



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**RECEPTORES TOLL-LIKE COMO DIANA  
DIAGNÓSTICA Y TERAPÉUTICA EN LAS ECTASIAS  
CORNEALES**

Uxía Regueiro Lorenzo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018





## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

### **“Receptores Toll- like como diana diagnóstica y terapéutica en las ectasias corneales”**

Dña. Uxía Regueiro Lorenzo

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela,                      de Julio de 2018

Fdo.

Uxía Regueiro Lorenzo





## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

**“Receptores Toll- like como diana diagnóstica y terapéutica en las ectasias corneales”**

Dña. M<sup>a</sup> Isabel Lema Gesto

D. Tomás Sobrino Moreiras

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Uxía Regueiro Lorenzo, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela,                      de Julio de 2018

Fdo. Directora y tutora  
M<sup>a</sup> Isabel Lema Gesto

Fdo. Director  
Tomás Sobrino Moreiras





Este trabajo ha sido financiado con una subvención concedida por el Fondo de Investigación en Salud (FIS) del Ministerio de Economía y Competitividad de España (Código PI14/00247).

Durante la realización de este trabajo, Dña Uxía Regueiro Lorenzo ha disfrutado de una ayuda de apoyo a la etapa pre-doctoral del Plan gallego de investigación, innovación y crecimiento 2011-2015 (Plan I2C) de la Xunta de Galicia (Nº Exp.ED481A-2015/001).

No existe ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.



# Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que, de una manera u otra, me habéis ayudado y acompañado durante la tesis.

Si tengo que empezar por alguien es por Isabel Lema. Isa, gracias a ti comenzó todo hace al menos 7 años, cuando, estando a punto de terminar la diplomatura y sin tener ni idea de mis perspectivas de futuro, escuché de tu boca la palabra "investigación". Aquel día de prácticas nos hablaste de la posibilidad de realizar un estudio con pacientes, me transmitiste tanto entusiasmo que sentí que ese era el camino que debía tomar. Afortunadamente, el Dr. Elío Díez-Feijóo y tú, me concedisteis la oportunidad de llevarlo a cabo. Durante el TAD, me transmitiste el amor y la dedicación al trabajo bien hecho y aprendí de ti la pasión por la contactología. Todo ello me motivó a continuar vinculada al mundo de la investigación. Después de tanto tiempo juntas como mi directora de tesis y demás trabajos, solo encuentro palabras de admiración y cariño hacia ti. Por tu ejemplo, tu sencillez y claridad, tu conocimiento y tu capacidad para aplicarlo, así como por tu cercanía, dedicación, apoyo diario y amistad, espero poder continuar aprendiendo de ti, no solo a nivel profesional sino también personal, durante muchos años más. Gracias por tanto.

Muchas gracias también a Tomás Sobrino, codirector de esta tesis, por toda su ayuda durante estos últimos 4 años, por su afecto, sus buenos consejos y por guiarme en el complicado mundo de la investigación básica.

Al LINC y al INGO gracias por proporcionar los recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo.

Profesor Pepe Castillo, muchas gracias por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme formar parte del equipo LINC, aun siendo "la niña de ojos" en un laboratorio de neurociencias. Este equipo me ha ayudado a comprender el carácter multidisciplinar de la investigación, es envidiable ver como neurólogos y biólogos aprendéis unos de otros fomentando una buena investigación traslacional. Cada miércoles durante los seminarios he ido conociendo un poquito más sobre vuestro mundo del ictus, alzheimer, migraña... e incluso cadasil..., aportándome enseñanzas tanto de ciencia como de la vida. Todos y cada uno de los que formáis el equipo LINC habéis contribuido a que me sienta como una más entre vosotros. Los cocidos, las cenas... así como las churrascadas en Chaian, las partidas de pádel y las fiestas, han hecho que vuestra compañía se extienda más allá de las paredes del laboratorio llegando a formar una buena amistad. A todos los que están, estuvieron o sean recién llegados... Alba, Ana, Andrés, Antía, Antonio, Clara, Elena, Esteban, Fernando, Fran, Héctor, Joserra, Juan, Manuel, Marta, Nacho, Pablo, Paulo, Ramón, Tania; gracias por vuestra acogida, por toda la paciencia, ayuda y tiempo que habéis dedicado en explicarme dudas científicas, por todos los buenos momentos del día a día, por las risas y la complicidad; y como no, muchas gracias a los que participasteis como "voluntarios" en la recogida de muestra. María, a ti tengo que agradecerte tu implicación, ya que tu apoyo y enseñanzas fueron imprescindibles para la experimentación en cultivos celulares. Nunca pensé que algo tan pequeñito pudiese dar tanto trabajo. Gracias compañeros por ser como sois.

Al Dr. Elío Díez-Feijóo le agradezco enormemente la oportunidad de permitirme formar parte de su grupo clínico. Gracias por tu acogida, por tu voto de confianza y por tu cariño. Sin duda, la experiencia en el INGO a lo largo de estos años ha sido fundamental en mi formación como optometrista. A todos los compañeros del INGO: Consuelo Ruíz, M<sup>a</sup> José Copena, Belén Pazos, Pedro Pacheco, Jesús, Míriam, Gema y Óscar, que día a día promovieron un ambiente de trabajo en equipo, estímulo y aprendizaje. Gracias por el afecto que me habéis dado siempre. Mencionar también al Profesor Sánchez Salorio que siempre lo consideraré todo un referente en el ámbito de la oftalmología.

Agradecerle al grupo de Neoplasia y Diferenciación de Células Endocrinas de la USC la cesión de sus instalaciones y su ayuda con las cubetas de electroporación.

No me olvido de todos los pacientes y voluntarios que participaron en este estudio. Muchas gracias por vuestra implicación y colaboración, vosotros hacéis que esta investigación haya sido posible.

En cuanto a mis compañeros de la Facultad de Óptica y Optometría: Vicente Moreno, Manuel Caamaño y Pepe, os agradezco que siempre me recibieseis con una sonrisa y con palabras de ánimo y aliento. Y Chedes, amiga y compañera de tesis, gracias por tu apoyo, las dos sabemos lo que cuesta llegar hasta aquí.

A mis optometristas favoritas: Ana, Myriam, Cris y Vane. Gracias por estar siempre ahí, por vuestra amistad y por los buenos ratos de risas y confianzas. Es genial poder compartir con vosotras algo tan bonito como es nuestra profesión.

Gracias también al resto de mis amigas y amigos que, a pesar de no haber cursado la carrera en Óptica y Optometría, ya casi saben tanto como yo acerca del "queratocono" y de las "celulillas". Alba y Laura, Antía, Jeni y Raquel, Bea y Gonzalo, Elsa, Bea, Lidia... Muchas gracias por los buenos momentos que me hacéis pasar, por todos estos años de amistad y por aportarme tanta energía positiva.

A Lucía, por las innumerables horas de estudio y convivencia que hemos compartido este último año, eres todo un ejemplo a seguir en cuanto a fuerza de voluntad y perseverancia. Estoy segura de que pronto alcanzarás tus objetivos.

Javi, en poco tiempo te has convertido en alguien imprescindible. Gracias por ser como eres, por estar dispuesto a apoyarme en todo, por completarme y por sacarme tantas sonrisas. Tú has contribuido a que estos últimos meses de tesis hayan sido más llevaderos. Gracias por transmitirme tanto amor cada día.

Y finalmente, a mi familia. Abuela Pilar y abuela Oliva, gracias por quererme y por cuidarme tanto siempre. Abuelo Camilo, sé que ahora mismo estarías orgulloso de tu "nieteciña". Mamá, papá, Alba, gracias por el cariño que me demostráis, por vuestro apoyo, ánimos y confianza, soy todo lo que me habéis enseñado; en definitiva, gracias por acompañarme en esta vida.

Por todo esto y mucho más,

Gracias a todos/as.





"Sé todo en cada cosa...

Pon cuanto eres en lo mínimo que hagas"

*Fernando Pessoa*



## Resumen

El queratocono y la degeneración pelúcida marginal son ectasias corneales crónicas, progresivas y sin tratamiento curativo, que afectan a la visión y a la calidad de vida del paciente. Aunque estudios previos demostraron la implicación de mecanismos inflamatorios en su fisiopatología, a día de hoy su etiología sigue sin estar clara. Postulamos que dicha inflamación puede ser inmunidad-innata dependiente, y por tanto, que los receptores Toll-like podrían estar implicados en su inicio y progresión. El presente trabajo aporta nuevos datos acerca del potencial diagnóstico y pronóstico de TLR2 y TLR4, corneal y conjuntival, en pacientes con ectasia corneal, así como de la capacidad antiinflamatoria de su bloqueo como posible diana terapéutica en cultivos de epitelio corneal.

Palabras clave: ectasia corneal, inflamación, inmunidad innata.





# Índice

Abreviaturas y acrónimos .....	1
Introducción .....	7
<b>1. Ectasia corneal .....</b>	<b>7</b>
1.1 Definición .....	7
1.2 Clasificación .....	8
1.3 Queratocono vs degeneración pelúcida marginal .....	10
1.3.1 Epidemiología .....	10
1.3.2 Etiología y factores fisiopatológicos .....	10
1.3.2.1 Factores genéticos .....	11
1.3.2.2 Factores mecánicos y ambientales .....	13
1.3.2.3 Factores bioquímicos y moleculares .....	13
1.3.3 Cambios histológicos .....	17
1.3.4 Semiología .....	18
1.3.5 Pruebas diagnósticas .....	19
1.3.6 Tratamiento .....	21
<b>2. Implicación de la superficie ocular en la ectasia corneal .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Inflamación e inmunidad en la fisiopatología de la ectasia corneal .....</b>	<b>25</b>
3.1 Inflamación .....	25
3.1.1 Definición .....	25
3.1.2 Mediadores inflamatorios en la ectasia corneal .....	27
3.2 Inmunidad .....	30
3.2.1 Definición .....	30

3.2.2	Importancia de la inmunidad innata en la superficie ocular .....	31
3.3	Receptores Toll-like .....	33
3.3.1	Estructura y vías de activación .....	33
3.3.2	Localización, clasificación y ligandos .....	35
3.3.3	TLRs en la superficie ocular .....	36
3.3.4	Potencial terapéutico del bloqueo de los TLRs .....	37
3.4	Modelo de ectasia corneal para investigación básica .....	38
Hipótesis .....		43
Objetivos .....		47
Estudio Clínico .....		51
<b>4.</b>	<b>Material y Método .....</b>	<b>51</b>
4.1	Características de la muestra y diseño del estudio .....	51
4.1.1	Cronograma temporal .....	52
4.1.2	Determinación del tamaño muestral .....	52
4.2	Criterios de selección .....	53
4.2.1	Criterios de inclusión .....	53
4.2.2	Criterios de exclusión .....	55
4.3	Protocolo de exploración clínica .....	55
4.4	Recogida de lágrima y análisis molecular .....	57
4.4.1	Recogida de lágrima .....	58
4.4.2	Análisis de cFn, HSP60 y Lf .....	58
4.5	Recogida de epitelio y análisis celular .....	59
4.5.1	Recogida de células de epitelio corneal y conjuntival .....	60
4.5.2	Determinación de TLR2 y TLR4 .....	60
4.6	Análisis estadístico .....	61
<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>63</b>
5.1	Análisis descriptivo de la muestra .....	63
5.2	Expresión de TLR2 y TLR4 en los grupos de estudio .....	66

5.3 Relación entre la expresión de TLR2/TLR4 y el grado de ectasia corneal .....	69
5.4 Expresión de ligandos endógenos en lágrima y su correlación con la expresión de TLR2/TLR4 .....	71
5.5 Evolución de la expresión de TLR2/TLR4 tras año y medio de seguimiento .....	74

<b>Estudio <i>in Vitro</i></b> .....	81
--------------------------------------	----

<b>6. Material y Método</b> .....	81
-----------------------------------	----

6.1 Cultivo celular .....	81
6.1.1 Descongelación, sembrado y subcultivo .....	81
6.2 Diseño experimental .....	82
6.2.1 Expresión de TLR2 y TLR4 en cultivos de epitelio corneal .....	84
6.2.2 Estimulación de TLR2 y TLR4 en cultivos de epitelio corneal .....	85
6.2.2.1 Estimulación con LPS y Pam3CSK4 .....	85
6.2.2.2 Electroporación y estimulación con LPS y Pam3CSK4 .....	87
6.2.3 Evaluación de la respuesta inflamatoria generada tras la estimulación de TLR2 y TLR4 .....	89
6.2.4 Bloqueo de la respuesta inflamatoria .....	89
6.2.4.1 Bloqueo con anticuerpos neutralizantes de TLR2 y TLR4 .....	92
6.2.4.2 Bloqueo e inmunomodulación con lactoferrina .....	92
6.2.4.3 Evaluación de la respuesta inflamatoria tras el bloqueo .....	92
6.3 Determinación del contenido proteico .....	93
6.4 Análisis estadístico .....	93

<b>7. Resultados</b> .....	95
----------------------------	----

7.1 Expresión de TLR2 y TLR4 en cultivos de epitelio corneal .....	95
7.2 Estimulación de TLR2 y TLR4 .....	97
7.2.1 Estimulación con LPS y Pam3CSK4 .....	97
7.2.2 Electroporación y estimulación con LPS y Pam3CSK4 .....	99
7.3 Bloqueo de la respuesta inflamatoria obtenida tras la estimulación de TLR2 y TLR4.....	101
7.3.1 Bloqueo con anticuerpos neutralizantes de TLR2 y TLR4 .....	102

7.3.2 Tratamiento con Lf recombinante (rLf) .....	104
7.3.3 Bloqueo con anticuerpo de Lf (anti-Lf) .....	104
<b>Discusión</b> .....	<b>109</b>
8.1 Expresión de TLR2 y TLR4 en los grupos de estudio: correlación con el grado de ectasia corneal e influencia de las características de la muestra...109	
8.2 Expresión de ligandos endógenos en lágrima y su correlación con los TLRs .....	113
8.3 Evolución de los TLRs tras año y medio de seguimiento .....	117
8.4 Cultivos de epitelio corneal: expresión y estimulación de TLRs .....	118
8.5 Cultivos de epitelio corneal: bloqueo de TLRs .....	121
<b>Conclusiones</b> .....	<b>125</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>127</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>147</b>
<b>ANEXO 1.</b> Protocolo del estudio clínico .....	<b>147</b>
<b>ANEXO 2.</b> Informe favorable del comité ético .....	<b>151</b>
<b>ANEXO 3.</b> Exploración clínica, recogida de muestra, análisis molecular y celular .....	<b>152</b>
<b>ANEXO 4.</b> Condiciones de cultivo .....	<b>153</b>

# Abreviaturas y acrónimos

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>anti-Lf</b>	Anticuerpo de lactoferrina
<b>anti-TLR2</b>	Anticuerpo de TLR2
<b>anti-TLR4</b>	Anticuerpo de TLR4
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AV</b>	Agudeza visual
<b>AVL</b>	Agudeza visual lejana
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>BUT</b>	Test del tiempo de rotura lagrimal (del inglés; Break-Up Time)
<b>CASRN</b>	Número de registro CAS (del inglés; CAS registry number)
<b>CC</b>	Licencia "Creative Commons"
<b>cél</b>	Células
<b>cFn</b>	Fibronectina celular
<b>CHUS</b>	Complejo hospitalario universitario de Santiago de Compostela
<b>CiMus</b>	Centro de investigación en medicina molecular y enfermedades crónicas
<b>CLEK</b>	Evaluación longitudinal en colaboración del queratocono (del inglés; Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus)
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetros cuadrados
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>coef.</b>	Coefficiente
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>D</b>	Dioptrías
<b>dK</b>	Astigmatismo corneal
<b>dPaquiMin</b>	Distancia desde el centro hasta en punto de espesor corneal mínimo
<b>DPBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (del inglés; Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
<b>dPDMáx</b>	Distancia desde el centro hasta en punto de máximo poder dióptrico
<b>DPM</b>	Degeneración pelúcida marginal
<b>Dr</b>	Doctor
<b>Dra</b>	Doctora
<b>e</b>	Estimuladas

<b>ELISA</b>	Técnica de análisis cuantitativo de inmunoabsorción ligada a enzimas (del inglés; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
<b>FITC</b>	Fluoresceína isotiocianato
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Hora
<b>Hª</b>	Historia
<b>HCEC</b>	Células primarias de epitelio corneal humano (del inglés; Human Corneal Epithelial Cells)
<b>HCEC-I</b>	Línea inmortalizada de células epiteliales corneales humanas (del inglés; Human Corneal Epithelial Cells- Inmortalized Line)
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico (del inglés; heat shock protein)
<b>HSP60</b>	Proteína de choque térmico 60 (del inglés; heat shock protein 60)
<b>HUVEC</b>	Células primarias de endotelio de vena umbilical humana (del inglés; Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
<b>IANUS</b>	Sistema de historia clínica electrónica del servicio gallego de salud
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intracelular 1 (del inglés; Intracellular Adhesion Molecule 1)
<b>IDIS</b>	Instituto de investigación sanitaria de Santiago de Compostela
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IL-1</b>	Interleuquina 1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>IL-10</b>	Interleuquina 10
<b>IL-13</b>	Interleuquina 13
<b>IL-17</b>	Interleuquina 17
<b>INGO</b>	Instituto gallego de oftalmología
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés; inducible Nitric Oxide Synthase)
<b>IRAK</b>	Receptor IL-1 asociado a quinasa (del inglés; IL-1R associated kinase)
<b>I-S</b>	Ínfero-superior
<b>K1</b>	Meridiano corneal más plano
<b>K2</b>	Meridiano corneal más curvo
<b>KPI</b>	Índice de predicción de queratocono (del inglés; Keratoconus Prediction Index)
<b>LC</b>	Lente de contacto
<b>Lf</b>	Lactoferrina
<b>LH</b>	Lámpara de hendidura
<b>LINC</b>	Laboratorio de investigación en neurociencias clínicas
<b>lot</b>	Lote
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido

<b>LRR</b>	Dominio rico en aminoácidos de leucina (del inglés; Leucine-Rich Repeats)
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP</b>	Metaloproteasa de matriz (del inglés; Matrix Metalloproteinase)
<b>MMP9</b>	Metaloproteasa de matriz 9 (del inglés; Matrix Metalloproteinase 9)
<b>MyD88</b>	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (del inglés; Myeloid differentiation primary response 88)
<b>nº</b>	Número
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa B (del inglés; Nuclear Factor - kappa B)
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>NLR</b>	Receptor NOD-like (del inglés; NOD –Like Receptor)
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OD</b>	Ojo derecho
<b>OI</b>	Ojo izquierdo
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub></b>	Lipopéptido sintético
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés; Pathogen Associated Molecular Pattern)
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato (del inglés; Phosphate Buffered Saline)
<b>PDC</b>	Poder dióptrico central
<b>PDmáx</b>	Punto de máximo poder dióptrico
<b>PE</b>	Ficoeritrina (del inglés; phycoerythrin)
<b>pg</b>	Picogramos
<b>PRRS</b>	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés; Pattern Recognition Receptors)
<b>QC</b>	Queratocono
<b>ref</b>	Referencia
<b>RI</b>	Respuesta inflamatoria
<b>rLf</b>	Lactoferrina recombinante humana
<b>RLR</b>	Receptor RIG-I-Like (del inglés; RIG-I-Like Receptor)
<b>RMS</b>	Valor cuadrático medio (del inglés; Root Mean Square)
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno (del inglés; Reactive Oxygen Species)
<b>RPG</b>	Rígido permeable al gas
<b>SD</b>	Desviación estándar de la media (del inglés; Standard Deviation)
<b>s/e</b>	Sin estimular
<b>Tª</b>	Temperatura
<b>tº</b>	Tiempo

<b>TIMP</b>	Inhibidor tisular de metaloproteasas
<b>TIR</b>	Dominio Toll/IL-1R
<b>TLRs</b>	Receptores Toll-like (del inglés; Toll-like Receptors)
<b>TLR2</b>	Receptor Toll-like tipo 2 (del inglés; Toll-like Receptor 2)
<b>TLR4</b>	Receptor Toll-like tipo 4 (del inglés; Toll-like Receptor 4)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés; Tumor Necrosis Factor $\alpha$ )
<b>TNF<math>\beta</math></b>	Factor de necrosis tumoral beta (del inglés; Tumor Necrosis Factor $\beta$ )
<b>TRAF6</b>	Proteína transformadora de la tirosina quinasa 6
<b>UAF</b>	Unidades arbitrarias de fluorescencia
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión celular vascular 1 (del inglés; Vascular Cell Adhesion Protein 1)
<b>VQ</b>	Vídeoqueratoscopio
<b>vs</b>	Versus
<b>uds</b>	Unidades
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrómetros
<b>Z<sub>3</sub><sup>±1</sup></b>	Aberración comática vertical y horizontal de tercer orden
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>%</b>	Tanto por ciento



# INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

ESTUDIO CLÍNICO

ESTUDIO *IN VITRO*

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES





# 1. Ectasia Corneal

## 1.1 Definición.

Las ectasias corneales se definen como un conjunto de enfermedades de la córnea caracterizadas por un adelgazamiento y un aumento progresivo de la curvatura corneal que, como consecuencia, se acompañan de protrusión.<sup>1-3</sup> Este proceso es degenerativo y crónico, generalmente bilateral, asimétrico y de curso incierto, pudiendo variar de leve a severo.

En la ectasia corneal se observa una desestructuración de las fibras de colágeno que, al dejar de aportar rigidez estructural, ocasiona el debilitamiento, adelgazamiento y protrusión patológicos del tejido. La distorsión de la curvatura corneal provoca la aparición de astigmatismos irregulares y defectos refractivos elevados, que deterioran la función visual y la calidad de vida del paciente que lo padece.<sup>4,5</sup>

Por lo general, los trastornos ectásicos corneales afectan a pacientes jóvenes; la combinación entre la afectación visual y la temprana edad de inicio, hacen que estos trastornos representen un problema significativo de salud pública.<sup>6</sup>

Clásicamente, las ectasias corneales se han considerado como condiciones clínicamente no inflamatorias pero, a pesar de que así es como se definen en la mayoría de los artículos publicados, este término quedó obsoleto tras la demostración de su correlación con la presencia de moléculas de tipo inflamatorio.<sup>7,8</sup> En la actualidad, se considera una enfermedad inflamatoria que se acompaña de apoptosis y estrés oxidativo.<sup>7,9,10</sup>

## 1.2 Clasificación.

Existen varias condiciones que se incluyen con el término de ectasia corneal. En 2015, el Consenso Global de Queratocono y Enfermedades Ectásicas<sup>11</sup> reconoció como “ectasias corneales primarias” o “ectasias corneales propiamente dichas” al queratocono (QC), la degeneración pelúcida marginal (DPM), el queratoglobo y la ectasia post-cirugía refractiva.

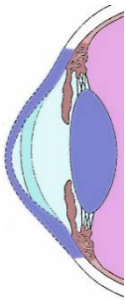
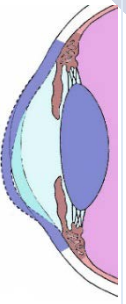

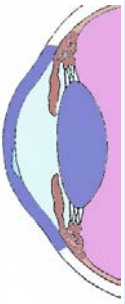
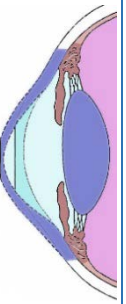
Existen otras entidades que no son puramente ectasias corneales, sino meras alteraciones en el espesor de alguna zona de la córnea. Las ectasias post-traumáticas, la degeneración marginal de Terrien, la úlcera de Mooren, la degeneración marginal en surco (*Furrow Degeneration*) y el dellen corneal; son considerados simplemente como “desórdenes de adelgazamiento”.<sup>11</sup>

Centrándonos en las ectasias corneales propiamente dichas, éstas pueden clasificarse atendiendo a diversos criterios; siendo los más utilizados: el origen de la ectasia y la localización del área de máximo adelgazamiento.<sup>12</sup>

En cuanto al origen, las ectasias corneales pueden desencadenarse de modo natural o estar relacionadas con una cirugía (ectasia iatrogénica), generalmente con fines refractivos.<sup>13,14</sup> En la cirugía refractiva corneal, la detección de formas leves de ectasia preoperatoria es esencial para evitar la ectasia progresiva postoperatoria, que también se ve condicionada por el impacto del procedimiento en la córnea. En cuanto a la localización del área de máximo adelgazamiento, su configuración puede ser axial (central o paracentral), generalizada o periférica. La **Tabla.1** muestra las principales características diferenciales de las ectasias corneales primarias.

