

Estudio del polimorfismo del gen de TNF- α , de dicha citocina, y de MCP-I en pacientes con queratopatía climática esferoidea

Studies of TNF- α gene polymorphism, TNF- α and MCP-I cytokines in patients with spheroidal climatic keratopathy

Horacio M. Serra¹, María F. Suárez¹, María C. García Oro², Evangelina Espósito³, Thamara A. Cafaro¹, Rodolfo Monti³, Julio A. Zavalía-Urrets³

Premio AAAeIC al Mejor Trabajo de Investigación Clínica en Alergia – XXXVI Congreso Anual AAAeIC

ARCHIVOS DE ALERGI A E INMUNOLOGÍA CLÍNICA 2013;44(3):90-96

RESUMEN

Objetivo. Investigar polimorfismo de nucleótidos únicos (SNP) en la posición -308 (G/A) del gen *TNF- α* y la participación de las citocinas TNF- α y MCP-I en pacientes con queratopatía climática esferoidea (QCE) y en controles sanos.

Materiales y métodos. Participaron 15 pacientes con QCE y 15 individuos sanos del departamento El Cuy, Provincia de Río Negro. Todos ellos, luego de firmar el consentimiento informado, recibieron un examen oftalmológico completo y se recolectaron muestras de sangre y lágrima para realizar diferentes estudios. EL ADN genómico fue obtenido de sangre de todos los individuos mediante el método de *salting out* y posteriormente amplificado y estudiado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el sistema de amplificación refractaria a la mutación (ARMS). También se investigaron concentraciones de algunas citocinas proinflamatorias en lágrimas y en sobrenadante de cultivo de células epiteliales corneales humanas (CECH) tratadas o no con radiación ultravioleta B (RUV-B).

Resultados. Los resultados de SNP en la posición -308 (G/A) del gen *TNF- α* (frecuencia alélica y genotípica) indicaron ausencia de diferencias significativas entre pacientes y controles sanos. Fenotípicamente ambos grupos de individuos serían bajos o intermedios productores *in vitro* de la citocina TNF- α . Sin embargo en las lágrimas de pacientes con QCE se detectaron concentraciones significativamente superiores de TNF- α , IL-1 β y MCP-I (citocinas proinflamatorias) que en lágrimas de individuos controles sanos ($p < 0,0001$). En la periferia y limbo de la córnea las células dendríticas (CD) incrementaron significativamente con el progreso de la enfermedad ($p < 0,05$). La contribución del epitelio corneal en el proceso inflamatorio fue investigada utilizando CECH expuestas o no a 10 mJ/cm² de RUV-B. A pesar de la presencia de gelatinas, IL-6 e IL-8 en sobrenadantes de cultivos obtenidos a las 48 horas (datos no mostrados) no observamos niveles detectables de TNF- α , IL-1 β ni MCP-I.

Conclusión. Este trabajo aporta nuevos datos para aumentar los conocimientos sobre los mecanismos inmunológicos involucrados en la etiopatogenia y progresión de la QCE. Demostramos que las citocinas proinflamatorias MCP-I y TNF- α están significativamente elevadas en lágrimas de individuos con QCE, como se observó previamente con IL-1 β . MCP-I sería la responsable del aumento de CD en córnea periférica y limbo de estos pacientes a medida de que la enfermedad avanza. El hallazgo de que estas citocinas no pudieron ser detectadas en cultivos de CECH estresadas con RUV-B implica que otras células son las responsables de su producción o que además de RUV-B otros factores son necesarios para iniciar esta cascada de eventos que se observan en esta hipersensibilidad corneal humana.

Palabras claves: hipersensibilidad, queratopatía, TNF- α , MCP-I, RUV-B.

ABSTRACT

Purpose. To investigate Single Nucleotide Polymorphism (SNP) at -308 position (G/A) of *TNF- α* gene and involving of TNF- α and MCP-I cytokines in Climatic Droplet Keratopathy (CDK) patients and healthy controls.

Materials and methods. Fifteen patients with CDK and fifteen healthy controls from departamento El Cuy, province of Río Negro were involved in this study. After informed consent was obtained from all participants, they had a complete eye examination and then tear and blood samples were collected to perform different assays. DNA was obtained from blood of all individuals using the method of "salting out" and then amplified and studied performing the polymerase chain reaction (PCR) with Amplification-refractory Mutation System (ARMS). Furthermore, some cytokines concentrations were measured in tears and supernatants from human corneal epithelial cells (HCEs) exposed or not to UVR-B radiation.

