. Los platos se monitorearon cada 24 horas hasta que ocurrió el cierre de la herida en los pozos control de cada plato. Para cada registro, los platos se sacaron de la incubadora, se examinaron, y luego se volvieron a colocar en ella para reanudar la incubación. Se realizaron seis experimentos independientes con cuatro replicas biológicas en cada uno.

La comparación de las imágenes obtenidas para cada muestra se analizó cuantitativamente utilizando el software ImageJ (*ImageJ*, s. f.). La imagen primero se convirtió a escala de grises (*Image→type→8-bit*), luego se identificaron los bordes del defecto (*process→find edges*) y se afinaron para darles continuidad (*process→smooth x37*), lo que permitió la identificación del área

de la herida (*Image*→*adjust*→*autothreshold*) y finalmente, se calculó el área del defecto (*analyze*→*analyze particles*→*10.000-infinity*).

Por último, se obtuvo el porcentaje de cierre normalizando el área de cada imagen en los diferentes lapsos de tiempo (Área actual) con el área de referencia (tiempo 0 (t0)).

$$\text{Magnitud de cambio del area del defecto} = \frac{(\text{Área } t0 - \text{Área actual})}{\text{Area } t0} \times 100\%$$

La magnitud de cambio corresponde al porcentaje del área del rasguño inicial (t0) que se ha cubierto en cada momento de registro.

2.1.3 Apoptosis

Se sembraron células de la línea de endotelio corneal humano a una densidad de 2×10^5 células/pozo en placas de cultivo de 6 pozos. Todos los pozos se incubaron por 24 horas con medio basal (Medio de Eagle Dulbecco modificado (DMEM) / F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (20%), insulina-transferrina-selenio (ITS) al 1% (BD Biosciences, Bedford, MA) y 40 µg / ml de gentamicina (Gibco) a 37 ° C), en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Al siguiente día, se cambió el medio, y las muestras que corresponden a exposición elevada a la glucosa se incubaron con medio con una concentración alta de glucosa (55 mM). En estas condiciones las células permanecen 24 h, al cabo de las cuales, se recoge el medio, se lavan con PBS 1X y se dejan 2-4 horas con (DMEM) / F12 (Gibco) sin suplementar, a 37 ° C, en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. El medio reservado se centrifuga y el pellet se expone a las mismas condiciones, con el finde tomar en cuenta las células que se desprenden. Pasado este tiempo todas las células se incuban con el buffer de lisis del kit *Cell Death Detection ELISA PLUS* (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para quitar los efectos de fondo (EF) sobre la lectura de las muestras se obtuvo el valor de absorbancia de la mezcla de buffer de incubación + solución ABTS + solución para parar la reacción de ABTS en proporciones iguales a las empleadas en las muestras. La muestra definida como basal, es decir, aquella sin el tratamiento que se quiere evaluar como inductor de muerte celular, causa cierta absorbancia que se usó en todos los ensayos como control. El control positivo de cada experimento fue el complejo de ADN-histona incluido en el kit. Se realizaron cinco experimentos independientes con tres replicas biológicas en cada uno.

Para obtener los valores de enriquecimiento de mono y oligonucleosomas liberados al citoplasma de las células en cada condición, es decir la diferencia en la magnitud de apoptosis respecto al control, se promediaron los valores de absorbancia de cada una de las condiciones, se les restó el valor de absorbancia medido para EF y se calculó el enriquecimiento específico de mono y oligonucleosomas con la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de enriquecimiento} = \frac{\text{mU de la muestra en estudio}}{\text{mU del control (sin tratamiento)}}$$

mU = absorbancia [10^{-3}]

2.1.4 Análisis gráfico y estadístico.

Los valores obtenidos en cada experimento se importaron al software GraphPad Prism versión 9.1.0 para su análisis. Se utilizó ANOVA para comparar tres o más grupos de datos utilizando un valor de $p < 0,05$ para definir significancia estadística. Si los datos satisfacían las pruebas de normalidad e igualdad de varianza, se realizó una prueba t para comparar la media de dos grupos. Si los datos no pasaban la prueba de normalidad, entonces se usaron pruebas no paramétricas usando un valor p más pequeño para definir la significancia ($p < 0.01$).

2.2 Resultados

2.2.1 Ensayo de proliferación.

El potencial proliferativo de las células de la línea de endotelio corneal cultivadas en medio normal y con un aumento de la glucosa se evaluaron con un ensayo con MTT.

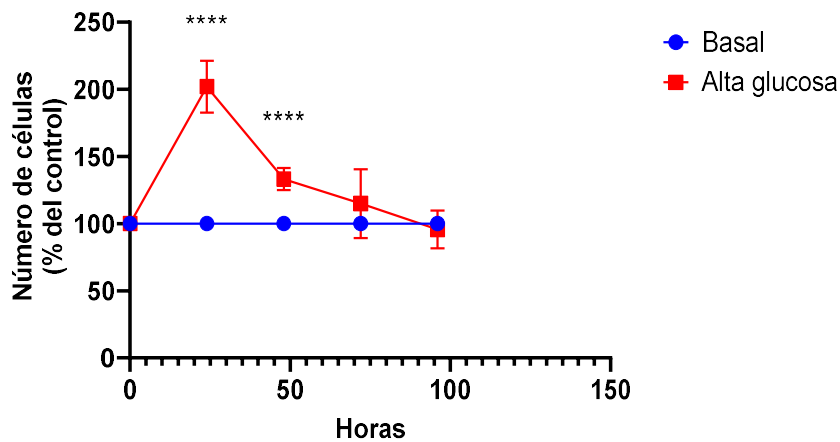
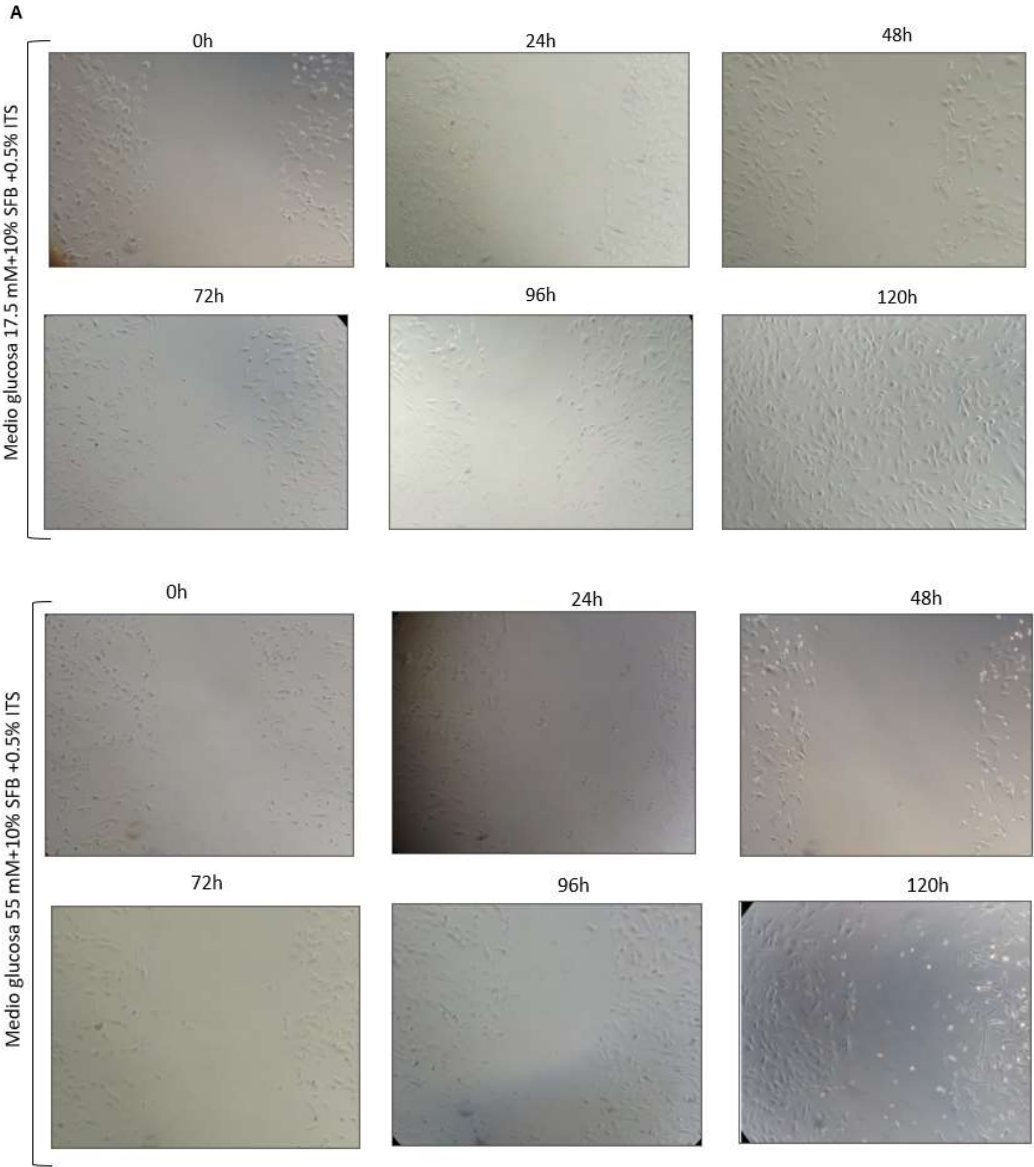


Figura 2.1. Ensayo MTT en condiciones basales y en concentraciones altas de glucosa. Los datos se normalizaron con respecto al control. Símbolo de punto o cuadrado representa la media y las barras la desviación estándar.

La tasa de proliferación aumentó significativamente en las primeras 24 y 48 horas en las células expuestas a altas concentraciones de glucosa respecto a las cultivadas en medio basal. A partir de este momento disminuyó en los siguientes días hasta alcanzar a las 96 horas la capacidad proliferativa media del grupo control (Figura 2.1). Las pruebas se analizaron utilizando una prueba de comparaciones múltiples vs condiciones basales (a las 24h, $p < 0,0001$; a las 48h, $p < 0,0001$, a las 72 horas $p = 0,4710$ y a las 96 horas $p = 0,9088$).

2.2.2 Ensayo de migración.



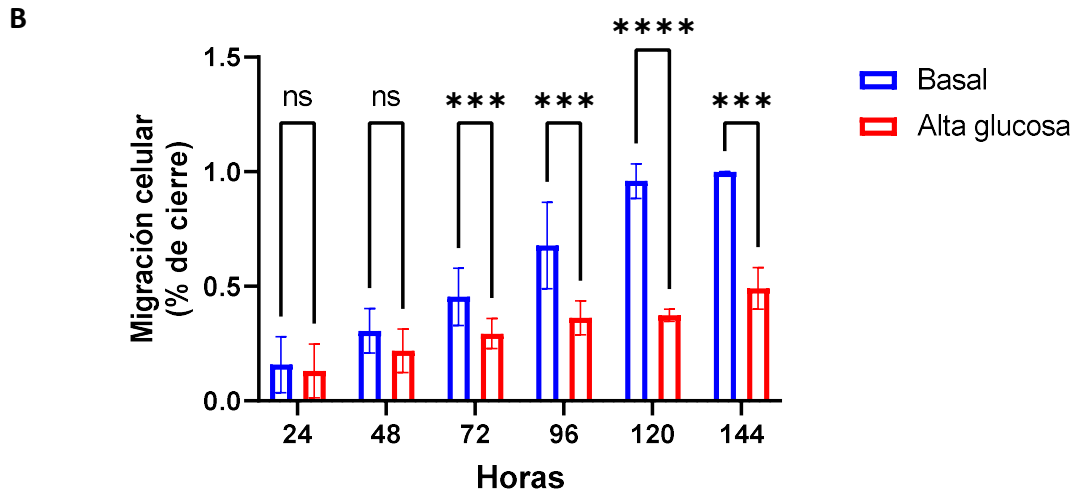


Figura 2.2 Ensayo de migración (*scratch assay*) para células en medio normal y con altas concentraciones de glucosa. (A) Microfotografías representativas de la evolución del ensayo de rasguño a las 24, 48, 72 y 96 horas después de realizado el defecto en la monocapa. En la línea superior células expuestas a medio normal (concentración de glucosa 17.5 mM), en la línea inferior células en medio con alta concentración de glucosa (concentración de glucosa 55 mM). Magnificación 10X (B) Análisis cuantitativo de la tasa de cobertura del defecto. El análisis de múltiples comparaciones determina una diferencia no significativa (ns) entre las condiciones a las 24h ($p=0,9830$) y 48 horas ($p=0,0670$) de iniciar el cierre y diferencias significativas a las 72 h ($p=0,0008$), 96 h ($p=0,0003$), 120 h ($p<0,0001$) y 144 h ($p=0,0002$).

2.2.3. Ensayo de apoptosis

Este experimento detectó los nucleosomas, complejos formados por ADN y las histonas H2A, H2B, H3 y H4, que se generaron durante la escisión del ADN por la endonucleasa endógena en el evento de una apoptosis. El enriquecimiento de mono y oligonucleosomas citoplasmáticos en las células expuestas a altas concentraciones de glucosa es significativamente mayor ($p<0.0001$) respecto a las células en medio basal (figura 2.3).

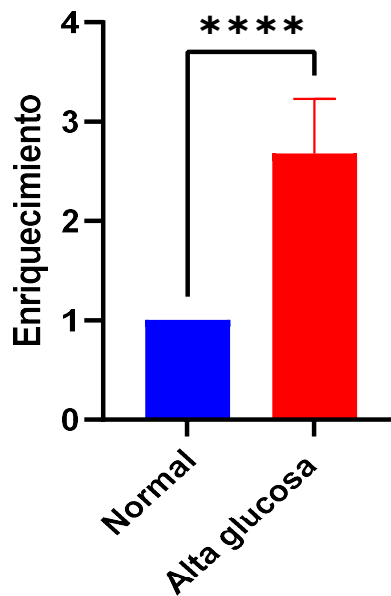


Figura 2.3. Detección de apoptosis en células de endotelio humano expuestas a concentraciones elevadas de glucosa.

2.3 Discusión de los resultados

A nivel corporal todas las células tienen la misma maquinaria del ciclo celular; sin embargo, de acuerdo con los factores de crecimiento a los que se expongan, las respuestas pueden ser diferentes para cada tipo de célula. A nivel renal, por ejemplo, la hiperglicemia estimula la proliferación persistente de los fibroblastos tubulointersticiales, sin embargo, otras células renales, como las células mesangiales, presentan un modelo de proliferación temprana autolimitada. Este efecto se considera secundario a la inhibición de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) inducida por el aumento de la glucosa. El resultado es que al faltar la actividad de las quinasas la proteína del gen del retinoblastoma no se fosforila y falla la progresión del ciclo de la fase G1 a la S (Wolf, 2000).

El ambiente diabético se ha identificado como un entorno en general favorable para el desarrollo de cáncer por varios mecanismos que coexisten. Por un lado, el estado hiperinsulinémico previo a la insuficiencia de las células B pancreáticas y la regulación al alta de receptores para el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1R), favorecen la proliferación en células normales y tumorales. Los estudios realizados por Lopez y colaboradores en células de la mama, por ejemplo, mostraron una activación de la vía de señalización de IGF-1 particularmente alta a las 24 horas, lo que se asemeja al patrón visto en los experimentos realizados en este trabajo (Lopez et al., 2013).

En ambientes con alta disponibilidad de glucosa, la proliferación puede aumentar por el estímulo metabólico secundario a la generación de grandes cantidades de ATP y los productos intermedios del metabolismo de carbohidratos que terminan influyendo en la síntesis del ADN. La síntesis de ADN y la glucólisis están vinculadas genéticamente por mecanismos que involucran las enzimas polimerasa, primasa y helicasa, y la actividad de los compuestos de tres carbonos de la vía de la

glucólisis, y estos mecanismos parecen estar ubicuamente distribuidos en las células, y les permite adaptarse a la energía proporcionada por el medio ambiente (Jannière et al., 2007). La ribosa-5-fosfato, necesaria para la síntesis de nucleótidos y NADPH, es generada por la vía de las pentosas, siendo la enzima limitante la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Durante el ciclo celular, la mayor actividad de la vía de las pentosas ocurre durante la fase S y contribuye a la progresión del ciclo. La vía de las pentosas también juega un rol importante en el efecto Warburg, un cambio del metabolismo de la glucosa aeróbico al anaeróbico, incluso en presencia de oxígeno, que puede presentarse en las células normales en la fase G1 cuando entran en proliferación. Es decir que el exceso de glucosa intracelular al desviarse por otras vías metabólicas, como la de la pentosa fosfato puede contribuir al inicio del efecto Warburg y afectar la proliferación celular (da Veiga Moreira et al., 2015).

Aunque estos efectos proliferativos que ocurren en respuesta a la disponibilidad de glucosa parecen benéficos, coinciden con un aumento del estrés oxidativo que resulta deletéreo para ella. El exceso de glucosa intracelular y el aumento de la actividad del ciclo de Krebs sobrecargan las mitocondrias con cofactores reducidos (NADH, FADH₂) y generan un cambio en el potencial de la membrana mitocondrial que bloquea la transferencia de electrones a través de la cadena de transporte de electrones, entonces, los electrones se utilizan para generar radicales de oxígeno (ROS) que peroxidan los lípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas generando alteraciones celulares. En consecuencia, el aumento de ROS y el estrés oxidativo favorecen el daño celular, la apoptosis o la detención del ciclo celular, y esto ocurrirá en mayor o menor medida de acuerdo con el nivel de la hiperglicemia y la capacidad de los antioxidantes para proteger a la célula (Brownlee, 2005).

Las células endoteliales de la córnea son susceptibles al estrés oxidativo y se ha descrito como uno de los principales mecanismos fisiopatológicos de la reducción celular asociada al envejecimiento (Joyce et al., 2009), así como de las enfermedades que afectan a estas células (Jurkunas et al., 2010). Los resultados experimentales presentados, sugieren que las células del endotelio corneal podrían ser bastante sensibles a la descompensación entre oxidantes y antioxidantes secundaria al incremento de la glucosa en el medio extracelular. En este contexto es relevante el efecto inhibitorio de los ROS sobre la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el aumento secundario de los intermediarios metabólicos que se generan corriente arriba y la activación de vías metabólicas alternas ante la necesidad de metabolizar estos productos intermediarios. Uno de estos mecanismos es el aumento de la síntesis de sorbitol por la reducción de la glucosa gracias a la actividad de la enzima aldosa reductasa. Este proceso consume NADPH, que funciona como cofactor de la enzima y, aunque parte de él se reemplaza por la vía de las pentosas, la sobreproducción de sorbitol hace que el NADPH se agote, lo que a su vez favorece el estrés oxidativo, ya que este cofactor es necesario para el mantenimiento del glutatión en estado reducido. El sorbitol también puede potenciar este efecto al glicar proteínas o producir AGE y activar la señalización de RAGE, productos que han demostrado aumentar el estrés oxidativo y la apoptosis en células de endotelio corneal bovino (Kaji et al., 2003). Todos estos mecanismos potencian la activación de la vía de señalización de p38MAPK que participa como enlace molecular entre la glucosa, la apoptosis y la detención del ciclo celular. Otra vía metabólica alterna es la vía de las

hexosaminas. La fructosa-6-P acumulada al metabolizarse por la enzima glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa produce uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), la cual induce modificaciones postraduccionales en las proteínas. Esta hexosamina participa en la glicosilación (N-acetilglucosamina unida a los aminoácidos) de varias proteínas reguladoras del ciclo celular tales como la ciclina D1, la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) y la ciclina B1. Esta modificación post-traducciona l inhibe su función limitando la progresión del ciclo celular (Nagy et al., 2019) y favoreciendo la disrupción del contenido nuclear (Slawson et al., 2005). Sin embargo, en el endotelio de la córnea, experimentos que lo exponen a tert-butil hidroperóxido (tBHP) con el fin de aumentar el estrés oxidativo, evidenciaron que el aumento de O-GlcNAc mejora la viabilidad celular al reducir la sobrecarga de calcio intracelular y los ROS, y favorecer la estabilidad eléctrica de la membrana mitocondrial (Yoon et al., 2020), así que su efecto en ambientes hiperglúcidos sería un objetivo de investigación interesante.

En cuanto a la migración, estudios en varios tejidos presentan resultados similares a los nuestros en condiciones de hiperglicemia. En el 2004, Akhtar y Chaouchi presentaron en la reunión anual de la Asociación para la Investigación Visual y en Oftalmología (ARVO), datos que mostraban que las concentraciones altas de glucosa (> 25 mM) reducían la capacidad de migración y proliferación de células epiteliales de la córnea de conejos, efectos que podrían deberse a una disminución de la expresión de la fosfolipasa C1 (PLCy1) (Akhtar & Chaouchi, 2004). Kruse y colaboradores en el 2016, evidenciaron que las concentraciones de glucosa elevadas inhiben la migración de los queratinocitos y los fibroblastos de una manera dependiente de la concentración, y demostraron que este efecto es independiente de la producción del factor de crecimiento o de la presión osmótica (Kruse et al., 2016). Pahwa y colaboradores en el 2020, mostraron que a elevadas concentraciones de glucosa se reduce la biogénesis mitocondrial, el potencial migratorio y la quimiotaxis de las células preosteoblásticas (Pahwa et al., 2020). Aunque esta es la primera vez que se reportan los efectos de la concentración elevada de glucosa sobre la capacidad migratoria de las células del endotelio de la córnea, estudios previos permiten sugerir que la vía de Rho-quinasa (ROCK) podría estar involucrada en este resultado. La hiperglucemia estimula la actividad de la vía ROCK a través de las vías dependientes de la PKC y del estrés oxidativo (Rikitake & Liao, 2005), e inhibidores de ROCK, como Y-27632 y H-1152, inducen la migración de células del endotelio de la córnea *in vitro* y *in vivo* en modelos animales (Meekins et al., 2016; Okumura et al., 2009). Estos inhibidores adicionalmente favorecen la proliferación, así que en conjunto, estos efectos han llevado a sugerirlos como fármacos útiles para mejorar la cicatrización de las heridas del endotelio corneal (Koizumi et al., 2013).

En conclusión, la exposición de células del endotelio corneal a medios con elevadas concentraciones de glucosa, generan un aumento de la proliferación en las primeras horas de exposición que luego se ve reducida de manera progresiva. La caída en la proliferación coincide con el aumento de la apoptosis que afecta de manera significativa a las células incluso a partir de 24 horas post exposición. La exposición de estas células a medios hiperglúcidos, también impacta negativamente la migración, particularmente a partir del tercer día post exposición. De acuerdo con la literatura disponible, se sugiere que los resultados experimentales pueden estar determinados por el

desequilibrio entre los factores antioxidantes y oxidantes, así como la generación de productos secundarios a la activación las vías metabólicas alternas no convencionales cuyos derivados afectan las proteínas celulares de manera directa o por modificaciones post-transduccionales generando eventos relevantes en la fisiopatología de las lesiones endoteliales.

CAPÍTULO 3.

Identificación de los canales activados por cationes en el endotelio corneal.

Dentro de los mecanismos fisiopatológicos relacionados con la lesión tisular en DM, recientemente se ha dado importancia al compromiso electrofisiológico particularmente asociado a la familia de canales de potasio activados por calcio (KCa); sin embargo, poco se conoce acerca del mismo.

La familia de KCa está constituida por dos grupos principales de canales que se resumen en la tabla 3.1.

Tipo de conductancia	Proteína	Nombre alternativo	Gen que lo codifica
Alta	KCa1.1	BK o MaxiK	KCNA1
	KCa5.1	SLO3	KCNU1
	KCa4.1 o KNa1.1	Slack	KCNT1
	KCa4.2 o KNa1.1	Slick	KCNT2
Intermedia	KCa3.1	IK, SK4	KCNN4
Baja	KCa2.1	SK1	KCNN1
	KCa2.2	SK2	KCNN2
	KCa2.3	SK3	KCNN3

Tabla 3.1 Clasificación general por conductancia de los canales de potasio activados por calcio.

El primer grupo corresponde a los canales de alta conductancia KCa1, entre los que se incluyen los KCa1.1, también conocidos como canales “BK” (*Big K⁺ conductance*) o MaxiK, que se activan tanto por el aumento del calcio intracelular como por cambios de voltaje de las células, los KCa5, específicamente el KCa5.1, activado por calcio y alcalinización, y los KCa4, que se activan por el aumento del sodio intracelular y por cambios de voltaje de las células. En el segundo grupo, se encuentran los canales KCa2, también conocidos como canales “SK” (*Small K⁺ conductance*), y los KCa3, también llamados “IK” (*intermediate K⁺ conductance*), ambos son activados principalmente por cambios en las concentraciones de calcio intracelular y no por cambios de voltaje transmembrana (Guéguinou et al., 2014; Hage & Salkoff, 2012). Los KCa se han visto modificados en estados diabéticos y se involucran en general con mayores complicaciones secundarias a la reducción de la capacidad de relajación vascular, inestabilidad eléctrica cardíaca, mayor lesión renal y cambios en la respuesta de la glía a nivel del sistema nervioso central (Glaser et al., 2017; Y. Wang et al., 2010; Yi et al., 2015; L.-M. Zhao et al., 2014).

La actividad de los BK se ha visto reducida en el músculo liso de arterias cerebrales de pacientes con DMT2 en respuesta a la regulación negativa de las subunidades moduladoras β 1. Esto causa un aumento del tono vascular y la presión arterial, y contribuye de este modo a las complicaciones cerebro-vasculares (Y. Wang et al., 2010). En arterias mesentéricas de ratas se ha evidenciado una

respuesta similar, pero en este caso la regulación a la baja de los canales IK y SK3, secundarias al aumento del estrés oxidativo y el acumulo de AGEs, fue el mecanismo electrofisiológico descrito (L.-M. Zhao et al., 2014).

La regulación a la baja no transcripcional de SK3, en asociación con la de SK2, pero no de SK1, también se ha visto asociada a la prolongación del potencial de acción atrial en el corazón de modelos murinos diabéticos. En este estudio también se sugiere que estos cambios se deben a inestabilidad de las proteínas y disfunción de los canales mediados por el estrés oxidativo (Yi et al., 2015).

En cuanto a IK, se ha encontrado una mayor expresión en los riñones de pacientes y modelos animales con nefropatía diabética, y se ha demostrado, que la inhibición de KCa3.1 suprime las respuestas inflamatorias y fibróticas tanto en estudios *in vitro* de células tubulares proximales humanas como en modelos de ratones diabéticos. Parte de esta respuesta nefropática está relacionada con el papel clave de células inflamatorias como los leucocitos y los macrófagos, que al exponerse a niveles altos de glucosa y AGEs se activan, lo que aumenta su nivel de reclutamiento y los estimula a producir ROS, citocinas y proteasas, que conducen a lesión tisular y finalmente a fibrosis (Huang et al., 2014b). En esta respuesta inflamatoria, IK también contribuye estimulando la migración, la activación y la proliferación de células inmunológicamente activas, incluso, se ha propuesto como un objetivo para reducir la infiltración de células T y macrófagos en las primeras etapas de rechazo crónico del trasplante renal (Huang et al., 2014b).

Adicionalmente, parece que la activación de las células mediada por IK también involucra a la neuroglia en la que la inhibición de la actividad de KCa3.1 con TRAM-34, en ratas con cetoacidosis diabética, disminuye la activación microglial y reduce la astrogliosis reactiva, lo que mejora la supervivencia neuronal (Glaser et al., 2017).

Todos estos estudios apuntan a que los canales de la familia KCa participan en los mecanismos fisiopatológicos de lesión tisular en condiciones diabéticas, particularmente en respuesta a la acumulación de AGEs y el estrés oxidativo propio de la enfermedad, y sugieren que los cambios están asociados a isoformas particulares para los diferentes tejidos.

3.1 Métodos

Para la identificación en el endotelio de la córnea de genes relacionados con la familia de canales KCa se realizó una búsqueda siguiendo el proceso mostrado en el flujograma de la figura 3.1, en donde se consolidan los pasos para la selección de datos obtenidos a partir de endotelio corneal humano. Se utilizó principalmente GEO OMNIBUS ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) como repositorio de microarreglos para buscar conjuntos de datos de expresión génica obtenidos con tecnologías de última generación, haciendo la consulta a través de NCBI E-utilities. Se utilizaron las palabras clave "corneal endothelial cells" y la sub-selección por organismo *Homo sapiens*. También se usó la base de datos PubMed para identificar estudios relevantes con bases de datos de secuenciación asociadas utilizando con los mismos parámetros, y una búsqueda adicional con las palabras clave "corneal endothelial dystrophies" y la sub-selección por organismo *Homo sapiens*.

Posteriormente se hizo una revisión con el fin de encontrar entre los artículos aquellos que tuvieran datos de secuenciación con al menos dos réplicas biológicas por grupo experimental, que provinieran de tejidos humanos (no cultivos) y que no hubieran sido sometidos a transformación, tratamiento, ni inducción alguna.

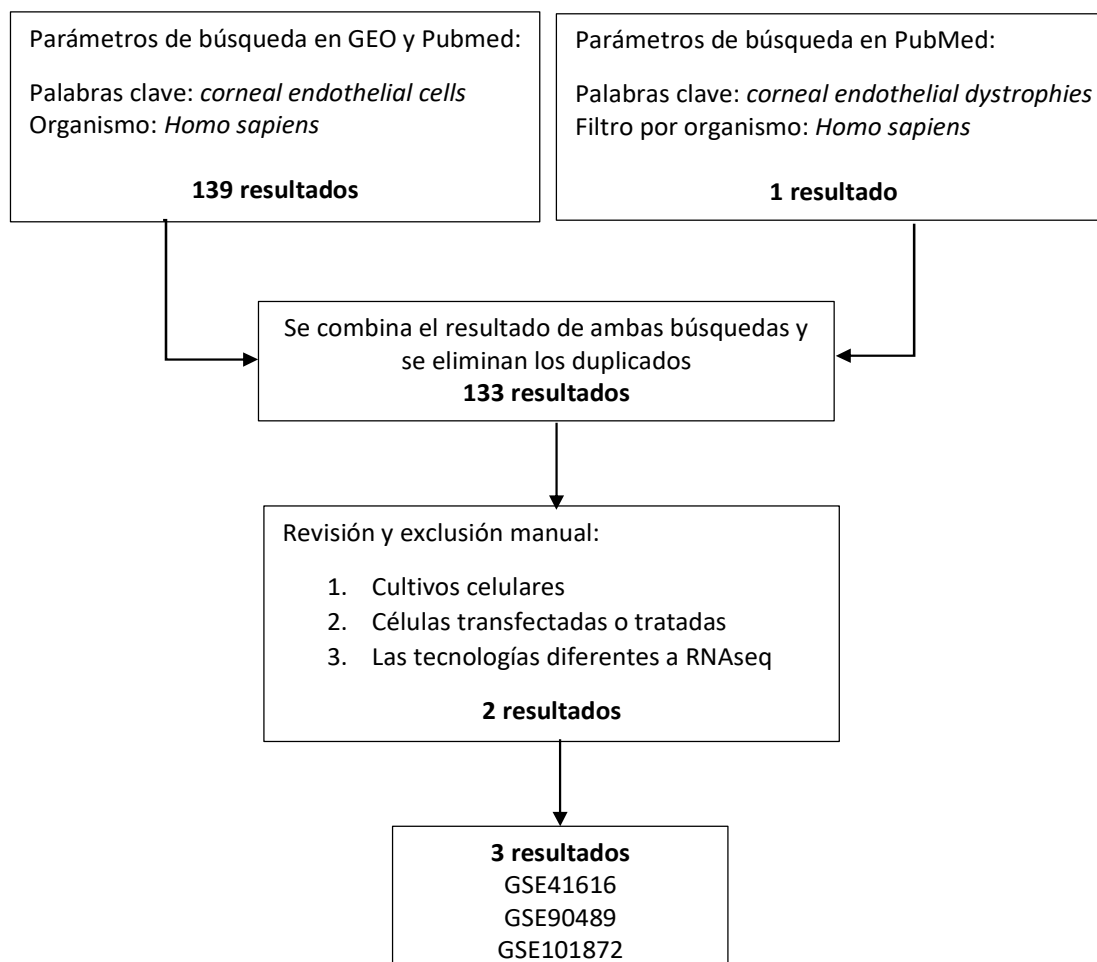


Figura 3.1. Flujograma para la selección de las bases de datos con genes expresados en el endotelio corneal humano.