A pesar de que estas condiciones difieren en la región de la córnea afectada, el tiempo de inicio, la tasa de progresión y que se presentan típicamente con características biomicroscópicas distintivas; algunos autores apuntan a un origen común, debido a sus similitudes histopatológicas, topográficas y paquimétricas.

Se ha propuesto que podrían realmente representar variaciones en la expresión fenotípica del mismo mecanismo patogénico. Ello explicaría la existencia de casos atípicos de QC con formas más globulares o más periféricas de lo habitual.<sup>15</sup> Se han dado casos con un tipo de degeneración en un ojo y otra diferente en el contralateral, como la aparición de queratoglobo en el ojo contralateral de pacientes con QC o DPM,

Características	QC	DPM	Queratogloblo	QC posterior	Ectasia post-cirugía refractiva
Origen	Natural	Natural	Natural	Natural	Iatrogénico
Configuración	Axial (cónica apical)	Periférica	Generalizada globular	Axial, en superficie corneal posterior	Axial
Frecuencia	Más frecuente	Menos frecuente	Raro	Menos frecuente	Infrecuente
Edad de inicio	Pubertad	20-40 años	Generalmente en el nacimiento	En el nacimiento	>6 meses tras cirugía
Adelgazamiento	Central o paracentral inferior	Banda inferior de 1-2mm de ancho	Difuso, mayor en periferia	Central o paracentral	Central o paracentral
Protrusión	Ápex coincidente con adelgazamiento	Superior a la franja de adelgazamiento	Generalizada	Excavación posterior	Generalizada
Lateralidad	Generalmente bilateral	Generalmente bilateral	Bilateral	Generalmente unilateral	Generalmente bilateral
Simetría	Asimétrico	Asimétrico	Simétrico	Asimétrico	Asimétrico
Línea férrea	Frecuente (anillo de Fleischer)	Algunas veces	Ninguna	Muy rara vez	A veces, sin patrón definido
Cicatriz	Frecuente	Solo tras hidropesía	Moderada	Infrecuente	Infrecuente
Estrías	Frecuente (de Vogt)	Infrecuente	Infrecuente	Ninguna	Infrecuente
Representación gráfica					

**Tabla.1.** Diagnóstico diferencial de las alteraciones ectásicas corneales primarias. Tabla e ilustraciones propias, (basada en referencias<sup>1-3,11-13</sup>).

o la aparición de DPM en el ojo contralateral de pacientes con QC.<sup>16</sup> También se podría explicar una posible asociación genética entre ellas, ya que se ha observado que pueden coexistir en miembros de una misma familia.

El Consenso Global de Queratocono y Enfermedades Ectásicas<sup>11</sup> afirma que el QC y la DPM son diferentes presentaciones clínicas de la misma enfermedad.

### **1.3 Queratocono vs degeneración pelúcida marginal.**

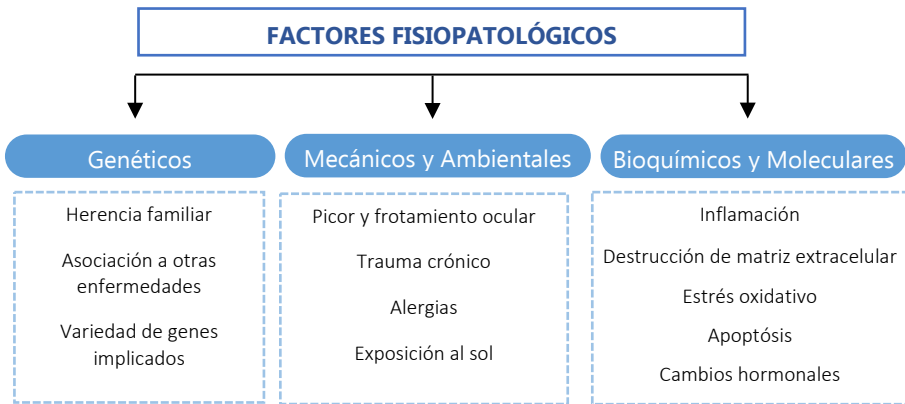
A continuación definiremos el QC y la DPM, por ser las ectasias corneales objetivo de este estudio. Globalmente, ambas son ectasias corneales primarias y naturales. El QC da lugar a un cono central o paracentral, mientras que la DPM cursa con adelgazamiento periférico inferior.

#### **1.3.1 Epidemiología.**

El QC es la ectasia más común. Su prevalencia varía según la localización geográfica y el método de estudio utilizado;<sup>17,18</sup> se estima una incidencia de 1 de cada 2000 habitantes en la población general. La DPM es una condición menos común y por tanto menos estudiada, esto hace que no existan estimaciones acerca de su prevalencia e incidencia.<sup>16</sup> La distribución por sexo es igual en el QC,<sup>2</sup> mientras que existe predominancia masculina en la DPM<sup>16,19,20</sup>. Ambas ectasias pueden aparecer en todas las razas.

#### **1.3.2 Etiología y factores fisiopatológicos.**

La etiología de estos desórdenes no está clara y parece ser multifactorial.<sup>11,21</sup> Es posible que el desarrollo de la ectasia represente el camino final común de distintos procesos patológicos.<sup>22</sup> Su fisiopatología se asocia con una gran variedad de factores genéticos, mecánicos, ambientales, bioquímicos y moleculares. **[Figura.1]** Este estudio se centrará en la fisiopatología atendiendo a la inmunidad y a la inflamación.



**Figura.1.** Factores asociados a la fisiopatología de la ectasia corneal. Esquema propio (basado en las referencias utilizadas en el apartado 1.3.2)

#### 1.3.2.1 Factores genéticos.

La herencia familiar, la asociación con determinadas enfermedades y la mayor concordancia en gemelos monocigóticos que dicigóticos evidencian la predisposición genética del QC.<sup>23-25</sup> En cuanto a la DPM, aunque el estudio de su fisiopatología es muy limitado, también se asocia a una posible herencia familiar.

##### Herencia familiar

Desde hace tiempo se reconoce la existencia de familias con varios miembros afectados de ectasia corneal. Rabinowitz<sup>2</sup> ha descrito una incidencia de ectasia corneal del 6-10% en familiares de pacientes afectados con QC. El estudio CLEK (*Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus*)<sup>26</sup> encontró una tasa de incidencia del 14%. A su vez, Kaya et al<sup>27</sup> observaron que la incidencia de ectasia en familiares de primer orden de pacientes con QC era superior a la incidencia encontrada en la población general (11% frente a 0.05%). Además, esta herencia puede darse también en la segunda o tercera generación.

Por otro lado, se observó que aquellos familiares asintomáticos que no habían desarrollado ectasia corneal, podían presentar valores topográficos anómalos, aunque sin llegar a mostrar un patrón representativo de ectasia.<sup>27-31</sup> Santo et al<sup>32</sup> observaron alteraciones topográficas corneales en familiares asintomáticos de un

paciente con DPM. Levy et al<sup>31</sup> describió que la morfología de los patrones topográficos encontrada con mayor prevalencia en los familiares clínicamente sanos de pacientes con ectasia era de J o J invertida; evidenciando una predisposición genética o de baja expresividad de ectasia corneal.

Estos hechos reflejan que todos los pacientes con ectasia deben ser informados sobre la posible base genética de su enfermedad, con el fin de que sus familiares sean examinados, especialmente si van a someterse a cirugía refractiva.<sup>27</sup>

### Asociación a otras enfermedades

Aunque ambas ectasias corneales suelen presentarse de forma aislada,<sup>2,11</sup> su presencia se ha relacionado con afecciones sistémicas y oculares. La trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down),<sup>33,34</sup> las enfermedades del tejido conectivo (síndrome de Marfan y síndrome de Ehlers-Danlos),<sup>35</sup> la amaurosis congénita de Leber,<sup>36</sup> y sobre todo la atopia; son algunas de las afecciones asociadas al QC. La DPM se ha asociado a episodios de conjuntivitis atópica, vernal o bacteriana, acné y rosácea.

### Modo de herencia

El estudio en gemelos y en familiares de pacientes con QC, evidencia que la herencia puede ser autosómica recesiva o dominante, mostrando además una penetrancia incompleta con fenotipo variable.<sup>37,38</sup>

En estos últimos años, el estudio genético del QC se centró en buscar mutaciones en genes que codificasen posibles proteínas implicadas en el desarrollo de la enfermedad; por ejemplo, genes que codificasen el colágeno, las posibles vías inflamatorias, el sistema de proteasas y sus inhibidores, el sistema de la interleuquina-1 (IL-1) y el sistema antioxidante frente al estrés oxidativo.<sup>39</sup> Hasta el momento los resultados fueron poco concluyentes y se ha comprobado que la identificación del gen responsable del QC es compleja; siendo más probable la implicación de varios genes, y que las alteraciones de estos genes formen parte de una serie de vías o cascadas que puedan converger para originar un fenotipo similar.<sup>24</sup> Por tanto, se sugiere que el QC es un rasgo involucrado por múltiples genes, con penetrancia variable, y contribuciones ambientales.<sup>24</sup>

### 1.3.2.2 Factores mecánicos y ambientales.

Los estímulos mecánicos y los factores ambientales contribuyen al cuadro fenotípico característico del QC, y probablemente también de la DPM.<sup>1,21</sup> El picor, la irritación y el frotamiento ocular constituyen algunos de estos factores.

El trauma crónico generado por el frotamiento ocular y por la adaptación incorrecta de lentes de contacto (LC), puede considerarse como un factor etiológico en el desarrollo de la ectasia.<sup>1,2,40,41</sup> El QC y la DPM se han asociado con un mayor porcentaje de frotamiento ocular (50-80%).<sup>26,42,43</sup> Se ha demostrado que este frotamiento se hace típicamente con los nudillos, que es más enérgico, vigoroso y prolongado que el de la alergia o la infección, y que contribuye al aumento de los niveles de moléculas inflamatorias.<sup>9</sup> Las razones que explican el frotamiento son variadas, apuntando fundamentalmente al picor intenso. Se especula que este frotamiento pueda ser el enlace entre las ectasias y las enfermedades sistémicas u oculares asociadas.

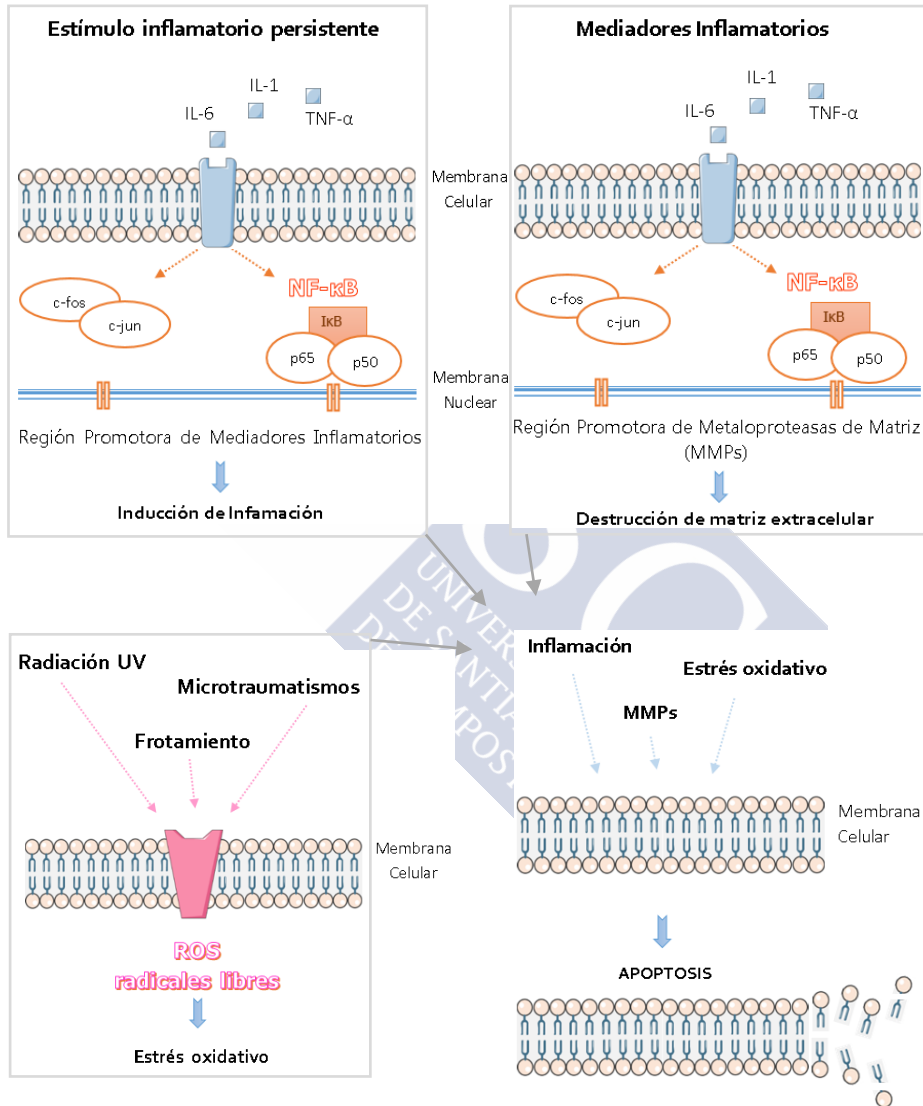
El picor, la irritación y el frotamiento ocular son características comunes entre la enfermedad atópica y la ectasia corneal. Aunque la naturaleza exacta de la asociación entre atopia y ectasia no está clara, numerosos estudios confirman que puede existir un vínculo entre ellas.<sup>26,42,44,45</sup> Se estima una prevalencia de alergia en el QC del 53%.<sup>26,46</sup> La DPM también se ha asociado a enfermedad alérgica.<sup>19</sup> La triada alergia–picor–frotamiento debe ser controlada para evitar la progresión de la ectasia corneal.<sup>44</sup>

Por otro lado, la exposición a la radiación ultravioleta (UV) también parece estar implicada en la patogénesis de la ectasia. Por su localización, la córnea está expuesta constantemente a grandes cantidades de luz UV y oxígeno atmosférico, contribuyendo a la producción de componentes citotóxicos y especies reactivas de oxígeno (ROS). Una córnea sana tendrá capacidad antioxidante endógena. El problema aparece cuando existe un desequilibrio entre la cantidad de ROS y la capacidad antioxidante corneal. Varios estudios demuestran que la córnea del QC tiene una capacidad antioxidante reducida en comparación con la córnea sana, favoreciendo así el estrés oxidativo.<sup>47,48</sup>

### 1.3.2.3 Factores bioquímicos y moleculares.

Aunque los elementos del entorno (factores mecánicos y ambientales) parecen tener una intervención más o menos decisiva, son realmente los fenómenos internos (factores bioquímicos, moleculares y genéticos) los que determinan la presencia de la ectasia corneal. Las hipótesis que se plantean a nivel bioquímico y molecular son la

inflamación, el desequilibrio entre las proteasas de matriz y sus inhibidores, el estrés oxidativo, la apoptosis y los cambios hormonales.<sup>49,50</sup> [Figura.2]



**Figura.2.** Relación entre los factores bioquímicos y moleculares implicados en la ectasia corneal. Figura propia (basada en referencias del apartado 1.3.2.3) (utilizando elementos con licencia "Creative Commons" (CC)).

### Inflamación

La hipótesis inflamatoria en el QC se ve apoyada por el aumento de mediadores de la inflamación, el aumento de receptores de moléculas que median la inflamación, y el frotamiento ocular crónico.

Diversos autores confirman el incremento de mediadores de la inflamación en la superficie ocular de pacientes con QC y con DPM.<sup>7,8,51-53</sup> Jun et al<sup>54</sup> sugieren que existe un desequilibrio complejo entre el aumento de moléculas pro-inflamatorias y la disminución de moléculas anti-inflamatorias en los ojos con QC, y que esto interrumpe la adecuada homeostasis corneal. Además, parece que el aumento de mediadores inflamatorios es directamente proporcional al grado de evolución de la enfermedad.<sup>7</sup>

Por otra parte, se ha evidenciado que los queratocitos de córneas con QC presentan una expresión de receptores de IL-1 cuatro veces superior a las córneas normales.<sup>55</sup> La IL-1 es un modulador que, entre otras funciones, promueve la apoptosis celular. Un estudio *in vitro* ha demostrado que la IL-1 induce apoptosis en queratocitos estromales obtenidos de pacientes con QC.<sup>56</sup> Así, el adelgazamiento corneal característico en la ectasia, podría ocurrir debido a un exceso de muerte apoptótica de los queratocitos estromales.<sup>57</sup>

Se ha demostrado que el microtrauma epitelial generado con el frotamiento ocular y con el uso de LC promueven una mayor liberación de IL-1 y de otros marcadores inflamatorios en pacientes con QC;<sup>9,58</sup> estableciéndose así un nexo entre los factores inflamatorios y mecánicos que explica la desestabilización corneal.

Todo esto hace pensar que los ojos con ectasia corneal tienen una capacidad de respuesta inflamatoria superior a la de los sujetos normales.<sup>58</sup>

### Destrucción de matriz extracelular

Varios estudios han investigado el papel de las enzimas catabólicas y proteolíticas, como las metaloproteasas de matriz (MMP), en la ectasia corneal. Las MMPs están involucradas en la degradación de la matriz extracelular y en la activación de la apoptosis,<sup>59</sup> y son secretadas por células epiteliales y estromales de la córnea.<sup>60</sup>

Las córneas con QC exhiben un incremento de la actividad enzimática de las MMPs,<sup>10,61,62</sup> y en muchos casos, un desequilibrio en la acción de sus inhibidores, como los TIMP (inhibidor tisular de proteasas).<sup>63,64</sup> El análisis lagrimal mostró niveles aumentados de MMPs, no solo en QC sino también en DPM.<sup>53,65</sup> Además, el

frotamiento ocular y el porte de LC favorecen la liberación de estas enzimas proteolíticas.<sup>9,58</sup> Se especula que una sobreexpresión de proteasas y una infraexpresión de sus inhibidores, favorece la actividad enzimática de las MMPs en la superficie ocular; contribuyendo a la degradación del colágeno corneal y por tanto a la reducción de la integridad estructural que ocurre en la ectasia.<sup>64,66,67</sup>

Aunque estos resultados sostienen la hipótesis de la degradación de la matriz extracelular como posible mecanismo etiopatogénico de la ectasia corneal; la ausencia de sobreexpresión de MMPs en la ectasia post-cirugía refractiva, sugiere que también deben estar implicados otros mecanismos fisiopatológicos.<sup>68</sup>

### Estrés oxidativo

Las córneas de QC tienen una capacidad antioxidante reducida, ya que muestran niveles disminuidos de enzimas como la superóxido dismutasa o la aldehído deshidrogenasa.<sup>48,69</sup> Ambas juegan un papel importante en los procesos reactivos de oxígeno de diferentes especies. La acumulación de ROS no neutralizados provoca la deposición citotóxica de diferentes metabolitos como el óxido nítrico y el peroxinitrito, que dañan los tejidos corneales al destruir membranas, aumentar la producción de MMPs y disminuir los TIMP.<sup>49,70,71</sup> La radiación UV contribuye a que la córnea sea más susceptible a condiciones de estrés oxidativo.<sup>49,70</sup>

Un estudio realizado en un cultivo de fibroblastos pertenecientes a córneas con QC, ha podido demostrar que responden de manera exagerada ante el estrés oxidativo, manifestando disfunción mitocondrial y daño del ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial.<sup>72</sup> Todo ello indica la importancia que este factor puede tener en el desarrollo y progresión de la enfermedad.<sup>47</sup>

### Apoptosis

La apoptosis consiste en una muerte celular programada y lenta, que no provoca inflamación en las células circundantes. Las moléculas inflamatorias, las proteasas y los radicales libres generados por estrés oxidativo tienen el potencial de inducir la apoptosis, siendo ésta la principal forma de muerte celular en las córneas con QC.<sup>56</sup>

La apoptosis parece ser el motivo por el que el número de células epiteliales y estromales se encuentra reducido en la ectasia corneal, evidenciándose con adelgazamiento del tejido.<sup>56</sup> Estos datos fueron confirmados mediante el estudio de córneas de QC por microscopía confocal, encontrando una menor densidad de queratocitos proporcional al grado evolutivo de la enfermedad.<sup>73</sup>

## Cambios hormonales

El hecho de que el QC se desarrolle en la pubertad ha llevado a pensar que ciertos factores hormonales pueden estimular el proceso. Los frecuentes cambios producidos durante el embarazo y la menopausia apoyan la influencia hormonal.<sup>11,74</sup>

En consecuencia, los factores bioquímicos y moleculares pueden desempeñar un papel importante en la fisiopatología de la ectasia corneal aunque todavía no está claro el orden que sigue cada uno de estos eventos en la cascada de sucesos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Probablemente la teoría fisiopatológica de la degradación lenta pero sostenida del tejido corneal asociada a inflamación crónica de baja intensidad, que veremos más adelante, explique esta asociación poco clara.

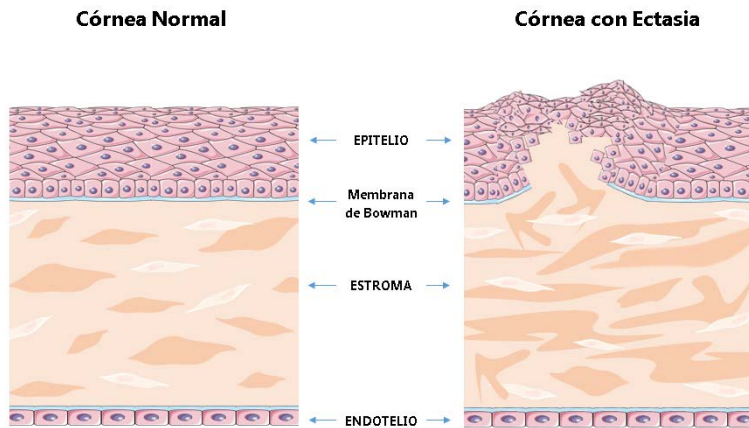
### 1.3.3 Cambios histológicos.

El adelgazamiento producido en la ectasia es el resultado de la pérdida o alteración de los componentes que conforman la estructura corneal. La córnea es un tejido complejo comprendido por 6 capas que, de anterior a posterior, son: epitelio, membrana de Bowman, estroma, capa Dua<sup>75</sup>, membrana de Descemet y endotelio.

La patología del QC, al menos inicialmente, se localiza en el área corneal anterior comprometiendo principalmente al epitelio, a su membrana basal y al estroma anterior.<sup>76,77</sup> Con el QC cambia la morfología de las células epiteliales,<sup>78</sup> hay deposición de partículas de hierro en la membrana basal epitelial,<sup>76</sup> se producen roturas en la membrana de Bowman<sup>2,77</sup> y adelgazamiento estromal correlacionado con pérdida de láminas de colágeno, alteración en la orientación de las fibras de colágeno y disminución de la densidad de los queratocitos<sup>79</sup>. En la membrana de Descemet pueden encontrarse pliegues (estrías) que desaparecen al aplicar presión y, se han visto además, casos de ruptura tras hidrops. El endotelio es la única capa que no suele estar afectada, aunque a veces aparece polimegatismo y pleomorfismo en las células endoteliales.