Results. Analysis from SNP at position -308 (G/A) of *TNF- α* gene (allelic and genotypic frequency) showed no significant differences between patients and healthy controls. Phenotypically both groups of individuals would be low or intermediate *in vitro* producers of TNF- α cytokine. However, in tears from CDK's patients we detected significantly higher concentrations of TNF- α , IL-1 β and MCP-I (pro-inflammatory cytokines) than in healthy control subjects tears ($p < 0,0001$). At the corneal peripheral / limbus area, dendritic cells (DCs) increased significantly with the progression of the disease ($p < 0,05$). The corneal epithelium contribution to the inflammatory process was investigated using HCEs exposed or not to 10 mJ/cm² of UV radiation-B (UVR-B). Despite the presence of gelatinases, IL-6 and IL-8 in culture supernatants obtained after 48 hours (data not shown), detectable levels of TNF- α , IL-1 β and MCP-I were not detected.

Conclusion. This study provides new insights to increase our knowledge about the immunological mechanisms involved in the etiopathogenesis and progression of CDK. We showed that pro-inflammatory cytokines MCP-I y TNF- α were significantly increased in tears from CDK's patients, as previously described with IL-1 β . MCP-I would be responsible for the increasing of DCs on the corneal peripheral / limbus area of these subjects as the disease progresses. The fact that these cytokines could not be detected in cultures of HCEs stressed with UVR-B implies that other cells are responsible for their production or, in addition to UVR-B, other factors are necessary to initiate the cascade of events observed in this human corneal hypersensitivity.

Key words: hypersensitivity, keratopathy, TNF- α , MCP-I, UVR-B.

1. CIBICI, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.
2. Laboratorio, Hospital Infantil Municipal Córdoba.
3. Centro de la Visión, Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidad Católica de Córdoba, Rep. Argentina

Correspondencia: alergofas@gmail.com

Introducción

En el año 1898 Baquis describió por primera vez una rara enfermedad de la córnea humana caracterizada por una marcada opacidad.¹ Muchos años después se confirmaría que este velamiento progresivo ocurre en la capa

de Bowman y en el estroma superficial.²⁻⁵ Desde entonces, muchas descripciones de esta enfermedad se han hecho en distintas partes del mundo, que tienen en común polvo y partículas en suspensión, clima seco y ventoso, e inapropiada protección ocular a RUV-B.⁶⁻³³

Esta enfermedad ha recibido diferentes denominaciones de acuerdo con la extensión y aspecto clínico del compromiso corneal, la naturaleza de los depósitos, el área geográfica de descripción, las actividades del paciente, por epónimo y por presunta etiología.³⁴⁻⁴⁷ Uno de los nombres usados para describir esta enfermedad es queratopatía climática esferoidea (QCE) la cual es una entidad clínica bien definida que no debe confundirse con *secondary spheroidal degeneration*, *gelatinous drop-like dystrophy*, edema corneal, *band-shaped corneal degeneration*, *Salzmann's nodular degeneration*, *climatic stromal proteoglycan keratopathy*, *Vogt limbal degeneration* y distrofias corneales superficiales, tales como las de *Reis-Buckler* y *granular*, y la *peripheral hypertrophic corneal degeneration*.⁴⁸

En adición a los hallazgos en la córnea, recientemente hemos notado que en pacientes con QCE son comunes las anomalías en el iris.⁴⁹

En los últimos siete años solamente nuestro grupo e investigadores japoneses de la Universidad de Tsukuba liderados por el Dr. N. Fujii han aportado nuevos resultados sobre QCE. Aunque los depósitos globulares en la porción más anterior de la córnea con QCE fueron descritos ya hace muchos años usando microscopía óptica y electrónica,^{50,51} nosotros hemos estudiado anomalías en QCE usando microscopía confocal láser de barrido *in vivo* (MCF). Con esta técnica ha sido posible obtener imágenes de diferentes capas de la córnea, clasificarlas, estimar su densidad celular y estudiar diferentes parámetros de los nervios.⁵²⁻⁵⁶ Aunque muchas degeneraciones corneales y distrofias han sido estudiadas con MCF, fuimos los primeros en describir anomalías corneales encontradas en pacientes con QCE usando esta técnica.⁵⁷ Imágenes de MCF mostraron que cambios iniciales en las capas superficiales no parecen afectar los plexos nerviosos, pero formaciones de depósitos posteriores conducen a cambios en los nervios sub-basales y estromales, los cuales son responsables de la hiposensibilidad corneal encontrada en estos pacientes.⁴⁹ Las consecuencias patológicas en los nervios por acumulación de material extracelular pueden ser similares a la patogenia de la enfermedad Meretoja, en donde la acumulación anormal de gelsolina conduce a la destrucción de los nervios corneales.⁵⁸

Como se mencionó anteriormente, muy poca investigación se ha llevado a cabo en el siglo pasado para tratar de elucidar los mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de esta enfermedad. A pesar del hecho de que algunos constituyentes en los depósitos fueron identificados,⁵⁹ su composición precisa es aún desconocida.