Se incluyeron las bases con muestras obtenidas de tejido patológico por dos razones, la primera, que dado el objetivo primario de identificar la presencia de los canales en el endotelio corneal, estas bases de datos aportan controles que son útiles para este propósito; y segundo, tener bases de datos de expresión a partir de tejido patológico, también permite evaluar variaciones en la expresión de las proteínas de interés y eventualmente identificar vías de señalización que puedan estar relacionadas con ellas.

Para el estudio *in silico*, los datos se descargaron directamente del sitio web de GEO OMNIBUS (dos casos) o se obtuvieron mediante comunicación con los autores de los estudios originales (un caso).

Según la información proporcionada por los autores en los artículos (Chen et al., 2013; Chung et al., 2017; Du et al., 2015), las muestras de endotelio corneal se obtuvieron a través de bancos de ojos o como muestras frescas durante un procedimiento quirúrgico. Chen y colaboradores obtuvieron los datos de secuenciación a partir de endotelios de la córnea de tres adultos normales (31, 56 y 64 años) que donaron sus córneas al banco de ojos del *Jules Stein Eye Institute* de UCLA.; las muestras de endotelio fetal las obtuvieron a partir de ojos de fetos de 16 y 18 semanas de gestación, proporcionadas por el Departamento de Patología y Laboratorio de UCLA. Chung y colaboradores publicaron datos obtenidos a partir del endotelio de dos pacientes, de 5 y 15 años, que tras ser examinados con lámpara de hendidura tenían un diagnóstico de distrofia corneal polimórfica posterior (PPCD) y fueron llevados a queratoplastia, la muestra se tomó durante el procedimiento quirúrgico y se procesó inmediatamente. Como grupo control usaron el tejido de dos donantes pareados por edad (6 y 17 años) que adquirieron comercialmente a partir de bancos de ojos. Finalmente, Du y colaboradores obtuvieron los datos usando el endotelio de la córnea de cinco pacientes llevados a queratoplastia con diagnóstico de distrofia endotelial de Fuchs calificada en alto grado utilizando la escala de Krachmer modificada (grado 0 (sin guttae) a grado 6 (guttae confluyente con edema corneal). Los datos de córneas humanas normales los obtuvieron de botones corneo-esclerales del bando de ojos *Minnesota Lions Eye Bank* o como muestras frescas de enucleación quirúrgica para patología que no involucraba el segmento anterior del ojo.

Los tres estudios seleccionados correspondían a las bases GSE41616 (Chen et al., 2013), GSE90489 (Chung et al., 2017) y GSE101872 (Du et al., 2015). En total sumaban 16 muestras secuenciadas en la plataforma Illumina HiSeq discriminadas así: nueve de muestras sanas (dos fetales y siete adultos), y siete de muestras con patologías (cinco con endoteliopatía de Fuch y dos de distrofia corneal polimorfa posterior).

De los tres conjuntos de datos seleccionados, dos estaban en GEO OMNIBUS normalizados como RPKM (del inglés *Reads Per Kilobase of transcript and Million mapped reads*), y la otra base de datos tenía el recuento de genes, así que se normalizó a RPKM con el fin de homogenizar las medidas de expresión génica para hacerlas comparables entre sí. Con este fin, inicialmente se sumó el total de lecturas en una muestra, este valor se dividió por un millón y posteriormente se normalizó para la profundidad de secuenciación. Después los recuentos de lectura se dividieron por el factor de escala y, finalmente, los valores se dividieron por la longitud (kilobases) del gen dado.

Usando los archivos de anotación de genoma con la versión hg19 y el software SAMMATE se calculó la abundancia de expresión génica utilizando los datos de RNA-seq de los intervalos genómicos de interés. Con estos datos y el modelo de sobre-dispersión de Poisson EdgeR (Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R), para controlar la variabilidad técnica y evidenciar la variabilidad biológica, se construyeron gráficos de escala multidimensional (MDS). Usando el comando `heatmap.2` de `gplots` del paquete R, se construyeron los mapas de agrupación para los genes de interés y las muestras basándose en la distancia euclidiana entre ellos.

Cada conjunto de datos se analizó de forma independiente para comparar mediante un análisis estadístico los mínimos niveles de réplicas biológicas y la expresión diferencial entre las muestras,

entre fetales y adultos para la base GSE41616, y en los demás, entre controles sanos y muestras de pacientes con distrofia corneal polimorfa posterior (PPCD) (GSE90489) o endoteliopatía de Fuch (GSE101872). Se consideró que un gen está diferencialmente expresado (DEG) en una muestra respecto a otra utilizando el modelo de análisis no paramétrico NOISeqBIO (Tarazona et al., 2015), debido a que en todos los conjuntos de datos analizados, al menos un grupo experimental tenía sólo dos réplicas biológicas. Los métodos implementados en NOISeq son adaptables a los datos, por lo que los supuestos distributivos para el análisis de expresión diferencial no son necesarios. NOISeq calcula la probabilidad de expresión diferencial para cada comparación. Se supuso que un gen estaba diferencialmente expresado si la probabilidad era igual o superior a 0,95 y la magnitud de cambio era superior a 1,5 o inferior a -1,5, considerando un cambio en la expresión con una relación logarítmica en base 2 (\log_2 FC).

Con los genes diferencialmente expresados, a la alta y a la baja, se construyeron vías de señalización utilizando la base de datos para anotaciones, Visualización y descubrimiento integrado (DAVID) (del inglés *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discover*) (*DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis*, s. f.). El objetivo era identificar de una manera imparcial las funciones o vías moleculares enriquecidas a partir de los grupos de genes relacionados (clúster). Las rutas con valores de p inferiores a 0,05 se seleccionaron como enriquecidas y entre ellas se identificaron las que incluían uno o más de los genes de interés. Estas vías se representaron usando la enciclopedia de genes y genomas Kyoto (KEGG) con el fin de explorar las redes de interacción en términos de los grupos ortológicos en los que podrían estar funcionalmente relacionados los canales en estudio, de modo que la evidencia experimental, además de la literatura, permita identificar la función probable de las proteínas a partir de la información genómica analizada. Teniendo en cuenta los genes involucrados en las vías sobre-representadas en las que se encontraron los KCa se construyeron redes de asociación funcional de proteínas utilizando el programa STRING (*STRING: functional protein association networks*, s. f.) con el objetivo de identificar aquellas que estuvieran directamente involucradas con los genes de interés y la participación de los mismos en vías de señalización particulares.

Para validar la concordancia de los resultados *in silico* en relación con la expresión de los genes para los canales de interés, una vez se tuvieron los iniciadores a utilizar y estandarizadas las condiciones, se realizó PCR convencional utilizando la línea celular inmortalizada de endotelio corneal humano descrita por Griffith y colaboradores en 1999 (Griffith et al., 1999) y donada para la realización de este trabajo por el Dr Mitchell A. Watsky, así como endotelio humano obtenido durante queratoplastias por patologías que no comprometen directamente el endotelio.

Para realizar el cultivo de la línea celular, un vial mantenido a -80°C se descongeló y cultivó a 37°C , en frascos de cultivo estándar con Medio de Eagle Dulbecco modificado (DMEM) / F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (20%), insulina-transferrina-selenio (ITS) al 1% (BD Biosciences, Bedford, MA) y $40\ \mu\text{g} / \text{ml}$ de gentamicina (Gibco) en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO_2 . El medio de cultivo se cambió dos veces por semana.

Para los cultivos primarios, las córneas de donantes humanos se obtuvieron durante procedimientos quirúrgicos de pacientes con endotelio sano, en las que el endotelio se disecó de la membrana de Descemet y se incubó en DMEM suplementado con FBS al 8%, factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) 20 ng / ml y penicilina / estreptomina por 18 horas. A continuación, los explantes se incubaron con una solución de EDTA al 0,02% a 37 ° C durante 1 h para separar las células y luego se sembraron en superficies de cultivo pretratadas con colágeno tipo IV (Becton-Falcon) y se incubaron a 37 ° C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%.

Las secuencias de los iniciadores, la temperatura de anillamiento y el tamaño del producto esperado para cada uno, se especifican en la tabla 3.1. Los iniciadores usados, tanto los directos como los inversos, reconocen secuencias presentes en diferentes exones, con excepción de los correspondientes al gen KCNN2. Los iniciadores para los genes KCNN1-3 habían sido previamente descritos por Yu y colaboradores (T. Yu et al., 2012), el iniciador para KCNN4 por Hayashi y colaboradores (Hayashi et al., 2012) y finalmente los iniciadores para KCNT1 y 2 se modificaron a partir de la secuencia publicada por Bonito y colaboradores (Bonito et al., 2016).

Los productos PCR se secuenciaron en un laboratorio externo y se alinearon utilizando BLAST para confirmar la concordancia entre el producto PCR y la proteína de interés tras la identificación y alineamiento de la secuencia de bases.

Nombre del gen	Secuencias de los iniciadores	Tm de reacción*	Tamaño del amplicón (pb)
KCNMA1-F	AGCAATATCCACGCGAACCAT	55	191
KCNMA1-R	AAAGCCCACCACATGCGTT		
KCNMB1-F	AAGGTCAGAGCCAAATCCAAG	55	80
KCNMB1-R	AATAGGACGCTGGTTTCGTTTC		
KCNMB2-F	GACCAACATTCTCTAAGATGTT	55	729
KCNMB2-R	GCATTTATCTATTGATCCGTTGGA		
KCNMB3-F	GGTTTGCCATGATGGGCTTCTC	ND	696
KCNMB3-R	ACAGACATCTGAAGGCCAGCAC		
KCNMB4-F	GTTTCGAGTGACCTTCACCT	60	245
KCNMB4-R	TAAATGGCTGGGAACCAATC		
KCNN1-F	CAGCATCTCCTCCTGGATCAT	57	88
KCNN1-R	GCTGGTCACTTCCTGCTTGTC		
KCNN2-F	TGAGGCTCAGATGGAGAGCTAC	60	102
KCNN2-R	GTTGGTGGTGCTGTGGAAGA		
KCNN3-F	GCCAACACTCTGGTGGACCT	59	141
KCNN3-R	GTTGAAGCTGGCGGTGAGAT		
KCNN4-F	CGCCAGGTGCGGCTGAAAC	55	91
KCNN4-R	GCAGGTCATACAGGATCAT		

KCNU1-F	CTCGAACTCCCTAAAATCTTACAGAT	ND	157
KCNU1-R	TTCCGTTGAGCCAGGGGTCACCAGAATT		
KCNT1-F	GACAAGGGCTGCAAGCACAA	57	209
KCNT1-R	CAGATGGCTTCCAGGAAGTGGT		
KCNT2-F	GGCAGATGCCAAAACCATTG	60	336
KCNT2-R	CAAAGAAACCCAGATCCTGGTG		

Tabla 3.2 Secuencias de los iniciadores directo e inverso para cada KCa y tamaños de productos de PCR esperados para los genes analizados por RT-PCR convencional. Las temperaturas no descritas corresponden a genes que fue no fue posible amplificar. ND=no disponible.

Los productos amplificados y un marcador de peso molecular para ADN de 1 Kb se separaron en un gel de agarosa al 1,2% con bromuro de etidio para la visualización de bandas. Reacciones que se sometieron a todo el protocolo PCR en las que se reemplazó el cDNA por agua se utilizaron como controles negativos y GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) y actina fueron los genes de referencia.

Después de la extracción de RNA de la línea celular o de los tejidos de donantes, la fase orgánica se mezcló con isopropanol para precipitar proteínas, y el sedimento se disolvió en tampón optimizado (Kopec et al., 2017). Las muestras de proteínas diluidas y separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) y se bloquearon. Finalmente, se incubaron durante 4 h con los anticuerpos primarios anti-KCNN2 policlonal primario de conejo (dilución 1: 500; Alomone) o anti-KCNN3 policlonal de conejo (dilución 1: 500; Alomone). Después de la incubación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T, seguido de una incubación de 1 h con anticuerpos secundarios de cabra-anti-conejo (dilución 1: 10000). El inmunocomplejo se detectó utilizando Novex® ECL y el kit de reactivos de sustrato quimioluminiscente (INVITROGEN / NOVEX). Como control positivo se utilizó una muestra de cerebelo obtenida comercialmente.

Finalmente, para verificar la expresión de los canales en células de endotelio de cultivos primarios y en la línea celular, cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 70%, se retiró el medio de cultivo y se fijaron, se permeabilizaron e incubaron con tampón de bloqueo. Durante la noche a 4 °C realizó la incubación de células primarias con un anticuerpo anti KCNT2 policlonal de ratón (dilución 1: 200) (Thermo Scientific), anti-KCNN2 policlonal de conejo primario (dilución 1: 500; Alomone) o anti-KCNN3 policlonal de conejo (Dilución 1:500; Alomone). Al día siguiente, se incubaron en la oscuridad con anticuerpo secundario Alexa 546 cabra- Anti-ratón (1: 500) o Alexa 488 cabra- Anti-conejo (1:500) durante 1 h a temperatura ambiente. Después se tiñeron con DAPI para visualizar el núcleo u se obtuvieron las imágenes.

3. 2 Resultados

3.2.1. Selección de los datos para análisis bioinformático.

Después de una búsqueda de bases de datos que permitieran evaluar la expresión génica global (Figura 3.1), se seleccionaron GSE41616 (Chen et al., 2013), GSE90489 (Chung et al., 2017) y GSE101872 (Du et al., 2015) por cumplir todos los criterios de inclusión.

Base de datos	Identificación	Controles	Casos/Enfermos	Plataforma
GSE41616	A	3 adultos	2 fetos	Illumina HiSeq 2000
GSE90489	B	1 adulto/1 niño	2 PPCD	Illumina HiSeq 3000
GSE101872	C	2 adultos	5 FECD	Illumina HiSeq 2000

Tabla 3.3 Descripción de las bases de datos incluidas en el análisis de la expresión de genes del endotelio corneal humano. Se analizaron tres conjuntos de datos en los que se incluyen muestras normales y patológicas analizadas con la tecnología Illumina HiSeq. Los estudios identifican de A -C para referencia posterior. A, GSE41616; B, GSE90489; C, GSE101872.

En estos estudios, las muestras fueron secuenciadas utilizando la plataforma Illumina HiSeq (Tabla 3.3). En total 16 muestras se incluyeron en el análisis y se clasificaron de la siguiente manera: nueve muestras sanas (dos fetales, una pediátrica y seis adultos) y siete muestras con patologías (cinco con endoteliopatía de Fuchs (FECD) y dos con muestras de distrofia corneal polimórfica posterior (PPCD)).

El análisis de estas muestras permitió identificar la expresión de cuatro de los seis canales de interés en las células endoteliales corneales humanas y la confirmación de la expresión de IK previamente informada por Anumanthan y colaboradores en 2018 (Anumanthan et al., 2018).

3. 2. 2. Análisis bioinformático y mapa de calor.

Los gráficos de escala MDS y el análisis de estos mostró afinidad genética en los sub-grupos de cada estudio para todos los grupos de datos, particularmente entre los controles (Figura 3.2).

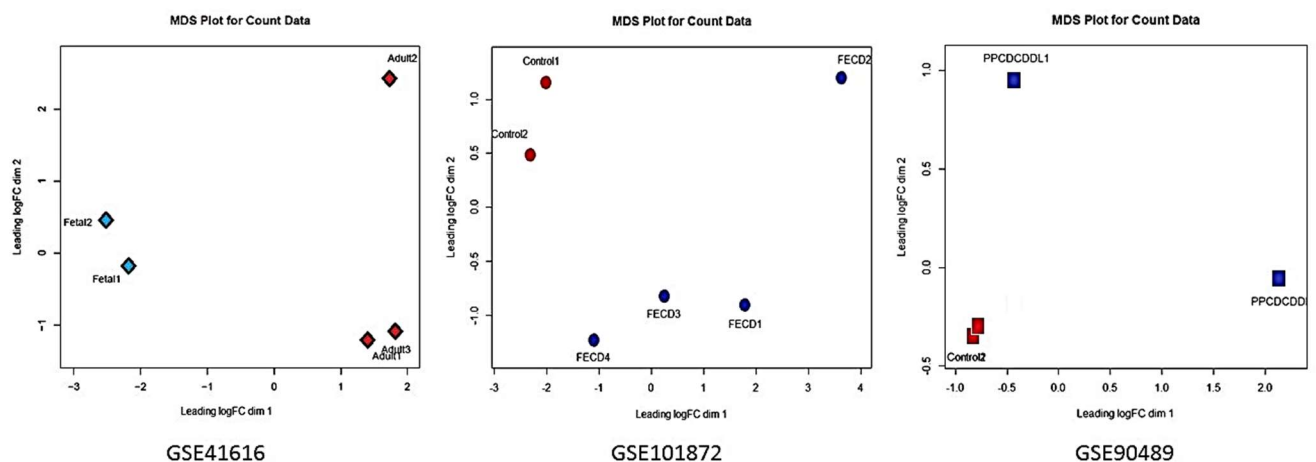


Figura 3.2. Análisis MDS para los datos de los estudios A, GSE41616; B, GSE90489; y C, GSE101872.

Las patologías pueden generar variabilidad biológica determinada por el estadio, pero en general la discriminación para la agrupación entre casos y controles es evidente.

Se construyó un clúster bidireccional utilizando la expresión normalizada en RPKM de los genes de interés en las muestras fetales, adultas, de control y patológicas (Figura 3.3).

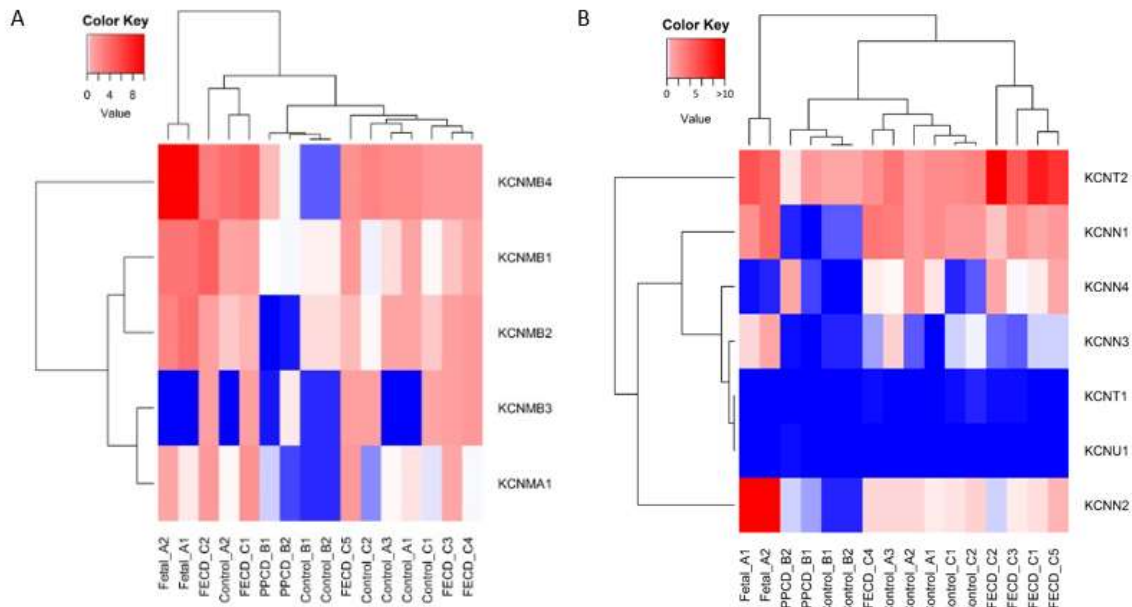


Figura 3.3 Mapa de calor de dos vías para los genes de los canales de interés. (A) Genes que codifican para el poro de BigK (*KCNNA1*) y unidades reguladoras β 1 a 4 (*KCNNB1*, *KCNNB2*, *KCNNB3*, *KCNNB4*). (B) Genes que codifican para los canales de conductancia intermedia (*KCNN4*), canales de baja conductancia (*KCNN1*, *KCNN2*, y *KCNN3*), y canales de alta conductancia activados por sodio y calcio (*KCNT1*, *KCNT2*, *KCNU1*). Los genes y las muestras se agruparon de forma no supervisada. Los genes con RPKM inferior a 0,1 están coloreados en azul. Los RPKM de 0, 1 a 23 están coloreados de blanco a rojo de acuerdo con los códigos de color de cada figura. Los estudios se identificaron de A a C como se mencionó anteriormente en la Tabla 3.2. Todas las muestras de control se obtuvieron del endotelio corneal de un adulto sano. FECD, distrofia corneal endotelial de Fuchs; PPCD, distrofia corneal polimorfa posterior.

En la figura 3.3, el dendrograma a la izquierda, en el componente vertical, representa el agrupamiento jerárquico basado en el nivel de expresión de cada gen, mientras que el dendrograma horizontal superior representa el agrupamiento jerárquico de las muestras. El agrupamiento evidenció grupos distintivos. Todas las muestras fetales analizadas se agruparon juntas en los dos análisis, considerando el análisis para los KCa de conductancia baja e intermedia y los canales activados por sodio, cuatro de las cinco muestras FECD se agruparon juntas; sin embargo, esta distribución no se mantiene con los genes que codifican BK. En ambas condiciones, todas las muestras de pacientes con PPCD se agruparon con los controles adultos sanos.

El análisis de los niveles de expresión de *KNCT2*, el gen que codifica para el canal SLICK, mostró un patrón de expresión único determinado para el nivel más alto en todas las muestras analizadas y entre ellos, un mayor nivel de expresión en el grupo de muestras de FECD. Los genes *KCNN2* y *KCNMB4*, que codifican el canal SK2 y la subunidad reguladora de BK β 4 respectivamente, mostraron un mayor nivel de expresión en muestras fetales en comparación con las de los adultos independiente del estado de salud. Los genes *KCNMB1*, *KCNMB2*, *KCNN1*, *KCNN3* y *KCNN4* que codifican para las subunidades reguladoras de BK tipo β 1 y 2 y los canales SK1, SK3 e IK respectivamente, mostraron un nivel de expresión intermedio. Es notorio el nivel más bajo de expresión del gen *KCNN4* que se observó en las muestras fetales en comparación con las muestras de adultos. Los genes *KCNMA1* y *KCNMB3* que codifican para el poro de BK y su subunidad reguladora β 3 se expresan en niveles intermedios en muestras de pacientes con FECD, pero prácticamente no se expresan en muestras de personas sanas. El análisis de los genes provenientes de pacientes con PPDC evidencia una menor expresión de *KCNMB2*, el gen que codifica para la subunidad regulatoria β 2 en estos pacientes respecto a los controles y los pacientes con FECD. Los genes *KCNT1* y *KCNU1* que codifican SLACK y los canales SLO3 respectivamente, mostraron un nivel de expresión menor a 0,1 en todas las muestras analizadas.

Los productos de amplificación de los genes *KCNMB3*, *KCNMB4*, *KCNN1*, *KCNN2*, *KCNN3*, *KCNN4*, *KCNT2* en células endoteliales corneales humanas se confirmó mediante RT-PCR convencional. *KCNMB3* solo se encontró cuando se utilizan cultivos en los que la suplementación de ITS se reduce a la mitad (0.5mg/ml de insulina). La reducción del suplemento implica también un cambio en las concentraciones de selenio (de 0.55 mg/ml a 0.275 mg/ml) y transferrina (0.00066 mg/ml a 0.00033 mg/ml) (figura 3.4). Se usó *GAPDH* como gen constitutivo para el control positivo y agua como control negativo. En estas mismas condiciones es posible ver cambios que sugieren algo de amplificación de *KCNMA1*, aunque no concluyente. Los genes *KCNMB1* y *KCNMB2*, aunque mostraban niveles intermedios de expresión en las pruebas *in silico*, no tuvieron productos de amplificación visibles.

Los productos PCR para *KCNN1*, *KCNN2*, *KCNN3*, *KCNN4* y *KCNT2* se secuenciaron en un laboratorio externo en ambas direcciones. Los resultados se visualizaron mediante FitchTV y las secuencias se alinearon con el banco de datos de ADN utilizando ClustalX y BLAST. Los resultados de nuestros productos de PCR mostraron una similitud del 100% de correspondencia para los genes *KCNN3* y *KCNT2* y una similitud del 98% para el producto del gen *KCNN2*.

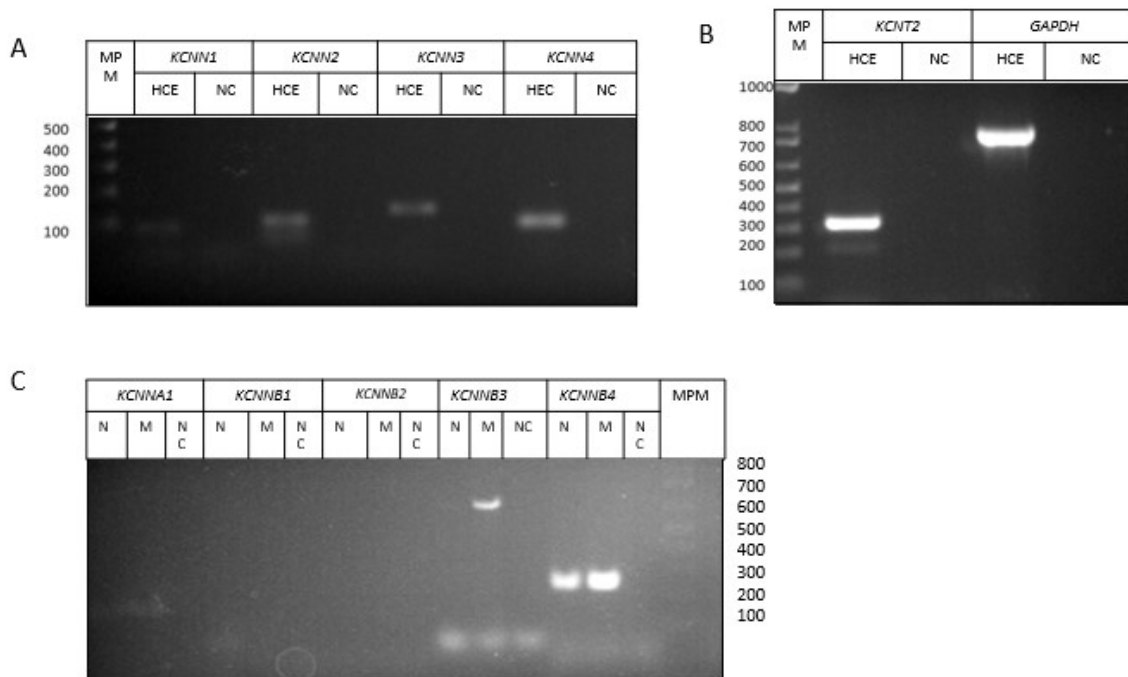


Figura 3.4 Expresión de los genes de canales de conductancia pequeños y canales SLICK en células de una línea de endotelio corneal humano. (A) Productos de amplificación por PCR de los genes *KCNN1*, *KCNN2*, *KCNN3* (B) Productos de amplificación por PCR de los genes *KCNT2* y *GAPDH* (C) Productos de amplificación por PCR de los genes *KCNMA1*, *KCNMB1*, *KCNMB2*, *KCNMB3* y *KCNMB4*.

El producto de PCR del gen *KCNN1* no fue visible de manera consistente en los gels de las réplicas realizadas para el experimento y la secuenciación del producto amplificado no fue concluyente (coincidencia del 68%).

La RT-PCR utilizando material genético obtenido a partir de endotelio corneal humano *ex vivo* permitió detectar los genes *KCNN2*, *KCNN3* y *KCNT2* (figura 3.5). Se usó el gen que codifica la proteína actina como gen constitutivo para el control positivo y agua como control negativo.

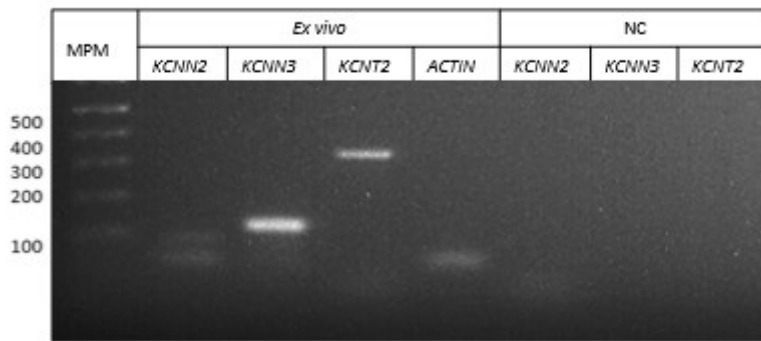


Figura 3.5 Expresión de los genes de canales de conductancia pequeños y canales SLICK en células de endotelio corneal humano *ex vivo*. Se presentan los productos de amplificación por PCR de los genes *KCNN2*, *KCNN3*, *KCNT2* y el gen que codifica la actina

3.2.3 Expresión de proteínas

La expresión de los canales a nivel de proteína se confirmó en la línea celular y en muestras *ex vivo*. Se utilizó Western Blot para la detección de la expresión de los canales SK2 y SK3 en la línea celular y en tejido *ex vivo* (figura 3.6). Existe una ligera diferencia en la migración de las muestras *ex vivo* que podría deberse a modificaciones postraduccionales de la proteína. GAPDH fue la proteína de control de carga, y se utilizó una muestra comercial de cerebelo como control positivo.

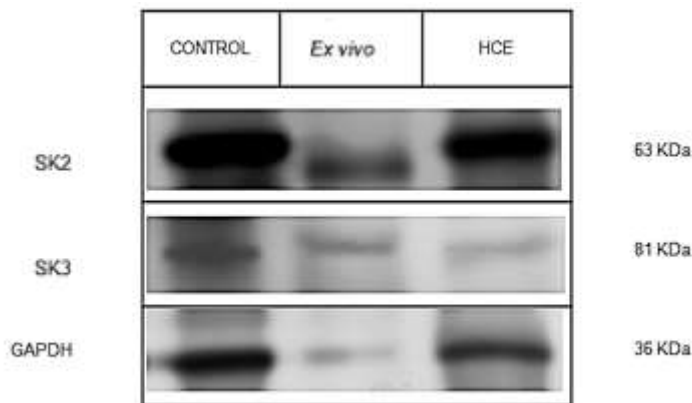


Figura 3.6. Expresión de proteínas de los genes de los canales de conductancia pequeños en las células endoteliales de la córnea humana. Resultados del Western blot de los canales SK2 y SK3 en la línea celular (HCE) y en células endoteliales corneales humanas *ex vivo*. Control positivo muestra comercial de Cerebelo

La inmunofluorescencia permitió la ubicación celular de los canales. La marcación por inmunofluorescencia del canal SLICK en células endoteliales corneales primarias lo detectó en la membrana plasmática y en la región perinuclear de las células. La marcación por inmunofluorescencia de los canales SK2 y SK3 en células de la línea celular identificó su presencia en la membrana plasmática, el nucleoplasma y el citosol (figura 3.7).

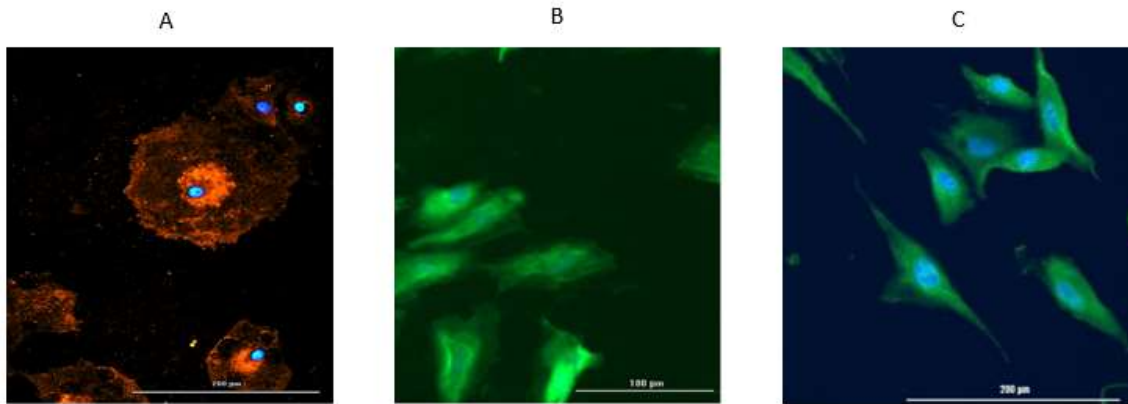


Figura 3.7 (A) Inmunofluorescencia del canal SLICK en un cultivo primario de células endoteliales de la córnea. Anticuerpo secundario conjugado con Alexa 546. (B) Inmunofluorescencia de canales SK2 en células de la línea de endotelio corneal humano (C) Inmunofluorescencia de canales SK3 en células de la línea celular. (B) y (C) Anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488.