Histológicamente, la DPM presenta un epitelio normal o irregular y, al igual que ocurre en el QC, pueden depositarse partículas de hierro en la membrana basal epitelial. La membrana de Bowman puede encontrarse intacta, con roturas o con pérdidas de discontinuidad. Con respecto al estroma, se observa un adelgazamiento periférico a la zona de la protrusión<sup>80</sup> y la microscopía electrónica ha mostrado la existencia de áreas de fibras de colágeno altamente espaciadas<sup>81</sup>. La membrana de

Descemet no suele estar afectada en estadios iniciales, pero a medida que aumenta la protrusión pueden aparecer pliegues concéntricos al limbo inferior. En casos aislados se ha detectado rotura en la membrana de Descemet.<sup>20</sup> El endotelio parece ser la única capa que se mantiene normal.



**Figura.3.** Cambios estructurales comunes en ambos tipos de ectasia corneal, incluyendo: adelgazamiento epitelial, rotura de la membrana de Bowman y alteración en las fibras de colágeno estromales. Ilustración propia (basada en referencias del apartado 1.3.3) (CC).

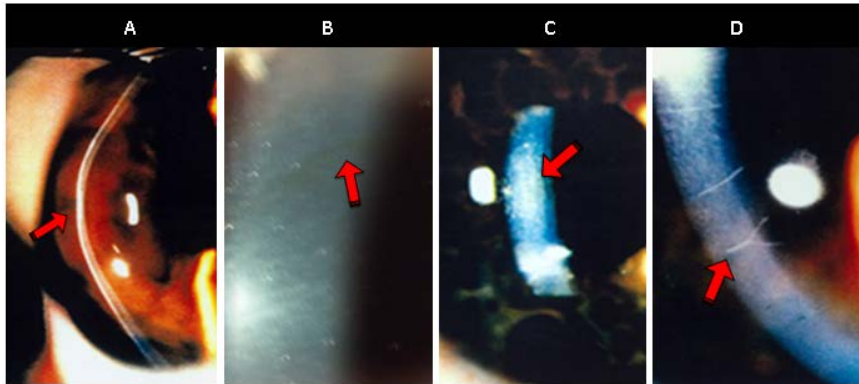
### 1.3.4 Semiología.

Los síntomas y signos varían dependiendo de la gravedad de la ectasia. En estadios iniciales la visión puede no estar afectada; sin embargo, a medida que avanza la enfermedad aumenta el componente esférico de la refracción y el astigmatismo irregular que, junto con el aumento de aberraciones ópticas de alto orden, hacen que el principal síntoma sea el deterioro progresivo de la calidad visual.<sup>82</sup> Generalmente, un signo diferencial entre QC y DPM es el eje opuesto del astigmatismo, a favor de la regla en el QC y en contra la regla en la DPM. Pérdida de sensibilidad al contraste, fotofobia, deslumbramiento, diplopía monocular e irritación ocular, muchas veces asociado a picor y frotamiento ocular, también aparecen como síntomas secundarios.

Entre los signos distintivos del QC se encuentran:<sup>1,2</sup> protrusión cónica, anillo de Fleischer, estrías de Vogt, nervios corneales prominentes y vascularización. **[Figura.4]** Solo en estadios finales la córnea pierde su transparencia y pueden aparecer

leucomas o cicatrices secundarias a hidrops. En estadios avanzados están presentes el signo de Munson y el fenómeno de Rizzuti.

El signo característico de la DPM es el adelgazamiento y la protrusión inferior. Puede aparecer una línea férrea y algunas estrías, desarrollarse hidropesía aguda, y producir cicatrización y vascularización.<sup>1,16,83</sup>



**Figura.4.** Hallazgos característicos del QC: A) adelgazamiento y protrusión axial, B) anillo de Fleischer, C) estrías de Vogt, D) nervios corneales prominentes. (Imágenes cedidas por el Dr. Elío Díez-Feijoo Arias, realizadas mediante lámpara de hendidura (LH)).

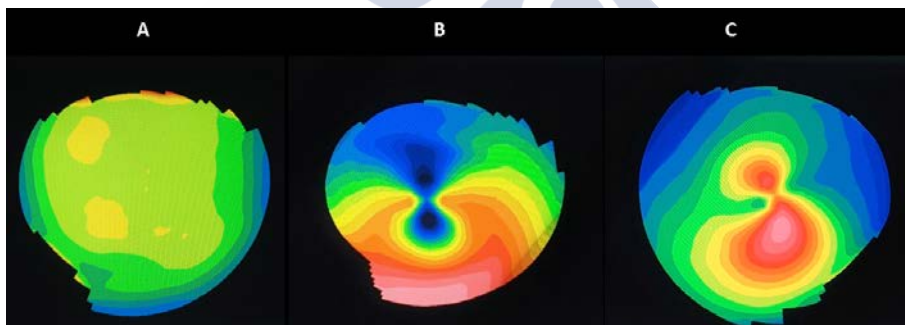
### 1.3.5 Pruebas diagnósticas.

Actualmente existen múltiples criterios diagnósticos para identificar la ectasia corneal. La presencia de signos clínicos característicos y/o la alteración en la curvatura, en la calidad óptica, en la elevación y en el espesor corneal contribuyen al diagnóstico. Cada uno podría considerarse como un dato de alarma, siendo la probabilidad de estar ante una ectasia corneal proporcional al número de alarmas presentes.

La topografía y la tomografía son dos métodos muy sensibles para la detección de la enfermedad y para el seguimiento de su progresión. El examen topográfico permite evaluar la curvatura corneal anterior y las aberraciones ópticas que ésta proporciona; mientras que el examen tomográfico analiza la elevación corneal anterior y posterior así como la paquimetría corneal.<sup>11</sup>

A nivel topográfico, la asimetría ínfero-superior (I-S) y la potencia dióptrica aumentada de manera localizada actúan como alarmas para el diagnóstico. En casos muy avanzados de DPM, se pueden encontrar diferencias de hasta 20 dioptrías (D) entre la zona central y la zona periférica afectada.<sup>84</sup>

El patrón topográfico más habitual en la DPM es el patrón en “pinza de cangrejo” (78%), también descrito como croissant, alas de mariposa o C tumbada; seguido del patrón de incurvamiento inferior (18%).<sup>85</sup> El QC se suele caracterizar por un patrón oval, redondo o en pajarita asimétrica; aunque el patrón en pinza de cangrejo no es exclusivo de la DPM, y puede aparecer en algunos casos de QC periférico.<sup>2,15,85-87</sup> Una de las claves para distinguir correctamente entre la DPM y el QC la proporciona la topografía de elevación, donde el punto más adelgazado y el punto de mayor curvatura coinciden en el QC, no siendo así en la DPM.<sup>85</sup> Otra clave sería la edad de inicio de la enfermedad, más temprana en el QC que en la DPM.<sup>16</sup> La **Figura.5** muestra el patrón topográfico en pinza de cangrejo característico de la DPM y el patrón topográfico en pajarita asimétrica característico del QC.



**Figura.5.** Patrones topográficos (los colores cálidos representan áreas de mayor curvatura, mientras que los colores fríos representan áreas más planas): A) normal, B) pinza de cangrejo, C) pajarita asimétrica. (Imágenes propias, realizadas con el topógrafo CA-100 de TOPCON).

Lee et al<sup>15</sup> mostraron que el radio de elevación máxima anterior y posterior en pacientes con DPM era significativamente mayor que en pacientes con QC. Lo mismo sucede con el radio de paquimetría mínima.<sup>88</sup> Esto confirma que la protrusión se localiza más periféricamente en DPM que en QC.

El estudio de la aberrometría corneal anterior ha ido adquiriendo importancia en la patología ectásica, siendo aplicado para la detección y gradación del QC. El QC muestra niveles de coma primario vertical y coma-like más elevados que los niveles

existentes en córneas sanas.<sup>89</sup> QC y DPM, producen un aumento notable del coma de alto orden;<sup>90</sup> pero generalmente presentan un signo opuesto en la aberración esférica, siendo positivo en la DPM y negativo en el QC.<sup>91</sup> Esta diferencia posiblemente se deba a la posición del ápex corneal en relación con la pupila de entrada.

Los valores paquimétricos muestran que el espesor corneal central suele estar reducido en los pacientes con QC frente a los sujetos sanos, mientras que en los pacientes con DPM suele estar dentro de la normalidad. En ambos tipos de ectasia, el patrón de isla central es el más común en los mapas de elevación anterior y posterior.<sup>85</sup> Belin et al<sup>3</sup> proponen que los estudios asociados con DPM deberían analizar el mapa paquimétrico completo cubriendo los 12 mm centrales de la córnea.

El análisis de los parámetros biomecánicos corneales también parece resultar útil en el diagnóstico, ya que permiten detectar la debilidad estructural previa a las alteraciones topográficas.<sup>92,93</sup> En comparación con la población normal, la patología ectásica muestra valores biomecánicos reducidos.<sup>94</sup> Dicha reducción está además relacionada con las alteraciones aberrométricas corneales.<sup>95</sup>

Para el diagnóstico de las ectasias, además de las pruebas mencionadas, la historia clínica debe incluir: edad del paciente, antecedentes personales y familiares, evaluación refractiva y evaluación de la progresión de la enfermedad. Los análisis repetidos permitirán evaluar la progresión y, por tanto, distinguir de una manera fiable entre lo patológico y lo normal.<sup>26</sup> Los pacientes con QC, cuya edad de inicio es temprana, se asocian con una progresión más rápida en comparación con la DPM, que tiene un curso de progresión más lento.<sup>96</sup>

El diagnóstico precoz adquiere especial importancia ante la realización de una cirugía refractiva; donde, la detección de una posible ectasia preoperatoria es esencial para evitar la ectasia progresiva postoperatoria.<sup>14,97</sup> En candidatos jóvenes, la detección preoperatoria de una posible DPM puede ser difícil debido a la tardía edad de inicio que suele presentar la enfermedad.

### 1.3.6 Tratamiento.

En la actualidad los tratamientos solo tienen como finalidad la compensación óptica de la irregularidad corneal, la eliminación y sustitución del área afectada por tejido sano, o el refuerzo estructural.<sup>98-100</sup>

En estadios leves, los pacientes pueden utilizar gafas o LC blandas.<sup>101-103</sup> A medida que la patología progresa, la corrección visual suele realizarse con LC rígidas permeables al gas (RPG), híbridas o esclerales; que proporcionan una superficie óptica nueva y regular.<sup>104-106</sup> Si la adaptación es correcta, el uso de LC no reducirá ni empeorará la progresión de la ectasia corneal.<sup>1,11,107</sup>

La refracción y la corrección óptica deben intentarse en todos los pacientes con ectasia.<sup>108</sup> En muchos casos, en estados moderados o avanzados de DPM, a pesar de ser evidente su astigmatismo corneal, se conserva una zona central uniforme que puede proporcionar una pequeña corrección refractiva con gafa;<sup>19,102</sup> esto no ocurre en el QC. La adaptación de LC RPG en DPM puede ser más compleja que en QC por los descentramientos que ocasiona el astigmatismo contra la regla; la utilización de lentes con diámetros grandes mejora la estabilidad sobre la córnea.<sup>109,110</sup>

Cuando la corrección en gafa es insuficiente, el uso continuado de LC es intolerable y la agudeza visual ha disminuido a niveles inaceptables, existen varios procedimientos quirúrgicos a los que optar.<sup>102,111,112</sup> Por un lado, la inserción de segmentos o anillos intraestromales regulariza la forma de la córnea y centran el ápex corneal, permitiendo en algunos casos mejorar la adaptación de LC o mejorar la agudeza visual (AV); aunque rara vez la ganancia visual excede una o dos líneas en la enfermedad avanzada.<sup>113-115</sup> Por otro lado, el trasplante corneal es un tratamiento destinado a estadios más avanzados, irreversible y que requiere un largo período de rehabilitación.<sup>116</sup> Generalmente, los pacientes con DPM son malos candidatos para el trasplante por situarse el adelgazamiento de la córnea cercano al limbo. Los resultados visuales posteriores al trasplante son impredecibles, y es frecuente encontrarse complicaciones como rechazo corneal, neovascularización y astigmatismo residual.

Otra modalidad quirúrgica es el crosslinking corneal. Este tratamiento, destinado a estadios leves-moderados, busca prevenir o detener la progresión de la enfermedad favoreciendo la rigidez de las fibras de colágeno estromales que mantienen la estructura corneal. Se ha confirmado que se trata de un método seguro y efectivo,<sup>117</sup> por ello se recomienda su utilización en niños y adolescentes diagnosticados con ectasia progresiva.<sup>118</sup> Esta técnica intenta contribuir a que el trasplante corneal se posponga o se evite por completo.

Finalmente, el Consenso Global de Queratocono y Enfermedades Ectásicas<sup>11</sup> recuerda la importancia de guiar al paciente para evitar el frotamiento ocular continuado; y recomienda usar medicación antialérgica tópica y lubricantes tópicos en pacientes con alergia, para así disminuir el impulso de frotarse.

## 2. Implicación de la superficie ocular en la ectasia corneal

La superficie ocular de los pacientes con ectasia corneal muestra numerosos cambios que generalmente guardan relación con la progresión de la enfermedad. Se han observado alternaciones en la película lagrimal y anomalías estructurales, metabólicas y funcionales, no solo de la córnea, sino también del tejido conjuntival.

La película lagrimal es esencial para mantener la homeostasis ocular.<sup>119</sup> El fluido lagrimal es secretado por las glándulas lagrimales y está formado por una capa interna de mucina, una capa media acuosa y una capa externa lipídica; por tanto está compuesta de lípidos, proteínas, péptidos, proteasas, inhibidores de proteasas y metabolitos.<sup>120</sup> La lágrima lubrica y protege la superficie ocular, además, nutre el epitelio corneal y el estroma anterior suministrando nutrientes y productos metabólicos. La composición del film lagrimal puede verse modificada ante diferentes condiciones oculares,<sup>121</sup> por ello el análisis de sus marcadores moleculares constituye una fuente de información con importante valor diagnóstico.<sup>122</sup>

El 70% de los pacientes con QC parecen mostrar valores de BUT (del inglés "BreakUp Time") más reducidos que los sujetos normales, además, esta reducción parece ser mayor en QC moderado y avanzado.<sup>123</sup> Este estudio evidencia, a su vez, que independientemente del grado de afectación de la enfermedad, los ojos con QC tienen valores normales en el Test de Schirmer. Todo ello sugiere que, a pesar de no existir correlación directa entre ojo seco y ectasia, el aumento de la curvatura corneal, los cambios en las células epiteliales conjuntivales, y la posible alteración de la secreción de mucina por el epitelio corneal enfermo, contribuyen a la inestabilidad en la película lagrimal. Además, la liberación de productos de degradación de colágeno y de mediadores inflamatorios también puede afectar negativamente a la estabilidad de la película lagrimal en los pacientes con ectasia corneal.<sup>124</sup>

La córnea es la porción anterior del ojo que cubre el iris, la pupila y la cámara anterior. Se trata de una estructura avascular y no linfática con una inervación muy densa. Es además un medio transparente. Forma la capa externa del ojo junto con la esclera, con la que se continúa. La transición entre ambas se denomina limbo

esclerocorneal, un área muy vascularizada de gran actividad celular. La cara anterior corneal está en contacto con el medio ambiente y con los párpados, y bañada por la película lagrimal. Su cara posterior está en contacto con el humor acuoso.

Como se ha mencionado, el estudio histopatológico de la ectasia confirma que se trata de una enfermedad corneal anterior que, en casos leves a moderados, deja las porciones posteriores aparentemente ilesas.<sup>125</sup> En 1963, Teng et al<sup>126</sup> postularon que la liberación de enzimas tras la muerte de las células epiteliales basales podía promover la fragmentación de la membrana basal del epitelio corneal, las rupturas en la membrana de Bowman, la afectación de las fibras de colágeno y de los queratocitos estromales, y la alteración de las fibras nerviosas. Es decir, que el QC tendría una etiología epitelial, por tratarse de una enfermedad que se inicia en las capas ectodérmicas corneales y que posteriormente afecta a los tejidos de origen mesodérmico como el estroma.<sup>126</sup> Los estudios con microscopía electrónica de barrido, en córneas con QC, muestran que a medida que progresa la enfermedad se desprenden un mayor número de células epiteliales sin ser reemplazadas, causando agujeros y depresiones en la superficie epitelial corneal.<sup>127,128</sup> Estos estudios concluyen que existe un proceso de envejecimiento acelerado en la superficie epitelial corneal del QC.<sup>127,128</sup> A pesar de la clara evidencia de un comportamiento epitelial anómalo, la variación de su espesor puede, hasta cierto punto, ser el resultado de una adaptación a la relación patológica con el tejido subyacente; volviéndose irregular y menos organizado en ausencia de la membrana basal anterior. Por todo ello, la mayoría de estudios confirman que el epitelio es un participante involucrado en el proceso de la ectasia corneal, aunque no evidencian si esta capa constituye el origen de la enfermedad o si es un respondedor pasivo.<sup>125</sup> Tuori et al<sup>129</sup> argumentan que el adelgazamiento del estroma y la pérdida de queratocitos en el QC pueden preceder a los cambios epiteliales.

Lo que sí es evidente es que la función del epitelio como barrera se ve comprometida en la ectasia corneal. Además, las interacciones entre los distintos tipos celulares presentes a nivel corneal pueden estar mediadas por citoquinas, factores de crecimiento y quimiocinas.<sup>130</sup> Por tanto, los procesos inflamatorios observados en la ectasia pueden contribuir a la alteración de la homeostasis y de la barrera epitelial.<sup>131</sup> Probablemente, el tratamiento de la ectasia corneal podría dirigirse hacia el epitelio corneal y conjuntival.

En la conjuntiva de pacientes con ectasia corneal se puede observar metaplasia escamosa y pérdida de células caliciformes, así como un aumento de los niveles de enzimas lisosomales intraepiteliales.<sup>67</sup> Ziangirova et al<sup>132</sup> confirmaron la presencia de inflamación inmune en el tejido conjuntival de pacientes con QC. Todos estos hechos evidencian que la afectación ectásica implica a toda la superficie ocular.

## 3. Inflamación e inmunidad en la fisiopatología de la ectasia corneal

### 3.1 Inflamación.

Normalmente, a nivel tisular, la inflamación se refiere a dilatación vascular, alteraciones en la permeabilidad capilar con mayor exudación de líquido, y acumulación de glóbulos blancos y proteínas inflamatorias. Sin embargo, la posibilidad de aplicar este criterio en la ectasia corneal se ve limitado por la naturaleza avascular de la córnea; por ello, los signos clásicos de inflamación no suelen ser clínicamente aparentes en la ectasia corneal. Al igual que el QC, la osteoartritis rompe las reglas clásicas para la definición de inflamación debido a la arquitectura avascular, aneural y alinfática del cartílago.<sup>133</sup> Actualmente, la inflamación se considera un proceso caracterizado por la liberación y la activación de mediadores moleculares que promueven la lesión tisular.

En la actualidad, la inflamación se considera uno de los principales componentes de la fisiopatología del QC.<sup>134,135</sup> Un número creciente de artículos indican que los impulsores moleculares de la ectasia corneal pueden ser factores dependientes de la inflamación que causen la degradación de la matriz.<sup>7,8,54,58,65</sup> Además, la inflamación observada en la ectasia corneal es similar a la inflamación crónica, y no a la inflamación aguda.<sup>136</sup>

#### 3.1.1 Definición.

La inflamación constituye un mecanismo de defensa, reparación y preludio a la recuperación funcional, puesta en marcha por el organismo cuando existe una alteración importante en la homeostasis de un tejido. Habitualmente se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio y tiene lugar principalmente en tejidos conectivos vascularizados. La respuesta inflamatoria (RI), tiene como finalidad inmediata detener la agresión y, posteriormente, reparar sus consecuencias.

Se trata de un fenómeno básicamente local, pudiendo ser secundario a una respuesta inmune.<sup>137</sup>

Las causas que pueden dar lugar a una RI son variadas. Entre los principales desencadenantes de la inflamación se puede citar la agresión física (traumatismos oculares contusos y penetrantes, intervenciones quirúrgicas intra y extraoculares, roce sistemático provocado por una LC, radiaciones, cambios bruscos de temperatura), la actividad química (causticaciones, reacciones químicas), la actividad de microorganismos (virus, bacterias, hongos) y la agresión inmunológica (detección y respuesta frente a los diferentes tipos de antígenos). El organismo provoca una cascada inespecífica de procesos fisiológicos en los que participan elementos del sistema inmunitario innato, con el fin de reparar el daño celular y de restablecer la función normal del tejido.<sup>138</sup>

La respuesta sistémica a la lesión tisular ha sido denominada reacción aguda. La inflamación aguda es un proceso a corto plazo y está integrada por los siguientes componentes: rubor (enrojecimiento causado por el aumento del flujo sanguíneo secundario a la dilatación de pequeños vasos sanguíneos), calor (producido por el metabolismo de los leucocitos y macrófagos que acuden al lugar de la lesión y por el aumento del flujo sanguíneo), tumor (hinchazón debido al edema que se produce al acumularse el líquido que sale de los vasos), dolor (producido por los nervios irritados), y consecuentemente, pérdida de función (debido a la falta de homeostasis y al gasto energético de los procesos de reparación que tienen lugar en el tejido).<sup>137</sup> Las inflamaciones agudas suelen ser muy floridas semiológicamente, mientras que las crónicas tienden a presentar cuadros indolentes.

La inflamación crónica es, principalmente, la incapacidad de resolver la inflamación aguda. Se produce cuando ni el agente ni el huésped son lo suficientemente potentes para superar al otro. Puede durar semanas, meses o años y causa lesiones crónicas formadas por tejido conectivo laxo, fibroblastos infiltrados y células inflamatorias.

Aunque la asociación entre la inflamación y el daño tisular se conocía desde hace tiempo, la primera se consideraba principalmente el resultado del daño más que una causa de éste. Esta cadena de acontecimientos puede producirse inicialmente en un nivel bajo y asintomático, lo que hace suponer que la inflamación crónica subaguda podría ser la causa de diversas patologías.<sup>139</sup> La inflamación puede considerarse como la expresión de un conjunto de procesos celulares y moleculares complejos, que conducen a la defensa de los tejidos lesionados por un agente causal cualquiera que fuere su naturaleza.

### 3.1.2 Mediadores inflamatorios en la ectasia corneal.

La inflamación en la ectasia corneal se caracteriza por la acumulación de células y mediadores inflamatorios en la superficie ocular. Los mediadores inflamatorios son moléculas solubles que actúan localmente en el lugar de la lesión y regulan la RI. Pueden ser exógenos, producidos fuera del organismo, o endógenos, producidos dentro del organismo por las células lesionadas o activadas en la zona de inflamación. Además, pueden ser de naturaleza muy diversa: enzimas, radicales libres, citoquinas, moléculas de adhesión celular, MMPs... En algunos casos, la sobreexpresión de determinados mediadores inflamatorios puede contribuir a que fracase la función de defensa y, en vez de limitar su acción a los efectos beneficiosos, repercute negativamente en el tejido.