Nosotros investigamos especímenes corneales con QCE parcialmente enriquecidos en depósitos anormales de proteínas, usando espectrometría de masas, e identificamos proteínas con función de unión celular, adhesión focal y regulación del citoesqueleto, lo que sugiere que varias de ellas podrían jugar un rol en la formación de depósitos.⁶⁰ Hace algunos años, Fujii et al., usando un anticuerpo contra péptidos que contenía D-beta-Asp,⁶¹ demostraron la acumulación de proteínas que contienen D-beta-Asp en varias partes del ojo,⁶² y en tres especímenes con QCE.⁶³ En un estudio previo ellos mostraron que los materiales amorfos encontrados en los mismos tres pacientes con QCE eran proteínas agregadas que contienen productos finales de glicosilación avanzada (AGE).⁶⁴ Dado que todos estos cambios estructurales en las proteínas llevan a la acumulación de estas así como a su disfunción, los autores propusieron que en la patogenia de la QCE subyacen la formación y acumulación de AGE y proteínas con D-beta-Asp.

Recientemente nuestro grupo de investigación demostró un rol protagónico de ciertas citocinas proinflamatorias y gelatinasas en el desarrollo de la QCE. Los altos niveles de IL-1 β e IL-8 en lágrimas de pacientes facilitan la producción de MMP-8 y gelatinasas, y los efectos de ellas se exacerban, ya que los pacientes tienen bajos niveles de sus inhibidores naturales (TIMP-1). La MMP-9, además de degradar componentes de la matriz extracelular, cataliza la activación postranscripcional de IL-1 β , potenciando el proceso inflamatorio.⁶⁵

Debido a que existe una importante participación de TNF- α en ciertos procesos de hipersensibilidad decidimos estudiar en este trabajo de investigación a esta citocina a nivel genético y proteico en pacientes que padecen de QCE. Además investigamos si MCP-1 participa en esta enfermedad.

Materiales y métodos

Individuos

Este estudio de investigación fue aprobado por el Consejo de Revisión Institucional de la Universidad Católica de Córdoba y por el Comité Institucional de Ética en Investigación de Salud del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, Argentina. El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Se examinaron individuos con QCE (n=15) y controles sanos (n=15) del departamento El Cuy, en la provincia de Río Negro, Argentina, todos de sexo masculino y de un rango etario de 49-70 años.

Exámenes oftalmológicos

A todos los participantes del estudio se les explicó el trabajo de investigación, y aquellos que decidieron partici-

par en él procedieron a firmar el consentimiento informado. Luego se les realizó un minucioso estudio de la córnea como se ha descrito anteriormente.⁴⁹ A algunos pacientes con diferentes grados de QCE se les realizó MCF como se describe en la referencia.⁵⁷

Muestra biológica

De todos los individuos se obtuvo lágrima (20 μ l), utilizando un microcapilar descartable con la mínima irritación conjuntival posible y sin estimulación química o física; además se obtuvo 5 ml de sangre entera. Todas estas muestras fueron inmediatamente congeladas a $\pm 80^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización para realizar diferentes estudios.

Ensayos

Extracción de ADN

Se obtuvo a partir de la sangre entera mediante el método descrito por Miller et al., denominado *salting out*.⁶⁶

Genotipificación de *TNF- α*

Se realizó la genotipificación de *TNF- α* [-308 (G/A)]. Se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el sistema de amplificación refractaria a la mutación (ARMS).⁶⁷

Cultivo de células epiteliales corneales

Células epiteliales corneales humanas inmortalizadas con SV-40 (CECH) se cultivaron en medio D-MEM/F12 suplementado con 15% de suero fetal bovino, 5 mg/ml de insulina, 10 ng/ml de EGF humano, 1 mg/ml de glutamina, 40 g/ml de gentamicina (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y 0,1 mg/ml de la toxina del cólera (Sigma, St. Louis, MO). Las células se sub cultivaron dos veces a la semana. CECH confluentes se lavaron una vez con PBS y la monocapa cubierta de PBS fue expuesto a RUV-B en recipientes de cultivo abiertos con energía de 10 mJ/cm². Después de la estimulación con RUV-B, las células se incubaron durante 48 horas, se recogió el sobre nadante y se centrifugó 10 min a 400 g para eliminar las células flotantes. La monocapa celular se lavó con PBS frío y se lisaron en hielo para la medición de concentración total de proteínas. Todos los datos se normalizaron a la concentración de proteína del lisado celular.