3.2.4 Identificación de genes expresados diferencialmente.

La comparación del transcriptoma completo de muestras fetales frente a adultas, y PPCD o FECD frente a sus homólogos sanos permitió identificar los DEG (genes expresados diferencialmente) tabla 3.4. De la lista de DEG, seleccionamos los genes que codifican para los canales iónicos de interés.

Estudio	Genes totales	DEG
A	13914	2560
B	17646	592
B	23344	1612

Tabla 3.4. Genes expresados en cada estudio y DEG identificados. La expresión diferencial se considera con una probabilidad de al menos 0,95 y una diferencia de cambio en \log_2 superior a 1,5 o inferior a -1,5. Los estudios se renombran como se mencionó anteriormente: A, GSE41616; B, GSE90489; C, GSE101872.

El gen *KCNN2* se regulaba positivamente en los tejidos fetales frente a los adultos, mientras que el gen *KCNN4* mostró la tendencia contraria (se regulaba negativamente en los tejidos fetales frente a los adultos). El análisis del grupo de muestras relacionadas con patologías endoteliales mostró que la expresión del gen *KCNN4* estaba regulada al alza en las muestras de PPCD y FECD en comparación

con los controles. La expresión del gen KCNT2 se incrementó en las muestras FEDC en comparación con los controles sanos (Tabla 3.5).

Gen	Estudio A		Estudio B		Estudio C	
	logFC	Prob	logFC	Prob	logFC	Prob
<i>KCNMA1</i>	0.988	0.539	1.343	0.740	3.724	0,999
<i>KCNMB1</i>	2.694	1.000	-0.474	0,051	3.216	0,971
<i>KCNMB2</i>	2.380	0.999	-4.687	1	1.572	0,542
<i>KCNMB3</i>	0.000	0.000	2.886	0.857	0.246	0,059
<i>KCNMB4</i>	2.451	1	2.956	0.948	0.195	0,050
<i>KCNN1</i>	0.433	0.164	1.345	0.087	0.118	0.044
<i>KCNN2</i>	5.240	1.000	2.045	0.890	-0.133	0.037
<i>KCNN3</i>	1.741	0.690	-1.150	0.003	-0.63	0.3159
<i>KCNN4</i>	-5.481	1.000	5.182	0.999	3.71	0.998
<i>KCNU1</i>	0.00	0.000	-0.023	0.215	NE	NE
<i>KCNT1</i>	0.00	0.000	-0.840	0.073	-0.567	0.000
<i>KCNT2</i>	1.029	0.821	0.209	0.369	1.927	0.974

Tabla 3.5. Identificación de DEG. Las diferencias en la expresión génica están marcadas con letras color rojo. Se consideró significancia de probabilidad $p > 0,95$ y magnitud de cambio $\log_2 > 1,5$ o $< -1,5$. NE, significa que el gen no se expresa. Los estudios se nombran como se mencionó anteriormente: GSE41616 (A), GSE90489 (B) y GSE101872 (C).

3.2. 5. Análisis de interacciones funcionales

Dado que los genes que codifican para KCCN1, KCNN2, KCNN3 y KCNT2, se describen por primera vez en células endoteliales y se confirma la presencia de las proteínas de estos canales en estas células y se confirma la expresión del gen *KCNN4*, es importante identificar las vías funcionales en las que estos canales podrían estar involucrados. Para ello, se realizó un análisis de sobrerrepresentación usando los DEG en cada conjunto de datos. De la lista de procesos biológicos desregulados, se analizaron en detalle los que involucran a los genes *KCNN2*, *KCNN3* y *KCNN4*. No se encontraron procesos desregulados relacionados con KCNT2.

En todas las bases de datos seleccionadas, KCNN4 se relacionó con los procesos de digestión y absorción de proteínas asociado a BK y, en dos de ellas, las que incluían muestras de personas con patologías endoteliales, se encontró asociado a la secreción salivar acuosa (Tabla 3.6).

Base de datos	Gen	Categoría	Término	Recuento	Valor de p	FE	Benjamini
A	KCNN4	KEGG_PATHWAY	hsa04974: Protein digestion and absorption	32	2,63E-6	2.4	0.00019
	KCNN2	KEGG_PATHWAY	hsa04726: Serotonergic synapse	27	0.015	1.6	0.095
	KCNN2 KCNN4	KEGG_PATHWAY	hsa04911: Insulin secretion	21	0.028	1.6	0.15
B	KCNN4	KEGG_PATHWAY	hsa04974: Protein digestion and absorption	23	0.0069	1.9	0.0375
	KCNN4	KEGG_PATHWAY	hsa04970: Salivary secretion	18	0.0619	1.6	0.2992
C	KCNN4	KEGG_PATHWAY	hsa04974: Protein digestion and absorption	22	9.5E-6	2.9	1.1E-4
	KCNN4	KEGG_PATHWAY	hsa04970: Salivary secretion	13	0.058	1.8	0.26

Tabla 3.6. Procesos biológicos sobrerrepresentados en los que intervienen los canales SK e IK. El recuento corresponde al número de DEG que participan en la vía, el enriquecimiento (FE= por sus siglas en inglés *fold enrichment*) es el número de veces que hay más DEG en el proceso de lo esperado por casualidad.

Con el fin de identificar funcionalmente los mecanismos específicos en los que participan los canales en estudio se realizó la reconstrucción de los grupos ortológicos en lo que se representaron los KCa utilizando la enciclopedia de genes y genomas Kyoto (KEGG). En las figuras 3.7 y 3.8 se muestran las vías sobre-representadas en al menos dos de los tres estudios analizados. En la vía correspondiente a la vía de digestión y absorción de proteínas y en la vía de secreción salivar el canal involucrado es KCNN4, y ambos casos se ubica en la membrana basolateral de las células. En la secreción y absorción de proteínas, el canal parece estar funcionalmente acoplado a la modulación del potencial de membrana, ya que se ubica paralelo a la de bomba Na^+/K^+ ATPasa y participa en un mecanismo de recirculación de potasio. Estos gradientes acoplan funcionalmente la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa con la de otros canales ya que, al estimular la actividad de la bomba, se reduce el sodio intracelular y se generan gradientes electrosmóticos que impulsan el movimiento de sodio y

otros iones en la cara apical. Adicionalmente, los IK podrían estar relacionados indirectamente con la modulación apical del recambio de péptidos, lo que específicamente para las células endoteliales puede corresponder con los ciclos de remodelación de la membrana de Descemet o con el paso de aminoácidos por vías aun no descritas.

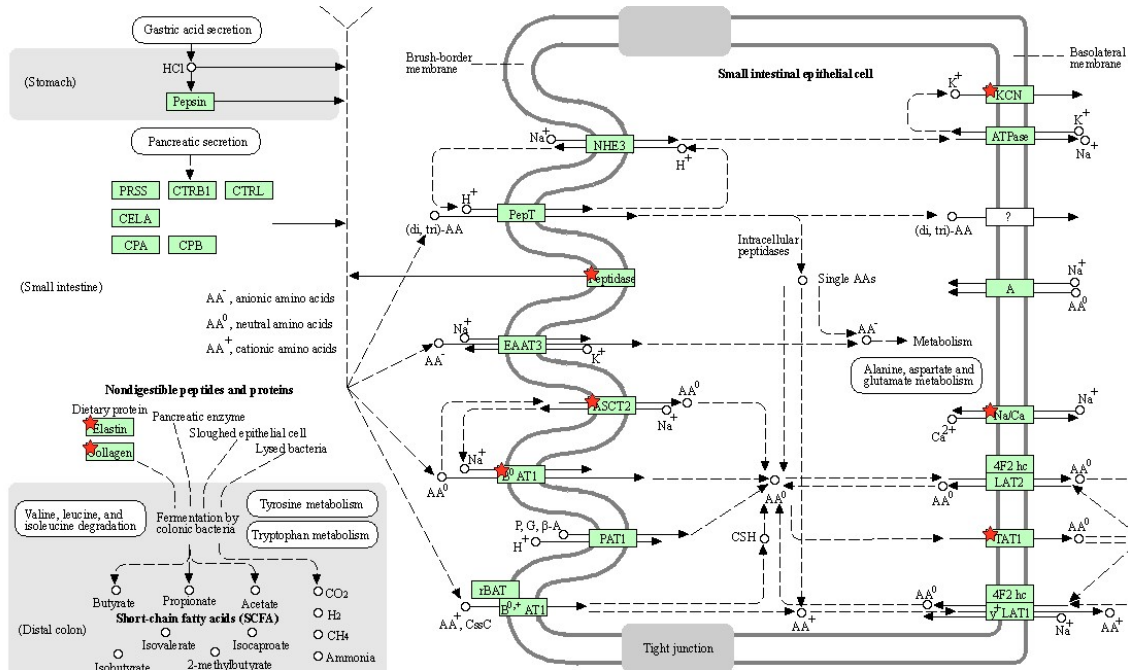


Figura 3.8. Análisis de la vía de KEGG hsa04974: digestión y absorción de proteínas sobre representada en todas las bases de datos. Los genes desregulados que se detectaron mediante análisis de enriquecimiento DAVID están marcados con una estrella roja.

En la secreción salival, el canal aparece IK funcionalmente acoplado a los BK, y ambos participan en la salida de potasio en respuesta al aumento de calcio intracelular liberado desde el retículo sarcoplasmático por vías que involucran el inositol-tri-fosfato (IP3) y el receptor de rianodina. Ese acople con señales mediadas por calcio los relaciona particularmente a cuatro respuestas, una intracelular que integra señales mediadas por fosfolipasa C, calmodulina y óxido nítrico y tres apicales: la traslocación de acuaporinas, la secreción de cloro mediada por calcio y la exocitosis de proteínas.

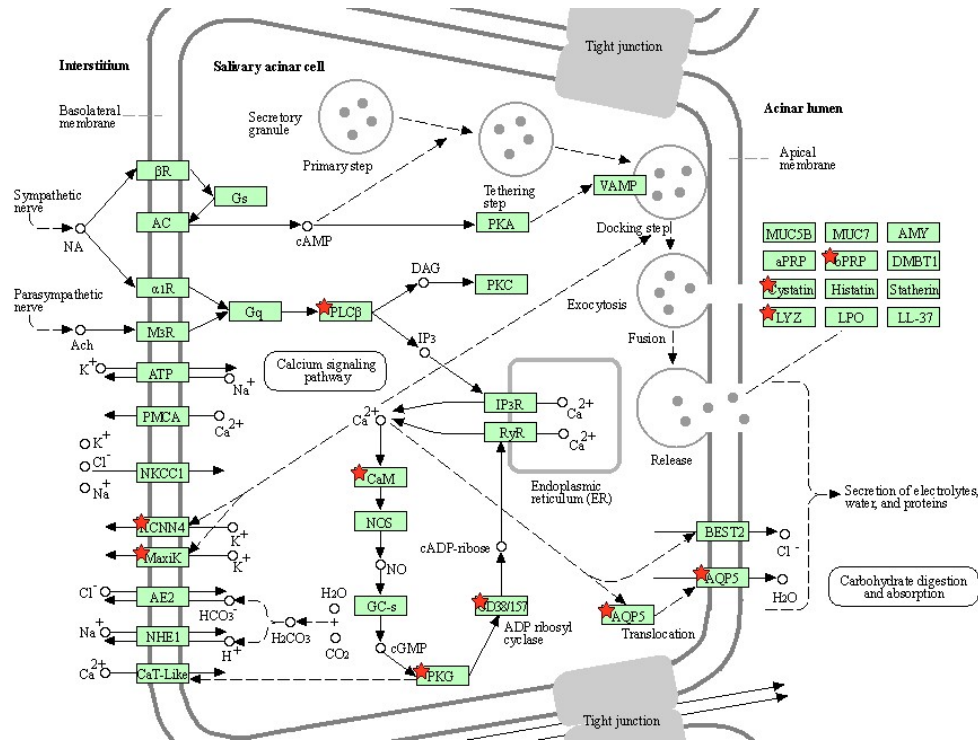


Figura 3.9. Análisis de la vía de KEGG hsa04970: secreción salival sobre representada en las muestras de pacientes respecto a los controles. Los genes desregulados que se detectaron mediante análisis de enriquecimiento DAVID están marcados con una estrella roja.

Tomando en consideración el grupo de genes involucrados en las vías sobre-representadas que incluyen los KCa, se realizó el análisis de interacción proteína-proteína utilizando la herramienta STRING. Las redes resultantes en la vía de digestión y absorción de proteínas (figura 3.9A) y en la vía de secreción salival (figura 3.9B) comprendían significativamente más interacciones de las esperadas para un conjunto aleatorio de tamaño similar extraído del genoma, lo que implica una intersección funcional significativa de las proteínas representadas. En la vía de digestión y absorción de proteínas, el número esperado de interacciones fue 37 y el número real 362 (valor p de enriquecimiento 1.0×10^{-16} ; puntuación de confianza: media, 0,4). En la vía de secreción salival para una interacción esperada, el número real de interacciones fue 10 (valor p de enriquecimiento 6.74×10^{-10} ; puntuación de confianza: alta, 0,7).

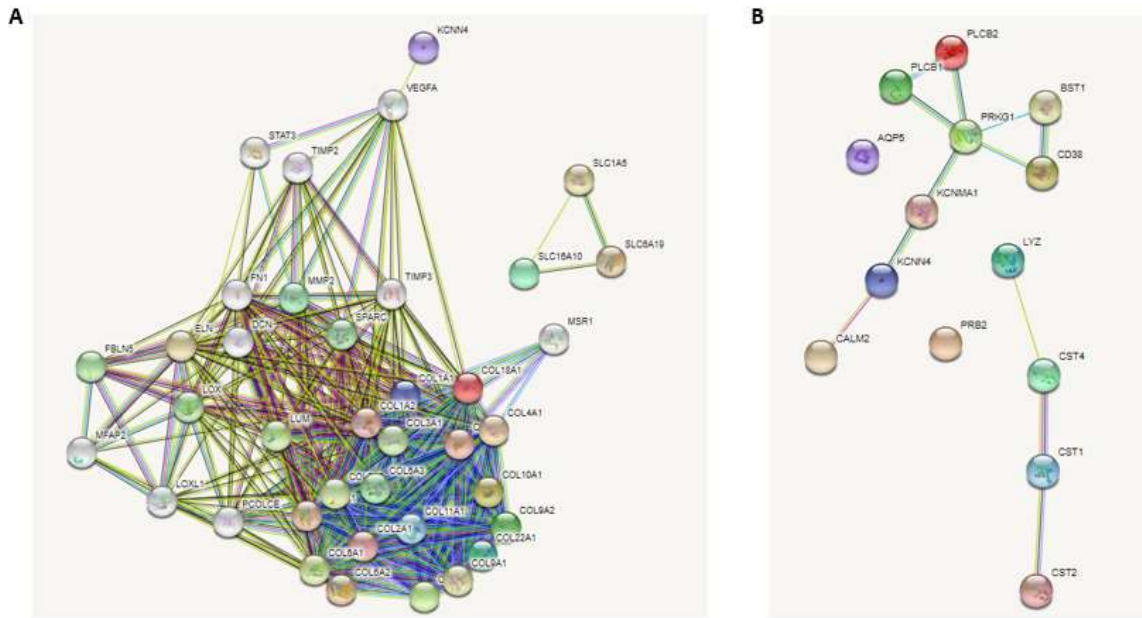


Figura 3.10: Análisis de interacción proteína-proteína (STRING). (A) Conectividad de red del grupo de proteínas involucradas en la vía de digestión y absorción de proteínas. (B) Conectividad de red del grupo de proteínas involucradas en la vía de secreción salival.

3.3 Discusión de los resultados

Los canales iónicos son poros transmembrana útiles para el movimiento de iones a través de la bicapa lipídica. Una vez que los iones seleccionados pasan a través de estos poros, los eventos de señalización eléctrica juegan un papel importante en diferentes funciones biológicas, incluida la proliferación, la migración y la regulación de la homeostasis de líquidos y electrolitos entre el espacio extracelular y el intracelular. Específicamente, en el endotelio corneal, los canales iónicos están involucrados en el flujo de agua hacia la cámara anterior (Mergler & Pleyer, 2007; Yang et al., 2003) y también participan en otras funciones fisiológicas como la respuesta al estrés oxidativo (Mergler et al., 2005), la regulación del volumen celular (Fischbarg, 2010), la detección de temperatura, los cambios metabólicos y las respuestas al estrés mecánico (Bourne, 2003). El número de estudios que correlacionan los canales iónicos con enfermedades de la córnea ha aumentado con el tiempo (Bonanno, 2012; Jalimarada et al., 2013), y se reconocen como nuevos objetivos potenciales para aplicaciones terapéuticas (Anumanthan et al., 2018).

En este estudio se identificó la expresión de los genes *KCNN2*, *KCNN3* y *KCNT2* tanto *in silico* como *in vitro* y en concordancia con el estudio publicado por Anumanthan y colaboradores (Anumanthan et al., 2018), nuestros resultados *in silico* mostraron la expresión del gen *KCNN4* en el endotelio corneal. Resulta particularmente interesante la evidencia *in silico* de la expresión diferencial de los genes *KCNN2* y *KCNN4* entre muestras fetales y adultas, así como la diferencia en la expresión génica entre muestras de pacientes con distrofias y sus controles, particularmente la regulación positiva

del gen *KCNN4* en ambas patologías y la regulación positiva del gen *KCNT2* en muestras de pacientes con distrofia de Fuchs.

Los canales SK2 y SK3 se han descrito principalmente en células excitables como neuronas (Deignan et al., 2012; Pedarzani & Stocker, 2008) o cardiomiocitos (Gu et al., 2018). En estas células participan en la integración de cambios de la concentración de Ca^{2+} intracelular con modificaciones en la conductancia para el K^+ involucradas en la estabilización del potencial de membrana. Esta función suele estar asociada con la actividad de los canales de calcio activados por voltaje, como los canales de Ca^{2+} tipo L, o canales intracelulares como el receptor de rianodina, y participan en el anclaje del citoesqueleto y la reducción de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (Lu et al., 2009; T. Yu et al., 2012). En la tabla 3.7 se describen distintas células en las que se han encontrado SK1-3, IK y SLICK así como el rol fisiológico descrito en cada una de ellas.

Nombre del canal (nombre alternativo; nombre del gen)	Proceso celular	Tipo celular	Referencia
K_{Ca}2.1 (SK1, SKCa1; KCNN1)	Respuesta al esfuerzo tangente.	Endotelio vascular.	(Takai et al., 2013) (Takai et al., 2013)
K_{Ca}2.2 (SK2,1 SKCa2; KCNN2)	Neuro protección, proliferación, secreción.	Neuronas corticales, melanoma y células del epitelio biliar.	(D'Arcangelo et al., 2019; Dolga et al., 2013; Feranchak et al., 2004) (D'Arcangelo et al., 2019; Dolga et al., 2011; Feranchak et al., 2004)
K_{Ca}2.3 (SK3, hKCa3, SKCa3; KCNN3)	Migración celular y disfunción del endotelio vascular en diabetes.	Células de cáncer de mama humano, células epiteliales de colon murino, células progenitoras neurales y endotelio vascular de ratas diabéticas.	(Chantome et al., 2009; Liebau et al., 2007; Potier et al., 2010)(Chantome et al., 2009; Liebau et al., 2007; Potier et al., 2010)
K_{Ca}3.1* (SK4, IK1, Gardos channel, K_{Ca}4, IK_{Ca}1; KCNN4)	Regulación del volumen celular, diferenciación, activación, proliferación,	Células de eritroleucemia murina (MEL), linfocitos, células musculares lisas vasculares humanas, células de	(Anumanthan et al., 2018; Begenisich et al., 2004; Bonito et al., 2016; Kaushal et al., 2007; Koegel et al., 2003; Lauf et

	cicatrización de heridas, neurotoxicidad, migración, secreción de fluidos	colangiocarcinoma intrahepático, células gliomas, fibroblasto corneal humano, células epiteliales bronquiales, células de glioblastoma, osteoclasto, microglía, hepatocitos, células humanas del cáncer de colon, glándulas submandibulares, queratinocitos, células madre mesenquimales, células epiteliales de lente, células epiteliales intestinales	al., 2008; McFerrin et al., 2012; Ouadid-Ahidouch and Ahidouch, 2013; Robles-Martínez et al., 2017; Romanenko et al., 2007; Sciacaluga et al., 2010; Song et al., 2017; Steudel et al., 2017; Trinh et al., 2008; Vandorpe et al., 1998; Vigneault et al., 2018)(Anumanthan et al., 2018; Begenisich et al., 2004; Bonito et al., 2016; Feranchak et al., 2004; Kaushal et al., 2007; Koegel et al., 2003; Lauf et al., 2008; McFerrin et al., 2012; Ouadid-Ahidouch & Ahidouch, 2013; Robles-Martínez et al., 2017; Romanenko et al., 2007; Sciacaluga et al., 2010; Song et al., 2017; Steudel et al., 2017; Trinh et al., 2008; Vandorpe et al., 1998; Vigneault et al., 2018)
K_{Ca}4.2 (Slick, Slo2.1, KCNT2, K_{Na}1.2; KCNT2)	Regulación del volumen celular, secreción en las células pancreáticas, ajuste del potencial de membrana neuronal en reposo.	Células de conductos pancreáticos murinos, células epiteliales renales y neuronas.	(Hayashi et al., 2012; Kaczmarek, 2013; Paulais et al., 2006; Tejada et al., 2017, 2014)(Hayashi et al., 2012; Kaczmarek, 2013; Paulais et al., 2006; Tejada et al., 2017)

Tabla 3.7. Células en las que se han encontrado SK1-3, IK y SLICK así como y el rol fisiológico descrito en cada una de ellas.

Aunque el canal SK2 podría participar en la regulación del flujo transendotelial en el endotelio corneal, la diferencia de expresión génica entre muestras fetales y adultas centra la atención en el papel de este canal en la proliferación y la neuroprotección (D’Arcangelo et al., 2019; Dolga et al.,

2011; Tajima et al., 2006). En entornos hipóxicos, la expresión del gen *KCNN2* está regulada positivamente por factores inducibles por hipoxia (HIF), y esta sobreexpresión del canal se asocia con una mayor capacidad proliferativa de las células (Tajima et al., 2006). El desarrollo prenatal ocurre en un ambiente con presiones de oxígeno inferiores a las posnatales y en este contexto, los HIF podrían regular al alza la expresión del gen *KCNN2* induciendo el estado proliferativo de las células del endotelio corneal. Después del nacimiento, cuando aumenta la presión del oxígeno, las células endoteliales corneales exhiben una capacidad proliferativa reducida en general en la que podría participar la regulación a la baja de *KCNN2*.

La expresión del gen *KCNN4* es menor en las muestras fetales en comparación con las de los adultos. En humanos, el canal IK se ha correlacionado fisiológicamente con tres funciones principales: secreción de fluidos, control del volumen celular y proliferación. En las células epiteliales, se ha descrito como modulador de la magnitud de la secreción (Romanenko et al., 2007) y también parece participar en la regulación del volumen celular (Lauf et al., 2008; J. Wang et al., 2003). En células no epiteliales, el IK usualmente promueve la proliferación (Koegel et al., 2003; Millership et al., 2010; Vigneault et al., 2018), lo que ha permitido que se considere como una posible diana terapéutica para el cáncer (Steudel et al., 2017). Sin embargo en algunas células como los astrocitos, ha mostrado un efecto bimodal dependiente de la fase en la que se encuentre la célula (Sundelacruz et al., 2009).

En primer lugar, el canal IK podría participar en el movimiento de los fluidos en el endotelio corneal. Según la teoría electro-osmótica, el movimiento de iones a través del endotelio corneal genera y mantiene una diferencia de potencial transendotelial de $\sim 0,5$ mV y esto es importante para el movimiento de iones de Na^+ y Cl^- y el movimiento secundario del agua hacia la cámara anterior (F. P. J. Diecke et al., 2007). Para mantener la composición iónica intracelular, el flujo de salida de K^+ debe estar acoplado al movimiento de otros iones como el Na^+ y el Cl^- , de este modo, los canales de potasio desempeñan un papel fundamental en la regulación del transporte transendotelial (Fischbarg, 2010). En el epitelio intestinal (Barrett & Keely, 2000) y en el epitelio de las vías respiratorias (Bernard et al., 2003), la activación de los canales KCa basolaterales desempeña un papel importante en el control del potencial de membrana apical y por lo tanto en el flujo hidroelectrolítico. La salida de K^+ hiperpolariza las membranas basolaterales; por lo tanto, se genera un gradiente eléctrico que impulsa la secreción de Cl^- (Bernard et al., 2003) de forma similar a como se representó en las vías de secreción salival construidas con los DEG. La bomba de Na^+K^+ ATPasa mantiene una baja concentración de sodio intracelular, y dado que intercambia tres cationes de Na^+ (hacia afuera) por dos de K^+ (hacia adentro) hace que el interior de la célula sea electronegativo con respecto al líquido extracelular, proporcionando la fuerza para impulsar la salida de cloruro (Barrett & Keely, 2000) y en el caso del endotelio probablemente el flujo apical de sodio.

En segundo lugar, KCa podrían estar involucrados en la migración y la proliferación de las células del endotelio de la córnea de manera similar a como se ha descrito que lo hacen en otros tejidos oculares (Anumanthan et al., 2018) y extraoculares (Robles-Martínez et al., 2017; Vigneault et al., 2018). Los tejidos epiteliales conectados por uniones estrechas actúan como una barrera para mantener estables el potencial transepitelial y la permeabilidad. Cuando se lesiona el epitelio se

produce una disrupción de la barrera y en el epitelio intacto circundante se generan campos eléctricos y corrientes iónicas alrededor de la herida con el fin de estimular la migración y proliferación de las células circundantes, lo que contribuye al cierre del defecto (Reid & Zhao, 2014). Aunque el proceso de cicatrización de heridas en el endotelio corneal no se comprende completamente, algunos experimentos con córneas de bovino y conejo, respectivamente, han mostrado campos eléctricos endógenos favorecidos por oscilaciones de calcio y corrientes de iones después de un trauma (Justet et al., 2019; Rae & Watsky, 1996). Las células lesionadas mostraron una corriente catiónica alrededor de la herida y este cambio eléctrico desaparece progresivamente en los siguientes días en la medida en que el proceso de curación se lleva a cabo (Watsky, 1995). Esta corriente, podría coincidir con la onda eléctrica descrita por Justet y colaboradores en 2019 que se inicia por un aumento del Ca^{2+} intracelular, mediado por IP_3 , y se propaga desde las células ubicadas en el borde de la herida hacia el resto de la monocapa (Justet et al., 2019). Adicionalmente, Vieira y sus colaboradores evidencian que después de herir la córnea de una rata, la onda de calcio es seguida por una gran salida de potasio (Vieira et al., 2011) lo que sugiere que este mecanismo de respuesta podría estar mediado por KCa .

En epitelios como el intestinal, los canales IK están involucrados en la migración de las células epiteliales y la disfunción de la barrera epitelial. En el modelo celular propuesto por Zundler y colaboradores, la inhibición de IK promueve la cicatrización de heridas; sin embargo, en condiciones inflamatorias inducidas por interferón γ ($\text{IFN-}\gamma$) la reparación mediada por el canal se reduce y la activación del receptor de EGF al parecer puede activar la vía de IP3K corriente abajo y recuperarla (Zundler et al., 2016). En un trabajo reciente se encontró una correlación negativa entre la densidad de las células endoteliales de la córnea y los niveles de $\text{IFN-}\gamma$ en el humor acuoso de pacientes con queratopatías como FECD (Yagi-Yaguchi et al., 2017), adicionalmente, la secreción autocrina de EGF también favorece la reparación del endotelio al estimular la migración (Mergler et al., 2005). Por lo tanto, estos resultados podrían conducir a una posible relación entre la sobreexpresión del canal IK en condiciones inflamatorias como FECD y EGF podría funcionar como modulador de la lesión en células del endotelio. Adicionalmente, en el endotelio de la córnea se ha identificado la expresión factor del crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor tipo 1 también denominado Flt-1 , cuya expresión aumenta particularmente en respuesta a lesiones inflamatorias generadas por trauma o infecciones virales. Aunque el VEGF no es mitógeno para las células endoteliales de la córnea, se supone que esta citocina puede estimular a través de su receptor Flt-1 la migración de estas células, especialmente durante la cicatrización de heridas (Philipp et al., 2000). Lo que podría estar relacionado con la conectividad de la red del grupo de proteínas involucradas en la vía de digestión y absorción de proteínas.

Los KCa podrían mediar, al menos en parte, la respuesta ante la lesión de las células endoteliales. En el año 2018, Yu y colaboradores demostraron que en astrocitos primarios y lisados cerebrales de pacientes con enfermedad de Alzheimer, el canal IK está notablemente asociado con la regulación del estrés del retículo endoplásmico y la respuesta de proteínas desplegadas (UPR) (Por sus siglas del inglés *Unfolded Protein Response*), (Z. Yu et al., 2018). En la FECD, el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplásmico y la UPR inducen apoptosis de las células endoteliales corneales lo cual

es clave en la fisiopatología de la enfermedad, por esta razón, es posible que la sobreexpresión del gen *KCNN4* encontrada en las muestras de pacientes con distrofias corneales pueda estar relacionada con estos mecanismos de respuesta al daño. Existe evidencia epidemiológica de que los trastornos del endotelio corneal afectan preferencialmente a las mujeres. Después del nacimiento, ambos sexos sufren una reducción progresiva de la densidad celular secundaria al estrés oxidativo que al parecer afecta preferencialmente a las mujeres (Aketa et al., 2021; Cárdenas Díaz et al., 2013) y al parecer parte de esta discrepancia esta mediada por estímulos hormonales, condición que podría estar asociada a KCa3.1 (C. Liu et al., 2020; Roy et al., 2010).

Los canales SLICK son activados por Na^+ , Cl^- y niveles citoplásmicos bajos de ATP; sin embargo, se han clasificado en la familia de genes Slo porque están relacionados filogenéticamente con los canales de potasio (Bhattacharjee et al., 2003; Kaczmarek, 2013). Se dispone de muy poca información sobre el papel fisiológico de estos canales. Dentro del sistema nervioso central, se ha encontrado que las células con el nivel más alto de expresión de SLICK juegan un papel en la hiperpolarización post-excitadora y la estabilización del potencial de reposo (Bhattacharjee et al., 2005). También se ha descrito que participan en la detección de cambios en el volumen celular (Tejada et al., 2014, 2017), la moderación de la nocicepción (Tomasello et al., 2017) y la regulación del metabolismo (Smith et al., 2018). La expresión de estos canales en las células endoteliales podría ser importante para la modulación de la repolarización y el potencial de reposo en consideración a la importancia de la recirculación de sodio para el gradiente electrosmótico que favorece el flujo de agua hacia el humor acuoso. Sin embargo, no se puede descartar que participe en otros mecanismos de modulación del volumen la migración u otros cambios funcionales del endotelio.