Lema et al<sup>52</sup> y Balasubramanian et al<sup>140</sup> demostraron que los pacientes con QC tenían una menor concentración lagrimal de lactoferrina (Lf) que los sujetos control. La Lf es una proteína antiinflamatoria y antimicrobiana que juega un papel importante en la respuesta inmune del huésped y en la homeostasis ocular. Su reducción en el QC se correlaciona además con el grado de progresión de la enfermedad.<sup>140</sup> Esta reducción significativa podría contribuir al aumento de los marcadores proinflamatorios lagrimales en estos pacientes.<sup>7</sup>

Además, Acera et al<sup>141</sup> encontraron que el nivel de albúmina sérica en lágrima era tres veces mayor en ojos con QC que en ojos control. La presencia de albúmina sérica lagrimal indica un fallo en la acción de los vasos sanguíneos conjuntivales como barrera ocular, sugiriendo la presencia de inflamación conjuntival.<sup>141</sup> También observaron una reducción significativa de los niveles lagrimales de lipofilina A y B.<sup>141</sup> Las lipofilinas son proteínas con propiedades antiinflamatorias y, su reducción en lágrima, sugiere que los procesos inflamatorios están más activos en la superficie ocular del QC que en la superficie ocular de un ojo sano.<sup>141</sup>

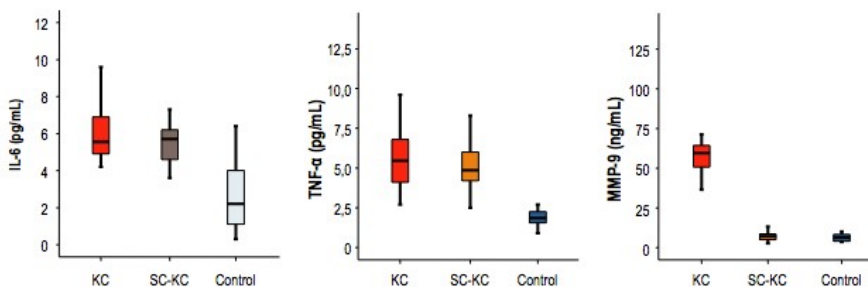
Los estudios bioquímicos indican que el adelgazamiento y la protrusión encontrados en la ectasia corneal pueden deberse a procesos de degradación de macromoléculas corneales.<sup>123</sup> El incremento en lágrima de IL-17 (interleuquina 17) que se observa en QC, sugiere que los procesos degenerativos tisulares contribuyen al debilitamiento del tejido conectivo corneal.<sup>54</sup> Balasubramanian et al<sup>142</sup> observaron un aumento lagrimal significativo de catepsina B en pacientes con QC, una proteasa lisosómica capaz de degradar las proteínas de la matriz extracelular. La degradación tisular implica la expresión de mediadores inflamatorios.<sup>143</sup> Al compararlos con sujetos normales, los pacientes con QC muestran mayores niveles de MMP9 en

lágrima.<sup>7</sup> Las MMPs también son enzimas responsables de la degradación de proteínas de matriz extracelular y se secretan en respuesta a citoquinas y factores de crecimiento. A esto se suma una reducción de inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) en el QC. Se sabe que la MMP9 reduce las funciones de la barrera corneal epitelial,<sup>144</sup> proporcionando una estimulación inflamatoria crónica de bajo grado y promoviendo un medio inflamatorio sostenido.

Se ha evidenciado que los queratocitos de las córneas queratocónicas tenían cuatro veces más sitios de unión para la IL-1 que las córneas normales. La IL-1 liberada desde las células epiteliales puede difundir hasta el estroma superficial.<sup>145</sup> Esta interleuquina induce la apoptosis de los queratocitos estromales *in vitro*.<sup>57</sup> La apoptosis ha sido demostrada en los queratocitos y en las células epiteliales de las córneas con QC, pero no en controles normales.<sup>56</sup> Esta pérdida se traduce en la aparición de erosiones corneales epiteliales y subepiteliales en pacientes con QC.<sup>146</sup>

Varios estudios de nuestro grupo demostraron la sobreexpresión de citoquinas inflamatorias a nivel lagrimal.<sup>7,8,52,58</sup> En 2009, Lema et al<sup>8</sup> demostraron la posible patogénesis inflamatoria del QC, al observar un aumento en el nivel de IL-6 (interleuquina 6) y TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) en ojos subclínicos y queratoconos, mientras que la MMP9 se detectó solo en lágrima de pacientes con enfermedad manifiesta. [Figura.6] El TNF $\alpha$  es una proteína transmembrana producida en respuesta a productos bacterianos, IL-1 o IL-6; y se considera un mediador importante de la inflamación sistémica y local.

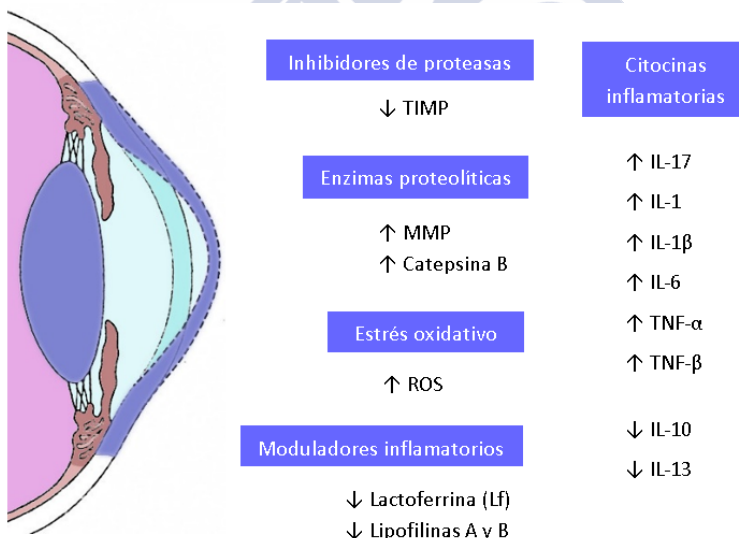
### RESPUESTA LACRIMAL



**Figura.6.** Niveles lagrimales de IL-6, TNF $\alpha$  y MMP9 en ojos con QC (KC), QC subclínico (SC-KC) y control. (Figura cedida por la Dra Isabel Lema Gesto del estudio con referencia<sup>8</sup>).

Sorkhabi et al <sup>147</sup> demostraron el aumento de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$  e interferón) y la reducción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10 (interleuquina 10)) en lágrima de pacientes con QC. Balasubramanian et al<sup>65</sup> también evidenciaron que los pacientes con QC tenían niveles de citoquinas (IL-6, TNF $\alpha$  y TNF $\beta$ ), de actividad proteolítica (colagenasas) y de sobreexpresión de MMPs significativamente superiores a los ojos normales. Jun et al<sup>54</sup> confirmaron el aumento de los niveles lagrimales de IL-6 y sugieren que el desequilibrio en la expresión de citoquinas es el responsable de alterar la homeostasis corneal en el QC. Actualmente no está claro si estas alteraciones en las concentraciones de citoquinas son la causa de la enfermedad o un efecto de ella.<sup>148</sup>

Algunos estudios reflejaron además la correlación entre los mediadores inflamatorios en lágrima y el grado de progresión de la ectasia corneal. Kolozsvári et al<sup>149</sup> revelaron una asociación positiva significativa entre IL-6 y el valor de máxima curvatura corneal, así como una relación negativa entre IL-13 (interleuquina 13) y la gravedad de la enfermedad. Pásztor et al<sup>150</sup> observaron que los niveles de MMP9 se incrementaron significativamente en asociación con K2 (meridiano corneal más curvo) del Pentacam.



**Figura.7.** Mediadores inflamatorios implicados en la ectasia corneal. Esquema propio (basado en referencias del apartado 3.1.2).

A todos estos cambios, se suma la posibilidad de que cualquier comorbilidad de naturaleza inflamatoria (el frotamiento ocular, la enfermedad atópica y/o alérgica, el roce de LC...) se agregue sinérgicamente a la inflamación relacionada con la ectasia corneal y exacerbe su proceso patogénico.

Por otro lado, Nemet et al<sup>151</sup> encontraron cierta asociación entre el QC y varias condiciones inmunes. Estos hallazgos sugieren que, junto con los mediadores inflamatorios, el sistema inmune puede tener un importante papel en la patogénesis del QC. Jun et al<sup>54</sup> postulan que, en pacientes con QC, la inflamación ocular evidenciada en la superficie ocular se debe a alteraciones en la homeostasis inmune. Una mejor comprensión sobre la compleja interacción que existe entre los mediadores inflamatorios y el sistema inmune podría servir como una vía para inhibir el adelgazamiento corneal patológico del QC y de la DPM.

## **3.2 Inmunidad.**

### **3.2.1 Definición.**

El sistema inmune de mamíferos utiliza una serie de mecanismos para detectar y eliminar patógenos invasores, permitiendo discriminar entre lo “propio” y lo “no-propio”. La respuesta inmune se clasifica en inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Ambos procesos reconocen microorganismos invasores como “no-propios”, lo que desencadena la respuesta inmune primaria y la inflamatoria secundaria para eliminarlos.<sup>152</sup> La inmunidad innata representa la primera línea de defensa contra los patógenos y no requiere la exposición previa del organismo a antígenos ajenos para su activación. La inmunidad adaptativa se activa a través de señales procedentes del sistema inmune innato que inducen la proliferación de linfocitos T y B específicos para cada antígeno. La respuesta adaptativa es mucho más diversa que la respuesta innata, pudiendo reconocer un número indefinido de antígenos. A pesar de esta gran diversidad, el sistema inmune adaptativo ha sido muy estudiado, mientras que la investigación de la respuesta inmune innata está menos avanzada.

La inmunidad innata se activa inmediatamente después del reconocimiento de los patógenos microbianos. Las células inmunes innatas expresan diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRRS) (del inglés “pattern recognition

receptors”), que reconocen determinadas moléculas de los agentes patógenos. Estas moléculas constituyen un componente esencial para la supervivencia del patógeno y son conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (del inglés “pathogen associated molecular pattern”). Hasta la fecha, se han identificado varios tipos de PRRS como: los receptores Toll-like (TLRs), los receptores NOD-like (NLRs) y los receptores RIG-I-like (RLR). La función de estos PRRS es reconocer PAMPs y desencadenar la liberación de citoquinas inflamatorias e interferones para la defensa del huésped. La respuesta del sistema inmune innato es importante no sólo para eliminar los agentes patógenos, sino también para desarrollar la inmunidad adaptativa específica ante un patógeno. Los TLRs son receptores innatos que se expresan en diversas células inmunes y no inmunes de los mamíferos, y que juegan un papel importante en la respuesta inmune adaptativa humoral y celular.<sup>153</sup>

### **3.2.2 Importancia de la inmunidad en la superficie ocular.**

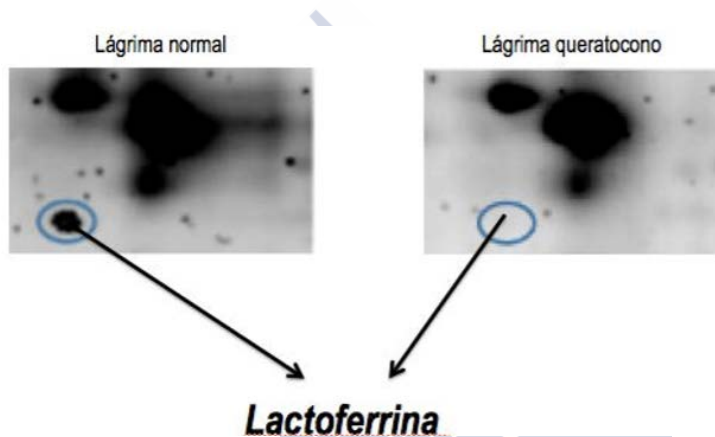
La superficie ocular está expuesta constantemente a agresiones externas (infecciosas, tóxicas y/o traumáticas). Para mantener la transparencia ocular son necesarios mecanismos de defensa mecánicos, anatómicos e inmunológicos. Los mecanismos defensivos inmunológicos en la superficie ocular incluyen la inmunidad innata y adaptativa. Se dice que el ojo es un órgano dotado de privilegio inmune en el que la inflamación, en condiciones normales, se autorregula preservando el buen funcionamiento de las partes que lo integran.<sup>154</sup> Los mecanismos que le otorgan el privilegio inmune son: las barreras anatómicas, celulares y moleculares que lo conforman, la tolerancia inmunológica asociada a la cámara anterior y el microambiente intraocular inmunosupresor.<sup>154</sup>

La glándula lagrimal es el principal efector en el sistema inmune secretor del ojo, contribuyendo a defender la superficie ocular.<sup>121</sup> Produce muchos componentes inmunológicos con actividad antibacteriana y antiinflamatoria (como citoquinas, Lf...) que juegan un papel importante en la defensa inmune específica e inespecífica. Gracias a ello, la película lagrimal desempeña un papel crítico en la defensa ocular, así como en el mantenimiento de la integridad conjuntival, la claridad corneal y la agudeza visual.<sup>121</sup>

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular que intervienen en la comunicación entre células. Desempeñan un papel esencial a nivel inmunológico, ya que pueden iniciar, amplificar o regular negativamente la respuesta inmune, así como influir en los procesos inflamatorios.<sup>155</sup> El equilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias es crucial para determinar el resultado de los

mecanismos de defensa inmunitaria. En la superficie ocular, las células corneales y conjuntivales también han demostrado producir citoquinas.

La Lf también modula las reacciones inflamatorias oculares y disminuye la formación de peróxidos inducidos por la radiación ultravioleta en las células epiteliales corneales. Además, la Lf induce vías de señalización que implican a los receptores Toll-like, regulando la expresión de genes involucrados en la producción de mediadores inflamatorios, modulando efectos antiapoptóticos.<sup>156</sup> Un estudio de nuestro grupo demostró la disminución de los niveles de Lf lagrimal en pacientes con QC.<sup>52</sup> [Figura.8]



**Figura.8.** Estudio proteómico donde se observó una disminución en lágrima de Lf en pacientes con QC. (Imagen cedida por la Dra Isabel Lema Gesto del estudio con referencia<sup>52</sup>).

La córnea contribuye al privilegio inmune debido a la ausencia de vascularización y de drenaje linfático. Las células epiteliales actúan como primera línea de defensa, en parte, mediante la activación de la inmunidad innata.<sup>157</sup> La inmunidad innata hace que el epitelio corneal intacto sea resistente a la infección a pesar de su exposición continua a microorganismos que residen, como flora bacteriana normal, en el saco conjuntival y en el borde del párpado. En muchos casos, factores que suelen ser pro-inflamatorios para otros tipos de células, no inducen una respuesta de defensa en las células epiteliales corneales.<sup>158</sup> Por ello, la inmunidad innata en este epitelio difiere de la inmunidad innata convencional, e indica una relación simbiótica entre el epitelio corneal y los microbios que habitan en la superficie ocular.

Sin embargo, una alteración en la integridad epitelial o una reacción exagerada como defensa a antígenos endógenos, pueden inducir el inicio y la perpetuación de la respuesta inflamatoria. Esto es especialmente importante en el epitelio corneal, avascular y transparente, donde la formación de tejido cicatricial como respuesta inflamatoria ante un agresor puede producir opacificación y pérdida de la visión.

### 3.3 Receptores Toll-like.

Los TLRs son proteínas transmembrana tipo I, evolutivamente muy conservados entre insectos y mamíferos. Su activación induce la expresión de genes que participan en la respuesta inflamatoria.<sup>159,160</sup> Originariamente, el receptor Toll fue identificado como una molécula esencial en la embriogénesis de la mosca *Drosophila melanogaster*.<sup>161</sup> En 1996, Lemaitre et al<sup>162</sup> observaron que las moscas que carecían de Toll eran más susceptibles a la infección fúngica, evidenciando que este receptor tenía además una función de defensa. Un año más tarde se identificó el primer homólogo humano del receptor Toll de *Drosophila*, al que se le llamó “receptor Toll-like”.<sup>160</sup>

El término alemán “toll”, fue dado por Nüsslein-Volhard al ver que las moscas que no tenían esta molécula se desarrollaban de una forma “extraña o fantástica”.<sup>163</sup>

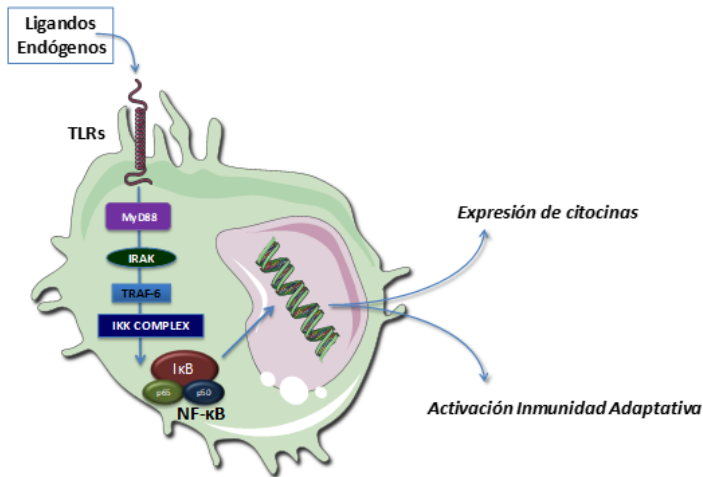
#### 3.3.1 Estructura y vías de activación.

Los TLRs están constituidos por un dominio extracelular (LRR) rico en aminoácido leucina, común a multitud de proteínas implicadas en el reconocimiento de ligandos y en la transmisión celular de señales. Poseen también un dominio intracelular, común al dominio de señalización del receptor de IL-1 en mamíferos, al que se le denominó dominio TIR (Toll/IL-1R).<sup>159</sup> Mediante la región LRR los TLRs reconocen sus ligandos y transmiten la señal intracelular a través del dominio TIR con interacciones del tipo proteína-proteína.

La vía de señalización más común está mediada por MyD88 (gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88), una proteína adaptadora que media la unión del TLR al receptor IL-1. Básicamente, la unión de los ligandos exógenos o endógenos al TLR, promueven el reclutamiento de MyD88 en su fracción intracelular. Tras ser estimulado, MyD88 interactúa con el receptor IL-1 asociado a quinasa (IRAK) (del

inglés “*IL-1R associated kinase*”) tipo 1 y 4. IRAK 1 es fosforilado por IRAK4. IRAK 1 se une a la proteína adaptadora TRAF 6 (proteína transformadora de la tirosina quinasa 6), que actúa a través de dos vías de activación. Una lleva a la activación del factor de transcripción AP-1 y la otra activa el complejo TAK1/TAB intensificando la actividad del complejo IKK. El complejo IKK, fosforila el dominio I $\kappa$ B del factor de transcripción nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) (del inglés “factor nuclear- $\kappa$ B”), promoviendo la degradación de I $\kappa$ B y la translocación de p65 del NF- $\kappa$ B hacia el núcleo. **[Figura.9]** La translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo media la expresión de genes inflamatorios como el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), así como la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6), la liberación de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), etc.<sup>164,165</sup> En definitiva, se pone en marcha la respuesta inflamatoria secundaria a la respuesta inmune innata. Curiosamente, también se sabe que NF- $\kappa$ B puede poner en marcha importantes vías de protección, especialmente antiapoptóticas.

Existe otra vía de señalización de TLRs no mediada por MyD88, denominada “vía independiente de MyD88” o “vía dependiente de TRIF”, que conduce a la activación del factor de transcripción IRF3 y NF- $\kappa$ B.<sup>164</sup>

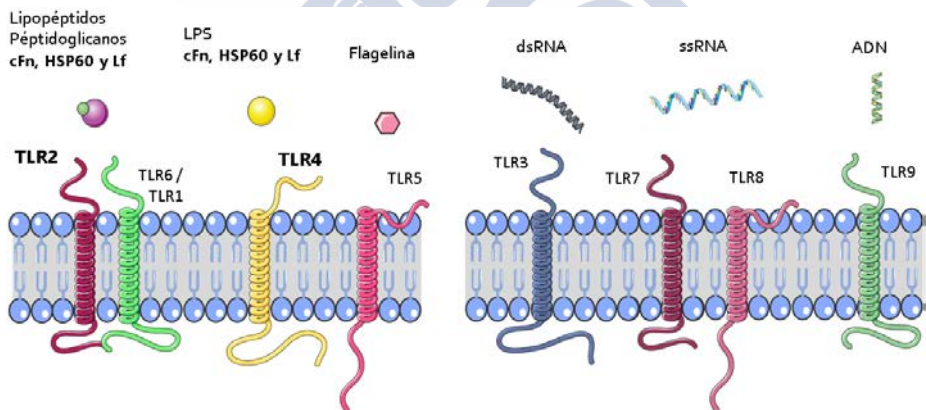


**Figura.9.** Vía de señalización de TLRs mediada por MyD88. Esquema propio (basado en referencias<sup>159,166,167</sup>)(CC).

### 3.3.2 Localización, clasificación y ligandos.

Los TLRs se expresan fundamentalmente en las células del sistema inmune: linfocitos, monocitos, neutrófilos, etc.; pero también se expresan en células epiteliales y endoteliales. En mamíferos existen al menos 11 TLRs, cada uno de los cuales parece ejercer una función específica en el reconocimiento inmune innato. A nivel celular, los TLRs se localizan en diferentes regiones; TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se expresan en la membrana celular, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se sitúan en compartimentos celulares como los endosomas.<sup>167</sup>

Como se ha descrito, los TLRs detectan la presencia de agentes exógenos (infecciosos) o endógenos (que provienen del daño celular) mediante el reconocimiento de PAMPs.<sup>168</sup> [Figura.10] Algunos ejemplos de PAMPs exógenos son el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas, el peptidoglicano o lipoproteína de bacterias Gram-positivas, la flagelina, determinadas secuencias de ADN microbiano y el ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena que producen la mayoría de los virus durante su ciclo replicativo.



**Figura.10.** Principales ligandos exógenos y endógenos de los TLRs. TLR2 combinado con TLR1 o con TLR6 reconoce lipoproteínas o péptidoglicanos, TLR4 media la respuesta al LPS, TLR5 reconoce la flagelina, TLR3 reconoce el ARN bicatenario (dsRNA), TLR7 y 8 median la respuesta al ARN monocatenario (ssRNA), y TLR9 reconoce ADN. Además, cabe destacar el papel de la fibronectina celular (cFn), la proteína de choque térmico 60 (HSP60) y de la lactoferrina (Lf) como ligandos endógenos de TLR2 y TLR4. Esquema propio (basado en referencias<sup>153,166</sup>). (CC)

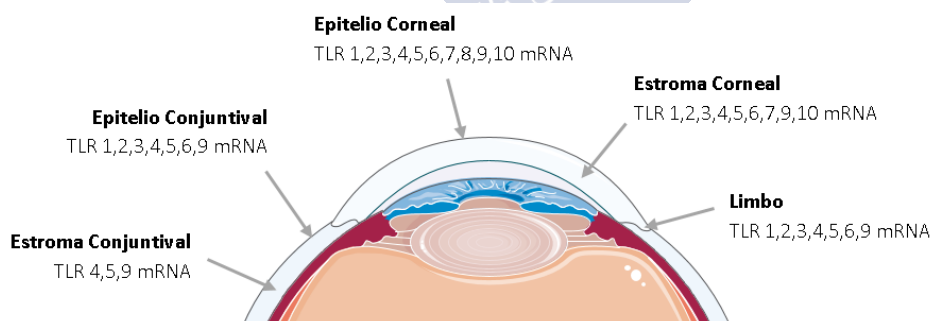
Varios estudios han demostrado que los ligandos endógenos de los TLRs pueden activar estos receptores de la misma manera que los ligandos procedentes de agentes infecciosos.<sup>169</sup> Algunos ejemplos de ligandos endógenos son la fibronectina celular (cFn), las proteínas de choque térmico (HSP), la lactoferrina (Lf), derivados de influencia hormonal, ácidos grasos insaturados, ADNs y ARNs celulares, etc. Estas proteínas se consideran “señales endógenas de peligro”, ya que son reconocidas por los TLRs tras un daño celular.<sup>170</sup> El listado publicado de ligandos endógenos de los TLRs se sigue incrementando en la actualidad.