Cuantificación de citocinas en lágrimas y en sobrenadante de cultivos de células epiteliales de córnea

Las citocinas IL-1 β , *TNF- α* y MCP-1 fueron cuantificadas mediante un equipo comercial basado en ELISA (Bio-rad, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la expresión de *TNF- α* en el estudio del equilibrio de Hardy-Weinberg, se compararon las frecuencias observadas y esperadas por el test de χ^2 . El test de Fisher fue utilizado para estudiar asociaciones entre las frecuencias alélicas de los pacientes y los controles. El test de χ^2 también fue utilizado para calcular la razón de ventaja (*OR: odds ratio*) y los valores *p* para comparar las frecuencias genotípicas y haplotípicas.

Los concentraciones de citocinas y las densidades de CD fueron evaluadas utilizando el test estadístico de Student y ANOVA, respectivamente, considerando una $p < 0,05$ como estadísticamente significativa.

Resultados

Demografía

La edad media y rangos de los individuos de este estudio fueron, para pacientes y controles del departamento El Cuy, de 61,5 (53-70) años y 59,8 (49-68) años, respectivamente.

Estudios oftalmológicos

De los quince pacientes con QCE, siete presentaron grado 1, cinco grado 2, y tres individuos grado 3.

Presencia de CD en zonas periféricas de la córnea

La MCF mostró que el número de CD en el área periférica/limbar de la córnea aumenta significativamente a medida que la enfermedad progresa. La densidad de CD en QCE grado 1 fue de 121 ± 11 células/mm²; mientras que en los estadios moderado y avanzado (grados 2 y 3) las CD aumentaron a 178 ± 14 células/mm² y 264 ± 13 células/mm², respectivamente ($p < 0,05$).

Genotipificación de *TNF- α*

Los resultados de SNP en la posición -308 (G/A) del gen *TNF- α* (frecuencias alélicas y genotípica) indicaron ausencia de diferencias significativas entre individuos con QCE y los controles sanos. Fenotípicamente ambos grupos de individuos serían bajos o intermedios productores *in vitro* de la citocina *TNF- α* (Tabla 1).

Cuantificación de citocinas en lágrimas y sobrenadantes de cultivo de CECH

Se estudió y cuantificó si *TNF- α* y MCP-1 estaban presentes en el fluido lagrimal de pacientes y controles. Se cuantificó también IL-1 β , a modo de control positivo, porque esta citocina pro-inflamatoria ya había mostrado niveles muy superiores en lágrimas de individuos con QCE en nuestro trabajo anterior utilizando otros pacientes⁶⁵.

Tabla 2. Niveles de citocinas (pg/ml/ng) en lágrimas de individuos con QCE y en controles sanos cuantificadas mediante la técnica de ELISA.

Citocinas	QCE n = 15 media \pm EEM	Controles sanos n = 15 media \pm EEM	p
IL-1	113,01 \pm 13,83	15,07 \pm 1,14	<0,0001
TNF- α	130,98 \pm 9,17	13,2 \pm 0,9	<0,0001
MCP-1	4900 \pm 241	842 \pm 29	<0,0001

Como se puede observar en la **Tabla 2**, las concentraciones de TNF- α y MCP-1 fueron 10 y 6 veces mayores en las lágrimas de los pacientes con respecto a los controles sanos ($p < 0,0001$).

Con el objetivo de investigar el rol del epitelio corneal en el proceso inflamatorio expusimos CECH al estrés provocado por RUV-B (una de las múltiples condiciones ambientales desfavorables que padecen los individuos con QCE). Cuando estudiamos los sobrenadantes de cultivos 48 horas después de la exposición o no a 10 mJ/cm² de RUV-B, no detectamos niveles de TNF- α , IL-1 β ni MCP-1.

Discusión

Nuestro grupo ha descrito que la QCE tiene una alta incidencia en el departamento El Cuy en la provincia de Río Negro, que afecta a individuos cuya ocupación principal es el cuidado de ganado ovino a campo abierto durante gran parte del día y durante todo el año, y que han tenido una deficiencia nutricional importante de ácido ascórbico (AA) durante toda la vida. Esta región patagónica se caracteriza por un clima seco, ventoso, y suelo arenoso escasamente cubierto por arbustos pequeños (Tesis Doctoral del profesor Dr. Julio A. Urrets-Zavalía).

Recientemente hemos demostrado que en pacientes con QCE se produce una reacción de hipersensibilidad en la córnea en donde inicialmente participan componentes proinflamatorios muy importantes de la inmunidad.⁶⁵

Debido a que estas personas están expuestas a un bombardeo sobre la córnea de partículas transportadas por el viento y tienen disminuidos los mecanismos protectores contra las RUV (no utilizan lentes de sol, ni sombrero, y tienen una disminución significativa de AA en la córnea), se produciría la degradación de proteínas extravasadas desde los vasos limbares y la acumulación progresiva en las capas superficiales (manuscrito en preparación).