Finalmente, BK se encuentra particularmente en neuronas y células musculares y participa en mantener o restaurar el potencial de membrana en reposo. Su capacidad para restablecer el potencial de membrana tras el aumento exagerado del calcio intracelular hace que sean particularmente importantes en los mecanismos neuroprotectores de las neuronas ante deficiencias metabólicas o en estados post- traumáticos (Gribkoff et al., 2001). El rol de los BK en otras patologías asociadas a células no excitables, como la obesidad y el cáncer, y su amplia distribución tisular y alto grado de conservación funcional en humanos, evidencia la importancia de su participación en los mecanismos de protección y desarrollo de las enfermedades (Toro et al., 2014) lo que hace posible su participación en eventos fisiopatológicos del endotelio corneal más que en eventos fisiológicos basales. Así pues, aunque el análisis no paramétrico de los datos de expresión génica identificó la expresión de *BKNMA1*, el gen que codifica para $\text{BK}\alpha$, en las muestras de FECD y algunas de sus subunidades reguladoras en otras muestras, la imposibilidad de demostrar eficientemente la expresión del gen que codifica para el poro del canal en las muestras usadas hace que estos resultados deban ser tomados con cautela.

CAPÍTULO 4

Efectos de la inhibición y la activación de KCa3.1 sobre la proliferación, la migración y la apoptosis del endotelio de la córnea.

KCa3.1, también denominado KCNN4 o IK, es el KCa de conductancia intermedia. Su activación no depende de voltaje sino de la unión de calcio intracelular a la calmodulina asociada constitutivamente con el extremo C-terminal del canal (Fanger et al., 1999). En los mamíferos, los canales de KCa3.1 se expresan principalmente en células del sistema hematopoyético; tejidos epiteliales en el tracto gastrointestinal, pulmón y glándulas endocrinas y exocrinas y células del endotelio, fibroblastos y músculo liso vascular (Wulff & Castle, 2010). En estas células, los canales KCa3.1 regulan la entrada de calcio y secundariamente modulan los procesos de señalización intracelular mediados por este ion. Cuando el calcio intracelular aumenta, el potencial de membrana se hace positivo y afecta el funcionamiento de otros canales mediados por voltaje o el ingreso adicional de calcio necesario para algunas funciones celulares, entonces, la activación de KCa3.1 permite la salida de potasio y reduce el potencial transmembrana, lo que permite que más calcio pueda entrar o se activen otros mecanismos voltaje dependientes. Estos mecanismos de regulación son importantes para la proliferación (Ghanshani et al., 2000; Grgic et al., 2005), la migración (Schilling et al., 2004; Su et al., 2013) y la apoptosis de ciertos tipos de células (Elliott & Higgins, 2003; Lang et al., 2003).

La identificación del canal y su función en diferentes tejidos ha determinado el interés por modularlo con objetivos terapéuticos fundamentalmente en enfermedades del sistema hematopoyético como la anemia de células falciformes (Brugnara et al., 1996), las enfermedades con un componente inmunomodulador importante como las enfermedades autoinmunes (Chandy et al., 2004), el trasplante renal (Huang et al., 2014b) y patologías vasculares (Y.-R. Zhu et al., 2019).

La lesión renal y la ocular en el paciente diabético con frecuencia han mostrado una progresión similar que incluso se ha identificado en el endotelio (Kanawa et al., 2021), y recientemente se ha identificado un papel relevante del canal KCa3.1 en múltiples mecanismos de lesión mediados por la diabetes (Huang et al., 2014b; Su et al., 2013). Las células epiteliales tubulares, son las células más abundantes en el parénquima renal, y están cada vez más implicadas en el proceso de la nefropatía diabética. Constituyen un epitelio no vascular, con baja capacidad de proliferación *in vivo*, y pueden ser modificadas en hiperglicemia por acumulo de AGEs y ROS induciendo eventos de señalización pro-inflamatoria y profibrótica. Estos sucesos están mediados fundamentalmente por citoquinas y quimiocinas como el factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1, que conducen a daño túbulo-intersticial, inflamación tisular y eventualmente insuficiencia renal (Huang et al., 2014b). KCa3.1 se expresa típicamente en la membrana basolateral de los túbulos y facilita la secreción de Cl⁻ apical y el transporte de agua, similar a la función encontrada *in silico* para el canal en el endotelio de la córnea (capítulo 1). Se ha encontrado una sobre-expresión de KCa3.1 en modelos animales con

nefropatía diabética (Huang et al., 2014a, 2014b) que al exponerse a TGF- β 1 llevan a la inhibición significativa de la producción de ATP mitocondrial, la mitofagia, el recambio mitocondrial y potencian la producción de ROS; sin embargo, estos efectos se revierten tras el silenciamiento de KCa3.1 (Huang et al., 2021).

En consideración a que el endotelio de la córnea se desarrolla embriológicamente a partir de la cresta neural, así como la glía y las neuronas, es relevante anotar la participación de KC3.1 en las enfermedades cerebrales que implican la activación de la microglía y la producción de moléculas neurotóxicas que inducen la muerte neuronal. Los KCa3.1 participan en la regulación al alza de la enzima óxido nítrico sintasa inducible, la producción de óxido nítrico y peroxinitrito, y a la consiguiente activación de la vía de las caspasas en las neuronas diana. La activación de la microglía involucra también las vías de señalización de la quinasa activada por mitógenos (MAPK) p38 y el factor nuclear kappaB (NF-kB). En modelos *in vitro* e *in vivo* se ha evidenciado que estos eventos se reducen notablemente cuando KCa3.1 es inhibido por TRAM-34, así que su menor actividad se asocia a neuro-protección en modelos de lesión cerebral asociados a cetoacidosis diabética (Glaser et al., 2017), y reduce la degeneración de las células ganglionares de la retina después de la sección del nervio óptico, por esta razón, también se ha considerado como un objetivo terapéutico potencial en terapias para la enfermedad de Alzheimer (Maezawa et al., 2012).

Una ventaja importante para el estudio funcional de KCa3.1 es que, contrario al resto de los KCa, tiene modulares farmacológicos altamente específicos. Algunos medicamentos, particularmente el clotrimazol, tienen efectos inhibitorios demostrados, pero la imposibilidad de administrarlos crónicamente por sus efectos sistémicos o sobre el sistema del citocromo (CYP) P450 limitan su uso, y esto precisamente dio paso al interés de sintetizar moduladores específicos más seguros. Wulff y colaboradores en el año 2000 identificaron a TRAM-34 (1-[(2-Clorofenil)difenilmetil]-1H-pirazol) , una molécula que no tiene los efectos sobre el sistema de CYP del clotrimazol, pero inhibe con una alta especificidad a KCa3.1 gracias a la unión con un residuo de treonina (Thr²⁵⁰) localizado en el bucle de la proteína que constituye el poro del canal (Wulff et al., 2000). En cuanto a los estimuladores, 1-EBIO (1-etilbenzimidazolinona) es el más usado, se une a la arginina (Arg³⁶²), un residuo que está en el centro de una red de enlaces de hidrógeno y estabiliza la molécula de KCa3.1 en su forma funcional sin modificar su sensibilidad al calcio (Chandy et al., 2004).

En consideración a la identificación de KCa3.1 en el endotelio de la córnea por métodos bioinformáticos, su validación de expresión por RT-PCR en este trabajo y la evidencia de la proteína en la inmunofluorescencia del estudio publicado por Anumanthan en el 2018 (Anumanthan et al., 2018, p. 1), se realizaron experimentos con el fin de identificar su rol en los principales procesos que se han identificado funcionalmente con él: la proliferación, la migración y la apoptosis.

4.1 Métodos

El medio de cultivo basal completo considerado como control corresponde a Medio de Eagle Dulbecco modificado (DMEM) / F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (20%), insulina-transferrina-selenio (ITS) al 1% (BD Biosciences, Bedford, MA) que corresponde a una concentración de 1 mg/ml de insulina, 0.55 mg/ml de transferrina y 0.00067 mg/ml de selenio; y 40

$\mu\text{g} / \text{ml}$ de gentamicina (Gibco). La concentración de glucosa del medio DMEM/F12 es 17,5 mM y el suplemento de ITS, aporta con el selenio una reducción de los niveles de radicales de oxígeno y peróxido (Tinggi, 2008), y con la transferrina, protección antioxidante adicional al ser un cofactor para la peroxidasa de glutatión (Bresgen & Eckl, 2015; Olaniyan & Babatunde, 2016). Los medios altos en glucosa corresponden al medio de referencia suplementado para una concentración final de glucosa de 55 mM. Para definir esta concentración se tomaron en consideración los experimentos de Deardorff y colaboradores publicados en el 2018 (Deardorff et al., 2018) y la predicción de la proporción de cambio en niveles de glicemia de diabéticos no controlados respecto a controles no diabéticos, publicada por Kovatchev en el año 2006 (Kovatchev et al., 2006), y el ajuste se hizo con las consideraciones expuestas en el capítulo 3.

Las células se expusieron a ambas condiciones en presencia y ausencia del estimulador del canal KCa3.1 EBIO (1-Etil -2-benzimidazolinona, Alomone, Jerusalem) y en presencia y ausencia del inhibidor del canal Tram-34 (1-[(2-Clorofenil)difenilmetil]-1H-pirazol) -, Alomone, Jerusalem).

4.1.1 Experimentos de proliferación.

Se sembraron células de la línea de endotelio corneal humano a una densidad de 6250 células/ cm^2 (2000 células/pozo) en placas de cultivo de 96 pozos para realizar comparaciones de la proliferación en 16 condiciones experimentales:

1. Medio basal
2. Medio basal suplementado con EBIO 50 μM
3. Medio basal suplementado con EBIO 100 μM
4. Medio basal suplementado con EBIO 200 μM
5. Medio basal suplementado con TRAM-34 1 μM
6. Medio basal suplementado con TRAM-34 2 μM
7. Medio basal suplementado con TRAM-34 4 μM
8. Medio basal suplementado con TRAM-34 8 μM
9. Medio basal suplementado con glucosa 55 mM
10. Medio basal suplementado con glucosa 55 mM y con EBIO 50 μM
11. Medio basal suplementado con glucosa 55 mM y con EBIO 100 μM
12. Medio basal suplementado con glucosa 55 mM y con EBIO 200 μM
13. Medio basal suplementado con glucosa 55 mM y con TRAM-34 1 μM
14. Medio basal suplementado con glucosa 55 mM y con TRAM-34 2 μM
15. Medio basal suplementado con glucosa 55 mM y con TRAM-34 4 μM

16. Medio basal suplementado con glucosa 55 mM y con TRAM-34 8 μ M

El valor de las concentraciones para 1-EBIO se definió de acuerdo con la recomendación del fabricante para experimentos de exposición continua (50 μ M). Esta concentración genera un aumento aproximado de 6 veces en la corriente del canal KCa3.1. Las concentraciones adicionales de 1-EBIO 100 μ M y 1-EBIO 200 μ M, se consideraron basadas en la literatura. En algunos estudios la concentración de 1-EBIO 100 μ M fue la más baja para encontrar efecto vasodilatador en arteriolas (Chadha et al., 2011) y mostraba efectos neuroprotectores que no se evidenciaban con concentraciones menores (Maldonado et al., 2020), la concentración de 1-EBIO 200 μ M hace parte de las concentraciones denominadas altas y es moduladora de excitabilidad neuronal (Spergel, 2007).

Para los experimentos con TRAM-34, el valor más bajo de las concentraciones utilizado fue 1 μ M, que corresponde a la concentración que recomienda el proveedor para uso sostenido y que se ha descrito reduce la corriente de KCa3.1 en un 43% (Lin et al., 2012), las concentraciones adicionales corresponden a valores intermedios (2 μ M, 4 μ M y 8 μ M) que en experimentos *in vitro* utilizando una línea de adenocarcinoma mamario, han demostrado efecto sobre la proliferación (Roy et al., 2010).

Se sembraron cuatro platos de cultivo con tres pozos para cada una de las condiciones de experimentación y se incubaron a 37 ° C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Cada 24 horas, a un plato de cultivo sembrado en el momento cero del experimento se le retiró el medio, se lavó con PBS y se incubó con reactivo MTT [bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio] a una concentración de 1mg/ml en DMEM durante 1h, al cabo de este tiempo se retiró el medio, se lava con PBS 1X y se solubilizan los cristales de formazán con isopropanol. Se realizaron cuatro experimentos independientes, cada uno con tres replicas biológicas por condición.

La proliferación celular se controló desde las 24 horas hasta las 96 horas. El cambio en el número de células metabólicamente activas en las diferentes condiciones se correlacionó con la intensidad de cambio por ensayo colorimétrico. Una vez disueltos los cristales de formazán, se midió espectrofotométricamente la absorbancia a 590 nm y 650 nm utilizando el equipo Cytation 3 (BioTek Instruments).

Para la interpretación de los resultados se corrigió el valor de absorbancia (A590-A650) y se calculó la diferencia de la muestra respecto al control con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células (\% del control)} = \frac{\text{Absorbancia corregida de la muestra}}{\text{Absorbancia corregida del control}} \times 100$$

Los resultados normalizados se graficaron como porcentaje de cambio respecto al tiempo.

4.1.2 *In vitro* ensayo de rasguño (*scratch assay*)

Se utilizó el método “*In vitro scratch assay*” descrito por Liang y colaboradores en el año 2007 (Liang et al., 2007). Se sembraron células de la línea de endotelio corneal humano a una densidad de 5000 células/cm² (20000 células/pozo) en placas de cultivo de 12 pozos para realizar comparaciones de

la tasa de cierre tras realizar un defecto con una punta para micropipeta p200 µl, en una monocapa al 80% de confluencia. Los tratamientos corresponden a las 16 condiciones relacionadas en el apartado 4.1.1; sin embargo, el medio basal para el control de referencia corresponde a Medio de Eagle Dulbecco modificado (DMEM) / F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (10%), insulina-transferrina-selenio (ITS) al 0,5% (BD Biosciences, Bedford, MA) que corresponde a una concentración de 0.5 mg/ml de insulina, 0.275 mg/ml de transferrina y 0.00335 mg/ml de selenio; y 40 µg / ml de gentamicina (Gibco). La concentración de glucosa de este medio es 17,5 mM y para los experimentos altos en glucosa se incrementó a una concentración de glucosa 55 mM. Para las condiciones con 1-EBIO se probó la exposición a concentraciones 100 µM y 200 µM y para los experimentos con TRAM-34 2 µM, 4 µM y 8 µM.

Una vez realizado el rasguño (*scratch*), las células se lavaron con PBS 1X para eliminar todos los detritos generados durante el procedimiento y se llenó el pozo con 1.5 ml de medio de acuerdo con las condiciones de ensayo. Este era el punto cero del experimento y se obtuvieron 3 imágenes de cada pozo con magnificación 10X como punto de partida de cada condición. Los días subsiguientes se adquirieron tres imágenes de cada pozo utilizando el microscopio invertido Axio Vert.A1 (Zeiss Microscopy), con la cámara adaptada AXIOCam y el software del proveedor ZEN (edición azul). Para obtener el mismo campo visual en cada imagen se usaron las coordenadas de la placa del microscopio y como doble factor de referencia se crearon señales con un marcador de punta ultrafina en la caja. Los platos se monitorearon cada 24 horas hasta que ocurrió el cierre de la herida en los pozos control de cada plato. Para cada registro, los platos se sacaron de la incubadora, se examinaron, y luego se volvieron a colocar en ella para reanudar la incubación. Se realizaron cuatro experimentos independientes con cuatro replicas biológicas en cada uno. Lo que corresponde a 48 imágenes analizadas por condición.

La comparación de las imágenes obtenidas para cada muestra se analizó cuantitativamente utilizando el software ImageJ (*ImageJ*, s. f.). La imagen primero se convirtió a escala de grises (*Image→type→8-bit*), luego se identificaron los bordes del defecto (*process→find edges*) y se afinaron para darles continuidad (*process→smooth x37*), lo que permitió la identificación del área de la herida (*Image→adjust→autotreshold*) y finalmente, se calculó el área del defecto (*analyze→analyze particles→10.000-infinity*).

Por último, se obtuvo el porcentaje de cierre normalizando el área de cada imagen en los diferentes lapsos de tiempo (Área actual) con el área de referencia (tiempo 0 (t₀)).

$$\text{Magnitud de cambio del area del defecto} = \frac{(\text{Área } t_0 - \text{Área actual})}{\text{Área } t_0} \times 100\%$$

La magnitud de cambio corresponde al porcentaje del área del rasguño inicial (t₀) que se ha cubierto en cada momento de registro.

4.1.3 Apoptosis

Se sembraron células de la línea de endotelio corneal humano a una densidad de 2 x 10⁵ células/pozo en placas de cultivo de 6 pozos. Todos los pozos se incubaron por 24 horas con medio

basal (Medio de Eagle Dulbecco modificado (DMEM) / F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (20%), insulina-transferrina-selenio (ITS) al 1% (BD Biosciences, Bedford, MA) (1 mg/ml de insulina, 0.55 mg/ml de transferrina y 0.00067 mg/ml de selenio) y 40 µg / ml de gentamicina (Gibco)) a 37 ° C, en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Al siguiente día, se reemplazó el medio por el tratamiento y 24 h después se retiró este medio y se reserva, se lavan las células con PBS 1X y se dejan 2-4 horas con (DMEM) / F12 (Gibco) sin suplementar, a 37 ° C, en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. El medio reservado se centrifuga y el pellet se expone a las mismas condiciones, con el fin de tomar en cuenta las células que se desprenden. Pasado este tiempo todas las células se incuban con el buffer de lisis del kit *Cell Death Detection* ELISA PLUS (Roche) siguiendo y se completa el experimento siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este kit se basa en una técnica de inmunoensayo enzimático en el que los cambios de coloración medidos por fotometría permiten hacer un análisis cuantitativo del nivel de apoptosis. La magnitud del color varía de acuerdo con la determinación de fragmentos de ADN asociados a histonas citoplasmáticas (mono y oligonucleosomas).

Para quitar los efectos de fondo (EF) sobre la lectura de las muestras, en cada experimento, se obtuvo el valor de absorbancia de la mezcla de buffer de incubación + solución ABTS + solución para parar la reacción de ABTS en proporciones iguales a las empleadas en las muestras. La muestra definida como basal, es decir, aquella sin el tratamiento que se quiere evaluar como inductor de muerte celular, causa cierta absorbancia que se usó en todos los ensayos como control. El control positivo de cada experimento fue el complejo de ADN-histona incluido en el kit. Se realizaron tres experimentos independientes con tres replicas biológicas en cada uno.

Para obtener los valores de enriquecimiento de mono y oligonucleosomas liberados al citoplasma de las células en cada condición, es decir la diferencia en la magnitud de apoptosis respecto al control, se promediaron las absorbancias de cada una de las condiciones, se les restó el valor de absorbancia medido para los EF y se calculó el enriquecimiento específico de mono y oligonucleosomas con la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de enriquecimiento} = \frac{\text{mU de la muestra en estudio}}{\text{mU del control (sin tratamiento)}}$$

$$\text{mU} = \text{absorbancia} [10^{-3}]$$

4.1.4 Análisis gráfico y estadístico.

Los valores obtenidos en cada experimento se importaron al software GraphPad Prism versión 9.1.0 para su análisis. Se utilizó ANOVA para comparar tres o más grupos de datos utilizando un valor de $p < 0,05$ para definir significancia estadística.

4.2 Resultados.

4.2.1 Proliferación

4.2.1.1 Experimentos con la activación del canal KCa3.1 mediada por 1-EBIO.

1-EBIO induce una reducción de la proliferación dosis dependiente hasta las 72 horas (figura 4.1). Respecto al basal, en todos los tiempos (24 h – 96 h), la diferencia en la proliferación es significativamente menor para las células expuestas a los tratamientos con el estimulador del canal. A las 24, 72 y 96 horas de incubación, la diferencia entre la condición basal y todas las concentraciones experimentales fue altamente significativa (1-EBIO 50 μM ($p < 0,0001$), 1-EBIO 100 μM ($p < 0,0001$) y 1-EBIO 200 μM ($p < 0,0001$)); a las 48 horas, este nivel de significancia respecto al basal se mantuvo alta para todas las concentraciones empleadas, pero varía ligeramente entre ellas 1-EBIO 100 μM (1-EBIO 50 μM ($p < 0,0001$), 1-EBIO 100 μM ($p = 0,0003$) y 1-EBIO 200 μM ($p < 0,0001$)).

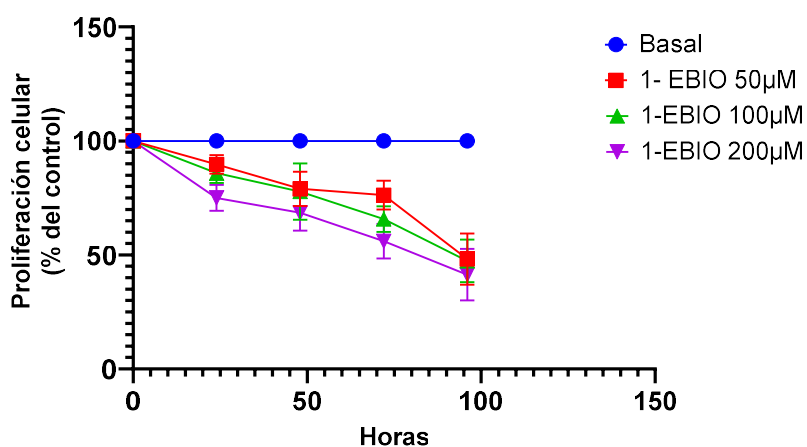


Figura 4.1 Efecto de la sobre-activación de KCa3.1 con 1-EBIO sobre la proliferación. Los datos se normalizaron con respecto al control de cada día durante los cuatro días de seguimiento. Los símbolos (punto, cuadrado o triángulo) representan la media y las barras la desviación estándar.

Si bien la diferencia entre los tratamientos y las condiciones basales se mantiene significativa a través del tiempo, entre los tratamientos la diferencia tiende a homogenizarse. A las 24 horas, la diferencia es significativa entre el tratamiento de 1-EBIO 200 μM y las otras dos concentraciones (1-EBIO 50 μM y 1-EBIO 100 μM), a las 48 y 72 horas la diferencia solo sigue siendo significativa con el tratamiento 1-EBIO 50 μM , y a las 96 horas ninguna de las concentraciones del estimulador del canal empleadas es significativamente diferente entre ellas en relación con el efecto que genera sobre la proliferación de las células de la línea de endotelio.

En los experimentos que incluyeron altas concentraciones de glucosa y 1-EBIO, el efecto de la estimulación funcional de KCa3.1 redujo en general los efectos proliferativos mediados por la glucosa (Figura 4.2).

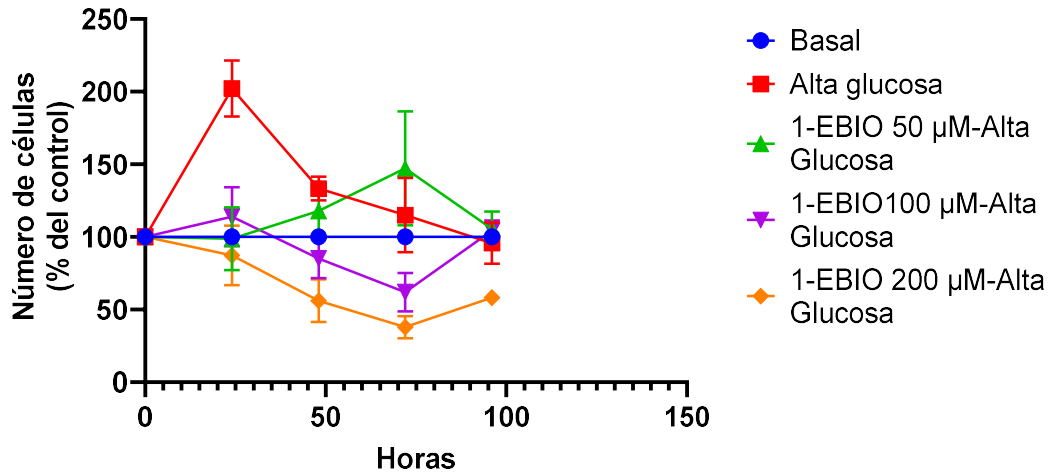


Figura 4.2. Efecto de la estimulación de KCa3.1 en condiciones de alta glucosa (55mM). Los datos se normalizaron con respecto al control de cada día, durante los cuatro días de seguimiento. Los símbolos (punto, cuadrado, triángulo o rombo) representan la media y las barras la desviación estándar. En el punto en que la barra no es visible la desviación es inferior al tamaño del símbolo.

A las 24 horas, las células suplementadas adicionalmente con 1- EBIO en condiciones de alta glucosa mostraron una reducción significativa de la proliferación, en comparación con las condiciones de alta glucosa por sí solas, tanto así que no se encontraron diferencias significativas respecto a las condiciones basales (concentraciones de glucosa de 17,5 mM) (Basal vs. Alta glucosa + 1- EBIO 50µM $p=0,9996$, Basal vs. Alta glucosa + 1- EBIO 100µM $p=0,3311$, Basal vs. Alta glucosa + 1- EBIO 200µM $p=0,4033$). La administración de 1-EBIO, y por tanto la estimulación del flujo de K^+ hacia afuera de las células a través de KCa3.1, redujo el aumento de la proliferación mediado por las concentraciones elevadas de glucosa, independientemente de la concentración de 1-EBIO, al punto de hacerlas significativamente diferentes a estas (Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1-EBIO 50µM $p<0,0001$, Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1-EBIO 100µM $p<0,0001$, Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1-EBIO 200µM $p<0,0001$). A las 48 horas, la reducción de la proliferación con altas concentraciones de 1-EBIO (200µM) es tal que difiere significativamente de las condiciones basales ($p=0,0001$) y de las condiciones altas en glucosa ($p<0,0001$). La condición más baja y la intermedia siguieron siendo similares a las basales (Basal vs. Alta glucosa + 1- EBIO 50µM $p=0,985$, Basal vs. Alta glucosa + 1-EBIO 100µM $p=0,0631$); sin embargo, en condiciones de alta glucosa, mientras las concentraciones bajas no mostraron significancia (Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1- EBIO 50µM $p=0,2069$) las intermedias si (Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1- EBIO 100µM $p=<0,0001$). A las 72 horas, todas las condiciones son significativamente diferentes en relación con las condiciones basales (Basal vs. Alta glucosa + 1- EBIO 50µM $p=0,0408$, Basal vs. Alta glucosa + 1- EBIO 100µM $p=0,0002$, Basal vs. Alta glucosa + 1- EBIO 200µM $p=<0,0001$); sin embargo, en relación con las condiciones de alta glucosa solo las concentraciones de 1-EBIO intermedias y altas producen un cambios significativo (Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1-EBIO 50µM $p=0,2906$; Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1-EBIO 100µM $p=0,0011$, Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1-EBIO 200µM $p<0,0001$). Es importante notar que el efecto reductor de la proliferación que se había identificado los días previos con bajas concentraciones de

1-EBIO en este punto cesa, y ahora las condiciones de Alta glucosa + 1-EBIO 50 μ M son significativamente superiores a las basales y a las de alta glucosa para el mismo punto de tiempo. A las 96 horas, solo las condiciones con altas concentraciones de 1-EBIO cursan con una proliferación significativamente menor a la de las condiciones de referencia basales y altas en glucosa (Basal vs. Alta glucosa + 1- EBIO 50 μ M $p=0,6404$, Basal vs. Alta glucosa + 1- EBIO 100 μ M $p=0,4123$, Basal vs. Alta glucosa + 1- EBIO 200 μ M $p<0,0001$); (Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1-EBIO 50 μ M $p=0,5088$, Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1-EBIO 100 μ M $p=0,4954$, Alta glucosa vs. Alta glucosa + 1-EBIO 200 μ M $p=0,0002$).

4.2.1.2 Experimentos con la inhibición del canal KCa3.1 mediada por TRAM-34.

La inhibición funcional de KCa3.1 estimula la proliferación celular particularmente a las 48 horas de exponer las células a concentraciones de TRAM-34 4 μ M y 8 μ M (figura 4.3).

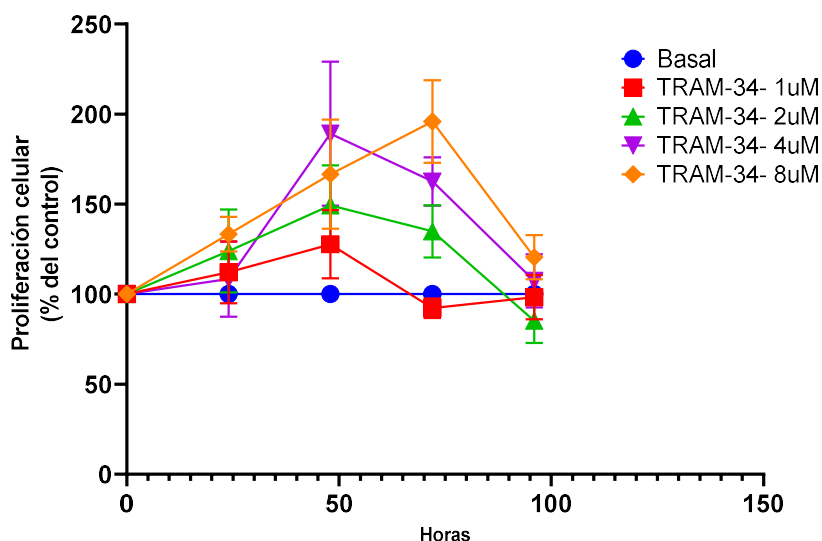


Figura 4.3 Efecto de la inhibición funcional de KCa3.1 con TRAM-34 sobre la proliferación. Los datos se normalizaron con respecto al control de cada día durante los cuatro días de seguimiento. Los símbolos (punto, cuadrado, triángulo o rombo) representan la media y las barras la desviación estándar.

A las 24 horas, todos los experimentos con diferentes concentraciones de TRAM-34 generan un aumento en la proliferación; sin embargo, la diferencia respecto al cultivo con condiciones basales solo es significativa para las células tratadas con concentraciones de TRAM-34 8 μ M ($p<0,0001$) (Basal vs. TRAM-34- 1 μ M $p=0,3600$; Basal vs. TRAM-34- 2 μ M $p=0,1557$; Basal vs. TRAM-34- 4 μ M $p=0,7505$). La diferencia en la proliferación aumenta a las 48 horas para todas las condiciones y se vuelve significativa en todos los casos (Basal vs. TRAM-34- 1 μ M $p=0,0147$; Basal vs. TRAM-34- 2 μ M $p=0,0011$; Basal vs. TRAM-34- 4 μ M $p=0,0011$, Basal vs. TRAM-34- 8 μ M $p=0,0012$). Sin embargo, este efecto es temporal y tiende a perderse en los siguientes días. A las 72 horas, las células expuestas a TRAM-34 1 μ M se acercan a la magnitud de proliferación del control para ese momento ($p=0,0835$) y aunque las demás concentraciones siguen presentando una proliferación

significativamente mayor a la del control (Basal vs. TRAM-34- 2 μM $p=0,0006$), particularmente las células expuestas a TRAM-34 4 μM ($p<0,0001$) y 8 μM ($p<0,0001$), esa diferencia deja de ser significativa a las 96 horas para las células en medio suplementado con TRAM-34 4 μM ($p=0,6397$) y se mantiene significativamente alta solo para los cultivos con TRAM-34- 8 μM ($p=0,0068$). Incluso la caída en la tasa de proliferación es tal que las células expuestas a TRAM-34- 2 μM alcanzan niveles de proliferación significativamente menores ($p=0,0426$) respecto al control. Los cultivos expuestos a menores concentraciones de TRAM-34 1 μM a las 96 horas se mantienen en condiciones cercanas al control ($p=0,9940$) como venían haciéndolo desde las 72 h.

Los experimentos con alta glucosa evidenciaron un aumento sumatorio del estímulo proliferativo mediado por TRAM-34 y las elevadas concentraciones de glucosa que persistió para algunos grupos durante todo el tiempo del experimento (figura 4.4).