Por tanto, los TLRs desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento extracelular de PAMPs, y contribuyen al proceso fisiopatológico de muchas enfermedades autoinmunes o que representan una respuesta fisiológica al daño tisular.<sup>168,169,171</sup>

### 3.3.3 TLRs en la superficie ocular.

El ARN mensajero (ARNm) de los TLRs, es decir, la información genética necesaria para la elaboración de las proteínas receptoras Toll-like, está presente en el epitelio corneal y conjuntival, e incluso en fibroblastos y células endoteliales.<sup>172-174</sup> **[Figura.11]**

Ueta et al<sup>157</sup> demostraron que las células epiteliales de la superficie ocular humana, reconocen y responden selectivamente a componentes microbianos e inducen inflamación mediante la vía de activación de los TLRs. Además, afirman que



**Figura.11.** Expresión de ARN mensajero (mRNA) de TLR en la superficie ocular. Esquema propio, basado en referencias <sup>172-174</sup>, sobre secciones de tejido humano y células primarias cultivadas. (CC)

la disfunción o la anomalía de la inmunidad innata pueden llevar a la inflamación de la superficie ocular.<sup>157</sup>

Mediante inmunohistoquímica en tejido humano, se demostró que las proteínas TLR2, TLR3 y TLR4 se expresaban en células epiteliales, corneales y conjuntivales, de la capa basal a la superficial.<sup>157</sup> Sin embargo, el TLR5 se expresaba solo en la capa basal, indicando una presencia espacial selectiva. A pesar de que inicialmente las capas superficiales epiteliales no expresasen TLR5, ante flagelina derivada de bacterias patógenas, las células epiteliales respondían a través de este receptor produciendo citoquinas proinflamatorias.<sup>175</sup> Por lo tanto, se especula que el TLR5 del epitelio superficial no es funcional en una superficie ocular sana, siendo activada su expresión ante una agresión determinada.

Como ya se ha mencionado, la ectasia corneal desencadena una respuesta inflamatoria en la superficie ocular. Este fenómeno podría ser dependiente de los TLRs, por ello es importante evaluar el papel de estos receptores en la ectasia corneal.

### **3.3.4 Potencial terapéutico del bloqueo de los TLRs.**

Los TLRs pueden desempeñar un papel inmunomodulador precoz, ya que, como actúan antes de la cascada de activación del sistema inmune e inflamatorio, su inhibición inducirá una reducción drástica de los niveles de citoquinas. La inhibición de los TLRs será más eficaz que la inhibición de las moléculas inflamatorias en sí mismas.<sup>176,177</sup>

En aquellas enfermedades en las cuales la inflamación exacerbada sea la causa de los procesos patológicos, se podrían administrar inhibidores o antagonistas para los TLRs o para las vías implicadas en su activación.<sup>176-178</sup> Respecto a los mecanismos de inhibición, existen varias alternativas. Una opción es utilizar anticuerpos neutralizantes, pero solo sirven contra los TLRs de la superficie celular; es decir, TLR 1, 2, 4, 5 y 6. Los antagonistas sintéticos pueden utilizarse contra cualquiera de los miembros de la familia TLR; sin embargo, es difícil predecir su eficacia y sus posibles efectos secundarios. Otra posibilidad es la inhibición de las rutas de señalización al bloquear algunas de las quinasas de la cascada de activación; lo cual permite bloquear múltiples TLRs al mismo tiempo, aumentando su eficacia pero pudiendo causar una inmunosupresión excesiva.

Por otro lado, las patologías causadas por infecciones, podrían beneficiarse del tratamiento con agonistas de los TLRs al aumentar la capacidad del sistema inmune para luchar contra la infección.<sup>176,178</sup> Un ejemplo de agonista del TLR2 sería el Pam3CSK4, un lipopéptido sintético que mimetiza el terminal de las lipoproteínas bacterianas. Además, estos agonistas podrían ser útiles como coadyuvante de vacunas.

Puesto que un estudio reciente de nuestro grupo ha demostrado la implicación, a nivel sistémico, de los TLRs en la ectasia corneal;<sup>179</sup> su modulación a través del bloqueo de los ligandos endógenos o mediante la utilización de anticuerpos neutralizantes podría suponer una diana terapéutica muy útil.

### **3.4 Modelo de ectasia corneal para investigación básica.**

Uno de los problemas que limita el estudio de la fisiopatología de la ectasia corneal es la recolección del tejido. Si bien una muestra de sangre generalmente no es difícil de recolectar, la recolección de tejido corneal completo o su fragmento se limita a los pacientes con trasplante de córnea o crosslinking. Además, no es posible obtener córnea sana de donantes vivos para análisis comparativos. Por lo tanto, los tejidos corneales control a menudo se derivan de individuos, con otros eventos corneales, que fueron remitidos para trasplante de córnea.

Un buen modelo para la investigación podrían ser las líneas celulares derivadas de diferentes partes de la córnea humana, es decir, líneas celulares epiteliales, endoteliales o fibroblastos corneales. Sin embargo, el establecimiento y cultivo de líneas celulares es difícil y a menudo falla. Además, las líneas de células corneales tienen una vida útil limitada y pueden no reflejar exactamente las propiedades de las células in vivo. Existen líneas celulares de tejido corneal humano sano, pero ningún laboratorio comercializa líneas celulares corneales de ojo con ectasia corneal.

Esto mismo ocurre para el análisis de otras enfermedades de la superficie ocular. Redfern et al<sup>180</sup> crearon un modelo de sequedad ocular cultivando células de epitelio corneal y conjuntival humano sano bajo condiciones de estrés hiperosmolar. En el caso de la ectasia corneal, debido a la complejidad y el desconocimiento que se tiene acerca de su etiología, no existe actualmente ningún modelo adecuado para la investigación básica.

Los estudios *in vitro* han sido muy útiles para demostrar el papel de múltiples moléculas como ligandos endógenos de los TLRs, para estudiar el efecto de sus vías de activación en el desencadenamiento de la inflamación, y para probar fármacos potenciales que bloqueasen dichas vías. Si la implicación tisular de los TLRs en la ectasia corneal estuviese demostrada, podrían suponer una opción para intentar reproducir la fisiopatología de la enfermedad ectásica en cultivos de células corneales humanas sanas.

Por otro lado, un modelo animal también sería una herramienta valiosa que ayudaría a comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad, verificar las hipótesis patogénicas y evaluar los posibles tratamientos. Estudios previos han intentado utilizar un modelo animal de ectasia corneal que implicaba la eliminación del exceso de estroma corneal, simulando así una ectasia corneal posquirúrgica.<sup>181</sup> Sin embargo, este modelo difiere en histopatología y estructura al QC y a la DPM, por lo tanto no constituye un modelo ideal.





INTRODUCCIÓN

**HIPÓTESIS**

OBJETIVOS

ESTUDIO CLÍNICO

ESTUDIO *IN VITRO*

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

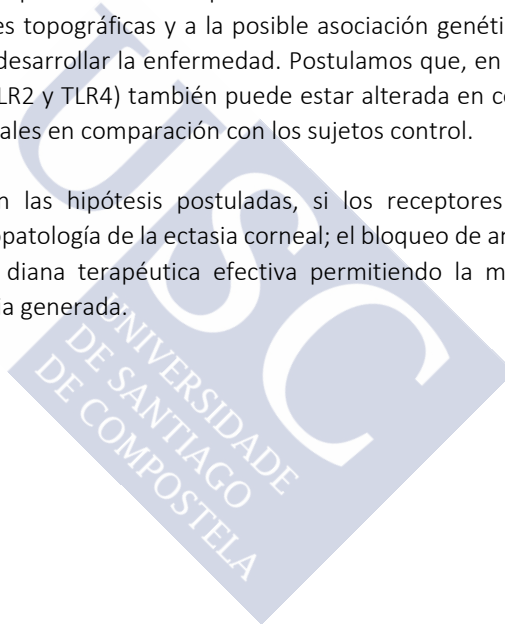




Las ectasias corneales son enfermedades que cursan con alteración de la respuesta inflamatoria (aumento de IL-6, TNF $\alpha$  y MMP9), pudiendo estar mediada por la activación de los TLRs. La hipótesis del proyecto postula que la inflamación es el mecanismo central en el desencadenamiento de los cambios estructurales que condicionan el inicio y progresión de la ectasia corneal, siendo esta inflamación inmunidad innata dependiente. Por ello, la expresión de TLRs (TLR2 y TLR4) estará exacerbada en células epiteliales de la córnea y conjuntiva de pacientes con QC y DPM, en comparación con sujetos control. Asimismo, la expresión de estos TLRs en pacientes con ectasia será mayor a medida que la enfermedad avance.

Los familiares de primer orden de pacientes con ectasia corneal, debido a las alteraciones corneales topográficas y a la posible asociación genética, tienen cierta susceptibilidad para desarrollar la enfermedad. Postulamos que, en estos sujetos, la expresión de TLRs (TLR2 y TLR4) también puede estar alterada en células epiteliales corneales y conjuntivales en comparación con los sujetos control.

De acuerdo con las hipótesis postuladas, si los receptores Toll-like 2 y 4 intervienen en la fisiopatología de la ectasia corneal; el bloqueo de ambos receptores podría suponer una diana terapéutica efectiva permitiendo la modulación de la respuesta inflamatoria generada.





INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

**OBJETIVOS**

ESTUDIO CLÍNICO

ESTUDIO *IN VITRO*

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES





El **objetivo principal** de este estudio es demostrar que los receptores Toll-Like 2 y 4 pueden constituir una diana diagnóstica, pronóstica y terapéutica en la ectasia corneal.

La capacidad diagnóstica y pronóstica, de TLR2 y TLR4, se evaluará mediante un estudio clínico en pacientes con ectasia corneal, familiares de primer orden y sujetos control. La capacidad antiinflamatoria del bloqueo de los TLRs como posible diana terapéutica se evaluará mediante un estudio *in vitro* en cultivos celulares de epitelio corneal humano.

**Objetivos específicos secuenciales:**

**Clínicos**

1. Demostrar que la expresión de TLR2 y TLR4 en células del epitelio corneal y conjuntival de pacientes con ectasia corneal es mayor que en familiares de primer orden; siendo en ambos casos mayor que en sujetos control.
2. Demostrar la relación entre la expresión de los TLRs con el grado de ectasia mediante estudios topográficos y tomográficos corneales.
3. Demostrar la correlación entre la expresión de TLR2 y 4 en células del epitelio corneal y conjuntival de pacientes con ectasia corneal y los ligandos endógenos (fibronectina celular (cFn), HSP60 y lactoferrina (Lf)) presentes en lágrima.
4. Analizar la evolución de la expresión de los TLRs tras año y medio de seguimiento.

***In Vitro***

5. Demostrar la expresión y estimulación de TLR2 y TLR4 en cultivos primarios e inmortalizados de células epiteliales humanas sanas.
6. Demostrar el bloqueo de la respuesta inflamatoria mediada por TLR2 y TLR4 con Lf y anticuerpos específicos neutralizantes de los TLRs.



INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

## **ESTUDIO CLÍNICO**

**Material, método y resultados**

ESTUDIO *IN VITRO*

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES





## Material y Método

### 4.1 Características de la muestra y diseño del estudio.

Para la realización de este estudio se contó con una muestra total de 263 ojos (138 sujetos), divididos en cuatro grupos:

- Grupo control: 72 ojos sanos pertenecientes a 36 sujetos control, pareados en edad y sexo con el resto de grupos y sin antecedentes familiares conocidos de ectasia corneal.
- Grupo de familiares de primer orden de pacientes con ectasia corneal: 53 ojos sanos de 27 sujetos con antecedentes familiares de ectasia corneal.
- Grupo de QC: 109 ojos con queratocono pertenecientes a 60 pacientes.
- Grupo de DPM: 29 ojos con degeneración pelúcida marginal; 15 pacientes.

A todos ellos se les aplicó un protocolo clínico, topográfico, aberrométrico, tomográfico y de extracción de muestra biológica común **[Anexo 1]**.

La selección de la muestra y el desarrollo de los exámenes clínicos, topográficos, aberrométricos, paquimétricos y de elevación se llevaron a cabo en la Unidad de Contactología Clínica del Instituto Gallego de Oftalmología (INGO), Hospital Provincial de Conxo del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Donde disponemos de cada historia clínica, en la que figuran el diagnóstico, la evolución y los resultados de las pruebas realizadas. La extracción, el procesado y el análisis de las muestras biológicas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas (LINC) del CHUS.

A todos los pacientes y sujetos de estudio se les proporcionó la información del proyecto por escrito y firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (Código: 2015/436) **[Anexo 2]**.

Mediante este estudio analítico, observacional, longitudinal prospectivo; se pretendió evaluar la implicación de TLR2 y TLR4 como marcadores diagnósticos y pronósticos para las ectasias corneales.

#### **4.1.1 Cronograma temporal.**

En diciembre de 2014 comenzó la selección de sujetos y pacientes. A los dos meses, se empezaron a realizar los exámenes clínicos y la extracción de muestra. Las muestras de epitelio corneal y conjuntival se analizaron tras su recogida mientras que las de lágrima se analizaron al terminar la inclusión. Por tanto; los procesos de selección e inclusión se realizaron paralelamente a los procesos de recogida y análisis de muestra. Todo ello se llevó a cabo durante un año y medio, dándose por terminado en mayo de 2016. El análisis de los resultados obtenidos en este bloque inicial se extendió hasta julio de 2016.

Unos meses después, en octubre de 2016, los sujetos y pacientes que ya habían sido incluidos en la muestra inicial volvieron a ser citados, con el fin de realizar un seguimiento de las pruebas anteriores. Esta vez, tanto el desarrollo de los exámenes como la recogida y el análisis de las muestras duraron ocho meses, finalizando en mayo de 2017. El análisis de los resultados obtenidos en este segundo bloque y la comparativa con los resultados iniciales se extendió hasta septiembre de 2017.

#### **4.1.2 Determinación del tamaño muestral.**

El cálculo se realizó mediante el software EPIDAT 3.1, tomando como variable principal del estudio a la que determina los niveles de TLR2. La estimación del tamaño muestral se basó en los resultados obtenidos en estudios previos de nuestro grupo. Así, datos previos muestran que los ojos con QC presentan niveles de TLR2 en células epiteliales corneales un 50% más que los ojos subclínicos y un 100% más que los sujetos control. Con estos datos, y para un estudio exploratorio, aceptando un riesgo  $\alpha=0.05$  y un riesgo  $\beta=0.20$ , serían necesarios al menos 56 ojos con QC y 59 ojos control. La ausencia de estudios semejantes impidió realizar el cálculo de la muestra necesaria para el grupo de familiares y de DPM. Aunque, teniendo en cuenta la baja incidencia de la DPM en la población general, consideramos que nuestra muestra aporta un número de casos suficiente para ser analizada con una buena potencia estadística.

## 4.2 Criterios de selección.

Se instó a participar en el estudio a todos aquellos sujetos sanos o pacientes con ectasia corneal que cumplieren los criterios de selección y que acudiesen a la consulta para sus revisiones oculares. A todos los reclutados se les citó para realizar revisiones de seguimiento y tomas de muestra.

### 4.2.1 Criterios de inclusión.

En todos los grupos se tenían que cumplir las siguientes condiciones:

- ✓ Edad comprendida entre 12 y 65 años.
- ✓ Firma del consentimiento informado.
- ✓ Hiperemia conjuntival no superior a 2 en la escala de Nathan Efron.<sup>182</sup>
- ✓ Test de Schirmer con valores superiores a 15mm en 5 minutos.
- ✓ Usuarios de LC: cesar el porte una semana antes de la valoración clínica para usuarios de LC rígidas o híbridas, y tres días antes para usuarios de LC blandas.
- ✓ Usuarios de lágrima artificial u otro colirio: cesar su administración 7 días antes.
- ✓ Diagnóstico clínico y topográfico característico de cada patología.

De forma más específica:

En el **grupo control** se incluyeron sujetos sanos, pareados en edad y sexo con el resto de grupos pero sin ser familiares consanguíneos de los mismos. Sin antecedentes familiares con ectasia corneal. Con valores topográficos, aberrométricos y tomográficos normales **[Tabla.2]**; sin astigmatismo irregular ni alteraciones biomicroscópicas sugerentes de ectasia corneal.

En el **grupo de familiares** se incluyeron sujetos sanos, familiares consanguíneos de primer orden (hermanos o hijos) de pacientes con ectasia corneal (QC o DPM). Con valores topográficos, aberrométricos, paquimétricos y de elevación normales **[Tabla.2]**; pudiendo presentar patrones morfológicos topográficos característicos como en J invertida.<sup>31</sup>

Se incluyeron en el **grupo QC** todos aquellos pacientes con queratocono manifiesto bilateral o unilateral, de grado leve a avanzado. Teniendo en cuenta como criterios de diagnóstico clínico, los topográficos de Rabinowitz-McDonell,<sup>183,184</sup> los aberrométricos de Alió y Shabayek,<sup>89</sup> el Índice de Predicción de Queratocono (KPI)

elaborado por Maeda et al,<sup>185</sup> y los tomográficos asociados a QC con el sistema Orbscan II<sup>186,187</sup> [Tabla.2].

El estadio de QC se valoró con la clasificación del grupo CLEK<sup>26</sup>; estableciendo, según el meridiano corneal más curvo (K2) del mapa queratométrico, como leve al QC con K2<45D, moderado con K2 entre 45D y 52D, y avanzado con K2>52D. Además, para completar el diagnóstico, era imprescindible la presencia de uno o más signos biomicroscópicos característicos de la enfermedad:<sup>1</sup> nervios corneales prominentes, estrías de Vogt, anillo de Fleischer, protrusión corneal central o excéntrica y/o leucomas corneales.

Por último, el **grupo DPM** lo constituyen pacientes con degeneración pelúcida marginal, bilateral o unilateral, diagnosticados a una edad  $\geq 27$  años, que presentan un patrón morfológico topográfico en pinza de cangrejo en el que la zona corneal más adelgazada se sitúa inmediatamente inferior al área de mayor curvatura corneal. Con valores topográficos, aberrométricos y tomográficos similares a los encontrados en QC [Tabla.2]; teniendo en cuenta que algunos índices dan falsos negativos y que la distancia media desde el centro corneal hasta el punto de mínimo espesor en pacientes con DPM será superior a la de los pacientes con QC (2.56mm y 1.27mm, respectivamente).<sup>15</sup> Actualmente, no existen más criterios específicos aceptados para categorizar la DPM.<sup>53,88</sup>

	Topografía			Aberrometría	Tomografía		
	Rabinowitz-McDonnell <sup>183,184</sup>		Maeda et al <sup>185</sup>	Alió y Sabayec <sup>89</sup>	Rao et al <sup>187</sup>	Fam et al <sup>186</sup>	Rao et al <sup>187</sup>
	Poder Dióptrico Central (PDC)	Asimetría ínfero-superior (I-S)	Índice KPI	Coma-like	Punto mínimo espesor	Elevación cara anterior	Elevación cara posterior
<b>Normal</b>	$\leq 47.2$ D	$< 1.4$ D	$< 0.23\%$	$< 0.65 \mu\text{m}$	$> 470 \mu\text{m}$	$< 16.5 \mu\text{m}$	$< 35 \mu\text{m}$
<b>QC</b>	$\geq 48.7$ D	$> 1.9$ D	$> 0.23\%$	$> 0.65 \mu\text{m}$	$< 470 \mu\text{m}$	$> 16.5 \mu\text{m}$	$> 40 \mu\text{m}$

**Tabla.2.** Recopilación de valores topográficos, aberrométricos y tomográficos establecidos como criterios diagnósticos para la diferenciación entre córneas normales y ectásicas. Tabla propia.

#### 4.2.2 Criterios de exclusión.

Se excluyó del estudio a todos aquellos sujetos que presentasen alguna de las siguientes condiciones:

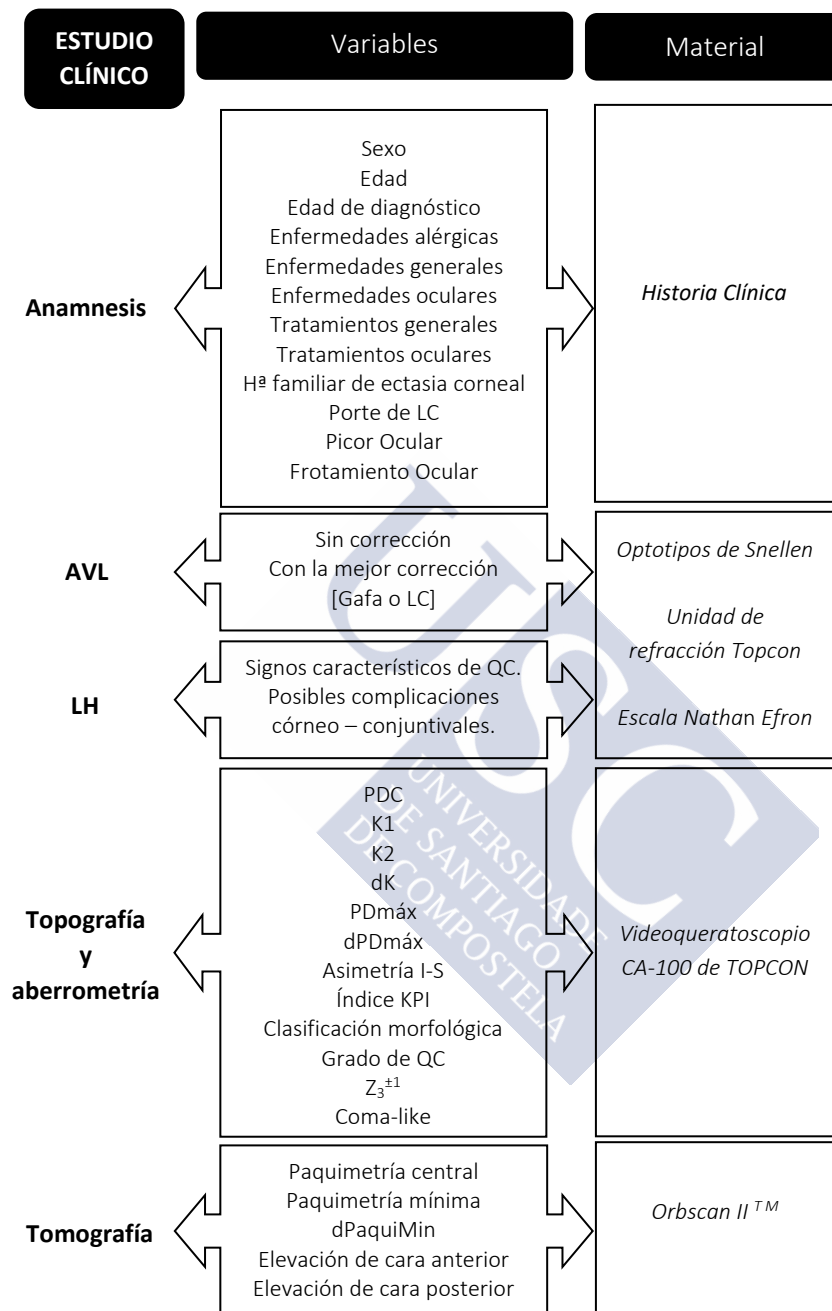
- × Incumplimiento de alguno de los criterios de inclusión.
- × Enfermedad, alteración o infección que pueda interferir en los marcadores moleculares de inmunidad innata: enfermedades hepáticas, hematológicas, renales, inmunológicas, alteraciones de la función tiroidea, tumores sólidos, diabetes descompensada e infecciones previas a la recogida de muestra.
- × Inflamación ocular o sistémica en curso.
- × Tratamientos antiinflamatorios sistémicos o locales.
- × Intervenciones quirúrgicas recientes en el ojo.
- × Traumatismo o enfermedad corneo-conjuntival.
- × Embarazo.

#### 4.3 Protocolo de exploración clínica.

Para todos los grupos de estudio se ha seguido el mismo protocolo de exploración [Figura.12] [Anexo 3].

En la anamnesis inicial se recogieron datos acerca del sexo, edad y presencia de enfermedad alérgica, general u ocular. Incluyendo como enfermedad alérgica: condiciones atópicas como rinitis, asma y dermatitis atópica, así como, alergias alimenticias, a medicamentos, a picaduras de insectos y a animales. Se recogió información sobre los tratamientos sistémicos y oculares en curso, los antecedentes familiares con ectasia corneal (QC o DPM, de primer y segundo orden), el porte de LC (anotando en caso afirmativo: el tipo de lente y el tiempo sin ella antes de la realización de las pruebas), junto con la presencia o ausencia de picor y/o frotamiento ocular. Además, en los pacientes con ectasia, se incluyó la edad a la que fueron diagnosticados. La información recogida en la historia (Hª) clínica del INGO fue contrastada con la Hª electrónica del servicio gallego de salud (IANUS).