En este trabajo continuamos con la investigación de otros componentes proinflamatorios de la inmunidad (TNF- α y MCP-1) en pacientes con QCE.

Existen muchísimas evidencias que le otorgan importancia a la asociación entre ciertas variantes alélicas de genes del complejo HLA y la susceptibilidad a múltiples enfermedades. Nosotros hemos estado estudiando posibles aso-

Tabla 1. Frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismo del gen TNF- α en la posición -308 (G/A) en individuos con QCE y en controles sanos.

Polimorfismo del TNF- α (-308)	QCE n = 15	Controles sanos n = 15	Estadística
Frecuencia alélica			
G ^b	27	25	p = 0,7065 OR = 1,800 IC95%: 0,3891-8,326
A ^a	3	5	
Frecuencia genotípica			
G/G ^b	12	10	Chi ² = 0,1705 p = 0,6797 (NS)
G/A ^c	3	5	
A/A ^a	0	0	
Perfil fenotípico Respondedor bajo, intermedio, alto			
^b Bajo (G/G)	12	10	Chi ² = 0,1705 p = 0,6797 (NS)
^c Intermedio (G/A)	3	5	
^a Alto (A/A)	0	0	

ciaciones entre ciertos genes HLA y QCE. En el cromosoma 6 humano, además de las regiones HLA-I y \pm II se encuentran genes que codifican citocinas tales como TNF- α y LT (HLA-III).

Las citocinas, que pueden ser proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-8, etc.) o antiinflamatorias (TGF- β , IL-10, etc.), son proteínas producidas por diferentes tipos celulares que ejercen distintos tipos de acciones sobre células que expresan receptores específicos de membrana para dichas moléculas. Se han observado polimorfismos de una o dos bases nucleotídicas en genes de varias de estas moléculas, los cuales están asociados a una mayor o menor producción de dichas proteínas *in vitro*.^{68,69} La cantidad de investigaciones que han demostrado asociación entre estos polimorfismos y diferentes enfermedades humanas es enorme y algunas de ellas pueden ser leídas en las siguientes revisiones.⁷⁰⁻⁷⁶

Con respecto al gen TNF- α , se ha identificado una transición G por A en la posición (-308) dentro de la región promotora, y los individuos portadores del alelo A son altos secretores de esta citocina.^{77,78}

A pesar de que este polimorfismo ha sido asociado con ciertas enfermedades,^{79,81} nuestra investigación a nivel genético no demostró diferencias significativas en el polimorfismo simple de nucleótido (-308), ni en las frecuencias alélicas o genotípicas entre pacientes con QCE y controles sanos.

Si bien tanto pacientes como controles corresponden a un fenotipo caracterizado por una producción baja o intermedia de TNF- α , los individuos con QCE tuvieron concentraciones de esta citocina en lágrima 10 veces superiores a las encontradas en individuos sanos. Las lágrimas de estos pacientes también mostraron un incremento similar en los niveles de IL-1 β con respecto a controles normales, dato que nos permite corroborar los resultados obtenidos

con otra cohorte de pacientes en un trabajo previo.⁶⁵ Los niveles aumentados de IL-1 β son los responsables del significativo aumento de MMP-9 en los pacientes con QCE. La existencia de importantes concentraciones de TNF- α (Tabla 2) potenciarían la actividad de IL-1 β up regulando la transcripción, traducción y actividad enzimática de MMP-9. Estos resultados concuerdan con las observaciones publicadas por Nee et al.⁸² utilizando células mesangiales glomerulares.

El aumento de IL-8, quimioattractante de neutrófilos (PMN), contribuye a la liberación por dichas células de elevados niveles de MMP-8 encontrados también en lágrima de pacientes. Es de interés resaltar que las diferencias significativas encontradas en este trabajo en las concentraciones de TNF- α en las lágrimas de pacientes con QCE *vs.* controles sanos podrían explicarse por la liberación de esta citocina por las células PMN.

Nuestros estudios de MCF demostraron que el número de CD presentes en la zona periférica/limbar en QCE es mayor que en córneas normales (datos no mostrados) y además aumenta de manera significativa a medida que la enfermedad progresa. Debido a que precursores de CD expresan el receptor para MCP-1 y nosotros encontramos un significativo aumento de esta quimiocina en lágrimas de pacientes (6 veces más que en individuos sanos), se

podría inferir que esta quimiocina contribuye al reclutamiento y posterior diferenciación del elevado número de CD observados en esta región de la cornea. La acción de estas excelentes células fagocíticas explicaría la acumulación de los depósitos proteicos en la zona central y su ausencia en la zona periférica.