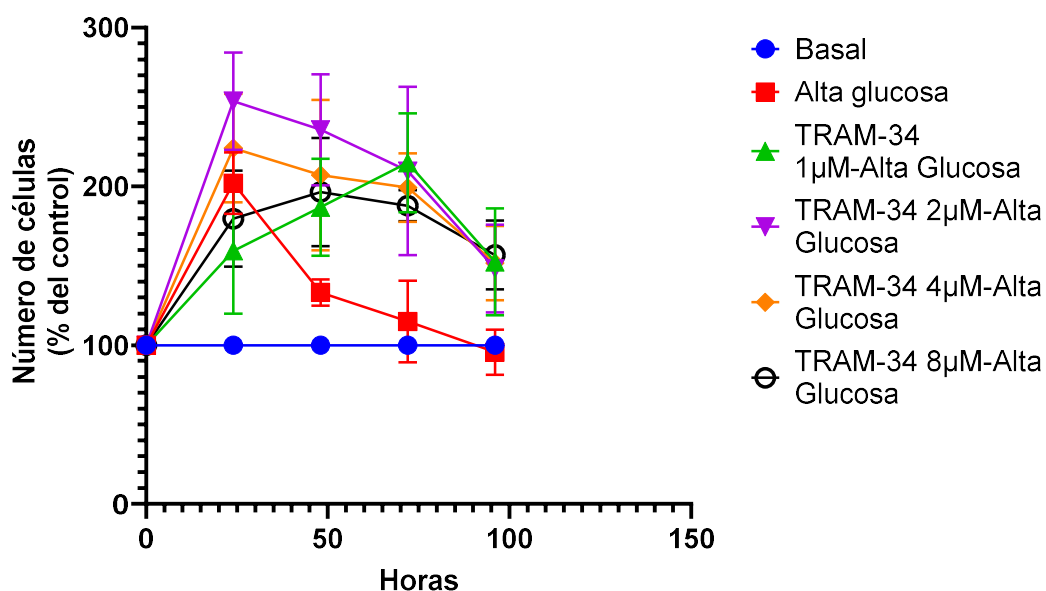


Figura 4.4 Efecto de la inhibición de KCa3.1 en condiciones de alta glucosa (55mM). Los datos se normalizaron con respecto al control de cada día, durante los cuatro días de seguimiento. Los símbolos (punto, cuadrado, triángulo o rombo) representan la media y las barras la desviación estándar.

A las 24 horas, se evidencia un aumento significativo de la proliferación en todos los grupos con tratamiento en relación con las condiciones basales (Basal vs. Alta glucosa+TRAM-34- 1 μM $p=0,0167$; Basal vs. Alta glucosa + TRAM-34- 2 μM $p<0,0001$; Basal vs. Alta glucosa TRAM-34- 4 μM $p<0,0001$, Basal vs. Alta glucosa + TRAM-34- 8 μM $p=0,0005$). Sin embargo, como la exposición a altas concentraciones de glucosa produce un aumento de la proliferación, una vez se comparan los tratamientos a diferentes concentraciones de TRAM-34 con las condiciones generadas por los altos niveles de glucosa *per se*, solamente el tratamiento de Alta glucosa +TRAM-34 2 μM mostró un cambio significativo (Alta glucosa vs. Alta glucosa+TRAM-34- 1 μM $p=0,01080$; Alta glucosa vs. Alta

glucosa + TRAM-34- 2 μ M $p=0,0085$; Alta glucosa vs. Alta glucosa TRAM-34- 4 μ M $p=5680$, Alta glucosa vs. Alta glucosa + TRAM-34- 8 μ M= $0,4579$).

A las 48 y 72 horas, los altos niveles de glucosa tienden a reducir su potencial proliferativo pero los tratamientos con TRAM-34 mantienen la tendencia a la proliferación, por lo tanto, las diferencias son significativas para todos los tratamientos respecto con las condiciones basales (48 horas: Basal vs. Alta glucosa+TRAM-34- 1 μ M $p=0,0003$; Basal vs. Alta glucosa + TRAM-34- 2 μ M $p<0,0001$; Basal vs. Alta glucosa TRAM-34- 4 μ M $p=0,0013$, Basal vs. Alta glucosa + TRAM-34- 8 μ M= $0,0003$; 72 horas: Basal vs. Alta glucosa+TRAM-34- 1 μ M $p<0,0001$; Basal vs. Alta glucosa + TRAM-34- 2 μ M $p=0,0023$; Basal vs. Alta glucosa TRAM-34- 4 μ M $p<0,0001$, Basal vs. Alta glucosa + TRAM-34- 8 μ M $p<0,0001$) y en relación con las condiciones de alta glucosa (48 h: Alta glucosa vs. Alta glucosa+TRAM-34- 1 μ M $p=0,0056$; Alta glucosa vs. Alta glucosa + TRAM-34- 2 μ M $p=0,0001$; Alta glucosa vs. Alta glucosa TRAM-34- 4 μ M $p=0,0127$, Alta glucosa vs. Alta glucosa + TRAM-34- 8 μ M= $0,0041$; 72 h: Alta glucosa vs. Alta glucosa+TRAM-34- 1 μ M $p<0,0001$; Alta glucosa vs. Alta glucosa + TRAM-34- 2 μ M $p=0,0047$; Alta glucosa vs. Alta glucosa TRAM-34- 4 μ M $p<0,0001$, Alta glucosa vs. Alta glucosa + TRAM-34- 8 μ M= $0,0001$).

Una situación particularmente interesante es que, en todas las condiciones experimentales presentadas previamente, con el tiempo tiende a ceder el efecto mediado por la condición experimental; sin embargo, en estos experimentos, a las 96 horas las muestras expuestas a los tratamientos mantienen una proliferación significativamente mayor tanto en relación con las condiciones basales como en las de alta glucosa (Basal vs. Alta glucosa+TRAM-34- 1 μ M $p=0,0134$; Basal vs. Alta glucosa + TRAM-34- 2 μ M $p=0,0258$; Basal vs. Alta glucosa TRAM-34- 4 μ M $p=0,0431$, Basal vs. Alta glucosa + TRAM-34- 8 μ M= $0,0012$, Alta glucosa vs. Alta glucosa+TRAM-34- 1 μ M $p=0,0070$; Alta glucosa vs. Alta glucosa + TRAM-34- 2 μ M $p=0,0133$; Alta glucosa vs. Alta glucosa TRAM-34- 4 μ M $p=0,0222$, Alta glucosa vs. Alta glucosa + TRAM-34- 8 μ M= $0,0002$). Esto significa que el efecto de TRAM-34 es aumentar la proliferación de las células del endotelio y puede mantenerla a pesar de los efectos deletéreos mediados por la exposición a concentraciones elevadas de glucosa.

4.2.2 Ensayo de migración.

4.2.2.1 Experimentos con la activación del canal KCa3.1 mediada por 1-EBIO.

Al agregar 1-EBIO en el plato de cultivo las células redujeron su tamaño (figura 4.5) y las que se encontraban en el borde de la lesión se desprendieron y generaron un aumento del área trazada inicialmente (figura 4.6). Estos cambios fueron irreversibles a altas concentraciones de 1-EBIO (200 μ M) y en la mayoría de los casos la línea de lesión se perdió y no fue posible hacer el seguimiento, adicionalmente, agregar 1- EBIO a altas concentraciones en el medio suplementado con 10% SFB, 1 mg/ml de insulina, 0.55 mg/ml de transferrina y 0.00067 mg/ml de selenio, y 40 μ g / ml de gentamicina indujo cambios morfológicos importantes en las células que sugieren una desdiferenciación fibroblástica (Figura 4.6).

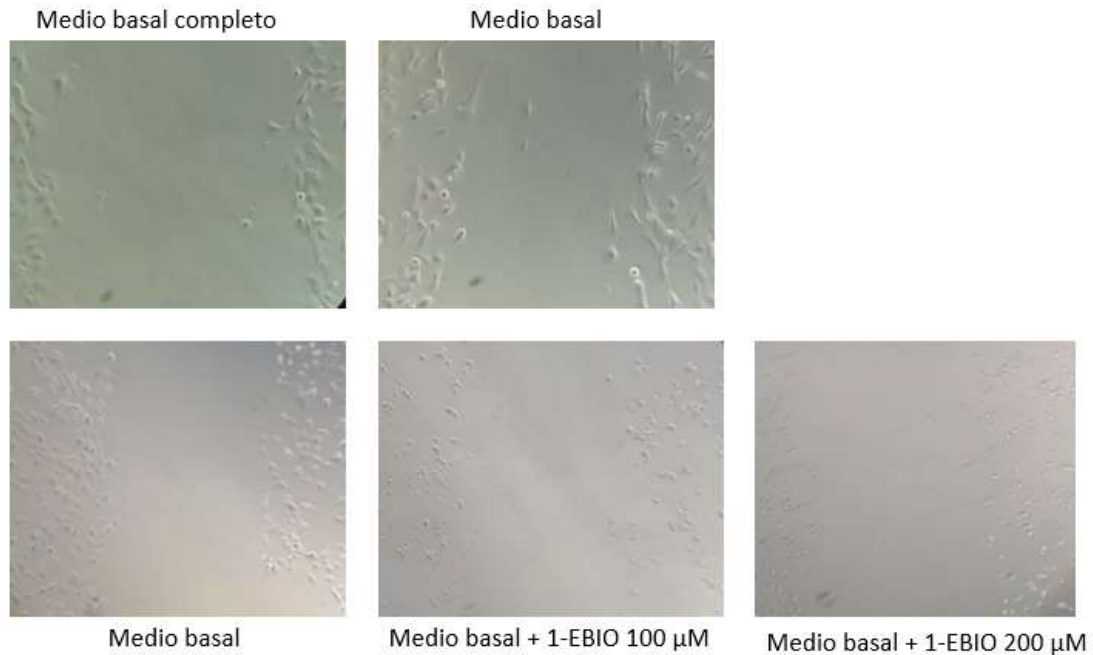


Figura 4.5. Cambios morfológicos de las células tras la exposición al medio de tratamiento. Las dos imágenes de la línea superior están registradas a 20X y las tres de la línea inferior a 10X. Medio basal completo corresponde a DMEM / F12 suplementado con FBS al 20%, 1 mg/ml de insulina, 0.55 mg/ml de transferrina, 0.00067 mg/ml de selenio y 40 μg / ml de gentamicina. El indicado en la figura como suero basal corresponde al medio utilizado como control en los experimentos de migración (DMEM / F12 suplementado con FBS al 10%, 0.5 mg/ml de insulina, 0.275 mg/ml de transferrina y 0.00335 mg/ml de selenio y 40 μg / ml de gentamicina).

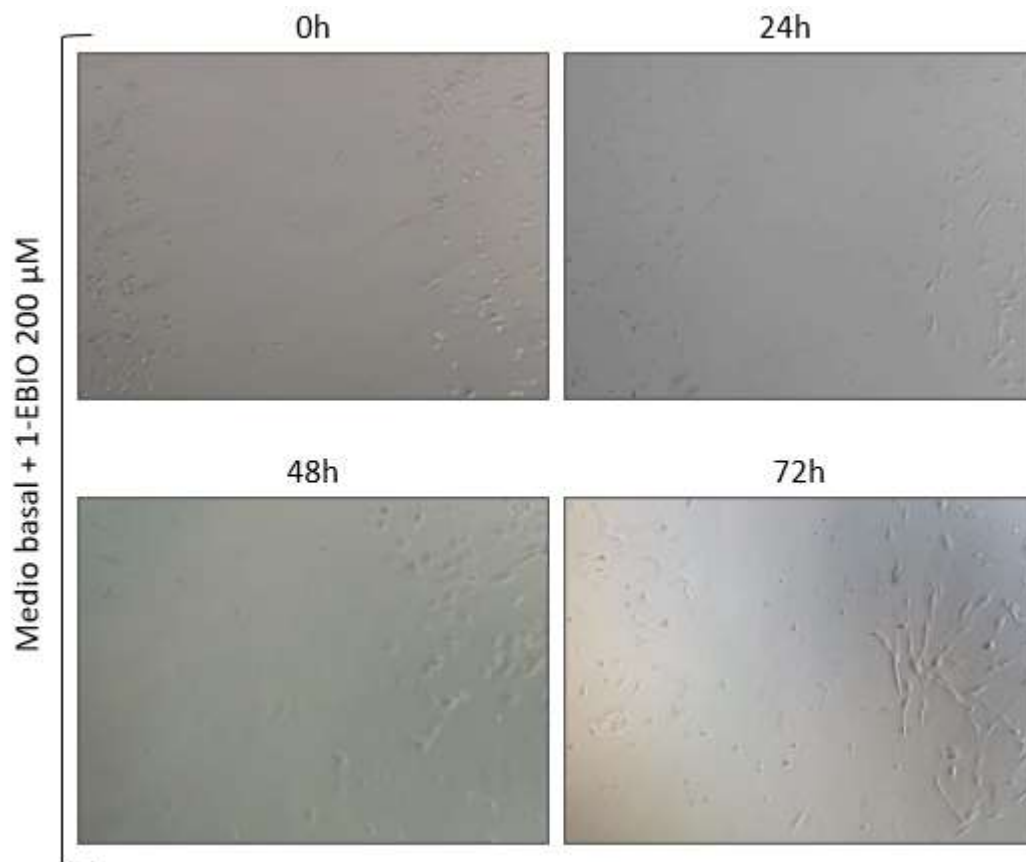


Figura 4.6. Experimento de migración en cultivos con 1-EBIO 200 μM . Nótese los cambios de la forma celular a las 72 horas.

Los experimentos con el tratamiento de medio basal + 1-EBIO 100 μM , pudieron ser seguidos. A las 24 h, buena parte de los valores eran mayores al del registro de partida probablemente por pérdida de algunas de las células del borde. El análisis estadístico evidenció un retraso significativo en la migración de las células expuestas a 1-EBIO 100 μM a partir de las 72 horas.

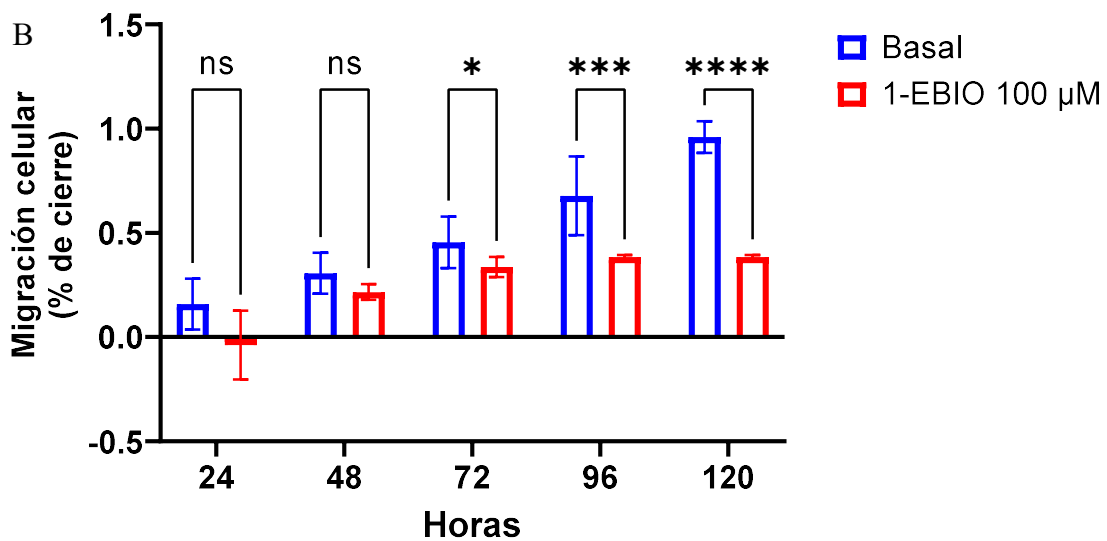
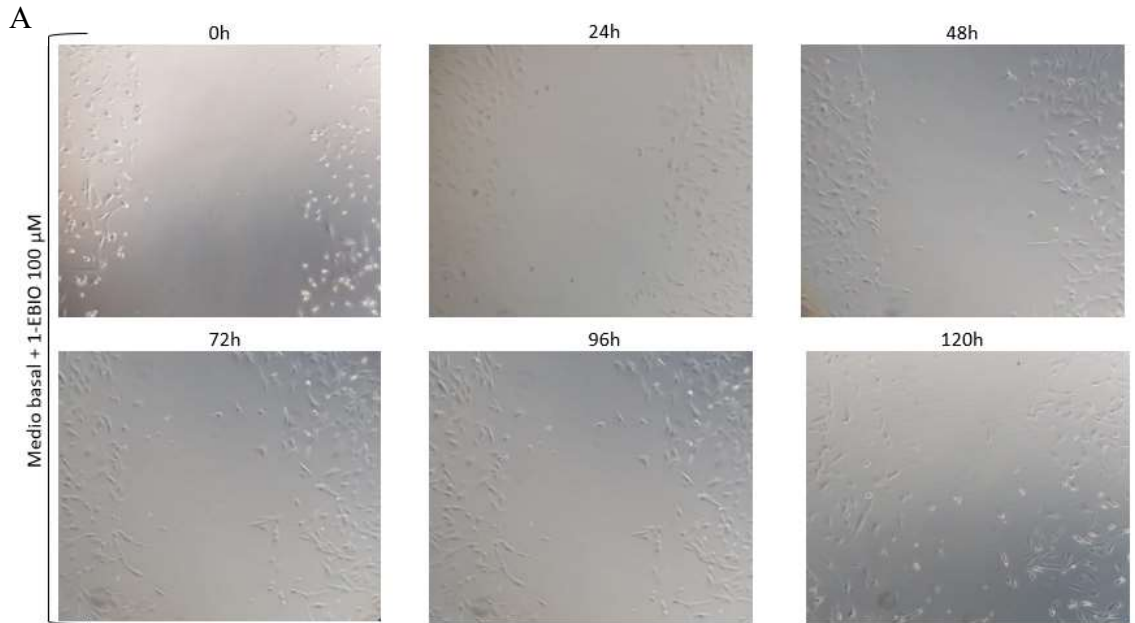


Figura 4.7 Ensayo de migración para células en medio basal suplementado con 1-EBIO 100 μM. (A) Microfotografías representativas de la evolución del ensayo de rasguño a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de realizado el defecto en la monocapa. Magnificación 10X (B) Análisis cuantitativo de la tasa de cobertura del defecto. El análisis de múltiples comparaciones determina que no hay diferencias significativas (ns) entre las condiciones basales y la suplementación con 1-EBIO 100 μM a las 24h ($p=0,1489$) y 48 horas ($p=0,0637$) de iniciar el cierre, posteriormente las células basales cierran el defecto significativamente más rápido que las células tratadas con el estimulador del canal (72 h ($p=0,0489$), 96 h ($p=0,0005$) y 120 h ($p<0,0001$)).

El mismo modelo experimental seguido con condiciones de alta glucosa, evidenció que la exposición a altas concentraciones de glucosa simultáneamente con la estimulación del canal no solo aumenta

el tamaño del defecto, sino que limita significativamente la posibilidad de cerrarlo (figura 4.8). El análisis cuantitativo de la tasa de cobertura del defecto evidencia que a las 24 horas el retraso de la migración secundario al tratamiento con alta glucosa y 1-EBIO 100 μM ya es significativo respecto al que puede ocurrir por tratamientos con alta glucosa ($p=0,0066$) o con 1-EBIO 100 μM ($p=0,0160$) de forma independiente. Estas diferencias siguen siendo significativas hasta las 96 horas ((48, 72 y 96 horas: Alta glucosa vs. Alta glucosa+1-EBIO 100 μM $p<0,0001$; 1-EBIO 100 μM vs. Alta glucosa y 1-EBIO 100 μM a las 48 y 96 horas $p=0,0001$ y a las 72 h $p=,0018$). Los experimentos a las 120 horas mostraron que las diferencias entre los tratamientos ya no son estadísticamente significativas (Alta glucosa vs. Alta glucosa+1-EBIO 100 μM $p=0,5155$; 1-EBIO 100 μM vs. Alta glucosa + 1-EBIO 100 μM $p=5043$). Las células expuestas a altas concentraciones de glucosa y 1-EBIO 100 μM simultáneamente siempre cierran el defecto significativamente más lento que los controles con medio basal (Basal vs. Alta glucosa+1-EBIO 100 μM a las 24 h $p=0,0046$, a las 48, 72 y 96 horas $p<0,0001$ y a las 120 h $p=0.0004$).

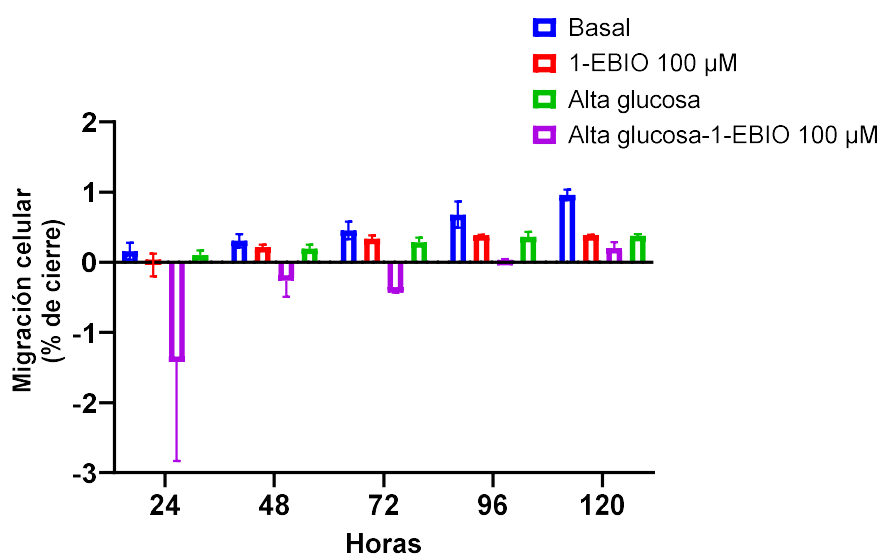


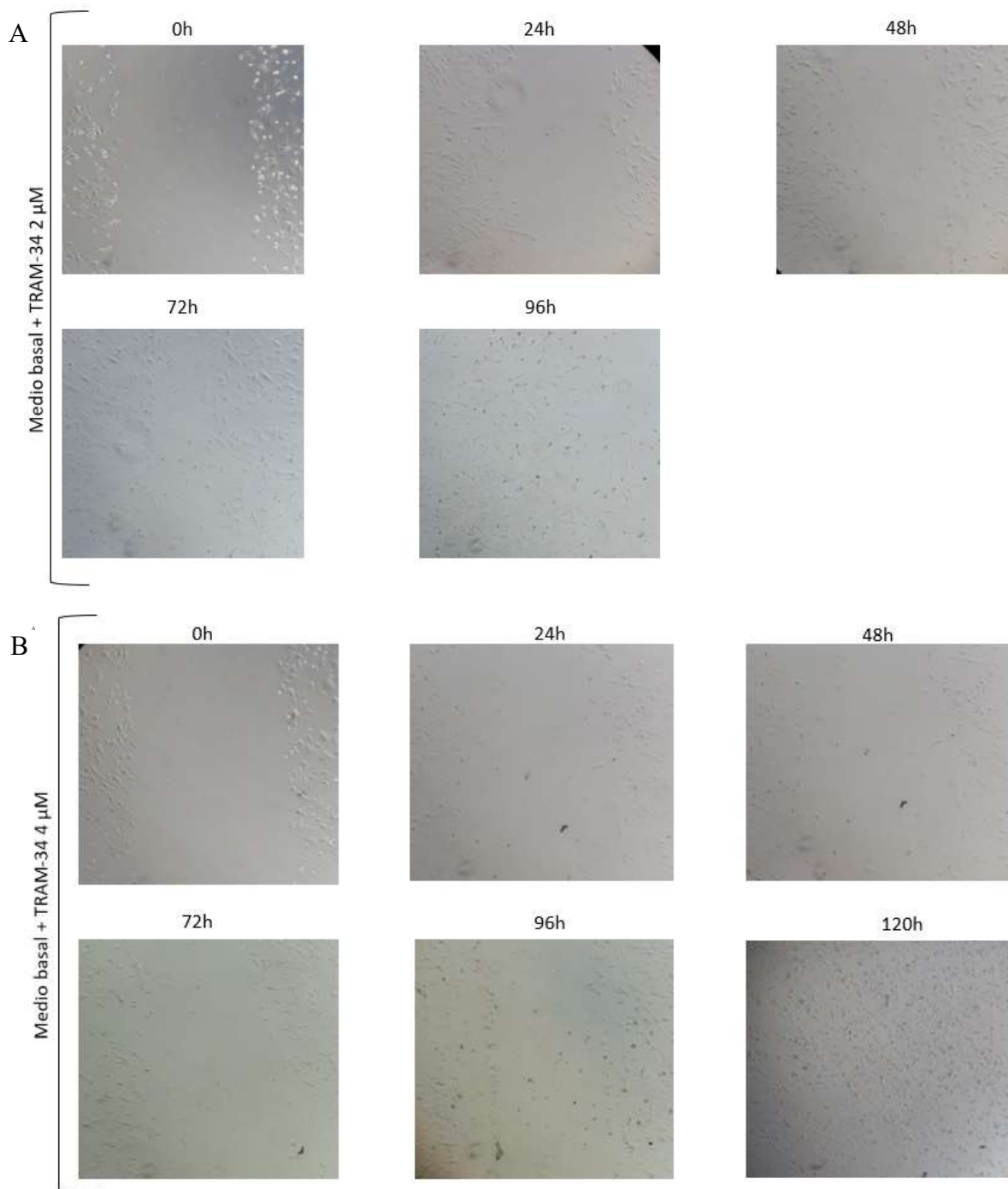
Figura 4.8. Ensayo de migración (*scratch assay*) para células con altas concentraciones de glucosa y 1-EBIO 100 μM . Se incluyen los cambios en la migración de células expuestas a medio basal, alta glucosa y medio basal con 1-EBIO 100 μM como referencia.

Es interesante que si bien las elevadas concentraciones de glucosa y 1-EBIO 100 μM reducen independientemente la capacidad de migración y cierre del defecto, ambos lo hacen en una proporción similar (24 h Alta glucosa vs. 1-EBIO 100 μM $p=0,7560$, 48 h $p= 0,9976$, 72 h $p=0,8804$, 96h $p= 0,9998$ y 120 h $p=0,9999$).

4.2.2.2 Experimentos con la inhibición del canal KCa3.1 mediada por TRAM-34.

Con TRAM-34, no hay cambios evidentes en el tamaño celular como los descritos en los experimentos con 1-EBIO; sin embargo, se generan ciertos depósitos intracelulares. Los tratamientos con TRAM-34- a una concentración de 2 μM y 8 μM de TRAM-34 indujeron un cierre

temprano de la herida sin embargo el tratamiento con 4 μ M de TRAM-34 generó un proceso de cierre más lento que el control.



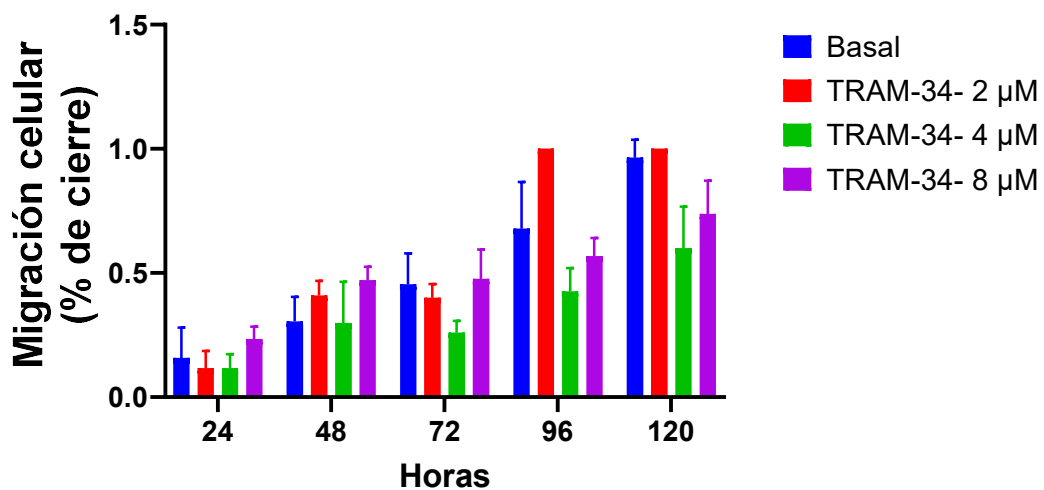
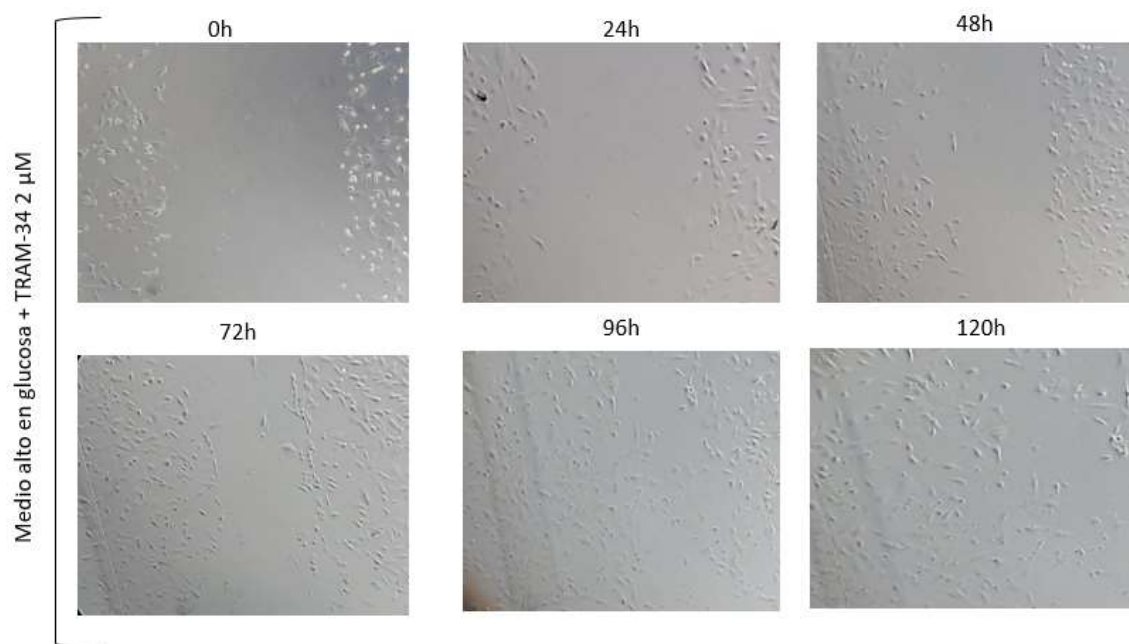


Figura 4.9 Ensayo de migración para células en medio basal suplementado con - 2 μ M, 4 μ M y 8 μ M de TRAM-34. (A) Microfotografías representativas de la evolución del ensayo de rasguño a las 24, 48, 72 y 96 en cultivos expuestos a TRAM-34 a una concentración de 2 μ M (B) Microfotografías representativas de la evolución del ensayo de rasguño a las 24, 48, 72, 96 y 120 h en cultivos expuestos a TRAM-34 a una concentración de 4 μ M (C) Microfotografías representativas de la evolución del ensayo de rasguño a las 24, 48, 72, 96 y 120 h en cultivos expuestos a TRAM-34 a una concentración de 8 μ M. Las imágenes de los 3 experimentos se tomaron con magnificación 10X (B)

Análisis cuantitativo de la tasa de cobertura del defecto en experimentos con medio basal y suplementado con TRAM-34 a concentraciones de 2, 4 y 8 μM (figura 4.9).