Se realizó una exploración clínica de la agudeza visual lejana (AVL) con y sin corrección, y un estudio biomicroscópico del segmento anterior con lámpara de hendidura (LH).



**Figura.12.** Esquema de los procedimientos exploratorios realizados, las variables clínicas estudiadas y el material utilizado en los exámenes clínicos. Figura propia.

La AVL se midió con optotipos de Snellen proyectados a 6 metros, anotando la AVL mediante una escala decimal, estableciendo una clasificación del 1 al 7 donde el 1 se corresponde con una AVL  $\leq 0.05D$  y 7 con una AVL  $\geq 1.00D$ . El estudio con LH permitió evaluar la presencia de signos corneales característicos de QC (nervios corneales prominentes, estrías de Vogt, anillo de Fleischer, leucomas), y cuantificar la gravedad de posibles alteraciones córneo-conjuntivales (neovascularización, epitelio patía e hiperemia) comparándolas con la escala de Nathan Efron<sup>182</sup>.

Para ello, el material utilizado fue el siguiente: autorrefractómetro Topcon RM 8000B ATE 600 (nº de serie: 206963), unidad de refracción IS-600 de Topcon (nº de serie 1227386) con biomicroscopio Topcon SL-2 e instrumentos de refracción (lentes, gafa de prueba, oclusores, foróptero), retinoscopio y oftalmoscopio Welch-Allyn.

Se evaluó la topografía y aberrometría corneal anterior con el videoqueratoscopio CA-100 software 1.4 de TOPCON (nº de serie: 16070132); y se analizaron los siguientes parámetros topográficos: PDC, meridiano corneal más plano (K1), K2, astigmatismo corneal (dK), punto de máximo poder dióptrico (PDMáx), distancia desde el centro hasta el PDMáx (dPDMáx), asimetría I-S e índice KPI. Morfológicamente, se utilizó la clasificación de Rabinowitz<sup>2</sup> para categorizar el patrón topográfico de cada ectasia en redondo, oval, pajarita asimétrica o pinza de cangrejo. En caso de QC, el valor de K2 permitió distinguir el grado de severidad de la enfermedad.<sup>26</sup> A nivel aberrométrico se seleccionaron los coeficientes de Zernike que evalúan la aberración comática de alto orden: coma vertical y horizontal ( $Z_3^{\pm 1}$ ) y coma-like (coma del orden 3 al 7); siempre para un tamaño pupilar de 6 mm de diámetro.

Finalmente, para la exploración tomográfica corneal se utilizó el Orbscan II™ (Orbtex Topcon IT-1, nº de serie: 04000841-03) y se recogieron las siguientes variables paquimétricas y de elevación: espesor corneal central, espesor corneal mínimo, distancia desde el centro hasta el punto de espesor corneal mínimo (dPaquiMin), máxima elevación de la cara anterior y máxima elevación de la cara posterior.

#### **4.4 Recogida de lágrima y análisis molecular.**

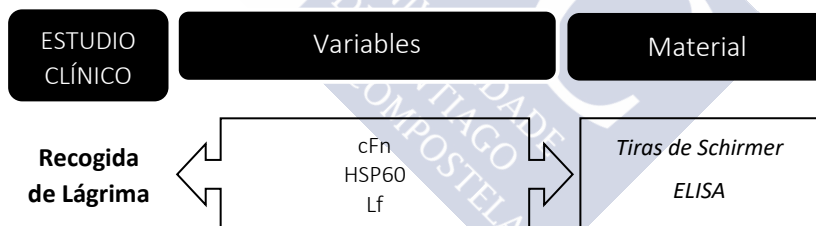
En todos los grupos se llevó a cabo el mismo método de obtención de lágrima. Todas las muestras se analizaron siguiendo el mismo protocolo **[Figura.13] [Anexo3]**.

#### 4.4.1 Recogida de lágrima.

La recogida de lágrima se realizó mediante una tira de papel milimetrado de Schirmer (Tear Strips, Contacare Ophthalmics & Diagnostics, Gujarat, India), sin previa administración de fármacos, con iluminación mesópica para reducir la estimulación de lágrima refleja, y utilizando guantes para evitar la contaminación de las muestras.

La tira de papel se dobla por la escotadura de modo que la zona doblada se introduce en el saco conjuntival inferior en la zona temporal. Una vez situado, el papel va absorbiendo lágrima. Se recogió lágrima hasta alcanzar los 15mm en el papel milimetrado de Schirmer, con el fin de extraer la misma cantidad de lágrima (9µL) en todos los ojos de estudio. Una vez alcanzada la marca, se retira la tira de papel del saco conjuntival y se guarda en un tubo Eppendorf estéril de 1mL correctamente etiquetado con el código anónimo del paciente o sujeto de estudio y el ojo correspondiente.

Finalmente, las muestras se congelaron a -80°C en ultracongeladores hasta su evaluación molecular. Las muestras de lágrima fueron utilizadas para la determinación de cFn, HSP60 y Lf.



**Figura.13.** Esquema de los biomarcadores moleculares estudiados y de los métodos empleados en la recogida y en el análisis de lágrima. Figura propia.

#### 4.4.2 Análisis de cFn, HSP60 y Lf.

Todas las muestras de lágrima recogidas fueron descongeladas y reconstituidas antes de su análisis. La descongelación se realizó en frío, manteniendo en todo momento las muestras en contacto con hielo, con el fin de evitar un choque térmico

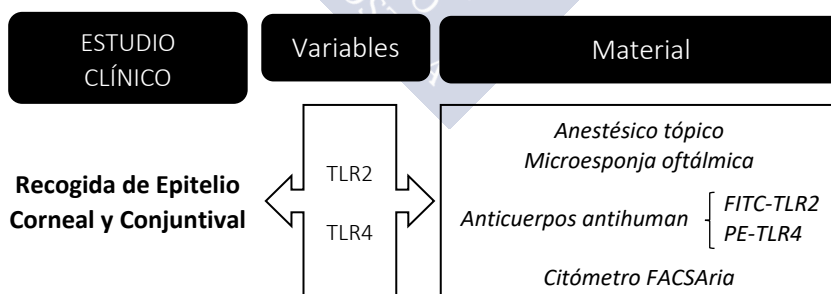
que pudiese degradar las proteínas de estudio. Una vez descongeladas, se añadieron 235µL de PBS estéril en cada Eppendorf para su reconstitución. Cada tubo se agitó en un vortex durante 1 minuto y posteriormente se dejó reposar durante 2 horas para el desprendimiento y disolución de las proteínas en el PBS.

Esta muestra se utilizó para la determinación de cFn y HSP60 mediante kits comercializados de análisis cuantitativo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), obtenidos de AbbeXa Ltd (Cambridge, Reino Unido) y de ASSAYPRO LLC (St. Charles, Estados Unidos), respectivamente. Para las determinaciones de Lf las muestras fueron diluidas 1:540000 con el diluyente proporcionado por su kit ELISA de ASSAYPRO LLC (St. Charles, Estados Unidos).

Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron: 8% y 10% para la cFn, 4.1% y 8.2% para la HSP60, y 4.3% y 9.5% para la Lf.

#### 4.5 Recogida de epitelio y análisis celular.

El método de obtención de células de epitelio corneal y conjuntival fue el mismo para todos los grupos. Todas las muestras se analizaron siguiendo el mismo protocolo [Figura.14] [Anexo 3].



**Figura.14.** Esquema de los biomarcadores celulares estudiados y de los métodos empleados en la recogida y en el análisis del epitelio corneal y conjuntival. Figura propia.

#### 4.5.1 Recogida de células de epitelio corneal y conjuntival.

La recogida de células se realizó mediante raspado con una hemosteta oftálmica quirúrgica de espuma de acetato de polivinilo (PVA) (NETCELL, Network Medical Products Ltd, Kearsley, Reino Unido); instilando previamente un anestésico tópico ocular (COLIRCUSÍ Anestésico Doble, con tetracaína al 0.1% y oxibuprocaina al 0.4%, ALCON CUSÍ SA, Barcelona, España) para una extracción más cómoda sin afectar a la muestra. El raspado corneal se realizó en el tercio inferior, entre las 4 y las 8 horas. El raspado conjuntival se realizó en conjuntiva bulbar inferior, próxima al limbo, sin tocar el borde palpebral. Se utilizó una hemosteta diferente para cada muestra. Una vez extraída la muestra, se introdujo la hemosteta en un tubo de citometría de 5mL estéril y libre de nucleasas con 1 mL de PBS. Cada tubo se etiquetó correctamente.

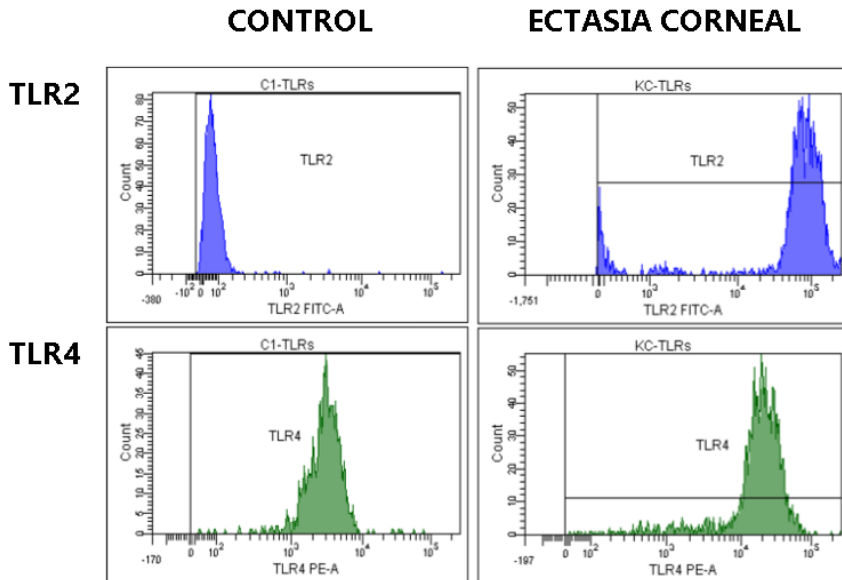
Al finalizar, se instiló una gota de lágrima artificial (RELIVE® Total Care, SALVAT SA, Barcelona, España) en el ojo examinado. Las muestras celulares se utilizaron para determinar la expresión de TLR2 y TLR4 en epitelio corneal y conjuntival.

#### 4.5.2 Determinación de TLR2 y TLR4.

Las células epiteliales fueron extraídas de la hemosteta para evaluar la expresión de TLR2 y TLR4. Agitando el tubo de citometría en un vórtex durante 30 segundos y dejándolo reposar 15 minutos, se desprenden las células de la microesponja y se sedimentan en el fondo del tubo. Una vez retirada la hemosteta, las células que permanecen en el PBS son marcadas con 5µL de anticuerpo monoclonal anti-TLR2 FITC-conjugado y con 5µL de anticuerpo monoclonal anti-TLR4 PE-conjugado (ambos de INMUNOSTEP, Salamanca, España). Tras una incubación de 30 minutos, se analizan las muestras mediante un citómetro de flujo-sorter FACS Aria IIu (BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos).

La expresión de TLR2 y TLR4 en células epiteliales de córnea (1000 eventos) y conjuntiva (2000 eventos) fue analizada mediante el software FACS Diva 6.02 (BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

La **Figura.15** muestra un histograma de citometría de flujo representativo de la sobreexpresión de TLR2 y TLR4 en pacientes con ectasia corneal frente a los sujetos control.



**Figura.15.** Histograma de citometría de flujo representativo en el que se muestra claramente una mayor expresión de TLR2 y TLR4 en el paciente con ectasia corneal (QC) que en el sujeto control. Figura propia.

#### 4.6 Análisis estadístico.

La descripción de las variables cuantitativas continuas se realizó mediante la media y desviación estándar (SD) en caso de distribución normal, y con la mediana y rango de percentiles en caso contrario. Las variables categóricas se describieron mediante porcentajes y frecuencias. La normalidad de una variable cuantitativa se demostró mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

La comparación bivariada de grupos se realizó con los contrastes de t-Student (variables continuas normales), U-Mann-Whitney (variables continuas no normales) y chi-cuadrado (variables categóricas). La representación gráfica de dichas comparaciones se realizó mediante barras de error, diagramas de caja y gráficos de sectores; respectivamente. El test ANOVA se utilizó para realizar comparaciones entre más de dos grupos de estudio (control, familiar, QC y DPM).

Las correlaciones bivariadas fueron analizadas mediante el coeficiente de Pearson (para distribución normal) o el coeficiente de Spearman (para distribución no normal).

Se realizaron estudios multivariados con modelos de regresión logística cuando la variable dependiente era categórica y con modelos de regresión lineal múltiple cuando la variable dependiente era lineal.

Una  $p \leq 0.05$  fue considerada como estadísticamente significativa en todos los test. El análisis estadístico se realizó con SPSS 20.0 para Windows (IBM, Nueva York, Estados Unidos).



## Resultados

### 5.1 Análisis descriptivo de la muestra.

Este estudio incluyó una muestra total de 263 ojos (138 personas), divididos en cuatro grupos de estudio: **grupo control**, 72 ojos sanos (36 sujetos); **grupo de familiares de primer orden de pacientes con ectasia corneal**, 53 ojos sanos (27 sujetos); **grupo de QC**, 109 ojos con queratocono (72 pacientes); y **grupo de DPM**, 29 ojos con degeneración pelúcida marginal (15 pacientes). La **Tabla.3** muestra las características epidemiológicas de la muestra.

VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS	Control	Familiares	QC	DPM
Edad, años	31.3 ± 10.4	25.4 ± 10.2	33.1 ± 8.7	45.2 ± 8.7
Hombres, n (%)	14 (38.9)	15 (57.7)	35 (58.3)	12 (80.0)
Edad diagnóstico, años			22.95 ± 5.82	32.93 ± 7.5
Enf. alérgica, n (%)	17 (47.2)	11 (42.3)	36 (60.0)	6 (40.0)
Enf. general, n (%)	3 (8.3)	0 (0.0)	9 (15.0)	8 (53.3)
Enf. ocular, n (%)	1 (2.8)	0 (0.0)	2 (3.3)	0 (0.0)
Tto. general, n (%)	5 (13.9)	4 (15.4)	21 (35.0)	4 (26.7)
Tto. ocular, n (%)	0 (0.0)	2 (7.7)	12 (20.0)	4 (33.3)
Hª familiar de ectasia, n (%)	0 (0.0)	26 (100)	16 (26.7)	1 (6.7)
Porte de LC, n (%)	36 (50)	8 (15.7)	53 (48.6)	11 (39.3)

**Tabla.3.** Variables epidemiológicas de cada grupo de estudio.

Algunas de estas variables presentan diferencias estadísticamente significativas a nivel global; sin embargo, para darle un valor real a este análisis es imprescindible exponer las diferencias entre grupos.

La principal razón por la cual muchas de las variables epidemiológicas dan diferencias significativas globales reside en la diversidad entre edades. El grupo de familiares presenta una edad significativamente inferior que los grupos de pacientes con ectasia corneal ( $p < 0.01$ ) por tratarse de sus hijos o hermanos. El grupo DPM muestra por la contra una edad significativamente superior al grupo de familiares ( $p < 0.01$ ), como consecuencia de la tardía edad de aparición y diagnóstico que presenta su enfermedad. En cuanto al grupo control, éste abarca la edad de los demás grupos de estudio mostrando una similitud adecuada con cualquiera de ellos.

Con respecto al género, se observa una mayor prevalencia de hombres en el grupo DPM (80%), lo cual proporciona diferencias globales con el resto de grupos.

Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de alergia ni en la presencia de enfermedad ocular asociada. Ninguna de estas variables influirá, por tanto, en los resultados obtenidos.

La presencia de enfermedad general fue significativamente superior en el grupo DPM, incluyendo: hipertensión arterial, hipotiroidismo, ansiedad, arritmia cardíaca, fibromialgia y/o artrosis. El uso de tratamientos generales no muestra diferencias entre grupos, y se asocia a las enfermedades padecidas. A pesar de que ninguna de estas enfermedades supuso un criterio de exclusión, los tratamientos fueron retirados una semana antes de la realización de las pruebas oculares para evitar cualquier posible interacción con los resultados.

De igual modo, los tratamientos oculares y el porte de LC se restringieron una semana antes de la realización de las pruebas. Los pacientes con ectasia mostraron una mayor utilización de tratamientos oculares, enfocados a reducir el síntoma de picor ocular que tienden a padecer. La utilización de LC fue similar entre grupos habiendo un porcentaje de usuarios significativamente menor en el grupo de familiares. La utilización de LC blandas predominó entre sujetos control y familiares, y la utilización de LC RPG, híbridas y piggy-back predominó entre los pacientes con ectasia corneal.

Finalmente, y por tratarse de un criterio de selección, el porcentaje de antecedentes familiares con ectasia fue nulo en los sujetos control, fue del 100% en el grupo de familiares y fue variable entre los pacientes ectásicos, mayor en QC (27%) que en DPM (7%).

En la **Tabla.4** se muestra el análisis de las variables clínicas para cada uno de los grupos de estudio.

VARIABLES CLÍNICAS	Control n=72 ojos	Familiares n=53 ojos	QC n=109 ojos	DPM n=29 ojos	P
Picor, n (%)	20 (27.8)	20 (39.2)	90 (82.6)	25 (86.2)	0.0001
Frotamiento, n (%)	24 (33.3)	18 (35.3)	78 (71.6)	25 (86.2)	0.0001
Signos LH, n (%)	17 (24.3)	29 (56.9)	98 (89.9)	28 (96.6)	0.0001
AVL sin corrección	0.4 – 0.7 [0.1– 0.2, ≥1.0]	0.8 – 0.9 [0.2 –0.3, ≥1.0]	0.2 – 0.3 [0.1–0.2, 0.4–0.5]	0.1-0.2 [≤0.05, 0.2 - 0.3]	0.0001
AVL con corrección	≥ 1.0 [≥ 1.0, ≥ 1.0]	≥ 1.0 [≥ 1.0, ≥ 1.0]	0.8 – 0.9 [0.6 – 0.7, ≥1.0]	0.8 – 0.9 [0.6 – 0.7, ≥1.0]	0.0001
PDC, D	44.05 ± 1.65	44.30 ± 1.14	49.19 ± 5.67	45.36 ± 6.15	0.0001
K1, D	43.48 ± 1.68	43.58 ± 1.20	45.67 ± 3.37	43.23 ± 4.05	0.0001
K2, D	44.32 ± 1.75	44.54 ± 1.22	49.42 ± 4.28	47.72 ± 5.17	0.0001
dK, D	0.84 ± 0.66	0.97 ± 0.74	3.75 ± 2.21	4.49 ± 3.20	0.0001
PDmáx , D	44.72 ± 1.80	45.21 ± 1.66	53.30 ± 5.33	51.34 ± 6.30	0.0001
dPDmáx, mm	1.39 ± 0.80	1.23 ± 0.67	1.57 ± 0.87	2.67 ± 1.20	0.0001
Índice KPI, %	0 [0, 0]	0 [0, 0]	100 [87, 100]	70 [55, 86]	0.0001
Asimetría Í-S, D	-0.09 ± 0.51	-0.18 ± 0.57	5.69 ± 3.75	7.19 ± 5.27	0.0001
Coma ( $Z_3^{\pm 1}$ ), $\mu\text{m}$	0.29 ± 0.15	0.26 ± 0.13	3.34 ± 9.92	3.00 ± 3.31	0.0001
Coma-like, $\mu\text{m}$	0.35 ± 0.14	0.34 ± 0.14	4.33 ± 17.23	4.24 ± 5.43	0.100
Elev.c.anterior, $\mu\text{m}$	9.8 ± 5.4	14.5 ± 17.0	41.2 ± 18.4	62.1 ± 40.4	0.0001
Elev.c.posterior, $\mu\text{m}$	28.0 ± 9.8	28.7 ± 12.3	94.7 ± 41.9	117.1 ± 71.7	0.0001
Paqui.central, $\mu\text{m}$	565 ± 36	548 ± 50	476 ± 60	520 ± 75	0.0001
Paqui.mínima, $\mu\text{m}$	556 ± 37	537 ± 51	453 ± 62	474 ± 99	0.0001
dPaquiMin, mm	0.85 ± 0.39	0.85 ± 0.39	1.01 ± 0.27	1.48 ± 0.72	0.0001

**Tabla.4.** Variables clínicas de cada grupo de estudio.

Los pacientes con ectasia muestran mayor incidencia de picor ocular (85%) y consecuentemente mayor tasa de frotamiento (80%) que el resto de sujetos de estudio. El grupo de familiares presenta cierta predisposición al picor y al frotamiento cuando se compara con el grupo control.

En consonancia con los criterios de inclusión, la mayoría de los pacientes con ectasia corneal (95%) presentaron signos biomicroscópicos característicos de su

enfermedad. El 25% de los sujetos control y el 55% de los familiares, tenían nervios corneales visibles.

La AVL tanto sin corrección como con ella, fue significativamente inferior en el grupo QC y DPM que en el grupo control ( $p < 0.01$ ) y de familiares ( $p < 0.01$ ). No se observaron diferencias entre controles y familiares.

Por otro lado, las variables asociadas al examen topográfico, aberrométrico y tomográfico, contribuyen a discernir entre sano y patológico. Más concretamente:

- K2, dK, PDmáx, índice KPI, asimetría I-S,  $Z_3^{\pm 1}$ , coma-like y paquimetría mínima, muestran diferencias significativas entre sujetos sanos y pacientes con ectasia.
- PDC y K1 presentan valores significativamente superiores en el QC que en los demás grupos de estudio.
- dPDmáx es significativamente superior en DPM con respecto al resto.
- Elevación de cara anterior y posterior, paquimetría central y dPaquiMin, además de mostrar diferencias significativas entre sujetos sanos y pacientes con ectasia, permiten discriminar significativamente entre QC y DPM.

Algunas de estas variables sirven como claros indicadores del grado de afectación de la enfermedad. Siguiendo la clasificación CLEK, nuestra muestra de ojos con QC está dividida en: 14% con grado leve, 62% con grado moderado y 24% con grado avanzado.

## 5.2 Expresión de TLR2 y TLR4 en los grupos de estudio.

La **Tabla.5** muestra los valores de expresión de TLR2 y TLR4 presentes en el epitelio corneal y conjuntival de los grupos de estudio. En la **Figura.16** y en la **Figura.17** se representan, respectivamente, las diferencias estadísticas encontradas en los valores corneales y en los valores conjuntivales.

La expresión de TLR2 y TLR4 en córnea y conjuntiva muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes con ectasia corneal (QC y DPM). Además, en todas las variables se observa un incremento de expresión gradual entre: sujetos control < familiares < pacientes con QC.

	CÓRNEA		CONJUNTIVA	
	TLR2 (UAF)	TLR4 (UAF)	TLR2 (UAF)	TLR4 (UAF)
Control	752 ± 629	1768 ± 1163	806 ± 412	2669 ± 1441
Familiares	1054 ± 772	1962 ± 693	1117 ± 595	3259 ± 1305
QC	2402 ± 1819	4172 ± 2018	1357 ± 1035	4374 ± 1723
DPM	1057 ± 510	2779 ± 1027	1038 ± 609	3969 ± 894
<b>p</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>

Tabla.5. Expresión de TLR2 y TLR4, en córnea y conjuntiva, del grupo control (N=72), del grupo de familiares (N=53), del grupo QC (N=109) y del grupo DPM (N=29).