Debido a que hasta ahora no disponemos de un modelo experimental que reproduzca esta patología en el ser humano, decidimos investigar como responden células epiteliales de córnea humana en cultivo cuando son tratadas con dosis similares de RUV-B a las que están expuestas los individuos enfermos. En los sobrenadantes de CECH expuestas a 10 mJ/cm² de RUV-B se detectó IL-8 (datos no mostrados), pero no observamos niveles detectables de TNF- α ni de MCP-1. Estos resultados no son contradictorios con lo anteriormente presentado sino que más bien indicarían que otras células corneales son las responsables de la producción de dichas moléculas, y que además de RUV-B otros factores están involucrados en la iniciación de esta cascada de eventos que se observan en esta hipersensibilidad corneal humana.

Este trabajo de investigación permitió profundizar el conocimiento sobre los complejos mecanismos que operan en la QCE y demostrar la participación de nuevas citocinas inflamatorias en el desarrollo de esta hipersensibilidad.

Referencias

1. Baquis E. Die colloide Degeneration der Cornea. Ein Beitrag zur Kenntniss der Entstehung des Colloids aus epithelialen Elementen. Albrecht von Graefe Arch Klin Exp Ophthalmol 1898;46:553-620.
2. Freedman A. Climatic droplet keratopathy. I. Clinical aspects. Arch Ophthalmol 1973;89:193-197.
3. Forsius H. Climatic changes in the eyes of Eskimos, Lapps and Cheremisses. Acta Ophthalmol (Copenh) 1972;50:532-538.
4. Rodger FC, Cuthill JA, Fydelor PJ, Lenham AP. Ultra-violet radiation as a possible cause of corneal degenerative changes under certain physiographic conditions. Acta Ophthalmol (Copenh) 1974;52:777-785.
5. Gray RH, Johnson GJ, Freedman A. Climatic droplet keratopathy. Surv Ophthalmol 1992;36:241-253.
6. Lugli L. Degeneratio corneae sphaerularis elaioides. Albrecht von Graefe Arch Klin Exp Ophthalmol 1935;134:211-226.
7. Zanettin G. I cieche delle isole Dahlac. Arch Ital Sci Med Colon Parass 1937;18:387-398.
8. Bartolucci F. Arch ital. Sci. med. colon 1933; 14: 430.
9. Falcone C. A tropical dystrophy. East Afr Med J 1954; 31:471-475.
10. Bietti GB, Guerra P, Ferraris de Gaspare PF. La dystrophie corneenne nodulaire en ceinture des pays tropicaux a solaride. Bull Soc Ophthalmol Fr 1955; 68:101-128.
11. Rodger FC. Clinical findings, course, and progress of Bietti corneal degeneration in the Dahlak Islands. Br J Ophthalmol 1973; 57:657-664.
12. Nataf R, Besnainou R, Ulveling N. Dystrophie cornéenne nodulaire en ceinture type Bietti. Ann Oculist 1957;190:316-321.
13. Gandolfi A. Osservazioni di distrofia corneale nodulare a bandelletta dei paesi tropicali a suolo arido in Cirenaica (Libia). Boll Oculist 1962;41:129-134.
14. Etzine S, Kaufmann JCE. Band-shaped nodular dystrophy of the cornea. Am J Ophthalmol 1964;57:760-763.
15. Freedman A. Labrador keratopathy. Arch Ophthalmol 1965; 74:198-202.
16. Young JD, Finlay RD. Primary spheroidal degeneration of the cornea in Labrador and northern Newfoundland. Am J Ophthalmol 1975;79:129-134.
17. Forsius H, Eriksson AW, Luukka H. Ophthalmological characteristics of Eskimos in Augpilagtok. Arch Anthropol 1970;7:9-17.
18. Fraunfelder FT, Hanna C, Parker JM. Spheroid degeneration of the cornea and conjunctiva. I. Clinical course and characteristics. Am J Ophthalmol. 1972; 74:821-828.
19. Klintworth GK. Chronic actinic keratopathy-a condition associated with conjunctival elastosis (pingueculae) and typified by characteristic extracellular concretions. Am J Pathol 1972;67:327-348.
20. McGuinness R, Hollows FC, Tibbs J, Campbell D. Labrador keratopathy in Australia. Med J Aust 1972;2:1249-1250.
21. Taylor HR. Aetiology of climatic droplet keratopathy and pterygium. Br J Ophthalmol 1980;64:154-163.
22. Forsius H, Eriksson A. The cornea at northern latitudes-corneal power, arcus senilis and corneal scars in Eskimos, Lapps and Finns. Can J Ophthalmol 1973;8:280-285.
23. Wyatt HT. Corneal disease in the Canadian North. Can J Ophthalmol 1973;8:298-305.
24. English FP. Eskimo keratopathy. Papua New Guinea Med J 1973; 18:95-96.
25. Anderson J, Fuglsang H. Droplet degeneration of the cornea in North Cameroon. Prevalence and clinical appearances. Br J Ophthalmol 1976;60:256-262.