El análisis de múltiples comparaciones determina que no hay diferencias significativas entre las condiciones basales y la suplementación con el inhibidor a las 24 horas una vez las células se exponen a medio con concentraciones de 2 μM ($p=0,6440$), 4 μM ($p=0,6376$) y 8 μM ($p=0,1739$) de TRAM-34. A las 48 horas los tratamientos con 2 μM ($p=0,0131$) y 8 μM ($p=0,0007$) mostraron un cierre significativamente más rápido respecto al control. El tratamiento con TRAM-34 a una concentración de 4 μM no mostro diferencias significativas ($p=0,9991$). Sin embargo, a partir de ese momento, las células expuestas a TRAM-34 4 μM mostraron un patrón de cierre significativamente más lento que las células expuestas a medio basal (72 horas $p=0,0002$, 96 h $p= 0,0062$ y 120 h $p<0,0001$), las células en tratamiento con TRAM-34 8 μM también mostraron un cierre más lento, sin embargo, la diferencia con el control solo fue significativamente menor a las 120 h de iniciar el cierre ($p=0,0269$) (72 horas $p=0,9815$ y 96 h $p= 0,2904$). Las células expuestas a TRAM-34 2 μM mostraron un patrón de cierre sostenido que hizo que se mantuvieran cerca del control a las 72 horas ($p= 0,8273$) sin embargo, a las 96 horas, más células en tratamiento con TRAM-34 2 μM había cerrado el defecto respecto al grupo expuesto con medio basal lo que hizo que fueran significativamente más rápidas ($p=0,0003$). Posteriormente, las células basales cierran el defecto y a las 120 horas ya no existe una diferencia estadísticamente significativa($p=0,5277$).

Para el experimento con altas concentraciones de glucosa se escogió TRAM-34 a una concentración de 2 μM por haber mostrado tasas de proliferación significativamente más rápidas en los experimentos con medio basal y TRAM-34 a una concentración de 4 μM como referencia del efecto de enlentecimiento del cierre en experimentos con medio basal (figura 4.10).



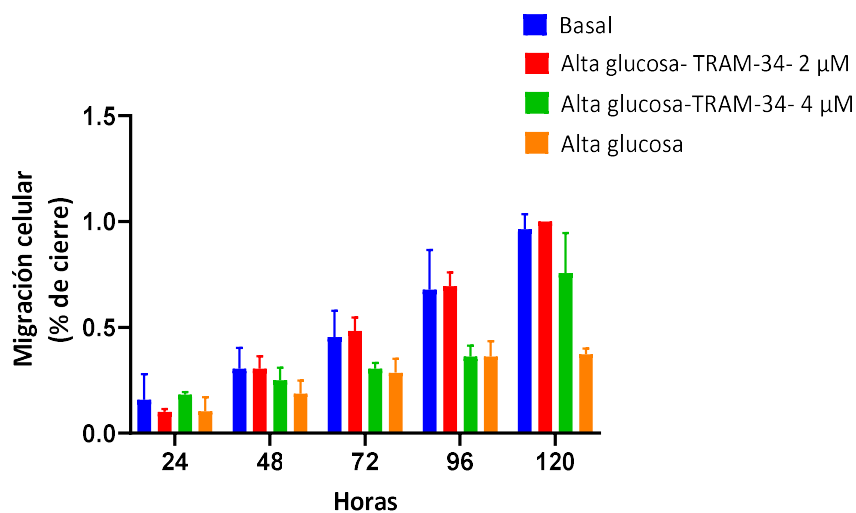
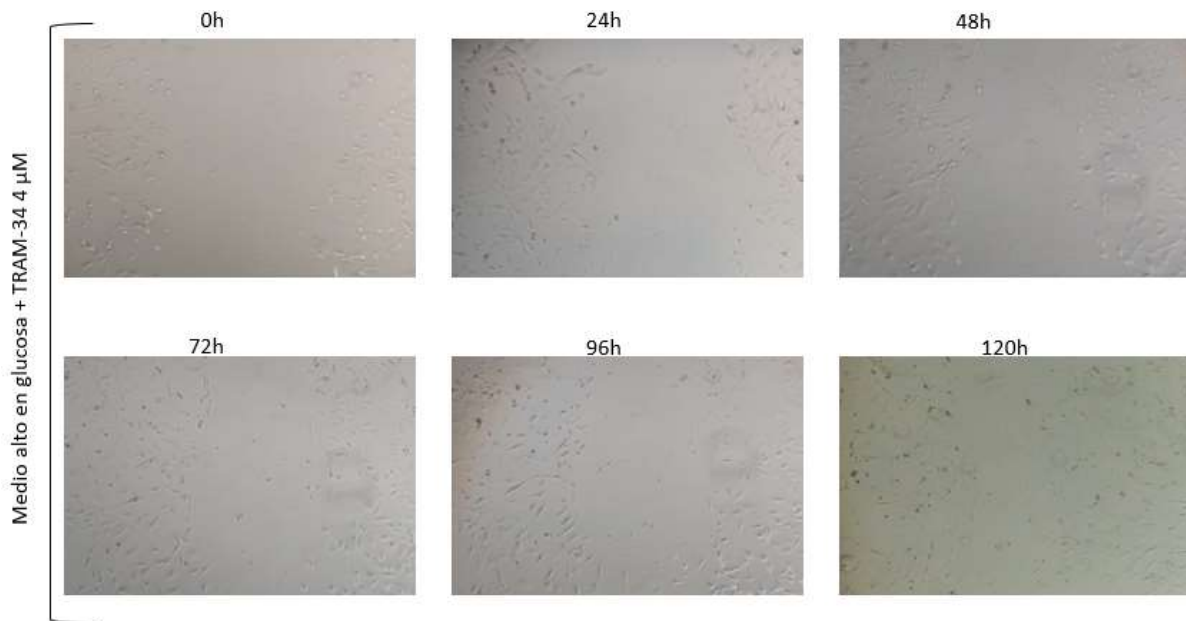


Figura 4.10 (A) Imágenes representativas de la migración de las células expuestas a altas concentraciones de glucosa y TRAM-34 2 y 4 μM (B) Imágenes representativas de la migración de las células expuestas a altas concentraciones de glucosa y TRAM-34 4 μM . Magnificación de las imágenes 10X. (C) Análisis cuantitativo de la cobertura del defecto en experimentos con medio basal (17,5 mM) , suplementado con alta glucosa (55 mM) y suplementado con altas concentraciones de glucosa con adición de TRAM-34 a concentraciones de 2, 4 y 8 μM .

A las 24 horas, se evidenció una diferencia significativa entre las células expuestas a alta glucosa y las que además se suplementaban con TRAM-34- 4 μM ($p=0,0015$), ya que estas últimas empezaban a cerrar el defecto más rápido. Sin embargo, esta tendencia no se mantuvo durante todo el experimento. A las 48, 72 y 96 horas, la tasa de cierre en ambas condiciones fue similar (48h $p=0,1875$, 72h $p=0,8109$ y 96h $p=>0,999$); y solo volvió a ser significativa a las 120 h ($p=0,0148$). Las

células en condiciones de alta glucosa y TRAM-34 a una concentración de 2 μ M, a las 48 horas empezaron a cerrar el defecto significativamente más rápido en relación con las células expuestas únicamente a altas concentraciones de glucosa ($p=0,0102$) y se mantuvo una diferencia significativa por el tiempo que duró el experimento (72 h $p=0,0004$ y 96 h y 120 h $p<0,0001$). Los valores de migración alcanzados por las células bajo el tratamiento de alta glucosa y TRAM-34- 2 μ M se acercaron a la tasa de cierre de las células en condiciones basales, por lo que, respecto a ellas la diferencia no fue significativa en ningún punto del experimento (24h $p=0,02871$, 48 h $p>0,999$, 72h $p=0,7853$, 96h $p=0,9919$ y 120 h $p=0,09277$), lo que implica que el tratamiento con TRAM-34- 2 μ M mejora la tasa de migración de las células expuestas a Altas concentraciones de glucosa y las acerca a los patrones de migración normales. Respecto al cierre de las células en condiciones basales, las células expuestas a condiciones de alta glucosa y TRAM-34- 4 μ M migraron más despacio, pero la diferencia solo fue significativa a las 72 ($p=0,0013$) y 96 horas ($p=0,0003$).

4.2.3. Ensayo de apoptosis.

Este experimento detectó los nucleosomas generados en el evento de una apoptosis. El enriquecimiento de mono y oligonucleosomas citoplasmáticos en las células expuestas a altas concentraciones de glucosa es significativamente mayor ($p<0.0001$) respecto a las células en medio basal (figura 4.11).

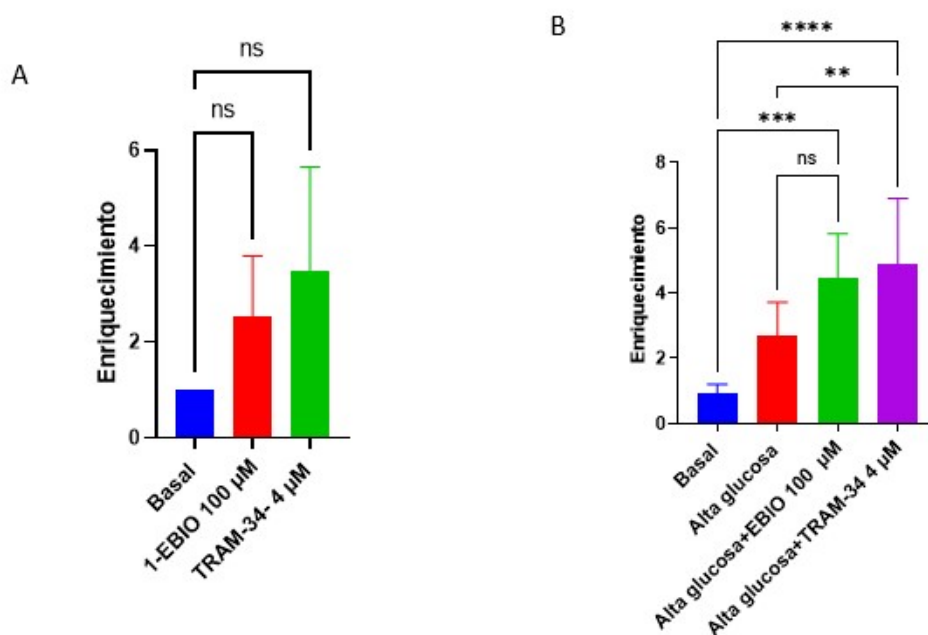


Figura 4.11. A. Detección de apoptosis en células de endotelio humano expuestas a concentraciones de 1-EBIO 100 μ M o TRAM-34 a una concentración de 4 μ M. B Detección de apoptosis en células de endotelio humano expuestas a 1-EBIO 100 μ M o TRAM-34 4 μ M asociados a elevadas de concentraciones de glucosa (55 mM).

La exposición de células del endotelio humano a las concentraciones de 1-EBIO 100 μM ($p=0,4876$) y TRAM-34 4 μM ($p=0,0525$) en medio basal no indujo apoptosis diferente a la del cultivo expuesto solo al medio control. Sin embargo, al exponer a las células la misma concentración de 1-EBIO y TRAM-34 pero disueltos en medio con altas concentraciones de glucosa (55 mM), el cultivo celular en el medio con TRAM-34 4 μM generó un nivel de apoptosis significativamente superior al que generaban elevadas concentraciones de glucosa por si mismas ($p=0,0098$), lo cual no sucedió en el medio con 1-EBIO 100 μM ($p= 0,1167$). Esto sugiere que la inhibición del canal KCa3.1 con TRAM-34 a las concentraciones usadas podría potenciar el efecto apoptótico de la diabetes.

4.3 Discusión de los resultados.

KCa3.1 ha sido descrito principalmente como un inductor de la proliferación y en escenarios menos habituales como agente inhibidor de la mitosis. Los experimentos realizados hacen pensar que el endotelio de la córnea hace parte de esos tejidos menos frecuentes ya que los resultados evidenciaron un efecto anti-proliferativo al estimular el canal en las células de la línea celular de endotelio de la córnea con 1-EBIO. La reducción en la proliferación se mantiene en el tiempo de exposición a concentraciones de 1-EBIO 50 μM , 100 μM y 200 μM y muestran una tendencia dosis dependiente. Adicionalmente, a altas concentraciones tiende a generar desdiferenciación celular. La inhibición funcional de KCa3.1 con TRAM-34 tuvo el efecto contrario sobre la proliferación, particularmente a concentraciones de 2 μM , 4 μM y 8 μM ; sin embargo, en este caso el efecto no era persistente en el tiempo y se acercaba al control al cuarto día de tratamiento independientemente de la concentración usada. En esto parece intervenir una condición que va más allá del aumento exclusivo en el flujo de iones y que involucra patrones de regulación particulares como se evidenció en los experimentos realizados por Koegel y colaboradores en la línea de queratinocitos HaCaT, una línea celular de piel humana adulta. En estos experimentos, a las 72 horas de exposición a EBIO ocurrió una pérdida casi total de la actividad mitogénica asociada a la caída de los niveles de la proteína del canal y el ARNm, al punto que las corrientes medidas en los experimentos de electrofisiología prácticamente desaparecían (Koegel et al., 2003). Sin embargo, si esto sucede en las células del endotelio corneal, es probable que las células puedan ser estimuladas simultáneamente por otros factores que asumirían el control de la proliferación ya que KCa3.1 se encuentra significativamente reducido en corneas fetales, es decir en el momento de la vida en el que la proliferación es máxima, en relación con las corneas de adultos (análisis presentado en el capítulo 1 a partir de las bases de expresión asociadas al estudio de Chen y colaboradores (Chen et al., 2013).

El primer mecanismo sugerido como posible modulador de la baja proliferación ante el estímulo con EBIO es la co-regulación con KCNN2 el cual, en las muestras fetales, se encuentra sobre-expresado en una proporción similar a la magnitud con la que KCNN4 es regulado a la baja. En entornos con bajas presiones de oxígeno, como el microambiente prenatal, la expresión del gen *KCNN2* está regulada fuertemente al alta por factores inducibles por hipoxia (HIF), y esta sobreexpresión del canal se asocia con una mayor capacidad proliferativa de las células (Tajima et al., 2006), aunque estas mismas condiciones pueden estimular la expresión de *KCNN4*, lo hacen en una proporción mucho menor, pero probablemente suficiente para inducir su regulación a la baja. Así pues, sería

interesante evaluar el comportamiento de la expresión de estos dos canales en el modelo experimental usado.

El otro mecanismo que podría participar en la regulación positiva de la proliferación en las células del endotelio ante la reducción de KCNN4 por contra-regulación funcional, son los factores de crecimiento, específicamente el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), ya que son producidos por las células del endotelio y la unión a sus receptores tirosina quinasa induce la activación de canales permeables a Ca^{2+} con un efecto proliferativo (Gospodarowicz et al., 1977; Mergler et al., 2003), proceso que puede favorecerse por la hiperpolarización mediada por KC3.1. Adicionalmente, la nifedipina que es inhibidor de los canales de calcio, pero también de KCa3.1 (Wulff et al., 2000), reduce significativamente la magnitud de este efecto.

Otro factor de crecimiento que podría estar asociado con la respuesta vista en los experimentos en el endotelio ante el estímulo por 1-EBIO y la inhibición por TRAM-34 es el factor de crecimiento plaquetario (PDGF). En células de músculo liso de las arterias coronarias induce un aumento en la expresión del ARNm de KCa3.1 que puede ser inhibida por 1-EBIO (300 μM) (Bi et al., 2013). Aunque PDGF no se ha determinado que lo produzcan las células del endotelio, si es producido por las células epiteliales de la córnea (Cuadrado Escamilla, 2009), lo que sugiere que podría también expresarse allí pero para lo cual son necesarios estudios adicionales.

En los experimentos de migración, la exposición a altas concentraciones de EBIO indujo desdiferenciación celular y desprendimiento de las células. TRAM-34 por su parte mostró un efecto bimodal, ya que a bajas concentraciones (2 μM) mejoró el cierre del defecto mientras que a concentraciones intermedias (4 μM y 8 μM) redujo la migración.

Para que una célula migre se requiere que sea estimulada por factores químicos (como los factores de crecimiento o ligandos) o por factores mecánicos, y que se generen en su interior ondas de calcio que favorezcan la polimerización de la actina y la activación de la miosina. Una vez esto sucede, ocurre un movimiento de la parte celular más cercana al defecto por una ganancia de volumen local, y un re-organización del citoesqueleto de la parte más distal al defecto acompañada de una pérdida de agua secundaria al flujo de cloro y potasio y, en conjunto, estos cambios permiten el movimiento (Catacuzzeno & Franciolini, 2018). Los cambios de volumen celular asociados a la protrusión frontal y la retracción posterior son secundarios a flujos de iones que deben regularse de manera precisa sin desestabilizar la osmolaridad intracelular (Catacuzzeno et al., 2011; Cuddapah et al., 2012). En este control osmolar la participación de KCa3.1. es muy importante, puesto que la entrada de calcio para mediar los movimientos del citoesqueleto lleva a una despolarización en la membrana que terminaría por reducir la entrada de calcio y frenaría el proceso, entonces, para que esto no ocurra, la salida de iones K^+ a través de los canales KCa3.1 es una solución, ya que reduce el número de cargas iónicas al interior de la célula y facilita la entrada de calcio, permitiendo que se generen señales más amplias (Gao et al., 2010), lo que además favorece la salida de agua y el desprendimiento posterior para avanzar. Después de la aplicación de TRAM-34 las corrientes de calcio se reducen significativamente (Fioretti et al., 2009) y la migración baja en la mayoría de los

casos (Bonito et al., 2016; Jakakul et al., 2021; Y. Liu et al., 2015) así como ocurrió en nuestros experimentos con las concentraciones de 4 μ M y 8 μ M. Además, esto explica al menos en parte, los mecanismos por los que la activación de KCa3.1 con 1-EBIO indujo una reducción del volumen celular y un desprendimiento de las células.

Si bien llama la atención que en los experimentos de proliferación 1-EBIO y TRAM-34 generaran efectos opuestos mientras que en migración parecieran con algunas dosis tener efectos similares, es importante anotar que TRAM-34 es modulado por condiciones metabólicas. Los niveles más elevados de suero fetal bovino e insulina del medio usado en los experimentos de proliferación generan un ambiente mitogénico que no es el mismo en los experimentos de migración tras la reducción del suplemento en el medio, y eso podría mediar esa diferencia además de aportar una explicación adicional a las posibles causas de la respuesta proliferativa de TRAM-34 en ambientes con alta suplementación. Cuando TRAM-34 es usado en ambientes altamente mitogénicos esto reduce notablemente el efecto anti-proliferativo que puede tener en ambientes menos estimulantes (Petho et al., 2016) y esta condición podría mediar también en los procesos de migración.

KCa3.1 podría participar en la apoptosis por mecanismos moduladores del volumen celular, cuya reducción hace parte de los eventos iniciales de la misma (McFerrin et al., 2012). KCa3.1 afecta la muerte celular programada, de una manera específica de acuerdo con el tipo de célula a través de los procesos de diferenciación celular. En algunas líneas de cáncer la inhibición del canal con TRAM-34 no provoca apoptosis pero sucede cuando se acompaña de algunos factores que pueden inducirla mediante la translocación del citocromo c en la mitocondria y la activación secundaria de la vía de las caspasas (De Marchi et al., 2009). Un efecto que parece ser mediado por un aumento de la sensibilidad celular para que un estímulo determinado induzca la apoptosis, lo que hipotetizamos podría suceder en los experimentos en que la inhibición de KCa3.1 favorece la apoptosis cuando sucede simultáneamente con la exposición a altas concentraciones de glucosa.

En conclusión, los efectos moduladores de KCa3.1 en la proliferación, la migración y la apoptosis dependen de la dosis y las condiciones asociadas. Las concentraciones moderadas y altas de EBIO muestran efectos inhibitorios en la proliferación sostenidos en el tiempo en condiciones basales y de alta glucosa, también reducen el volumen celular y tienden a afectar la estabilidad de las células en el borde de la lesión lo que dificulta el seguimiento *in vitro* particularmente en condiciones de alta glucosa. Las vías involucradas y los reguladores de estos eventos requieren estudios adicionales ya que de acuerdo con nuestros resultados al parecer no están mediadas por apoptosis. El tratamiento con TRAM-34 en las células del endotelio tiene efectos inductores de la proliferación en medios altamente mitogénicos. Experimentos con medios con menor cantidad de suplementos evidencian que TRAM-34 podría promover la migración a bajas dosis, pero a concentraciones intermedias, la reduce. Si bien el tratamiento con TRAM-34 no induce apoptosis a las dosis utilizadas, si la genera cuando se utiliza en conjunto con concentraciones altas de glucosa lo que sugiere un efecto de sensibilización ante la inhibición funcional de KCa3.1.

CONCLUSIONES

- La tasa de reducción de la CED en las poblaciones más jóvenes sin patologías oculares o sistémicas es mayor (calculada en 16 células / mm² por año) a la de los grupos de mayor edad (5 células / mm² por año).
- La hiperglicemia realmente tiene un impacto negativo sobre el endotelio de la córnea, pero no todos los tipos de diabetes lo afectan por igual. La DM T1 genera una reducción de 193,30 células / mm² anual en promedio y un aumento de la paquimetría de 24,11 μm en relación con los controles de la misma edad. Estos cambios son estadísticamente significativos entre los pacientes y controles independientemente de la duración de la enfermedad. La DM T2 se asocia con una reducción de la DEC de 151,14 células / mm² en promedio al año y un aumento en la paquimetría de 12,85 μm respecto a los controles pareados por edad; sin embargo, la diferencia solo es estadísticamente significativa en pacientes que llevan más de 11 años con DM T2. Estos modelos revelan la importancia del seguimiento de las condiciones del endotelio en pacientes diabéticos, el cual debe hacerse tempranamente, en particular, en los pacientes con DM T1.
- En experimentos realizados en una línea inmortalizada de endotelio humano, la exposición a altas concentraciones de glucosa promueve tempranamente la proliferación de las células del endotelio, pero luego el número de células viables tiende a reducirse, lo que se explica al menos parcialmente por la inducción de apoptosis asociada a la exposición a medios hiperglúcidos. Adicionalmente, los medios con elevadas concentraciones de glucosa retrasan la migración de las células, lo que podría tener un impacto en la capacidad de recuperación del endotelio *in vivo* y quizás se relacione con el edema persistente en el posoperatorio de los pacientes diabéticos, por lo que se sugiere hacer un seguimiento estricto de la glucemia en estos pacientes tanto pre como post quirúrgico.
- Las células del endotelio de la córnea expresan canales de potasio activados por cationes (calcio y sodio) SK2, SK3, IK y SLICK. Los canales BK parecen expresarse en condiciones particulares asociados a las subunidades regulatorias B3 y B4.
- *KCNN4*, el gen que codifica IK, está regulado a la baja en el periodo prenatal cuando sucede fisiológicamente la proliferación de las células del endotelio corneal; mientras que en el periodo posnatal se sobre-expresa solo en condiciones patológicas. *KCNN2*, gen que codifica para SK2, está sobre-expresado en el periodo prenatal.
- La sobreestimulación de IK reduce la proliferación, a bajas dosis (2μM) favorece la migración y no induce significativamente la apoptosis aún a dosis moderadas (4μM). El rol de IK sobre la proliferación podría estar mediado por TGF-β como se ha descrito en células del epitelio renal. Adicionalmente, IK modula el volumen de las células del endotelio, su estimulación reduce el tamaño y la inhibición lo aumenta, lo que sugiere que podría participar en la función de deshidratación por lo que podría estudiarse el rol en la permeabilidad de barrera.

- En condiciones hiperglúcidas, la sobreestimulación de IK reduce el efecto proliferativo inducido por el aumento de concentraciones de glucosa y retrasa de la migración. La inhibición funcional de IK aumenta la proliferación y potencia la proliferación asociada a medios hiperglúcidos. Si se inhibe funcionalmente IK con TRAM-34 aumenta la migración y a 2 μM la acerca a las condiciones basales. Tanto la inhibición del canal con 4 μM , como la estimulación del canal con 100 μM 1-EBIO favorecen la apoptosis.
- En medios hiperglúcidos, la inhibición del canal KCa 3.1 con TRAM-34 a 2 μM al favorecer la migración, se propone como un objetivo farmacológico de estudio para modular la migración en pacientes diabéticos.
- El modelo basado en la línea celular inmortalizada de endotelio corneal humano descrita por Griffith y colaboradores en 1999 (Griffith et al., 1999) y las condiciones descritas en este trabajo corresponde a un nuevo modelo experimental para la evaluación de la respuesta del endotelio corneal en condiciones hiperglúcidas que asemejan las presentes en los pacientes diabéticos abriendo una posibilidad a la generación de nuevo conocimiento.

DIFUSION DE RESULTADOS

1. In silico and in vitro analysis of cation-activated potassium channels in human corneal endothelial cells. Amador-Muñoz, D., Gutiérrez, Á. M., Payán-Gómez, C. & Matheus, L. M., Jun 17 2020, In: Experimental Eye Research. 197, 108114.
2. Diabetes mellitus type 1 has a higher impact on corneal endothelial cell density and pachymetry than Diabetes mellitus type 2 independently of age: A meta-regression. Amador-Muñoz D, Conforti V, Matheus LM, Molano-Gonzalez N, Payán-Gómez C. Cornea (Aceptado para publicación)
3. Análisis bioinformático identifica proteínas involucradas en el transporte iónico del endotelio corneal y su rol en la fisiopatología tisular. Amador Muñoz D, Payan- Gomez C, Matheus LM. I Congreso Internacional de Bioeconomía y Biotecnología, octubre 2019.
4. Identificación de dimorfismo sexual en el transcriptoma del endotelio de la córnea. Amador Muñoz D, Payan- Gomez C, Matheus LM. Congreso de Ingeniería Biomédica y Bioingeniería, noviembre 2019.

REFERENCIAS

- Abib, F. C., & Barreto Junior, J. (2001). Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 27(10), 1574-1578. [https://doi.org/10.1016/s0886-3350\(01\)00925-7](https://doi.org/10.1016/s0886-3350(01)00925-7)
- Aketa, N., Uchino, M., Kawashima, M., Uchino, Y., Yuki, K., Ozawa, Y., Sasaki, M., Yamagishi, K., Sawada, N., Tsugane, S., Tsubota, K., & Iso, H. (2021). Myopia, corneal endothelial cell density and morphology in a Japanese population-based cross-sectional study: The JPHC-NEXT Eye Study. *Scientific Reports*, 11(1), 6366. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85617-4>
- Akhtar, R. A., & Chaouchi, K. M. (2004). Effects of Hyperglycemia on Cell Migration and Proliferation, and Phospholipase C1 in Rabbit Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(13), 3799-3799.
- Aldrich, B. T., Schlötzer-Schrehardt, U., Skeie, J. M., Burckart, K. A., Schmidt, G. A., Reed, C. R., Zimmerman, M. B., Kruse, F. E., & Greiner, M. A. (2017). Mitochondrial and Morphologic Alterations in Native Human Corneal Endothelial Cells Associated With Diabetes Mellitus. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(4), 2130. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-21094>
- Amano, S., Kaji, Y., & Mimura, T. (2010). Biology of corneal endothelial cells in vivo and in vitro. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 54(3), 211-214. <https://doi.org/10.1007/s10384-010-0799-8>
- American Diabetes Association. (2020). Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. *Diabetes Care*, 43(Supplement 1), S98-S110. <https://doi.org/10.2337/dc20-S009>
- Anumanthan, G., Gupta, S., Fink, M. K., Hesemann, N. P., Bowles, D. K., McDaniel, L. M., Muhammad, M., & Mohan, R. R. (2018). KCa3.1 ion channel: A novel therapeutic target for corneal fibrosis. *PloS One*, 13(3), e0192145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192145>
- Baratz, K. H., Tosakulwong, N., Ryu, E., Brown, W. L., Branham, K., Chen, W., Tran, K. D., Schmid-Kubista, K. E., Heckenlively, J. R., Swaroop, A., Abecasis, G., Bailey, K. R., & Edwards, A. O. (2010). E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *The New England Journal of Medicine*, 363(11), 1016-1024. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1007064>
- Barrett, K. E., & Keely, S. J. (2000). Chloride secretion by the intestinal epithelium: Molecular basis and regulatory aspects. *Annual Review of Physiology*, 62, 535-572. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.535>
- Begenisich, T., Nakamoto, T., Ovitt, C. E., Nehrke, K., Brugnara, C., Alper, S. L., & Melvin, J. E. (2004). Physiological Roles of the Intermediate Conductance, Ca²⁺-activated Potassium Channel Kcnn4. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47681-47687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409627200>
- Bernard, K., Bogliolo, S., Soriani, O., & Ehrenfeld, J. (2003). Modulation of calcium-dependent chloride secretion by basolateral SK4-like channels in a human bronchial cell line. *The Journal of Membrane Biology*, 196(1), 15-31. <https://doi.org/10.1007/s00232-003-0621-3>
- Bhattacharjee, A., Joiner, W. J., Wu, M., Yang, Y., Sigworth, F. J., & Kaczmarek, L. K. (2003). Slick (Slo2.1), a Rapidly-Gating Sodium-Activated Potassium Channel Inhibited by ATP. *Journal of Neuroscience*, 23(37), 11681-11691. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-37-11681.2003>

- Bhattacharjee, A., von Hehn, C. A. A., Mei, X., & Kaczmarek, L. K. (2005). Localization of the Na⁺-activated K⁺ channel Slick in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 484(1), 80-92. <https://doi.org/10.1002/cne.20462>
- Bi, D., Toyama, K., Lemaître, V., Takai, J., Fan, F., Jenkins, D. P., Wulff, H., Gutterman, D. D., Park, F., & Miura, H. (2013). The Intermediate Conductance Calcium-activated Potassium Channel KCa3.1 Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation via Controlling Calcium-dependent Signaling*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(22), 15843-15853. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.427187>
- Bonanno, J. A. (2003). Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Progress in Retinal and Eye Research*, 22(1), 69-94.
- Bonanno, J. A. (2012). Molecular Mechanisms Underlying the Corneal Endothelial Pump. *Experimental Eye Research*, 95(1), 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.06.004>
- Bonito, B., Sauter, D. R. P., Schwab, A., Djamgoz, M. B. A., & Novak, I. (2016). KCa3.1 (IK) modulates pancreatic cancer cell migration, invasion and proliferation: Anomalous effects on TRAM-34. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 468(11), 1865-1875. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1891-9>
- Bourne, W. M. (2003). Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye (London, England)*, 17(8), 912-918. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700559>
- Bresgen, N., & Eckl, P. (2015). Oxidative Stress and the Homeodynamics of Iron Metabolism. *Biomolecules*, 5(2), 808-847. <https://doi.org/10.3390/biom5020808>
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6), 1615-1625.
- Brugnara, C., Gee, B., Armsby, C. C., Kurth, S., Sakamoto, M., Rifai, N., Alper, S. L., & Platt, O. S. (1996). Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation*, 97(5), 1227-1234.
- Busted, N., Olsen, T., & Schmitz, O. (1981). Clinical observations on the corneal thickness and the corneal endothelium in diabetes mellitus. *The British Journal of Ophthalmology*, 65(10), 687-690.
- Calvo-Maroto, A. M., Cerviño, A., Perez-Cambrodí, R. J., García-Lázaro, S., & Sanchis-Gimeno, J. A. (2015). Quantitative corneal anatomy: Evaluation of the effect of diabetes duration on the endothelial cell density and corneal thickness. *Ophthalmic & Physiological Optics: The Journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)*, 35(3), 293-298. <https://doi.org/10.1111/opo.12191>
- Cankurtaran, V., & Tekin, K. (2019). Cumulative Effects of Smoking and Diabetes Mellitus on Corneal Endothelial Cell Parameters. *Cornea*, 38(1), 78-83. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001718>
- Cárdenas Díaz, T., Corcho Arévalo, Y., Torres Ortega, R., Capote Cabrera, A., Hernández López, I., & Cruz Izquierdo, D. (2013). Caracterización del endotelio corneal en pacientes con indicación de cirugía de catarata. *Revista Cubana de Oftalmología*, 26(1), 39-47.
- Catacuzzeno, L., Aiello, F., Fioretti, B., Sforza, L., Castigli, E., Ruggieri, P., Tata, A. M., Calogero, A., & Franciolini, F. (2011). Serum-activated K and Cl currents underlay U87-MG glioblastoma cell migration. *Journal of Cellular Physiology*, 226(7), 1926-1933. <https://doi.org/10.1002/jcp.22523>