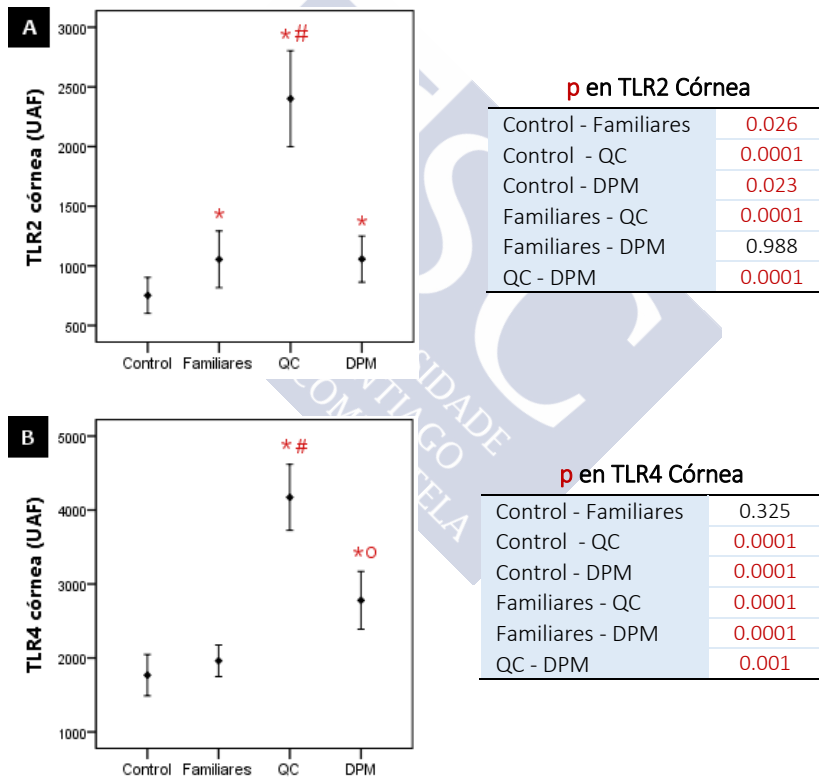
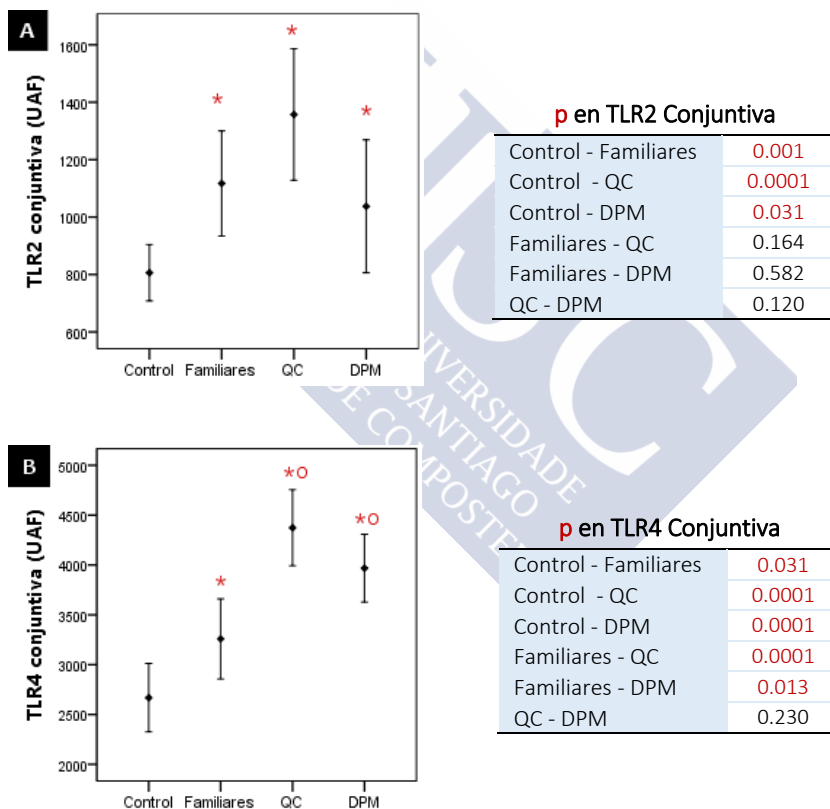


Figura.16. Representación de la media (±SD) de TLR2 (A) y TLR4 (B) corneal para cada grupo de estudio, y sus diferencias estadísticas (p). \*p<0.05 respecto al control; °p<0.05 respecto a los familiares; # p<0.05 respecto a todos.

Los TLRs a nivel corneal (TLR2 y TLR4) permiten establecer una distinción estadísticamente significativa entre el QC y el resto de grupos de estudio.

Por otro lado, la expresión de TLR4 (corneal y conjuntiva) es mayor en pacientes con DPM que en familiares y en sujetos control. Además, el TLR4 en conjuntiva permite diferenciar al grupo de familiares de los demás grupos de estudio, siendo su valor significativamente inferior al de los grupos QC y DPM, y significativamente superior al grupo control.



**Figura.17.** Representación de la media ( $\pm$ SD) de TLR2 (A) y TLR4 (B) conjuntiva para cada grupo de estudio, y sus diferencias estadísticas (p). \* $p < 0.05$  respecto al control;  $\circ p < 0.05$  respecto a los familiares.

Finalmente, se analizó la correlación entre la expresión de TLRs y ciertas variables epidemiológicas y clínicas asociadas clásicamente a la ectasia corneal: enfermedad alérgica, porte de LC, picor y frotamiento ocular. **[Tabla.6]**

	CÓRNEA				CONJUNTIVA			
	TLR2		TLR4		TLR2		TLR4	
	Coef.	p	Coef.	p	Coef.	p	Coef.	p
Enf. alérgica	-0.052	0.291	-0.047	0.308	-0.100	0.143	-0.047	0.307
Porte de LC	0.089	0.094	0.097	0.077	<b>-0.137</b>	<b>0.021</b>	0.029	0.336
Picor	<b>0.353</b>	<b>0.000</b>	<b>0.321</b>	<b>0.000</b>	<b>0.272</b>	<b>0.000</b>	<b>0.247</b>	<b>0.000</b>
Frotamiento	<b>0.214</b>	<b>0.001</b>	<b>0.225</b>	<b>0.000</b>	<b>0.241</b>	<b>0.000</b>	<b>0.181</b>	<b>0.003</b>

**Tabla.6.** Coeficiente de Spearman para cada TLR con respecto a parámetros epidemiológicos y clínicos: enfermedad alérgica, porte de LC, picor y frotamiento ocular.

La enfermedad alérgica no muestra ninguna correlación con la expresión de los TLRs. El porte de LC tampoco muestra correlación con TLR2 y 4 corneales, ni con TLR4 conjuntival; además, la correlación negativa establecida con el TR2 conjuntival tiene un valor estadístico bajo.

Por otro lado, el picor y el frotamiento ocular muestran una correlación positiva con todos los TLRs estudiados; observándose la correlación más elevada entre los TLRs corneales y el picor ocular.

### **5.3 Relación entre la expresión de TLR2/TLR4 y el grado de ectasia corneal.**

Para observar la relación que guardan los TLRs con el grado de afectación de la ectasia corneal, se analizó su correlación con diversos parámetros cuantitativos claramente involucrados en el mismo. Como parámetros asociados al grado de evolución del QC se incluyeron: PDmáx, KPI, asimetría I-S, elevación de cara anterior, elevación de cara posterior y paquimetría mínima; mientras que para el grupo DPM se utilizaron: KPI, asimetría I-S,  $Z_3^{\pm 1}$ , coma-like y elevación de cara posterior. La **Tabla.7**

muestra las correlaciones encontradas entre cada TLR y los parámetros topográficos, aberrométricos y tomográficos.

	C ÓRNEA				CONJUNTIVA			
	TLR2		TLR4		TLR2		TLR4	
	Coef.	p	Coef.	p	Coef.	p	Coef.	p
<b>QC</b>								
PDmáx	0.396	0.000	0.439	0.000	0.253	0.001	0.289	0.000
KPI	0.539	0.000	0.575	0.000	0.323	0.000	0.455	0.000
Asimetría Í-S	0.448	0.000	0.453	0.000	0.280	0.000	0.398	0.000
El.c.anterior	0.531	0.000	0.498	0.000	0.297	0.000	0.334	0.000
El.c.posterior	0.471	0.000	0.503	0.000	0.250	0.001	0.338	0.000
Paqui.mínima	-0.435	0.000	-0.468	0.000	-0.277	0.000	-0.385	0.000
<b>DPM</b>								
KPI	0.232	0.013	0.330	0.001	0.207	0.023	0.364	0.000
Asimetría I-S	0.239	0.011	0.263	0.006	0.193	0.031	0.301	0.002
Coma ( $Z_3^{\pm 1}$ )	0.336	0.001	0.217	0.018	0.199	0.027	0.280	0.003
Coma-like	0.351	0.000	0.219	0.017	0.124	0.116	0.277	0.003
El.c.posterior	0.214	0.020	0.286	0.003	0.144	0.085	0.304	0.002

**Tabla.7** Correlación (r de Pearson) para cada TLR con respecto a los siguientes parámetros topográficos, aberrométricos y tomográficos en QC y DPM: PDmáx, KPI, asimetría I-S, Coma ( $Z_3^{\pm 1}$ ), Coma-like, elevación de cara anterior, elevación de cara posterior y paquimetría mínima.

En los pacientes con QC, existe una correlación fuertemente positiva entre la expresión de los TLRs estudiados y los siguientes parámetros: PDmáx, KPI, asimetría Í-S, elevación de cara anterior y posterior. Además, se establece una fuerte correlación negativa entre el valor de paquimetría mínima y la expresión de los TLRs. Los pacientes con DPM muestran una correlación positiva entre los cuatro TLRs estudiados y los valores: KPI, asimetría Í-S y  $Z_3^{\pm 1}$ . Además, la expresión de TLR2 y TLR4 corneal y de TLR4 conjuntival se asoció positivamente con el coma-like y con la elevación de cara posterior.

En conjunto, estos resultados sugieren que los TLRs están asociados al grado de afectación de la ectasia corneal, pudiendo constituir una posible diana terapéutica en pacientes con QC o DPM.

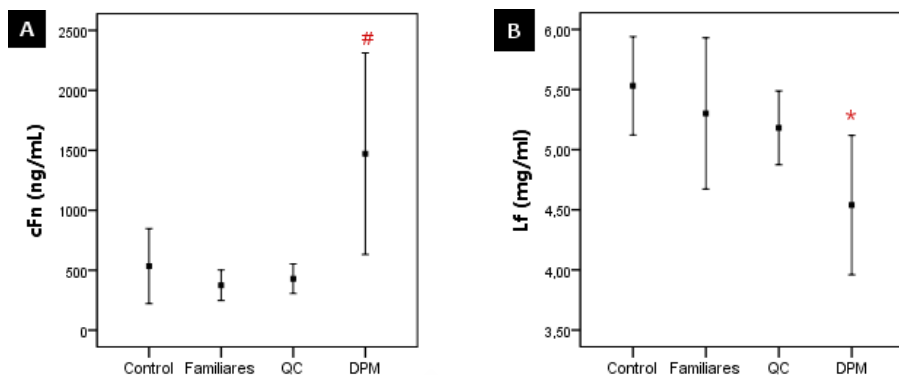
#### 5.4 Expresión de ligandos endógenos en lágrima y su correlación con la expresión de TLR2/TLR4.

Se analizaron los niveles de cFn, HSP60 y Lf lagrimal como posibles ligandos endógenos del TLR2 y TLR4 epitelial. La **Tabla.8** muestra los valores de expresión de cFn y Lf en lágrima de sujetos control, familiares y pacientes con ectasia corneal; además la **Figura.18** representa las diferencias estadísticas encontradas entre dichos valores. No se observó expresión de HSP60 a nivel lagrimal para ningún grupo de estudio, ya que todos los resultados obtenidos fueron inferiores al patrón de detección del test ELISA utilizado (<1.25ng/mL).

	LÁGRIMA	
	cFn (ng/mL)	Lf (mg/mL)
Controles	535 ± 924	5.53 ± 1.61
Familiares	375 ± 387	5.30 ± 2.17
QC	429 ± 487	5.18 ± 1.57
DPM	1472 ± 1744	4.54 ± 1.52
<b>P</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.040</b>

**Tabla.8.** Expresión de cFn y Lf, a nivel lagrimal en el grupo control (N=62), de familiares (N=48), QC (N=103) y DPM (N=29).

La concentración de cFn fue significativamente superior en el grupo DPM que en el resto de grupos de estudio ( $p < 0.01$ ). En el caso de la Lf, se aprecia una reducción gradual de su concentración entre los grupos: control > familiares > QC > DPM. Los pacientes con DPM muestran una concentración de Lf significativamente inferior a la del grupo control ( $p < 0.007$ ).



**Figura.18.** Media ( $\pm$ SD) de la concentración de cFn (A) y Lf (B) en lágrima, para cada grupo de estudio. #  $p < 0.05$  respecto a todos; \*  $p < 0.05$  respecto al control.

Para evaluar la asociación entre la concentración de cFn y Lf presente en lágrima de pacientes con ectasia y su expresión de TLRs en epitelio corneal y conjuntival, se estudió la correlación existente entre ellos. [Tabla.9]

	CÓRNEA				CONJUNTIVA				
	TLR2		TLR4		TLR2		TLR4		
	Coef.	p	Coef.	p	Coef.	p	Coef.	p	
<b>QC</b>									
cFn	-0.079	0.211	-0.128	0.096	-0.157	0.054	-0.141	0.075	
Lf	-0.118	0.057	-0.082	0.138	-0.022	0.385	<b>-0.139</b>	<b>0.031</b>	
<b>DPM</b>									
cFn	0.183	0.093	0.173	0.106	<b>0.301</b>	<b>0.013</b>	0.155	0.131	
Lf	<b>-0.203</b>	<b>0.029</b>	<b>-0.254</b>	<b>0.008</b>	-0.075	0.242	<b>-0.291</b>	<b>0.003</b>	

**Tabla.9.** Correlación (r de Pearson) entre la expresión de TLR2 y TLR4 de cada patología ectásica (QC y DPM) y sus posibles ligandos endógenos (cFn y Lf).

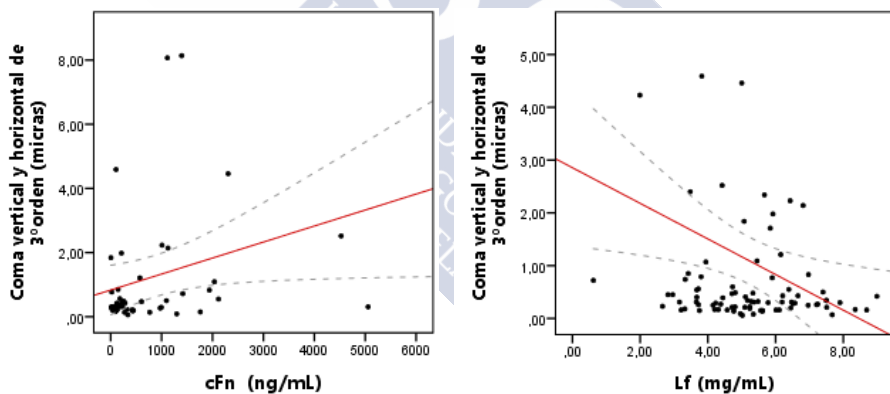
En los pacientes con QC, la concentración de Lf lagrimal se correlaciona negativamente ( $r = -0.139$ ,  $p = 0.031$ ) con la expresión de TLR4 conjuntival.

Los niveles de cFn se correlacionan fuertemente y de manera positiva con la expresión de TLR2 conjuntival en pacientes con DPM ( $r=0.301$ ,  $p=0.013$ ). A su vez, en el mismo grupo de estudio (DPM), se establece una correlación negativa entre la concentración de Lf y la expresión de TLR4 conjuntival ( $r=-0.291$ ,  $p=0.003$ ) y de TLR2 y TLR4 corneal ( $r=-0.203$ ,  $p=0.029$ ;  $r=-0.254$ ,  $p=0.008$ ; respectivamente).

Como análisis complementario, se estudió la correlación entre los niveles de Lf y cFn presentes en la lágrima de los pacientes con ectasia corneal y el valor aberrométrico  $Z_3^{\pm 1}$ ; con el fin de evaluar la influencia de ambos ligandos endógenos en el grado de afectación de la patología corneal.

En el grupo QC, no se observó correlación entre la concentración de cFn y  $Z_3^{\pm 1}$  ( $r=-0.134$ ,  $p=0.095$ ); tampoco entre el nivel de Lf y el valor de  $Z_3^{\pm 1}$  ( $r=-0.069$ ,  $p=0.193$ ).

La correlación obtenida en los pacientes con DPM se representa en la **Figura.19**. Dónde se puede observar una correlación positiva entre el valor aberrométrico  $Z_3^{\pm 1}$  y la concentración de cFn ( $r=0.274$ ,  $p=0.023$ ) y, por otro lado, una correlación negativa entre la Lf y el parámetro  $Z_3^{\pm 1}$  ( $r=-0.258$ ,  $p=0.008$ ).



**Figura.19.** Correlación entre el coma vertical y horizontal de tercer orden ( $Z_3^{\pm 1}$ ) y la concentración de cFn (izquierda) y Lf (derecha) presentes en la lágrima de los pacientes con DPM.

## 5.5 Evolución de la expresión de TLR2/TLR4 tras año y medio de seguimiento.

A los  $19 \pm 4$  meses después del examen inicial, un total de 56 personas (110 ojos) asistieron de nuevo a la consulta para realizar la revisión de seguimiento. La muestra utilizada para este análisis está constituida por: 32 ojos (16 sujetos) del grupo control, 57 ojos (29 pacientes) del grupo QC, 21 ojos (11 pacientes) del grupo DPM. El grupo de familiares de primer orden no se incluyó en el examen de seguimiento por su reducido tamaño muestral.

En la **Tabla.10** se exponen las medias obtenidas para esta muestra en el análisis de la expresión de TLR2 y TLR4 inicial y de seguimiento.

CÓRNEA				
	TLR2 (UAF)		TLR4 (UAF)	
	Inicial	Seguimiento	Inicial	Seguimiento
Control	823 $\pm$ 717	525 $\pm$ 199	1642 $\pm$ 767	1766 $\pm$ 609
QC	2570 $\pm$ 1855	1544 $\pm$ 491	4442 $\pm$ 1987	2938 $\pm$ 906
DPM	1101 $\pm$ 574	1110 $\pm$ 680	2989 $\pm$ 972	3117 $\pm$ 1632
<b>p</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>

CONJUNTIVA				
	TLR2 (UAF)		TLR4 (UAF)	
	Inicial	Seguimiento	Inicial	Seguimiento
Control	753 $\pm$ 343	1164 $\pm$ 709	2345 $\pm$ 1051	3879 $\pm$ 2093
QC	1260 $\pm$ 556	1928 $\pm$ 1041	4748 $\pm$ 1782	7060 $\pm$ 3907
DPM	954 $\pm$ 334	2219 $\pm$ 880	3987 $\pm$ 834	8885 $\pm$ 3959
<b>p</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>

**Tabla.10.** Medias ( $\pm$ SD) del valor inicial y de seguimiento para TLR2 y TLR4, corneal y conjuntival, en el grupo control, QC y DPM.

A continuación, en la **Tabla.11**, se exponen las significancias obtenidas en los resultados del análisis inicial y de seguimiento.

CÓRNEA				
	TLR2		TLR4	
	Inicial	Seguimiento	Inicial	Seguimiento
Control-QC	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Control-DPM	0.142	0.0001	0.0001	0.0001
QC - DPM	0.001	0.004	0.002	0.563

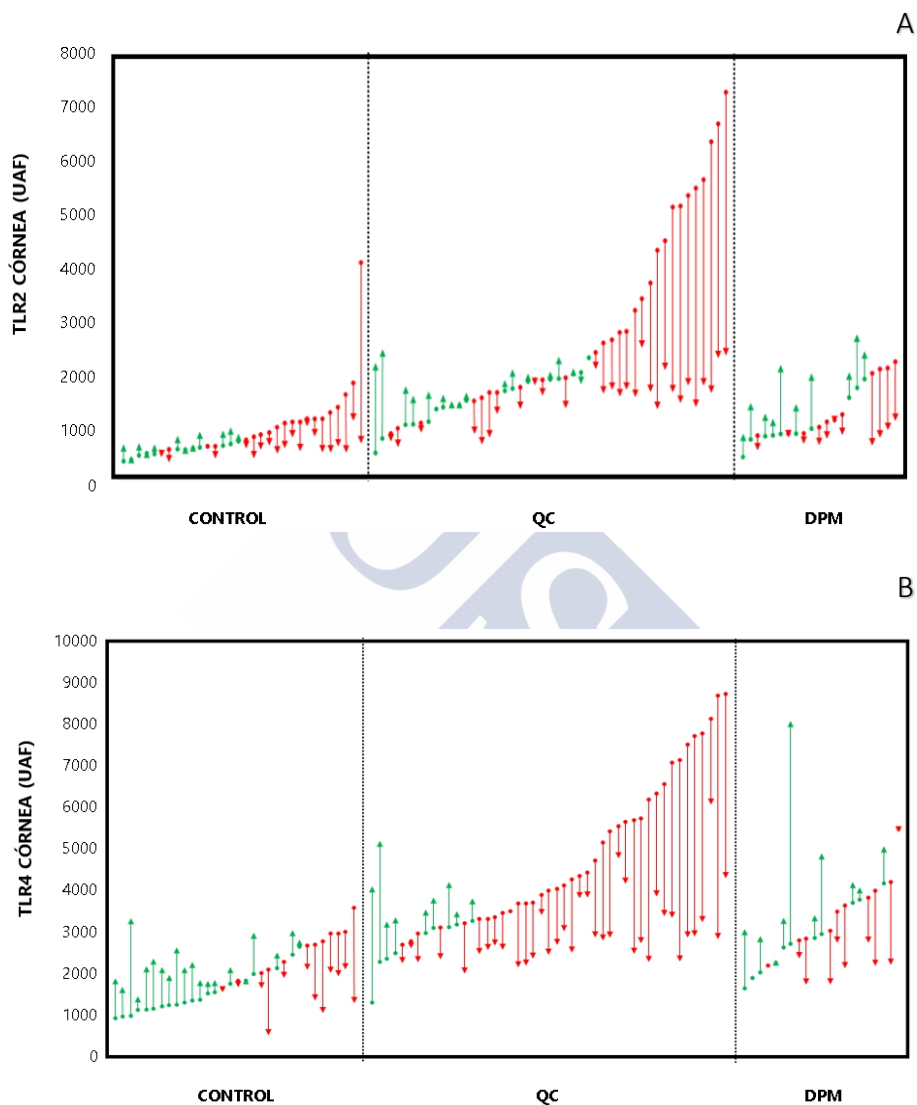
  

CONJUNTIVA				
	TLR2		TLR4	
	Inicial	Seguimiento	Inicial	Seguimiento
Control-QC	0.0001	0.001	0.0001	0.0001
Control-DPM	0.040	0.0001	0.0001	0.0001
QC - DPM	0.023	0.268	0.067	0.081

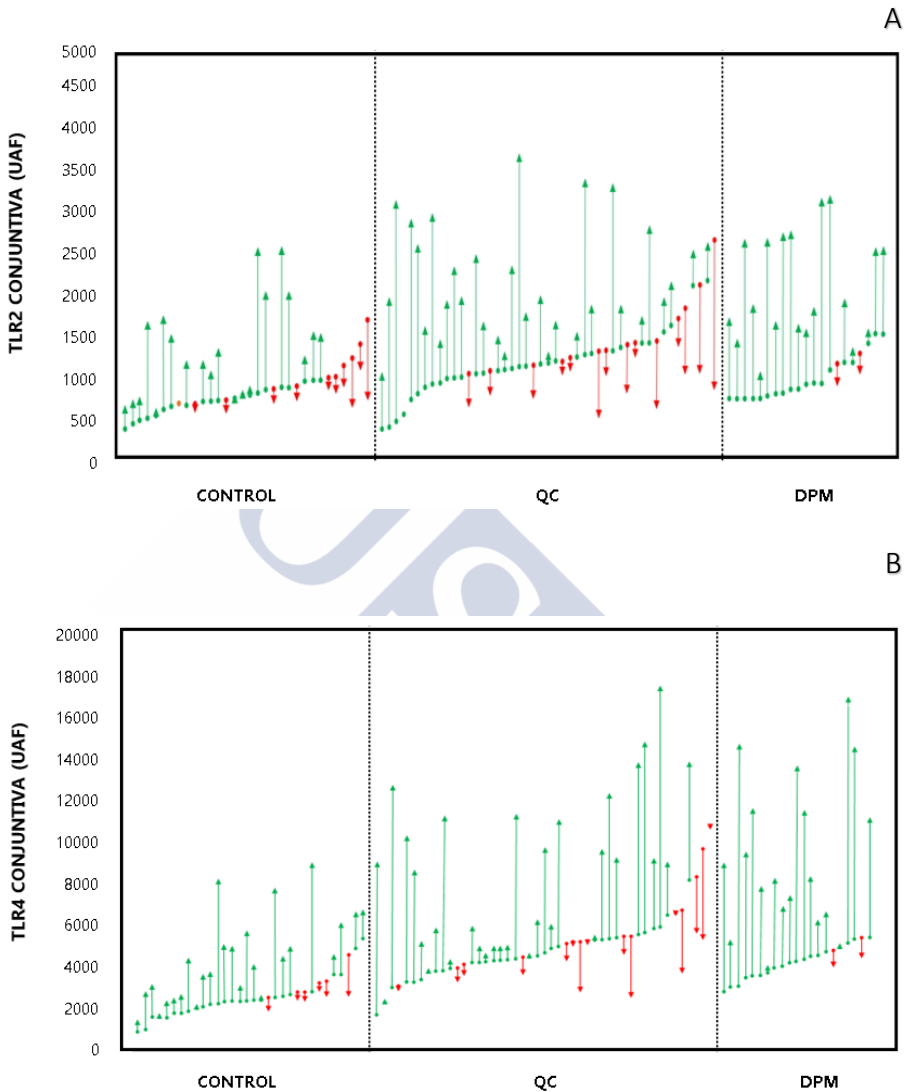
**Tabla.11** Significancia (p) del valor inicial y de seguimiento para TLR2 y TLR4, corneal y conjuntival, entre el grupo control, QC y DPM.