26. Pilley SF. The incidence and aetiology of blindness in Seychelles-1974. *J Trop Med Hyg* 1976;79:72-82.
27. Forsius H. Pterygium, climatic keratopathy and pinguecula of the eyes in Arctic and subarctic populations. In: Shepard RJ, Itoh S (eds.). *Circumpolar Health*. Toronto: University of Toronto Press; 1976, pp. 364-373.
28. Singh D, Singh M. Climatic keratopathy. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1978;98:10-13.
29. Norn MS. Spheroid degeneration of cornea and conjunctiva. Prevalence among Eskimos in Greenland and Caucasians in Copenhagen. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1978;56:551-562.
30. Resnikoff S. Epidemiology of Bietti's keratopathy. Study of risk factors in Central Africa (Chad). *J Fr Ophtalmol* 1988;11:733-740.
31. Forsius H, Losno W. The eye in high altitude: comparison between arctic populations and 392 adults in the Titicaca region of Peru. *Circumpolar Health* 1985;84:103-104.
32. Forsius H, Maertens K, Fellman J. Changes of the eye caused by the climate in Rwanda, Africa. *Ophthalmic Epidemiol* 1995;2:107-113.
33. Urrets-Zavalía JA, Knoll EG, Maccio JP, et al. Climatic droplet keratopathy in the Argentine Patagonia. *Am J Ophthalmol* 2006; 141:744-746.
34. Freedman J. Band shaped nodular dystrophy of the cornea in Bantu speaking Negroes. *South African Archives of Ophthalmology* 1973;1:149-155.
35. Tremblay M, Dube I. Keratitis of Labrador. Clinical, histochemical and ultrastructural study of 3 cases. *Arch Ophtalmol Rev Gen Ophtalmol* 1974;34:781-792.
36. Alajmo A. An Uncommon form of Corneal Degeneration. *Rass Ital Ottal* 1953;22:26-35.
37. Duke-Elder S, Leigh AG. Hyaline degeneration. In: Duke-Elder S (ed): *Diseases of the outer eye*. London, Kimpton, 1965; pp 888-890.
38. Garner A, Fraunfelder FT, Barras TC, Hinzpeter EN. Spheroidal degeneration of cornea and conjunctiva. *Br J Ophthalmol* 1976; 60:473-478.
39. Sachs alber A. Über die hyaline degeneration der cornea. *Beitr Augenhilhd* 1901;5:865-900.
40. Parsons JH: *The Pathology of the Eye*, Vol 1. London, Hodder and Stoughton, 1904; pp 240.
41. Kozłowski B: Szczegolna postac zwyrodnienia szklistego rogowski. *Acta Ophthalmol (Polonica)* 1953;23:249-253.
42. Garner A. Keratoid corneal degeneration. *Br J Ophthalmol* 1970;54:769-780.
43. Christensen GR. Proteinaceous corneal degeneration. A histochemical study. *Arch Ophthalmol* 1973;89:30-32.
44. Brownstein S, Rodrigues MM, Fine BS, Albert EN. The elastotic nature of hyaline corneal deposits. A histochemical, fluorescent, and electron microscopic examination. *Am J Ophthalmol* 1973; 75:799-809.
45. Rodrigues MM, Laibson PR, Weinreb S. Corneal elastosis. Appearance of band-like keratopathy and spheroidal degeneration. *Arch Ophthalmol* 1975;93:111-114.
46. Forsius H. Climatic changes in the eyes of Eskimos, Lapps and Cheremisses. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1972;50:532-538.
47. Prasad Rao RS. Fisherman's keratopathy. *J All India Ophthalmol Soc* 1961;9:56-59.
48. Järventausta PJ, Holopainen JM, Zalentein WN, Paakkanen R, Wennerström A, Seppänen M, Lokki ML, Tervo TM. Peripheral hypertrophic subepithelial corneal degeneration: characterization, treatment and association with human leucocyte antigen genes. *Acta Ophthalmol* 2013 Feb 7.
49. Urrets-Zavalía JA, Maccio JP, Knoll EG, Cafaro TA, Urrets-Zavalía EA, Serra HM. Surface alterations, corneal hypoesthesia and iris atrophy in patients with climatic droplet keratopathy. *Cornea* 2007;26:800-804.
50. Garner A, Morgan G, Tripathi RC. Climate droplet keratopathy. II. Pathologic findings. *Arch Ophthalmol* 1973; 89:198-204.
51. Johnson GJ, Overall M. Histology of spheroidal degeneration of the cornea in Labrador. *Br J Ophthalmol* 1978;62:53-61.
52. Ruggeri A, Pajaro S. Automatic recognition of cell layers in corneal confocal microscopy images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 2002;68:25-35.
53. Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, et al. Confocal microscopy of the living eye. *CLAO J* 1990;16:65-73.
54. Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:476-488.
55. Müller LJ, Vrensen GF, Pels L, et al. Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:985-994.
56. Auran JD, Koester CJ, Kleiman NJ, et al. Scanning slit confocal microscopic observation of cell morphology and movement within the normal human anterior cornea. *Ophthalmology* 1995;102:33-41.
57. Urrets-Zavalía JA, Croxatto JO, Holopainen JM, et al. In vivo confocal microscopy study of climatic droplet keratopathy. *Eye (Lond)* 2012; 26:1021-1023.
58. Rosenberg ME, Tervo TM, Gallar J, Acosta MC, Müller LJ, Moilanen JA, Tarkkanen AH, Vesaluoma MH. Corneal morphology and sensitivity in lattice dystrophy type II (familial amyloidosis, Finnish type). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:634-641.
59. Duhaiman AS, Gorban AM, Shoukrey N, Tabbara KF. Biochemical analysis of climatic droplet keratopathy. *Saudi Bull Ophthalmol* 1988;3:147-149.
60. Menegay M, Lee D, Tabbara KF, et al. Proteomic analysis of climatic keratopathy droplets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:2829-2837.
61. Fujii N, Shimo-Oka T, Ogiso M, et al. Localization of biologically uncommon D-beta-aspartate-containing alpha A-crystallin in human eye lens. *Mol Vis* 2000; 6:1-5.
62. Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, et al. Localization of D-beta-aspartic acid-containing proteins in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3923-3927.
63. Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, et al. Accumulation of D-beta-aspartic acid-containing proteins in age-related ocular diseases. *Chem Biodivers* 2010;7:1364-1370.
64. Kaji Y, Nagai R, Amano S, et al. Advanced glycation end product deposits in climatic droplet keratopathy. *Br J Ophthalmol* 2007; 91:85-88.
65. Serra HM, Cafaro TA, Suárez MF, Croxatto JO, Moro PA, Urrets-Zavalía JA. Participación de componentes inmunológicos en la etiopatogenia de la queratopatía climática esferoidea. *Archivos Argentinos de Alergia e Inmunología Clínica* 2011;42:49-58.
66. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1998;16:1215-1219.
67. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta gene polymorphisms. *Transplant Immunol* 1999;7:127-128.
68. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An Investigation of Polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1-8.
69. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-B1 gene: association with transforming growth factor-beta 1 production, fibrotic lung disease and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998;66:1014-1020.
70. Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:43-59.
71. Rao M, Wong C, Kanetsky P, Girndt M, Stenvinkel P, Reilly M, Raj DS. Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases. *Kidney Int* 2007;72:549-556.