- Catacuzzeno, L., & Franciolini, F. (2018). Role of KCa3.1 Channels in Modulating Ca²⁺ Oscillations during Glioblastoma Cell Migration and Invasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2970. <https://doi.org/10.3390/ijms19102970>
- Cernea, S., & Dobreanu, M. (2013). Diabetes and beta cell function: From mechanisms to evaluation and clinical implications. *Biochemia Medica*, 23(3), 266-280. <https://doi.org/10.11613/bm.2013.033>
- Chadha, P. S., Liu, L., Rikard-Bell, M., Senadheera, S., Howitt, L., Bertrand, R. L., Grayson, T. H., Murphy, T. V., & Sandow, S. L. (2011). Endothelium-Dependent Vasodilation in Human Mesenteric Artery Is Primarily Mediated by Myoendothelial Gap Junctions Intermediate Conductance Calcium-Activated K⁺ Channel and Nitric Oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(3), 701-708. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.165795>
- Chandy, K. G., Wulff, H., Beeton, C., Pennington, M., Gutman, G. A., & Cahalan, M. D. (2004). K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(5), 280-289. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.03.010>
- Chantome, A., Girault, A., Potier, M., Collin, C., Vaudin, P., Pagès, J.-C., Vandier, C., & Joulin, V. (2009). KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Experimental Cell Research*, 315(20), 3620-3630. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.07.021>
- Chen, Y., Huang, K., Nakatsu, M. N., Xue, Z., Deng, S. X., & Fan, G. (2013). Identification of novel molecular markers through transcriptomic analysis in human fetal and adult corneal endothelial cells. *Human Molecular Genetics*, 22(7), 1271-1279. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd527>
- Chhabra, M., Prausnitz, J. M., & Radke, C. J. (2009). Modeling corneal metabolism and oxygen transport during contact lens wear. *Optometry and Vision Science: Official Publication of the American Academy of Optometry*, 86(5), 454-466. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e31819f9e70>
- Cho, K. S., Lee, E. H., Choi, J. S., & Joo, C. K. (1999). Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(5), 911-919.
- Chung, D. D., Frausto, R. F., Lin, B. R., Hanser, E. M., Cohen, Z., & Aldave, A. J. (2017). Transcriptomic Profiling of Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(7), 3202-3214. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-21423>
- Costantini, E., Touzeau, O., Gaujoux, T., Basli, E., Kopito, R., Borderie, V. M., & Laroche, L. (2009). Age-Related Changes in Central and Peripheral Corneal Thickness. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(13), 5107-5107.
- Crotti, C., & Selmi, C. (2014). Chapter 46—Glutamic Acid Decarboxylase Antibody. En Y. Shoenfeld, P. L. Meroni, & M. E. Gershwin (Eds.), *Autoantibodies (Third Edition)* (pp. 385-389). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56378-1.00046-0>
- Cuadrado Escamilla, J. L. (2009). *Estudio anatómico-clínico y epidemiológico de la queratitis laminaar difusa como complicación postquirúrgica de la fotoqueratomileusis (lasik)*. Universitat de València, Servei de Publicacions.
- Cuddapah, V. A., Habela, C. W., Watkins, S., Moore, L. S., Barclay, T.-T. C., & Sontheimer, H. (2012). Kinase activation of ClC-3 accelerates cytoplasmic condensation during mitotic cell rounding. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 302(3), C527-538. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00248.2011>

- Cui, Z., Zeng, Q., Guo, Y., Liu, S., Wang, P., Xie, M., & Chen, J. (2018). Pathological molecular mechanism of symptomatic late-onset Fuchs endothelial corneal dystrophy by bioinformatic analysis. *PLOS ONE*, *13*(5), e0197750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197750>
- da Veiga Moreira, J., Peres, S., Steyaert, J.-M., Bigan, E., Paulevé, L., Nogueira, M. L., & Schwartz, L. (2015). Cell cycle progression is regulated by intertwined redox oscillators. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, *12*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12976-015-0005-2>
- D'Arcangelo, D., Scatozza, F., Giampietri, C., Marchetti, P., Facchiano, F., & Facchiano, A. (2019). Ion Channel Expression in Human Melanoma Samples: In Silico Identification and Experimental Validation of Molecular Targets. *Cancers*, *11*(4), 446. <https://doi.org/10.3390/cancers11040446>
- DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis. (s. f.). Recuperado 24 de abril de 2021, de <https://david.ncifcrf.gov/>
- Dawczynski, J., Franke, S., Blum, M., Kasper, M., Stein, G., & Strobel, J. (2002). Advanced glycation end-products in corneas of patients with keratoconus. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, *240*(4), 296-301. <https://doi.org/10.1007/s00417-002-0445-3>
- Dawson, D. G., John L. U, & Henry F. Edelhauser. (2011). Cornea and Sclera. En *Adler's Physiology of the Eye* (11th Edition). W B Saunders Company. <https://www.elsevier.com/books/adlers-physiology-of-the-eye/levin/978-0-323-05714-1>
- De Marchi, U., Sassi, N., Fioretti, B., Catacuzzeno, L., Cereghetti, G. M., Szabò, I., & Zoratti, M. (2009). Intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium channel (KCa_{3.1}) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Cell Calcium*, *45*(5), 509-516. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.03.014>
- Deardorff, P. M., McKay, T. B., Wang, S., Ghezzi, C. E., Cairns, D. M., Abbott, R. D., Funderburgh, J. L., Kenyon, K. R., & Kaplan, D. L. (2018). Modeling Diabetic Corneal Neuropathy in a 3D In Vitro Cornea System. *Scientific Reports*, *8*(1), 17294. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35917-z>
- Deignan, J., Luján, R., Bond, C., Riegel, A., Watanabe, M., Williams, J. T., Maylie, J., & Adelman, J. P. (2012). SK2 and SK3 Expression Differentially Affect Firing Frequency and Precision in Dopamine Neurons. *Neuroscience*, *217*, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.053>
- Diecke, F. P. J., Ma, L., Iserovich, P., & Fischbarg, J. (2007). Corneal endothelium transports fluid in the absence of net solute transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1768*(9), 2043-2048. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.020>
- Diecke, F. P., Wen, Q., Iserovich, P., Li, J., Kuang, K., & Fischbarg, J. (2005). Regulation of Na-K-2Cl cotransport in cultured bovine corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research*, *80*(6), 777-785. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.12.008>
- Dolga, A. M., Terpolilli, N., Kepura, F., Nijholt, I. M., Knaus, H.-G., D'Orsi, B., Prehn, J. H. M., Eisel, U. L. M., Plant, T., Plesnila, N., & Culmsee, C. (2011). KCa₂ channels activation prevents [Ca²⁺]_i deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia. *Cell Death & Disease*, *2*(4), e147. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.30>

- Dong, D.-L., Bai, Y.-L., & Cai, B.-Z. (2016). Chapter Six - Calcium-Activated Potassium Channels: Potential Target for Cardiovascular Diseases. En R. Donev (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 104, pp. 233-261). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.11.007>
- Donnelly, J. J., Li, W. Y., Rockey, J. H., & Prendergast, R. A. (1985). Induction of class II (Ia) alloantigen expression on corneal endothelium in vivo and in vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 26(4), 575-580.
- Doughty, M. J., & Zaman, M. L. (2000). Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: A review and meta-analysis approach. *Survey of Ophthalmology*, 44(5), 367-408. [https://doi.org/10.1016/s0039-6257\(00\)00110-7](https://doi.org/10.1016/s0039-6257(00)00110-7)
- Du, J., Aleff, R. A., Soragni, E., Kalari, K., Nie, J., Tang, X., Davila, J., Kocher, J.-P., Patel, S. V., Gottesfeld, J. M., Baratz, K. H., & Wieben, E. D. (2015). RNA toxicity and missplicing in the common eye disease fuchs endothelial corneal dystrophy. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 5979-5990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.621607>
- Eghrari, A. O., Riazuddin, S. A., & Gottsch, J. D. (2015). Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 134, 7-23. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.04.001>
- Elliott, J. I., & Higgins, C. F. (2003). IKCa1 activity is required for cell shrinkage, phosphatidylserine translocation and death in T lymphocyte apoptosis. *EMBO Reports*, 4(2), 189-194. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor722>
- Fang, M., Echouffo-Tcheugui, J. B., & Selvin, E. (2020). Burden of Complications in U.S. Adults With Young-Onset Type 2 or Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 43(4), e47-e49. <https://doi.org/10.2337/dc19-2394>
- Fanger, C. M., Ghanshani, S., Logsdon, N. J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J., Beckingham, K., Chandy, K. G., Cahalan, M. D., & Aiyar, J. (1999). Calmodulin Mediates Calcium-dependent Activation of the Intermediate Conductance KCa Channel, IKCa1 *. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5746-5754. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5746>
- Feranchak, A. P., Doctor, R. B., Troetsch, M., Brookman, K., Johnson, S. M., & Fitz, J. G. (2004). Calcium-dependent regulation of secretion in biliary epithelial cells: The role of apamin-sensitive SK channels. *Gastroenterology*, 127(3), 903-913. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.06.047>
- Fernández, A., Moreno, J., Prósper, F., García, M., & Echeveste, J. (2008). Regeneración de la superficie ocular: Stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31(1), 53-69.
- Fioretti, B., Catacuzzeno, L., Sforza, L., Aiello, F., Pagani, F., Ragozzino, D., Castigli, E., & Franciolini, F. (2009). Histamine hyperpolarizes human glioblastoma cells by activating the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 297(1), C102-110. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00354.2008>
- Fischbarg, J. (2010). Fluid Transport Across Leaky Epithelia: Central Role of the Tight Junction and Supporting Role of Aquaporins. *Physiological Reviews*, 90(4), 1271-1290. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2009>
- Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, 93(1), 137-188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>
- Forrester, J. V., Dick, A. D., McMenemy, P. G., Roberts, F., & Pearlman, E. (2016a). Chapter 1—Anatomy of the eye and orbit. En *The Eye (Fourth Edition)* (pp. 1-102.e2). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5554-6.00001-0>

- Forrester, J. V., Dick, A. D., McMenamin, P. G., Roberts, F., & Pearlman, E. (2016b). Chapter 4—Biochemistry and cell biology. En *The Eye (Fourth Edition)* (pp. 157-268.e4). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5554-6.00004-6>
- Gabelt, B. T., & Paul L. Kaufman. (s. f.). Production and Flow of Aqueous Humor. En *Adler's Physiology of the Eye* (11th edition). W B Saunders Company.
- Gagnon, M. M., Boisjoly, H. M., Brunette, I., Charest, M., & Amyot, M. (1997). Corneal endothelial cell density in glaucoma. *Cornea*, *16*(3), 314-318.
- Gambato, C., Longhin, E., Catania, A. G., Lazzarini, D., Parrozzani, R., & Midena, E. (2015). Aging and corneal layers: An in vivo corneal confocal microscopy study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, *253*(2), 267-275. <https://doi.org/10.1007/s00417-014-2812-2>
- Gao, Y., Hanley, P. J., Rinné, S., Zuzarte, M., & Daut, J. (2010). Calcium-activated K(+) channel (K(Ca)_{3.1}) activity during Ca(2+) store depletion and store-operated Ca(2+) entry in human macrophages. *Cell Calcium*, *48*(1), 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.06.002>
- Gees, M., Colsoul, B., & Nilius, B. (2010). The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003962>
- Ghanshani, S., Wulff, H., Miller, M. J., Rohm, H., Neben, A., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., & Chandy, K. G. (2000). Up-regulation of the IKCa₁ potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(47), 37137-37149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003941200>
- Glaser, N., Little, C., Lo, W., Cohen, M., Tancredi, D., Wulff, H., & O'Donnell, M. (2017). Treatment with the KCa_{3.1} inhibitor TRAM-34 during diabetic ketoacidosis reduces inflammatory changes in the brain: TRAM-34 reduces DKA-related brain inflammation. *Pediatric Diabetes*, *18*(5), 356-366. <https://doi.org/10.1111/pedi.12396>
- Goel, M., Picciani, R. G., Lee, R. K., & Bhattacharya, S. K. (2010). Aqueous Humor Dynamics: A Review. *The Open Ophthalmology Journal*, *4*, 52-59. <https://doi.org/10.2174/1874364101004010052>
- Goldstein, A. S., Janson, B. J., Skeie, J. M., Ling, J. J., & Greiner, M. A. (2020). The effects of diabetes mellitus on the corneal endothelium: A review. *Survey of Ophthalmology*, *65*(4), 438-450. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2019.12.009>
- Gospodarowicz, D., Mescher, A. L., & Birdwell, C. R. (1977). Stimulation of corneal endothelial cell proliferation in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. *Experimental Eye Research*, *25*(1), 75-89. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(77\)90248-2](https://doi.org/10.1016/0014-4835(77)90248-2)
- Grgic, I., Eichler, I., Heinau, P., Si, H., Brakemeier, S., Hoyer, J., & Köhler, R. (2005). Selective blockade of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(4), 704-709. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000156399.12787.5c>
- Gribkoff, V. K., Starrett, J. E., & Dworetzky, S. I. (2001). Maxi-K Potassium Channels: Form, Function, and Modulation of a Class of Endogenous Regulators of Intracellular Calcium. *The Neuroscientist*, *7*(2), 166-177. <https://doi.org/10.1177/107385840100700211>
- Griffith, M., Osborne, R., Munger, R., Xiong, X., Doillon, C. J., Laycock, N. L. C., Hakim, M., Song, Y., & Watsky, M. A. (1999). Functional Human Corneal Equivalents Constructed

from Cell Lines. *Science*, 286(5447), 2169-2172. <https://doi.org/10.1126/science.286.5447.2169>

Grizel, A. V., Glukhov, G. S., & Sokolova, O. S. (2014). Mechanisms of Activation of Voltage-Gated Potassium Channels. *Acta Naturae*, 6(4), 10-26.

Gu, M., Zhu, Y., Yin, X., & Zhang, D.-M. (2018). Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: Insights into their roles in cardiovascular disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), 1-7. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0043-z>

Guéguinou, M., Chantôme, A., Fromont, G., Bougnoux, P., Vandier, C., & Potier-Cartereau, M. (2014). KCa and Ca²⁺ channels: The complex thought. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(10), 2322-2333. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.019>

Güell, J. L. (2015). *Cornea*. Karger Medical and Scientific Publishers.

Ha, T. S., Heo, M.-S., & Park, C.-S. (2004). Functional Effects of Auxiliary β 4-Subunit on Rat Large-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel. *Biophysical Journal*, 86(5), 2871-2882. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74339-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74339-8)

Hage, T. A., & Salkoff, L. (2012). Sodium-Activated Potassium Channels Are Functionally Coupled to Persistent Sodium Currents. *The Journal of Neuroscience*, 32(8), 2714-2721. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5088-11.2012>

Harrison, T. A., He, Z., Boggs, K., Thuret, G., Liu, H.-X., & Defoe, D. M. (2016). Corneal endothelial cells possess an elaborate multipolar shape to maximize the basolateral to apical membrane area. *Molecular Vision*, 22, 31-39.

Harvitt, D. M., & Bonanno, J. A. (1998). Oxygen consumption of the rabbit cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(2), 444-448.

Hasan, S. A. (2010). The Cornea in Diabetes Mellitus. En *Diabetic Retinopathy* (pp. 347-355). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-85900-2_12

Hatou, S., Yamada, M., Akune, Y., Mochizuki, H., Shiraishi, A., Joko, T., Nishida, T., & Tsubota, K. (2010). Role of Insulin in Regulation of Na⁺/K⁺-Dependent ATPase Activity and Pump Function in Corneal Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(8), 3935-3942. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4027>

Hatou, S., Yamada, M., Mochizuki, H., Shiraishi, A., Joko, T., & Nishida, T. (2009). The effects of dexamethasone on the Na,K-ATPase activity and pump function of corneal endothelial cells. *Current Eye Research*, 34(5), 347-354. <https://doi.org/10.1080/02713680902829624>

Hayashi, M., Wang, J., Hede, S. E., & Novak, I. (2012). An intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel is important for secretion in pancreatic duct cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 303(2), C151-159. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00089.2012>

He, Z., Forest, F., Gain, P., Rageade, D., Bernard, A., Acquart, S., Peoc'h, M., Defoe, D. M., & Thuret, G. (2016). 3D map of the human corneal endothelial cell. *Scientific Reports*, 6, 29047. <https://doi.org/10.1038/srep29047>

Hejtmancik, J. F., & Nickerson, J. M. (2015). *Molecular Biology of Eye Disease*. Academic Press.

Hong, S.-J., Wu, K.-Y., Wang, H.-Z., & Fong, Jim. C. (2003). Change of Cytosolic Ca²⁺ Mobility in Cultured Bovine Corneal Endothelial Cells by Endothelin-1. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 19(1), 1-9. <https://doi.org/10.1089/108076803762718060>

Hopfer, U., Fukai, N., Hopfer, H., Wolf, G., Joyce, N., Li, E., & Olsen, B. R. (2005). Targeted disruption of Col8a1 and Col8a2 genes in mice leads to anterior segment abnormalities in the

eye. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(10), 1232-1244. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3019com>

Hu, R. G., Zhu, Y., Donaldson, P., & Kalloniatis, M. (2012). Alterations of Glutamate, Glutamine, and Related Amino Acids in the Anterior Eye Secondary to Ischaemia and Reperfusion. *Current Eye Research*, 37(7), 633-643. <https://doi.org/10.3109/02713683.2012.669509>

Huang, C., Pollock, C. A., & Chen, X.-M. (2014a). High Glucose Induces CCL20 in Proximal Tubular Cells via Activation of the KCa3.1 Channel. *PLOS ONE*, 9(4), e95173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095173>

Huang, C., Pollock, C. A., & Chen, X.-M. (2014b). Role of the potassium channel KCa3.1 in diabetic nephropathy. *Clinical Science*, 127(7), 423-433. <https://doi.org/10.1042/CS20140075>

Huang, C., Yi, H., Shi, Y., Cao, Q., Shi, Y., Cheng, D., Braet, F., Chen, X.-M., & Pollock, C. A. (2021). KCa3.1 Mediates Dysregulation of Mitochondrial Quality Control in Diabetic Kidney Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 573814. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.573814>

ImageJ. (s. f.). Recuperado 11 de mayo de 2021, de <https://imagej.nih.gov.ez.urosario.edu.co/ij/>

International Diabetes Federation. (2019). *IDF Diabetes Atlas* (9.^a ed.). International Diabetes Federation. https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133351_IDFATLAS9e-final-web.pdf

Islam, Q. U., Saeed, M. K., & Mehboob, M. A. (2017). Age related changes in corneal morphological characteristics of healthy Pakistani eyes. *Saudi Journal of Ophthalmology*, 31(2), 86-90. <https://doi.org/10.1016/j.sjopt.2017.02.009>

Iwata, M., Kiritoshi, A., Roat, M. I., Yagihashi, A., & Thoft, R. A. (1992). Regulation of HLA class II antigen expression on cultured corneal epithelium by interferon-gamma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 33(9), 2714-2721.

Jakakul, C., Kanjanasirirat, P., & Muanprasat, C. (2021). Development of a Cell-Based Assay for Identifying KCa3.1 Inhibitors Using Intestinal Epithelial Cell Lines. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*, 26(3), 439-449. <https://doi.org/10.1177/2472555220950661>

Jalimarada, S. S., Ogando, D. G., Vithana, E. N., & Bonanno, J. A. (2013). Ion Transport Function of SLC4A11 in Corneal Endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(6), 4330-4340. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-11929>

Janni re, L., Canceill, D., Suski, C., Kanga, S., Dalmais, B., Lestini, R., Monnier, A.-F., Chapuis, J., Bolotin, A., Titok, M., Chatelier, E. L., & Ehrlich, S. D. (2007). Genetic Evidence for a Link Between Glycolysis and DNA Replication. *PLOS ONE*, 2(5), e447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000447>

Jeganathan, V. S. E., Wang, J. J., & Wong, T. Y. (2008). Ocular Associations of Diabetes Other Than Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*, 31(9), 1905-1912. <https://doi.org/10.2337/dc08-0342>

Joyce, N. C. (2003). Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Progress in Retinal and Eye Research*, 22(3), 359-389.

- Joyce, N. C., Zhu, C. C., & Harris, D. L. (2009). Relationship among Oxidative Stress, DNA Damage, and Proliferative Capacity in Human Corneal Endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(5), 2116-2122. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3007>
- Jurkunas, U. V., Bitar, M. S., Funaki, T., & Azizi, B. (2010). Evidence of oxidative stress in the pathogenesis of fuchs endothelial corneal dystrophy. *The American Journal of Pathology*, 177(5), 2278-2289. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100279>
- Jurkunas, U. V., Rawe, I., Bitar, M. S., Zhu, C., Harris, D. L., Colby, K., & Joyce, N. C. (2008). Decreased expression of peroxiredoxins in Fuchs' endothelial dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(7), 2956-2963. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1529>
- Justet, C., Chifflet, S., & Hernandez, J. A. (2019). Calcium Oscillatory Behavior and Its Possible Role during Wound Healing in Bovine Corneal Endothelial Cells in Culture. *BioMed Research International*, 2019, e8647121. <https://doi.org/10.1155/2019/8647121>
- Kaczmarek, L. K. (2013). *Slack, Slick, and Sodium-Activated Potassium Channels* [Research article]. International Scholarly Research Notices. <https://doi.org/10.1155/2013/354262>
- Kaji, Y. (2005). Prevention of diabetic keratopathy. *The British Journal of Ophthalmology*, 89(3), 254-255. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.055541>
- Kaji, Y., Amano, S., Usui, T., Oshika, T., Yamashiro, K., Ishida, S., Suzuki, K., Tanaka, S., Adamis, A. P., Nagai, R., & Horiuchi, S. (2003). Expression and function of receptors for advanced glycation end products in bovine corneal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(2), 521-528.
- Kampik, D., Ali, R. R., & Larkin, D. F. P. (2012). Experimental gene transfer to the corneal endothelium. *Experimental Eye Research*, 95(1), 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.07.001>
- Kanawa, S., Jain, K., Sagar, V., & Yadav, D. K. (2021). Evaluation of changes in corneal endothelium in chronic kidney disease. *Indian Journal of Ophthalmology*, 69(5), 1080-1083. https://doi.org/10.4103/ijjo.IJO_1764_20
- Kase, S., Ishida, S., & Rao, N. A. (2011). Immunolocalization of advanced glycation end products in human diabetic eyes: An immunohistochemical study. *Journal of Diabetes Mellitus*, 1(3), 57-62. <https://doi.org/10.4236/jdm.2011.13009>
- Kaushal, V., Koeberle, P. D., Wang, Y., & Schlichter, L. C. (2007). The Ca²⁺-activated K⁺ channel KCNN4/KCa3.1 contributes to microglia activation and nitric oxide-dependent neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(1), 234-244. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3593-06.2007>
- Kew, J. N. C., & Davies, C. H. (2010). *Ion Channels: From Structure to Function*. Oxford University Press.
- Kheirkhah, A., Saboo, U. S., Abud, T. B., Dohlman, T. H., Arnoldner, M. A., Hamrah, P., & Dana, R. (2015). Reduced Corneal Endothelial Cell Density in Patients with Dry Eye Disease. *American Journal of Ophthalmology*, 159(6), 1022. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2015.03.011>
- Kim, J., Kim, C.-S., Sohn, E., Jeong, I.-H., Kim, H., & Kim, J. S. (2011). Involvement of advanced glycation end products, oxidative stress and nuclear factor-kappaB in the development of diabetic keratopathy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 249(4), 529-536. <https://doi.org/10.1007/s00417-010-1573-9>
- Koegel, H., Kaesler, S., Burgstahler, R., Werner, S., & Alzheimer, C. (2003). Unexpected down-regulation of the hK1 Ca²⁺-activated K⁺ channel by its opener 1-ethyl-2-

benzimidazolinone in HaCaT keratinocytes. Inverse effects on cell growth and proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3323-3330. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208914200>

Koizumi, N., Okumura, N., Ueno, M., Nakagawa, H., Hamuro, J., & Kinoshita, S. (2013). Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea*, 32(8), 1167-1170. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318285475d>

Konstantopoulos, S. (2011). Fixed effects and variance components estimation in three-level meta-analysis. *Research Synthesis Methods*, 2(1), 61-76. <https://doi.org/10.1002/jrsm.35>

Kopec, A. M., Rivera, P. D., Lacagnina, M. J., Hanamsagar, R., & Bilbo, S. D. (2017). Optimized solubilization of TRIzol-precipitated protein permits Western blotting analysis to maximize data available from brain tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 280, 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.02.002>

Kovatchev, B. P., Otto, E., Cox, D., Gonder-Frederick, L., & Clarke, W. (2006). Evaluation of a New Measure of Blood Glucose Variability in Diabetes. *Diabetes Care*, 29(11), 2433-2438. <https://doi.org/10.2337/dc06-1085>

Kruse, C. R., Singh, M., Sørensen, J. A., Eriksson, E., & Nuutila, K. (2016). The effect of local hyperglycemia on skin cells in vitro and on wound healing in euglycemic rats. *Journal of Surgical Research*, 206(2), 418-426. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.08.060>

Kuang, K., Yiming, M., Wen, Q., Li, Y., Ma, L., Iserovich, P., Verkman, A. S., & Fischbarg, J. (2004). Fluid transport across cultured layers of corneal endothelium from aquaporin-1 null mice. *Experimental Eye Research*, 78(4), 791-798. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.11.017>

Kudva, A. A., Lasrado, A. S., Hegde, S., Kadri, R., Devika, P., & Shetty, A. (2020). Corneal endothelial cell changes in diabetics versus age group matched nondiabetics after manual small incision cataract surgery. *Indian Journal of Ophthalmology*, 68(1), 72. https://doi.org/10.4103/ijjo.IJO_406_19

Kumagai, A. K., Glasgow, B. J., & Pardridge, W. M. (1994). GLUT1 glucose transporter expression in the diabetic and nondiabetic human eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35(6), 2887-2894.

Lang, P. A., Kaiser, S., Myssina, S., Wieder, T., Lang, F., & Huber, S. M. (2003). Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 285(6), C1553-1560. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00186.2003>

Larsson, L. I., Bourne, W. M., Pach, J. M., & Brubaker, R. F. (1996). Structure and function of the corneal endothelium in diabetes mellitus type I and type II. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, 114(1), 9-14.

Lauf, P. K., Misri, S., Chimote, A. A., & Adragna, N. C. (2008). Apparent intermediate K conductance channel hyposmotic activation in human lens epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 294(3), C820-C832. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00375.2007>

Lee, J. S., Oum, B. S., Choi, H. Y., Lee, J. E., & Cho, B. M. (2006). Differences in corneal thickness and corneal endothelium related to duration in diabetes. *Eye (London, England)*, 20(3), 315-318. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6701868>

- Li, Q. J., Ashraf, M. F., Shen, D. F., Green, W. R., Stark, W. J., Chan, C. C., & O'Brien, T. P. (2001). The role of apoptosis in the pathogenesis of Fuchs endothelial dystrophy of the cornea. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, *119*(11), 1597-1604.
- Li, S., Allen, K. T., & Bonanno, J. A. (2011). Soluble adenylyl cyclase mediates bicarbonate-dependent corneal endothelial cell protection. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *300*(2), C368-374. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00314.2010>
- Li, S., Kim, E., & Bonanno, J. A. (2016). Fluid transport by the cornea endothelium is dependent on buffering lactic acid efflux. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *311*(1), C116-C126. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00095.2016>
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, *2*(2), 329-333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Liebau, S., Vaida, B., Proepper, C., Grissmer, S., Storch, A., Boeckers, T. M., Dietl, P., & Wittekindt, O. H. (2007). Formation of cellular projections in neural progenitor cells depends on SK3 channel activity. *Journal of Neurochemistry*, *101*(5), 1338-1350. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04437.x>
- Liesegang, T. J. (2002). Physiologic changes of the cornea with contact lens wear. *The CLAO Journal: Official Publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists, Inc*, *28*(1), 12-27.
- Lin, M. T., Adelman, J. P., & Maylie, J. (2012). Modulation of endothelial SK3 channel activity by Ca²⁺-dependent caveolar trafficking. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *303*(3), C318-C327. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00058.2012>
- Lindner, L. M. E., Rathmann, W., & Rosenbauer, J. (2018). Inequalities in glycaemic control, hypoglycaemia and diabetic ketoacidosis according to socio-economic status and area-level deprivation in Type 1 diabetes mellitus: A systematic review. *Diabetic Medicine*, *35*(1), 12-32. <https://doi.org/10.1111/dme.13519>
- Liu, C., Miyajima, T., Melangath, G., Miyai, T., Vasanth, S., Deshpande, N., Kumar, V., Ong Tone, S., Gupta, R., Zhu, S., Vojnovic, D., Chen, Y., Rogan, E. G., Mondal, B., Zahid, M., & Jurkunas, U. V. (2020). Ultraviolet A light induces DNA damage and estrogen-DNA adducts in Fuchs endothelial corneal dystrophy causing females to be more affected. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(1), 573-583. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912546116>
- Liu, Y., Zhao, L., Ma, W., Cao, X., Chen, H., Feng, D., Liang, J., Yin, K., & Jiang, X. (2015). The Blockage of KCa3.1 Channel Inhibited Proliferation, Migration and Promoted Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Journal of Cancer*, *6*(7), 643-651. <https://doi.org/10.7150/jca.11913>
- Ljubimov, A. V., & Saghizadeh, M. (2015). Progress in corneal wound healing. *Progress in Retinal and Eye Research*, *49*, 17-45. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.002>
- Lopez, R., Arumugam, A., Joseph, R., Monga, K., Boopalan, T., Agullo, P., Gutierrez, C., Nandy, S., Subramani, R., Rosa, J. M. de la, & Lakshmanaswamy, R. (2013). Hyperglycemia Enhances the Proliferation of Non-Tumorigenic and Malignant Mammary Epithelial Cells through Increased leptin/IGF1R Signaling and Activation of AKT/mTOR. *PLOS ONE*, *8*(11), e79708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079708>
- Lou, Z., & Chen, J. (2006). Cellular senescence and DNA repair. *Experimental Cell Research*, *312*(14), 2641-2646. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.06.009>

- Lu, L. (2006). Stress-induced corneal epithelial apoptosis mediated by K⁺ channel activation. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(6), 515-538. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.07.004>
- Lu, L., Timofeyev, V., Li, N., Rafizadeh, S., Singapuri, A., Harris, T. R., & Chiamvimonvat, N. (2009). α -Actinin2 cytoskeletal protein is required for the functional membrane localization of a Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK2 channel). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43), 18402-18407. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908207106>
- Maezawa, I., Jenkins, D. P., Jin, B. E., & Wulff, H. (2012). Microglial KCa3.1 Channels as a Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, e868972. <https://doi.org/10.1155/2012/868972>
- Magdum, R. M., Mutha, N., & Maheshgauri, R. (2013). A study of corneal endothelial changes in soft contact lens wearers using non-contact specular microscopy. *Medical Journal of Dr. D.Y. Patil University*, 6(3), 245. <https://doi.org/10.4103/0975-2870.114645>
- Maldonado, O., Jenkins, A., Belalcazar, H. M., Hernandez-Cuervo, H., Hyman, K. M., Ladaga, G., Padilla, L., & Erausquin, G. A. de. (2020). Age-dependent neuroprotective effect of an SK3 channel agonist on excitotoxicity to dopaminergic neurons in organotypic culture. *PLOS ONE*, 15(7), e0223633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223633>
- Mannis, M. J., & Holland, E. J. (2016). *Cornea E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Margo, J. A., Whiting, M. F., Brown, C. H., Hoover, C. K., & Munir, W. M. (2017). The Effect of Chronic Pulmonary Disease and Mechanical Ventilation on Corneal Donor Endothelial Cell Density and Transplant Suitability. *American Journal of Ophthalmology*, 183, 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2017.08.023>
- Matsuda, M., Awata, T., Ohashi, Y., Inaba, M., Fukuda, M., & Manabe, R. (1987). The effects of aldose reductase inhibitor on the corneal endothelial morphology in diabetic rats. *Current Eye Research*, 6(2), 391-397. <https://doi.org/10.3109/02713688709025192>
- McCarey, B. E., Edelhauser, H. F., & Lynn, M. J. (2008). Review of Corneal Endothelial Specular Microscopy for FDA Clinical Trials of Refractive Procedures, Surgical Devices and New Intraocular Drugs and Solutions. *Cornea*, 27(1), 1-16. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31815892da>
- McFerrin, M. B., Turner, K. L., Cuddapah, V. A., & Sontheimer, H. (2012). Differential role of IK and BK potassium channels as mediators of intrinsic and extrinsic apoptotic cell death. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 303(10), C1070-1078. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00040.2012>
- Meekins, L. C., Rosado-Adames, N., Maddala, R., Zhao, J. J., Rao, P. V., & Afshari, N. A. (2016). Corneal Endothelial Cell Migration and Proliferation Enhanced by Rho Kinase (ROCK) Inhibitors in In Vitro and In Vivo Models. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(15), 6731. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20414>
- Meeting, K. C. C. (1997). *Current Opinions in the Kyoto Cornea Club: Proceedings of the First Annual Meeting of the Kyoto Cornea Club, Kyoto, Japan, December 1-2, 1995*. Kugler Publications.
- Mendez, M. G., Restle, D., & Janmey, P. A. (2014). Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophysical Journal*, 107(2), 314-323. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.04.050>

- Mergler, S., Dannowski, H., Bednarz, J., Engelmann, K., Hartmann, C., & Pleyer, U. (2003). Calcium influx induced by activation of receptor tyrosine kinases in SV40-transfected human corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research*, 77(4), 485-495.
- Mergler, S., Garreis, F., Sahlmüller, M., Reinach, P. S., Paulsen, F., & Pleyer, U. (2011). Thermosensitive transient receptor potential channels (thermo-TRPs) in human corneal epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 226(7), 1828-1842. <https://doi.org/10.1002/jcp.22514>
- Mergler, S., & Pleyer, U. (2007). The human corneal endothelium: New insights into electrophysiology and ion channels. *Progress in Retinal and Eye Research*, 26(4), 359-378. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2007.02.001>
- Mergler, S., Pleyer, U., Reinach, P., Bednarz, J., Dannowski, H., Engelmann, K., Hartmann, C., & Yousif, T. (2005). EGF suppresses hydrogen peroxide induced Ca²⁺ influx by inhibiting L-type channel activity in cultured human corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research*, 80(2), 285-293. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.09.012>
- Mergler, S., Valtink, M., Coulson-Thomas, V. J., Lindemann, D., Reinach, P. S., Engelmann, K., & Pleyer, U. (2010). TRPV channels mediate temperature-sensing in human corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research*, 90(6), 758-770. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.03.010>
- Mergler, S., Valtink, M., Taetz, K., Sahlmüller, M., Fels, G., Reinach, P. S., Engelmann, K., & Pleyer, U. (2011). Characterization of transient receptor potential vanilloid channel 4 (TRPV4) in human corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research*, 93(5), 710-719. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.09.021>
- Millership, J. E., Devor, D. C., Hamilton, K. L., Balut, C. M., Bruce, J. I. E., & Fearon, I. M. (2010). Calcium-activated K⁺ channels increase cell proliferation independent of K⁺ conductance. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(4), C792-C802. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00274.2010>
- Módis, L., Szalai, E., Kertész, K., Kemény-Beke, A., Kettesy, B., & Berta, A. (2010). Evaluation of the corneal endothelium in patients with diabetes mellitus type I and II. *Histology and Histopathology*, 25(12), 1531-1537. <https://doi.org/10.14670/HH-25.1531>
- Morran, M. P., Vonberg, A., Khadra, A., & Pietropaolo, M. (2015). Immunogenetics of Type 1 Diabetes Mellitus. *Molecular aspects of medicine*, 42, 42-60. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.12.004>
- Murano, N., Ishizaki, M., Sato, S., Fukuda, Y., & Takahashi, H. (2008). Corneal endothelial cell damage by free radicals associated with ultrasound oscillation. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, 126(6), 816-821. <https://doi.org/10.1001/archophth.126.6.816>
- Murphy, C., Alvarado, J., Juster, R., & Maglio, M. (1984). Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 25(3), 312-322.
- Nagy, T., Fisi, V., Frank, D., Káta, E., Nagy, Z., & Miseta, A. (2019). Hyperglycemia-Induced Aberrant Cell Proliferation; A Metabolic Challenge Mediated by Protein O-GlcNAc Modification. *Cells*, 8(9), 999. <https://doi.org/10.3390/cells8090999>
- Nguyen, T. T., & Bonanno, J. A. (2012a). Lactate-H⁺ Transport Is a Significant Component of the In Vivo Corneal Endothelial Pump. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(4), 2020-2029. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9475>

Nguyen, T. T., & Bonanno, J. A. (2012b). Lactate-H⁺ Transport Is a Significant Component of the In Vivo Corneal Endothelial Pump. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(4), 2020. <https://doi.org/10.1167/iops.12-9475>

Niederer, R. L., Perumal, D., Sherwin, T., & McGhee, C. N. J. (2007). Age-related differences in the normal human cornea: A laser scanning in vivo confocal microscopy study. *The British Journal of Ophthalmology*, 91(9), 1165-1169. <https://doi.org/10.1136/bjo.2006.112656>

Nita, M., & Grzybowski, A. (2016). The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-23. <https://doi.org/10.1155/2016/3164734>

Okumura, N., Minamiyama, R., Ho, L. T., Kay, E. P., Kawasaki, S., Tourtas, T., Schlötzer-Schrehardt, U., Kruse, F. E., Young, R. D., Quantock, A. J., Kinoshita, S., & Koizumi, N. (2015). Involvement of ZEB1 and Snail1 in excessive production of extracellular matrix in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 95(11), 1291-1304. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.111>

Okumura, N., Ueno, M., Koizumi, N., Sakamoto, Y., Hirata, K., Hamuro, J., & Kinoshita, S. (2009). Enhancement on Primate Corneal Endothelial Cell Survival In Vitro by a ROCK Inhibitor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(8), 3680-3687. <https://doi.org/10.1167/iops.08-2634>

Olaniyan, M., & Babatunde, E. (2016). Preventive (myoglobin, transferrin) and scavenging (superoxide dismutase, glutathione peroxidase) anti-oxidative properties of raw liquid extract of Morinda lucida leaf in the traditional treatment of Plasmodium infection. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 7(1), 47. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.175068> Ottawa Hospital Research Institute. (s. f.). Recuperado 28 de enero de 2021, de http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp

Ouadid-Ahidouch, H., & Ahidouch, A. (2013). K⁺ channels and cell cycle progression in tumor cells. *Frontiers in Physiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00220>

Pahwa, H., Khan, M. T., & Sharan, K. (2020). Hyperglycemia impairs osteoblast cell migration and chemotaxis due to a decrease in mitochondrial biogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 469(1-2), 109-118. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03732-8>

Paulais, M., Lachheb, S., & Teulon, J. (2006). A Na⁺- and Cl⁻-activated K⁺ Channel in the Thick Ascending Limb of Mouse Kidney. *The Journal of General Physiology*, 127(2), 205-215. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509360>

Pedarzani, P., & Stocker, M. (2008). Molecular and cellular basis of small—And intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(20), 3196-3217. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8216-x>

Petho, Z., Balajthy, A., Bartok, A., Bene, K., Somodi, S., Szilagyi, O., Rajnavolgyi, E., Panyi, G., & Varga, Z. (2016). The anti-proliferative effect of cation channel blockers in T lymphocytes depends on the strength of mitogenic stimulation. *Immunology Letters*, 171, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.02.003>

Philipp, W., Speicher, L., & Humpel, C. (2000). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Inflamed and Vascularized Human Corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(9), 2514-2522.

- Potier, M., Tran, T. A., Chantome, A., Girault, A., Joulin, V., Bougnoux, P., Vandier, C., & Pierre, F. (2010). Altered SK3/KCa2.3-mediated migration in adenomatous polyposis coli (Apc) mutated mouse colon epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(1), 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.046>
- Powers, A. C. (2015). Diabetes Mellitus: Diagnosis, Classification, and Pathophysiology. En D. Kasper, A. Fauci, S. Hauser, D. Longo, J. L. Jameson, & J. Loscalzo (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine* (19.^a ed.). McGraw-Hill Education. accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1120816080
- Powers, A. C., Niswender, K. D., & Evans-Molina, C. (2018). Diabetes Mellitus: Diagnosis, Classification, and Pathophysiology. En J. L. Jameson, A. S. Fauci, D. L. Kasper, S. L. Hauser, D. L. Longo, & J. Loscalzo (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine* (20.^a ed.). McGraw-Hill Education. accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1156520865
- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 95(4), 1383-1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>
- Price, M. O., Lisek, M., Feng, M. T., & Price, F. W. (2017). Effect of Donor and Recipient Diabetes Status on Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Adherence and Survival. *Cornea*, 36(10), 1184-1188. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001305>
- Price, M. O., Thompson, R. W., & Price, F. W. (2003). Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, 121(8), 1087-1092. <https://doi.org/10.1001/archophth.121.8.1087>
- R Core Team (2020). (s. f.). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing [Methodology Reference]. Recuperado 26 de marzo de 2021, de <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006>
- Rae, J. L., & Shepard, A. R. (2000). Kv3.3 potassium channels in lens epithelium and corneal endothelium. *Experimental Eye Research*, 70(3), 339-348. <https://doi.org/10.1006/exer.1999.0796>
- Rae, J. L., & Watsky, M. A. (1996). Ionic channels in corneal endothelium. *The American Journal of Physiology*, 270(4 Pt 1), C975-989. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.270.4.C975>
- Rauz, S., Walker, E. A., Murray, P. I., & Stewart, P. M. (2003). Expression and distribution of the serum and glucocorticoid regulated kinase and the epithelial sodium channel subunits in the human cornea. *Experimental Eye Research*, 77(1), 101-108.
- Redbrake, C., Salla, S., Frantz, A., & Reim, M. (1999). Metabolic changes of the human donor cornea during organ-culture. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 77(3), 266-272.
- Reid, B., & Zhao, M. (2014). The Electrical Response to Injury: Molecular Mechanisms and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 3(2), 184-201. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0442>
- Reim, M., Lax, F., Lichte, H., & Turss, R. (1967). Steady State Levels of Glucose in the Different Layers of the Cornea, Aqueous Humor, Blood and Tears in vivo. *Ophthalmologica*, 154(1), 39-50. <https://doi.org/10.1159/000305147>
- Reinach, P. S., Mergler, S., Okada, Y., & Saika, S. (2015). Ocular transient receptor potential channel function in health and disease. *BMC Ophthalmology*, 15(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s12886-015-0135-7>

- Remington, L. A. (2011). *Clinical Anatomy of the Visual System E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Rikitake, Y., & Liao, J. K. (2005). Rho-kinase mediates hyperglycemia-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular endothelial cells. *Circulation*, *111*(24), 3261-3268. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.534024>
- Riley, M. V., Winkler, B. S., Starnes, C. A., & Peters, M. I. (1997). Fluid and ion transport in corneal endothelium: Insensitivity to modulators of Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransport. *The American Journal of Physiology*, *273*(5 Pt 1), C1480-1486.
- Riordan-Eva, P. (2017). Anatomy & Embryology of the Eye. En P. Riordan-Eva & J. J. Augsburger (Eds.), *Vaughan & Asbury's General Ophthalmology, 19e* (Vol. 1-Book, Section). McGraw-Hill Education.
accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1144466589
- Robbins, A., Kurose, M., Winterson, B. J., & Meng, I. D. (2012). Menthol Activation of Corneal Cool Cells Induces TRPM8-Mediated Lacrimation but Not Nociceptive Responses in Rodents. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *53*(11), 7034-7042. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10025>
- Robles-Martínez, L., Garay, E., Martel-Gallegos, M. G., Cisneros-Mejorado, A., Pérez-Montiel, D., Lara, A., & Arellano, R. O. (2017). Kca3.1 Activation Via P2y2 Purinergic Receptors Promotes Human Ovarian Cancer Cell (Skov-3) Migration. *Scientific Reports*, *7*(1), 4340. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04292-6>
- Romanenko, V. G., Nakamoto, T., Srivastava, A., Begenisich, T., & Melvin, J. E. (2007). Regulation of membrane potential and fluid secretion by Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse submandibular glands. *The Journal of Physiology*, *581*(Pt 2), 801-817. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.127498>
- Roszkowska, A. M., Tringali, C. G., Colosi, P., Squeri, C. A., & Ferreri, G. (1999). Corneal endothelium evaluation in type I and type II diabetes mellitus. *Ophthalmologica. Journal International D'ophtalmologie. International Journal of Ophthalmology. Zeitschrift Fur Augenheilkunde*, *213*(4), 258-261. <https://doi.org/10.1159/000027431>
- Roy, J. W., Cowley, E. A., Blay, J., & Linsdell, P. (2010). The intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel inhibitor TRAM-34 stimulates proliferation of breast cancer cells via activation of oestrogen receptors. *British Journal of Pharmacology*, *159*(3), 650-658. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00557.x>
- Sagoo, P., Chan, G., Larkin, D. F. P., & George, A. J. T. (2004). Inflammatory cytokines induce apoptosis of corneal endothelium through nitric oxide. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *45*(11), 3964-3973. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0439>
- Sánchez, J. M., Li, Y., Rubashkin, A., Iserovich, P., Wen, Q., Ruberti, J. W., Smith, R. W., Rittenband, D., Kuang, K., Diecke, F. P. J., & Fischbarg, J. (2002). Evidence for a central role for electro-osmosis in fluid transport by corneal endothelium. *The Journal of Membrane Biology*, *187*(1), 37-50. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0151-9>
- Schilling, T., Stock, C., Schwab, A., & Eder, C. (2004). Functional importance of Ca²⁺-activated K⁺ channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *The European Journal of Neuroscience*, *19*(6), 1469-1474. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03265.x>
- Schmedt, T., Silva, M. M., Ziaei, A., & Jurkunas, U. (2012). Molecular Bases of Corneal Endothelial Dystrophies. *Experimental Eye Research*, *95*(1), 24-34. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.08.002>

- Sciaccaluga, M., Fioretti, B., Catacuzzeno, L., Pagani, F., Bertollini, C., Rosito, M., Catalano, M., D'Alessandro, G., Santoro, A., Cantore, G., Ragozzino, D., Castigli, E., Franciolini, F., & Limatola, C. (2010). CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299(1), C175-C184. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00344.2009>
- Senoo, T., & Joyce, N. C. (2000). Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(3), 660-667.
- Shenoy, R., Khandekar, R., Bialasiewicz, A., & Al Muniri, A. (2009). Corneal endothelium in patients with diabetes mellitus: A historical cohort study. *European Journal of Ophthalmology*, 19(3), 369-375.
- Shih, K. C., Lam, K. S.-L., & Tong, L. (2017). A systematic review on the impact of diabetes mellitus on the ocular surface. *Nutrition & Diabetes*, 7(3), e251. <https://doi.org/10.1038/nutd.2017.4>
- Skarbez, K., Priestley, Y., Hoepf, M., & Koevary, S. B. (2010). Comprehensive Review of the Effects of Diabetes on Ocular Health. *Expert review of ophthalmology*, 5(4), 557-577. <https://doi.org/10.1586/eop.10.44>
- Slawson, C., Zachara, N. E., Vosseller, K., Cheung, W. D., Lane, M. D., & Hart, G. W. (2005). Perturbations in O-linked β -N-Acetylglucosamine Protein Modification Cause Severe Defects in Mitotic Progression and Cytokinesis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 32944-32956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503396200>
- Smith, C. O., Wang, Y. T., Nadtochiy, S. M., Miller, J. H., Jonas, E. A., Dirksen, R. T., Nehrke, K., & Brookes, P. S. (2018). Cardiac metabolic effects of KNa1.2 channel deletion and evidence for its mitochondrial localization. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, fj201800139R. <https://doi.org/10.1096/fj.201800139R>
- Song, P., Du, Y., Song, W., Chen, H., Xuan, Z., Zhao, L., Chen, J., Chen, J., Guo, D., Jin, C., Zhao, Y., Tuo, B., & Zheng, S. (2017). KCa3.1 as an Effective Target for Inhibition of Growth and Progression of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Journal of Cancer*, 8(9), 1568-1578. <https://doi.org/10.7150/jca.18697>
- Spergel, D. J. (2007). Calcium and Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons before, during, and after Puberty. *Endocrinology*, 148(5), 2383-2390. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1693>
- Srinivas, S. P., Yeh, J. C., Ong, A., & Bonanno, J. A. (1998). Ca²⁺ mobilization in bovine corneal endothelial cells by P2 purinergic receptors. *Current Eye Research*, 17(10), 994-1004.
- Stepp, M. A. (2006). Corneal integrins and their functions. *Experimental Eye Research*, 83(1), 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.01.010>
- Studel, F. A., Mohr, C. J., Stegen, B., Nguyen, H. Y., Barnert, A., Steinle, M., Beer-Hammer, S., Koch, P., Lo, W.-Y., Schroth, W., Hoppe, R., Brauch, H., Ruth, P., Huber, S. M., & Lukowski, R. (2017). SK4 channels modulate Ca²⁺ signalling and cell cycle progression in murine breast cancer. *Molecular Oncology*, 11(9), 1172-1188. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12087>
- Storr-Paulsen, A., Singh, A., Jeppesen, H., Norregaard, J. C., & Thulesen, J. (2014). Corneal endothelial morphology and central thickness in patients with type II diabetes mellitus. *Acta Ophthalmologica*, 92(2), 158-160. <https://doi.org/10.1111/aos.12064>

STRING: functional protein association networks. (s. f.). Recuperado 13 de mayo de 2021, de <https://string-db.org/>

Stuard, W. L., Titone, R., & Robertson, D. M. (2020). The IGF/Insulin-IGFBP Axis in Corneal Development, Wound Healing, and Disease. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00024>

Su, X.-L., Zhang, H., Yu, W., Wang, S., & Zhu, W.-J. (2013). Role of KCa3.1 channels in proliferation and migration of vascular smooth muscle cells by diabetic rat serum. *The Chinese Journal of Physiology*, *56*(3), 155-162. <https://doi.org/10.4077/CJP.2013.BAB104>

Sudhir, R. R., Raman, R., & Sharma, T. (2012). Changes in the corneal endothelial cell density and morphology in patients with type 2 diabetes mellitus: A population-based study, Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy and Molecular Genetics Study (SN-DREAMS, Report 23). *Cornea*, *31*(10), 1119-1122. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31823f8e00>

Sun, X. C., Zhai, C.-B., Cui, M., Chen, Y., Levin, L. R., Buck, J., & Bonanno, J. A. (2003). HCO₃⁻-dependent soluble adenylyl cyclase activates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in corneal endothelium. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *284*(5), C1114-1122. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00400.2002>

Sundelacruz, S., Levin, M., & Kaplan, D. L. (2009). Role of Membrane Potential in the Regulation of Cell Proliferation and Differentiation. *Stem Cell Reviews and Reports*, *5*(3), 231-246. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9080-2>

Tajima, N., Schönherr, K., Niedling, S., Kaatz, M., Kanno, H., Schönherr, R., & Heinemann, S. H. (2006). Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1 α and the von Hippel-Lindau protein. *The Journal of Physiology*, *571*(Pt 2), 349-359. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.096818>

Takahashi, H., Ohara, K., Ohmura, T., Takahashi, R., & Zieske, J. D. (2000). Glucose Transporter 1 Expression in Corneal Wound Repair under High Serum Glucose Level. *Japanese Journal of Ophthalmology*, *44*(5), 470-474. [https://doi.org/10.1016/S0021-5155\(00\)00222-7](https://doi.org/10.1016/S0021-5155(00)00222-7)

Takai, J., Santu, A., Zheng, H., Koh, S. D., Ohta, M., Filimban, L. M., Lemaître, V., Teraoka, R., Jo, H., & Miura, H. (2013). Laminar shear stress upregulates endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels KCa2.3 and KCa3.1 via a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase/Akt/p300 cascade. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *305*(4), H484-493. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00642.2012>

Tandon, A., Tovey, J. C. K., Sharma, A., Gupta, R., & Mohan, R. R. (2010). Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology. *Current Molecular Medicine*, *10*(6), 565-578.

Tang, Y., Chen, X., Zhang, X., Tang, Q., Liu, S., & Yao, K. (2017). Clinical evaluation of corneal changes after phacoemulsification in diabetic and non-diabetic cataract patients, a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14656-7>

Tarazona, S., Furió-Tarí, P., Turrà, D., Pietro, A. D., Nueda, M. J., Ferrer, A., & Conesa, A. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Research*, *43*(21), e140-e140. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv711>

Tejada, M. A., Hashem, N., Calloe, K., & Klaerke, D. A. (2017). Heteromeric Slick/Slack K⁺ channels show graded sensitivity to cell volume changes. *PloS One*, *12*(2), e0169914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169914>

Tejada, M. A., Stople, K., Bomholtz, S. H., Meinild, A.-K., Poulsen, A. N., & Klaerke, D. A. (2014). Cell Volume Changes Regulate Slick (Slo2.1), but Not Slack (Slo2.2) K⁺ Channels. *PLOS ONE*, *9*(10), e110833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110833>

Thomas, M. C., Brownlee, M., Susztak, K., Sharma, K., Jandeleit-Dahm, K. A. M., Zoungas, S., Rossing, P., Groop, P.-H., & Cooper, M. E. (2015). Diabetic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers*, *15018*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.18>

Tinggi, U. (2008). Selenium: Its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine*, *13*(2), 102-108. <https://doi.org/10.1007/s12199-007-0019-4>

Tomasello, D. L., Hurley, E., Wrabetz, L., & Bhattacharjee, A. (2017). Slick (Kcnt2) Sodium-Activated Potassium Channels Limit Peptidergic Nociceptor Excitability and Hyperalgesia. *Journal of Experimental Neuroscience*, *11*, 1179069517726996. <https://doi.org/10.1177/1179069517726996>

Toro, L., Li, M., Zhang, Z., Singh, H., Wu, Y., & Stefani, E. (2014). MaxiK channel and cell signalling. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, *466*(5), 875-886. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1359-0>

Treseler, P. A., Foulks, G. N., & Sanfilippo, F. (1984). The expression of HLA antigens by cells in the human cornea. *American Journal of Ophthalmology*, *98*(6), 763-772. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(84\)90696-2](https://doi.org/10.1016/0002-9394(84)90696-2)

Trinh, N. T. N., Privé, A., Maillé, E., Noël, J., & Brochiero, E. (2008). EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *295*(5), L866-880. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90224.2008>

Tuft, S. J., & Coster, D. J. (1990). The corneal endothelium. *Eye*, *4*(3), 389-424. <https://doi.org/10.1038/eye.1990.53>

Vandorpe, D. H., Shmukler, B. E., Jiang, L., Lim, B., Maylie, J., Adelman, J. P., de Franceschi, L., Cappellini, M. D., Brugnara, C., & Alper, S. L. (1998). cDNA cloning and functional characterization of the mouse Ca²⁺-gated K⁺ channel, mIK1. Roles in regulatory volume decrease and erythroid differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(34), 21542-21553.

Vassilev, V. S., Mandai, M., Yonemura, S., & Takeichi, M. (2012). Loss of N-Cadherin from the Endothelium Causes Stromal Edema and Epithelial Dysgenesis in the Mouse Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *53*(11), 7183-7193. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9949>

Vedana, G., Villarreal, G., & Jun, A. S. (2016). Fuchs endothelial corneal dystrophy: Current perspectives. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, *10*, 321-330. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S83467>

Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annual review of biochemistry*, *76*, 387-417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>

Verkman, A. (2002). Aquaporin water channels and endothelial cell function. *Journal of Anatomy*, *200*(6), 617-627. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00058.x>

Viechtbauer, W. (2010). Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package. *Journal of Statistical Software*, *36*(1), 1-48. <https://doi.org/10.18637/jss.v036.i03>

Vieira, A. C., Reid, B., Cao, L., Mannis, M. J., Schwab, I. R., & Zhao, M. (2011). Ionic Components of Electric Current at Rat Corneal Wounds. *PLOS ONE*, *6*(2), e17411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017411>

- Vieira-Potter, V. J., Karamichos, D., & Lee, D. J. (2016). Ocular Complications of Diabetes and Therapeutic Approaches. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3801570>
- Vigneault, P., Naud, P., Qi, X., Xiao, J., Villeneuve, L., Davis, D. R., & Nattel, S. (2018). Calcium-dependent potassium channels control proliferation of cardiac progenitor cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *The Journal of Physiology*, 596(12), 2359-2379. <https://doi.org/10.1113/JP275388>
- Wang, H. Z., Wu, K. Y., Lin, C. P., Fong, J. C., & Hong, S. J. (1997). Alteration of glucose uptake in cultured human corneal endothelial cells grown in high glucose media via cAMP-dependent pathway. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 13(9), 566-571.
- Wang, J., Morishima, S., & Okada, Y. (2003). IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 284(1), C77-C84. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00132.2002>
- Wang, Y., Zhang, H.-T., Su, X.-L., Deng, X.-L., Yuan, B.-X., Zhang, W., Wang, X.-F., & Yang, Y.-B. (2010). Experimental diabetes mellitus down-regulates large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in cerebral artery smooth muscle and alters functional conductance. *Current Neurovascular Research*, 7(2), 75-84. <https://doi.org/10.2174/156720210791184925>
- Watsky, M. A. (1995). Nonselective cation channel activation during wound healing in the corneal endothelium. *The American Journal of Physiology*, 268(5 Pt 1), C1179-1185. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.5.C1179>
- Watsky, M. A., Cooper, K., & Rae, J. L. (1992). Transient outwardly rectifying potassium channel in the rabbit corneal endothelium. *The Journal of Membrane Biology*, 128(2), 123-132.
- Watsky, M. A., & Rae, J. L. (1991). Resting voltage measurements of the rabbit corneal endothelium using patch-current clamp techniques. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32(1), 106-111.
- Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., & Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 463-472. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.9>
- Whikehart. (1995). The inhibition of sodium, potassium-stimulated ATPase and corneal swelling: The role played by polyols. *Journal of the American Optometric Association*, 66(6), 331-333.
- WHO | Diabetes country profiles 2016. (s. f.). WHO. Recuperado 7 de marzo de 2018, de <http://www.who.int/diabetes/country-profiles/en/>
- Wolf, G. (2000). Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 58, S59-S66. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.07710.x>
- Wörner, C. H., Olguín, A., Ruíz-García, J. L., & Garzón-Jiménez, N. (2011). Cell Pattern in Adult Human Corneal Endothelium. *PLOS ONE*, 6(5), e19483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019483>
- Wu, Y.-C., Buckner, B. R., Zhu, M., Cavanagh, H. D., & Robertson, D. M. (2012). Elevated IGFBP3 levels in diabetic tears: A negative regulator of IGF-1 signaling in the corneal epithelium. *The Ocular Surface*, 10(2), 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2012.01.004>

- Wulff, H., & Castle, N. A. (2010). Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: An overview of recent advances, and promising trends. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 3(3), 385-396. <https://doi.org/10.1586/ecp.10.11>
- Wulff, H., Castle, N. A., & Pardo, L. A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(12), 982-1001. <https://doi.org/10.1038/nrd2983>
- Wulff, H., Miller, M. J., Hänsel, W., Grissmer, S., Cahalan, M. D., & Chandy, K. G. (2000). Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: A potential immunosuppressant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8151-8156.
- Yagi-Yaguchi, Y., Yamaguchi, T., Higa, K., Suzuki, T., Aketa, N., Dogru, M., Satake, Y., & Shimazaki, J. (2017). Association between corneal endothelial cell densities and elevated cytokine levels in the aqueous humor. *Scientific Reports*, 7(1), 13603. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14131-3>
- Yang, D., MacCallum, D. K., Ernst, S. A., & Hughes, B. A. (2003). Expression of the Inwardly Rectifying K⁺ Channel Kir2.1 in Native Bovine Corneal Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(8), 3511-3519. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-1306>
- Yau, J. W. Y., Rogers, S. L., Kawasaki, R., Lamoureux, E. L., Kowalski, J. W., Bek, T., Chen, S.-J., Dekker, J. M., Fletcher, A., Grauslund, J., Haffner, S., Hamman, R. F., Ikram, M. K., Kayama, T., Klein, B. E. K., Klein, R., Krishnaiah, S., Mayurasakorn, K., O'Hare, J. P., ... Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. (2012). Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, 35(3), 556-564. <https://doi.org/10.2337/dc11-1909>
- Yi, F., Ling, T.-Y., Lu, T., Wang, X.-L., Li, J., Claycomb, W. C., Shen, W.-K., & Lee, H.-C. (2015). Down-regulation of the Small Conductance Calcium-activated Potassium Channels in Diabetic Mouse Atria*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(11), 7016-7026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607952>
- Yoon, C. K., Yoon, S. Y., Hwang, J. S., & Shin, Y. J. (2020). O-GlcNAc Signaling Augmentation Protects Human Corneal Endothelial Cells from Oxidative Stress via AKT Pathway Activation. *Current Eye Research*, 45(5), 556-562. <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1686154>
- Yu, A. L., Kaiser, M., Schaumberger, M., Messmer, E., Kook, D., & Welge-Lussen, U. (2014). Donor-related risk factors and preoperative recipient-related risk factors for graft failure. *Cornea*, 33(11), 1149-1156. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000225>
- Yu, T., Deng, C., Wu, R., Guo, H., Zheng, S., Yu, X., Shan, Z., Kuang, S., & Lin, Q. (2012). Decreased expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels SK1 and SK2 in human chronic atrial fibrillation. *Life Sciences*, 90(5), 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.11.008>
- Yu, Z., Dou, F., Wang, Y., Hou, L., & Chen, H. (2018). Ca²⁺-dependent endoplasmic reticulum stress correlation with astrogliosis involves upregulation of KCa3.1 and inhibition of AKT/mTOR signaling. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 316. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1351-x>
- Zhang, J., McGhee, C. N. J., & Patel, D. V. (2019). The Molecular Basis of Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 23(1), 97-112. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0379-z>

- Zhang, K., Zhao, L., Zhu, C., Nan, W., Ding, X., Dong, Y., & Zhao, M. (2021). The effect of diabetes on corneal endothelium: A meta-analysis. *BMC Ophthalmology*, *21*(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12886-020-01785-3>
- Zhang, W., Li, H., Ogando, D. G., Li, S., Feng, M., Price, F. W., Tennessen, J. M., & Bonanno, J. A. (2017). Glutaminolysis is Essential for Energy Production and Ion Transport in Human Corneal Endothelium. *EBioMedicine*, *16*, 292-301. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.01.004>
- Zhang, W., Ogando, D. G., Bonanno, J. A., & Obukhov, A. G. (2015). Human SLC4A11 Is a Novel NH₃/H⁺ Co-transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(27), 16894-16905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627455>
- Zhao, D., Cho, J., Kim, M. H., Friedman, D. S., & Guallar, E. (2015). Diabetes, Fasting Glucose, and the Risk of Glaucoma: A Meta-analysis. *Ophthalmology*, *122*(1), 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.07.051>
- Zhao, H., He, Y., Ren, Y.-R., & Chen, B.-H. (2019). Corneal alteration and pathogenesis in diabetes mellitus. *International Journal of Ophthalmology*, *12*(12), 1939-1950. <https://doi.org/10.18240/ijo.2019.12.17>
- Zhao, L.-M., Wang, Y., Ma, X.-Z., Wang, N.-P., & Deng, X.-L. (2014). Advanced glycation end products impair K(Ca)_{3.1}- and K(Ca)_{2.3}-mediated vasodilatation via oxidative stress in rat mesenteric arteries. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *466*(2), 307-317. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1324-y>
- Zhu, C., & Joyce, N. C. (2004). Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *45*(6), 1743-1751.
- Zhu, Y.-R., Jiang, X.-X., & Zhang, D.-M. (2019). Critical regulation of atherosclerosis by the KCa_{3.1} channel and the retargeting of this therapeutic target in in-stent neoatherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine*, *97*(9), 1219-1229. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01814-9>
- Zundler, S., Caioni, M., Müller, M., Strauch, U., Kunst, C., & Woelfel, G. (2016). K⁺ Channel Inhibition Differentially Regulates Migration of Intestinal Epithelial Cells in Inflamed vs. Non-Inflamed Conditions in a PI3K/Akt-Mediated Manner. *PLOS ONE*, *11*(1), e0147736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147736>