72. Gutierrez-Roelens I, Lauwerys BR. Genetic susceptibility to autoimmune disorders: clues from gene association and gene expression studies. *Curr Mol Med* 2008;8:551-561.
73. Aguilón JC, Cruzat A, Aravena O, Salazar L, Llanos C, Cuchacovich M. Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution? *Immunobiology* 2006;211:75-84.
74. Wang SK, Wang ZZ, Huang YF. Advances in researches on the relationship between single nucleotide polymorphism and prostate cancer. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2005;11:605-610.
75. Karabon L. The role of cytokine gene polymorphisms in organ and haematopoietic stem cell transplantation. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2004;58:270-284.
76. Zhernakova A, van Diemen CC, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet* 2009;10:43-55.
77. Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon- γ , interleukin-10, transforming growth factor- β 1 and tumour necrosis factor- α genes: a technical report. *Trans Immunol* 1998; 6:193-197.
78. Westphal GA, Schnuch A, Moessner R, König IR, Kranke B, Hallier E, Ziegler A, Reich K. Cytokine gene polymorphisms in allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 2003;48:93-98.
79. Carrozzo M, Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Arduino P, Broccoletti R, Vezza D, Rendine S, Curtoni ES, Gandolfo S. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 2004;122:87-94.
80. Eberhard Y, Burgos E, Gagliardi J, Vullo CM, Borosky A, Pessoa S, Serra HM. Cytokine polymorphisms in patients with pemphigus. *Archiv Dermatol Res* 2005; 296: 309-313.
81. Radwan MI, Pasha HF, Mohamed RH, Hussien HI, El-Khshab MN. Influence of transforming growth factor- β 1 and tumor necrosis factor- α genes polymorphisms on the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cytokine* 2012;60:271-276.
82. Nee L, Tuite N, Ryan MP, McMorrow T. TNF-alpha and IL-1 beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in human glomerular mesangial cells. *Nephron Exp Nephrol* 2007;107(2):73-86.