Estos resultados muestran que las diferencias estadísticamente significativas observadas inicialmente entre el grupo control y los grupos patológicos se mantuvieron también después de un año de seguimiento; siendo así en todos los biomarcadores estudiados.

Además, en la **Figura.20** y en la **Figura.21** se representan caso a caso las variaciones obtenidas entre el valor inicial y el de seguimiento para TLR2 y TLR4, corneal y conjuntival. Estas gráficas muestran una tendencia a la disminución de la expresión de los TLRs corneales, sobre todo cuanto mayor es el valor inicial. En cuanto a la expresión de TLR2 y TLR4 conjuntival, se puede observar una tendencia generalizada al aumento. Este patrón fue igual para todos los grupos de estudio.



**Figura.20.** Cambios enTLR2 (A) y TLR4 (B) corneal para cada paciente de estudio, a los 19±4 meses del examen inicial. Los puntos representan los valores de TLR2 (A) y TLR4 (B) iniciales de cada paciente. Los pacientes del grupo control se representan a la izquierda del gráfico, los del grupo QC en parte central, y los del grupo DPM a la derecha. Para cada punto, una flecha representa el incremento (verde) o la reducción (rojo) de la expresión de sus TLRs en el seguimiento.



**Figura.21.** Cambios en TLR2 (A) y TLR4 (B) conjuntiva para cada paciente de estudio, a los  $19 \pm 4$  meses del examen inicial. En el eje horizontal, los puntos representan los valores de TLR2 (A) y TLR4 (B) iniciales de cada paciente. Los pacientes del grupo control se representan a la izquierda del gráfico, los del grupo QC en parte central, y los del grupo DPM a la derecha. Para cada punto, una flecha representa el incremento (verde) o la reducción (rojo) de la expresión de sus TLRs en el seguimiento.



INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

ESTUDIO CLÍNICO

**ESTUDIO *IN VITRO***

**Material, método y resultados**

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES





## Material y Método

### 6.1 Cultivo celular.

Para el estudio *in vitro* se utilizaron dos líneas celulares de epitelio corneal:

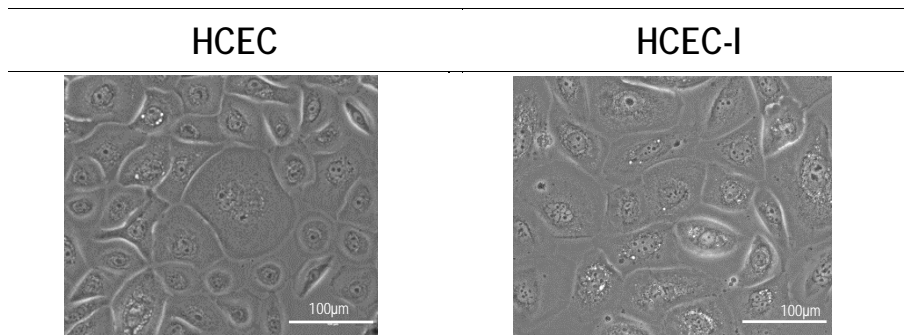
1. Línea primaria de células epiteliales corneales humanas sanas (HCEC) (ref.PCS-700-010, lot.64178655, ATCC, Virginia, Estados Unidos).
2. Línea inmortalizada de células epiteliales corneales humanas sanas transfectadas con un plásmido que contiene SV40 (HCEC-I) (ref.CRL-11515, lot.61992885, ATCC, Virginia, Estados Unidos).

Se emplearon medios de cultivo, soluciones de lavado, soluciones de levantamiento celular (tripsina e inhibidor de tripsina) y condiciones de centrifugado específicos para cada estirpe celular **[ver Anexo 4]**.

Se utilizó el mismo protocolo de descongelación, sembrado y subcultivo, así como la misma metodología experimental en ambas líneas celulares. Previamente al proceso de descongelación, sembrado y subcultivo, se preparó cada recipiente de cultivo con una cubierta base **[ver Anexo 4]** que contribuye a la adherencia celular.

#### 6.1.1 Descongelación, sembrado y subcultivo.

Cada vial se descongeló a 37°C e, inmediatamente después, las células se sembraron en un flask T-75 estéril (Corning, Nueva York, Estados Unidos) preparado con cobertura base y medio de cultivo específico para cada tipo celular **[Anexo 4]**. Las células se cultivaron en un incubador bajo las siguientes condiciones de mantenimiento: 37°C de temperatura (T<sup>a</sup>), 95% de humedad y 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). El medio de cultivo se cambió cada 48 horas, hasta alcanzar una confluencia celular del 80-90% **[Figura.22]**.



**Figura.22.** Fotografía de cultivos HCEC y HCEC-I en confluencia. Imagen propia, realizada a 20x con un microscopio Olympus y el software NCIS.

Una vez alcanzada la confluencia, las células se lavaron y se incubaron con tripsina para levantarlas y proceder al subcultivo **[Anexo 4]**. Posteriormente, se añadió solución neutralizante que inactivase la tripsina. Las células en suspensión fueron transferidas a un tubo Falcon estéril de 50 mL que se centrifugó, con el fin de eliminar los restos de tripsina, siguiendo las indicaciones específicas para cada tipo celular **[ver Anexo 4]**. Finalmente, tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular para determinar su concentración mediante conteo en cámara de Neubauer con azul tripán (trypan blue 0.4%, STEMCELL Technologies, Grenoble, Francia).

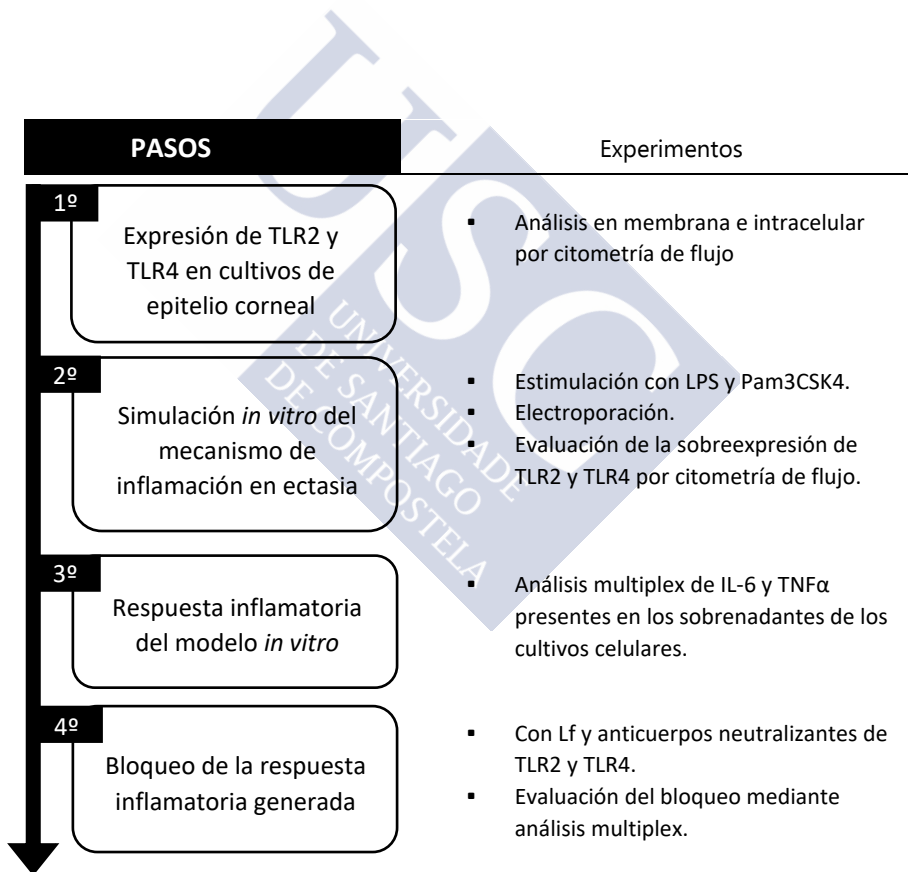
La manipulación celular se realizó bajo condiciones estériles en una cabina de flujo laminar, siguiendo las normas de bioseguridad de nivel 1 y 2<sup>188</sup>. En todos los experimentos se emplearon placas de 24 pocillos estériles (Corning - Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y cultivos en pases del 5 al 8, utilizando una densidad de 25.000 células por cm<sup>2</sup>.

## 6.2 Diseño experimental.

A partir de los cultivos de células epiteliales corneales, se intentó simular un modelo *in vitro* del posible mecanismo inmuno-inflamatorio implicado en las ectasias corneales. Los pasos seguidos para el desarrollo de este modelo consistieron en:

1. Evaluar la expresión extracelular e intracelular de TLR2 y TLR4 en cultivos HCEC y HCEC-I.
2. Estimular la sobreexpresión de dichos receptores.
3. Evaluar la funcionalidad de la sobreexpresión estudiando la respuesta inflamatoria generada.

Una vez puesto a punto el modelo *in vitro*, el objetivo se centró en intentar bloquear la respuesta inflamatoria mediada por la sobreexpresión de TLR2 y TLR4, utilizando Lf y anticuerpos neutralizantes para ambos TLRs. Todo ello con el fin de encontrar en la modulación de la respuesta inflamatoria una posible diana terapéutica para las ectasias corneales. La **Figura.23** muestra el protocolo experimental.



**Figura.23** Esquema de los pasos seguidos en el protocolo experimental. Figura propia.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas (LINC), excepto el procedimiento de electroporación que se realizó en el Laboratorio de Neoplasia y Diferenciación de Células Endocrinas del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMus). La realización del estudio *in vitro* abarcó un período temporal de 1 año y 5 meses (12/2016 – 04/2018). Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

### **6.2.1 Expresión de TLR2 y TLR4 en cultivos de epitelio corneal.**

La expresión de TLR2 y TLR4 a nivel de membrana e intracelular en cultivos HCEC y HCEC-I se determinó mediante citometría de flujo. Para ello, las células fueron tripsinizadas, resuspendidas y contadas, tal y como se explica en el *apartado 6.1.1*. Posteriormente, se repartieron en tubos de citometría de 5mL, estériles y libres de nucleasas, a una densidad de 50.000 células por tubo.

Para el análisis de TLR2 y TLR4 en membrana se añadieron 100µL de PBS (Biowest, Misuri, Estados Unidos) en cada tubo de citometría. Para el análisis de TLR2 y TLR4 intracelular se permeabilizaron las células con un kit de fijación y permeabilización (ref.554714, BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos), siguiendo el protocolo establecido en su manual<sup>189</sup>; y una vez permeabilizadas, se centrifugaron y resuspendieron en 100µL de PBS (Biowest, Misuri, Estados Unidos).

De igual forma en ambos casos, las células se marcaron con 5µL de anticuerpo monoclonal anti-TLR2 conjugado con fluoróforo FITC (FITC anti-human CD282, ref. 1399990068, Immunostep, Salamanca, España) y con 5µL de anticuerpo monoclonal anti-TLR4 conjugado con fluoróforo PE (PE anti-human CD284, ref. 1399990067, Immunostep, Salamanca, España). Tras una incubación de 20 minutos, a oscuras y a Tª ambiente; se realizó un lavado de la muestra para evitar que el ruido de fondo pudiese interferir en el análisis. Para ello, se añadió 1mL de PBS, se centrifugó la muestra, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 400µL de PBS.

La cuantificación de la expresión de TLR2 y TLR4 se llevó a cabo con un citómetro de flujo-sorter FACS Aria IIu (BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos) y los datos se procesaron mediante el software FACS Diva 6.02 (BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos). En cada análisis se recogieron 1000 eventos (células). Aquellas células cuya fluorescencia era superior al umbral del control negativo fueron contabilizadas como positivas. El control negativo lo determinaron células de epitelio

corneal sin marcar y por tanto, no fluorescentes. Finalmente, los resultados fueron expresados como porcentaje.

Para la evaluación de TLR2 y TLR4 a nivel de membrana, se utilizó como control positivo un cultivo primario de células humanas endoteliales de vena umbilical (HUVEC)<sup>190</sup>, cedidas por el Dr. Ezequiel Álvarez del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). Las células fueron aisladas a partir de cordones umbilicales humanos sanos recién obtenidos, donados con el consentimiento informado de las madres, siguiendo un método ya descrito<sup>191</sup>. Las células HUVEC se cultivaron en flasks T-75 estériles (Corning, Nueva York, Estados Unidos), recubiertos, siguiendo el proceso de sembrado y subcultivo explicado en el apartado 6.1.1. Se utilizaron medio de cultivo, soluciones de lavado y de levantamiento celular específicos para este tipo celular [ver Anexo 4]. Los pasos llevados a cabo para determinar la expresión de TLR2 y TLR4 fueron los mismos que los seguidos en los cultivos HCEC y HCEC-I.

## 6.2.2 Estimulación de TLR2 y TLR4 en cultivos de epitelio corneal.

Una vez determinados los niveles basales de expresión de TLR2 y TLR4 en nuestros cultivos celulares, el siguiente paso consistió en estimular ambos receptores hasta lograr su sobreexpresión, obteniendo, de este modo, una simulación *in vitro* de la expresión detectada clínicamente en las células epiteliales ectásicas.

Se llevaron a cabo dos métodos de estimulación:

- Mediante ligandos activadores de TLR2 y TLR4.
- Combinando dichos ligandos con un protocolo de electroporación celular.

La expresión de los receptores fue analizada mediante citometría de flujo, según el método descrito previamente, y su funcionalidad se evaluó analizando la respuesta inflamatoria generada.

### 6.2.2.1 Estimulación con LPS y Pam3CSK4

Los TLRs funcionan como sensores primarios del sistema inmune innato debido a su capacidad para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a

patógenos (PAMPs). Dicho reconocimiento contribuye a su estimulación, sobreexpresión y consecuentemente a la activación de una respuesta inflamatoria secundaria.

En este estudio se utilizaron lipopolisacáridos (LPS) (componentes característicos de la pared celular de las bacterias Gram-), cuyo reconocimiento está mediado por TLR4, y Pam3CSK4 (lipopéptido sintético que mimetiza el terminal de las lipoproteínas bacterianas), un potente activador de TLR2; para la estimulación de ambos receptores en cultivos HCEC y HCEC-I. Se realizaron estudios con diversas concentraciones y tiempos de exposición a cada ligando (resultados no mostrados), que junto con las guías establecidas por los laboratorios y los datos publicados por otros estudios<sup>192,193</sup>, nos permitió establecer el protocolo a seguir.

Las células se sembraron a una densidad de 25.000 cél/cm<sup>2</sup> en una placa estéril de 24 pocillos (Corning - Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) recubiertos con cobertura base específica para cada tipo celular **[ver Anexo 4]**. Pasadas 24 horas de incubación a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, se cambió el medio de cultivo estableciendo dos grupos:

- I. Células tratadas con ligandos (estimuladas): medio de cultivo con 1µg/mL de LPS (*Escherichia Coli* 055:B5, ref.L2880, SIGMA, Misuri, Estados Unidos) y 300ng/mL de Pam3CSK4 (CASRN.112208-00-1, InvivoGen, California, Estados Unidos).<sup>192,193</sup>
- II. Células sin tratar (no estimuladas): medio de cultivo sin LPS ni Pam3CSK4.

Las células se mantuvieron en cultivo con los tratamientos durante 24 horas a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se recogió el medio de cultivo de cada pocillo y se guardó, correctamente etiquetado, a -80°C en un ultracongelador (con el fin de analizar la respuesta inflamatoria, *apartado 6.2.3*). Las células se levantaron con tripsina, siguiendo el protocolo ya descrito, y se analizaron mediante citometría.

A su vez, se evaluó el efecto del tratamiento a nivel de membrana y a nivel intracelular. Para valorar la estimulación de TLR2 y TLR4 en membrana, el pellet celular se resuspendió con 100µL de PBS (Biowest, Misuri, Estados Unidos). Para valorar la estimulación intracelular de TLR2 y TLR4, las células se permeabilizaron con un kit de fijación y permeabilización (ref.554714, BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos), siguiendo el protocolo establecido en su manual<sup>189</sup>; y una vez permeabilizadas, se resuspendieron en 100µL de PBS (Biowest, Misuri, Estados Unidos).

Finalmente, las células se marcaron con 5 $\mu$ L de anticuerpo monoclonal anti-TLR2 conjugado con fluoróforo FITC (ref. 1399990068, Immunostep, Salamanca, España) y con 5 $\mu$ L de anticuerpo monoclonal anti-TLR4 conjugado con fluoróforo PE (ref. 1399990067, Immunostep, Salamanca, España). Tras una incubación de 20 minutos, a oscuras y a T<sup>o</sup> ambiente; se realizó un lavado de la muestra y se resuspendió el pellet celular en 400 $\mu$ L de PBS. La medición se realizó por citometría de flujo (FACS Aria IIu, BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos). Los datos se procesaron con el software FACS Diva 6.02 (BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos), recogiendo 1000 eventos en cada análisis. Las células sin marcar se establecieron como control negativo para cada grupo de estudio. Los resultados se expresaron como porcentaje.

#### 6.2.2.2 Electroporación y estimulación con LPS y Pam3CSK4.

La electroporación es una técnica de permeabilización celular que consiste en la aplicación de pulsos eléctricos para generar poros en la membrana plasmática de las células eucariotas. La combinación entre este método y el uso de ligandos activadores de los TLRs se utilizó para estimular intracelularmente los cultivos HCEC. Así, la incubación con LPS y Pam3CSK4 durante la electroporación permitió la entrada, a través de los poros, de estos compuestos extracelulares hacia el espacio intracelular. La funcionalidad de dicha estimulación se caracterizó mediante el estudio de la respuesta inflamatoria.

La electroporación se realizó mediante el dispositivo Amaxa Nucleofector II (Amaxa Biosystem, Colonia, Alemania) con cubetas de electrodo de aluminio estériles (Amaxa Biosystem, Colonia, Alemania), certificadas específicamente para dicho dispositivo. La selección de la magnitud del campo eléctrico aplicado y del tiempo de exposición al pulso eléctrico es importante para lograr que los poros formados se sellen tras un corto período, evitando así una excesiva muerte celular. Por ello, la revisión de los protocolos optimizados proporcionados por el fabricante, la prueba de diversos programas de ejecución y la evaluación de la estimulación a diferentes tiempos de incubación (resultados no mostrados), permitió establecer el protocolo final a seguir.

Inicialmente, las células se levantaron y contaron siguiendo el protocolo del apartado 6.1.1. A continuación, se repartieron en tubos Falcon de 15mL estériles a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células por tubo. A cada tubo se le añadió 1mL de medio de cultivo específico de HCEC [Anexo 4] para resuspender las células y mantenerlas durante 1 hora en incubación a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este

tiempo, cada tubo se centrifugó a 150g durante 5 minutos y, tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular estableciendo dos grupos:

- I. Células tratadas con ligandos (estimuladas): resuspendidas en 100µL de PBS (Biowest, Misuri, Estados Unidos) con 1µg/mL de LPS (*Escherichia Coli* 055:B5, re.L2880, SIGMA, Misuri, Estados Unidos) y 300ng/mL de Pam3CSK4 (CASRN.112208-00-1, InvivoGen, California, Estados Unidos).<sup>192,193</sup>
- II. Células sin tratar (no estimuladas): resuspendidas en 100µL de PBS (Biowest, Misuri, Estados Unidos) sin LPS ni Pam3CSK4.

Los 100µL de suspensión celular fueron transferidos a una cubeta de electroporación. La cubeta se insertó en el electroporador seleccionando el programa de ejecución V-023. Inmediatamente después de la electroporación, la suspensión celular fue transferida a un tubo estéril donde se resuspendió cuidadosamente con 200µl de medio de cultivo específico para HCEC **[Anexo 4]**. Posteriormente, se sembró el contenido de manera equitativa entre 6 pocillos estériles de una placa de 24 (Corning - Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), recubiertos con polilisina-D (Poly-D-lysine hydrobromide, ref.P6407, SIGMA, Misuri, Estados Unidos) diluida 1:10.

Finalmente, se establecieron 3 grupos de estudio:

1. Células electroporadas sin estimular: resuspendidas en PBS durante la electroporación y sembradas en medio de cultivo sin tratar.
2. Células estimuladas durante la electroporación: resuspendidas en PBS tratado con LPS y Pam3CSK4 durante la electroporación y sembradas en medio de cultivo sin tratar.
3. Células electroporadas y estimuladas al sembrado: resuspendidas en PBS durante la electroporación y sembradas en medio de cultivo tratado con 1µg/mL de LPS y 300ng/mL de Pam3CSK4.

Tras una incubación de 24 horas (a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>), los sobrenadantes fueron recogidos, centrifugados y almacenados a -80°C para un análisis posterior, con el fin de evaluar la presencia de citoquinas pro-inflamatorias.

Como controles negativos, se utilizaron un grupo de células HCEC sin electroporar y un grupo de células HCEC sin electroporar estimuladas al sembrado. Se siguió todo el protocolo descrito anteriormente.

### **6.2.3 Evaluación de la respuesta inflamatoria generada tras la estimulación de TLR2 y TLR4.**

La respuesta inflamatoria se evaluó, mediante análisis multiplex, determinando la concentración de citoquinas proinflamatorias liberadas al sobrenadante. La técnica multiplex es un método de cuantificación de citoquinas en muestras líquidas, cuyo principio es similar al ensayo ELISA pero permitiendo el análisis de múltiples analitos en una única muestra.

Para este estudio, los sobrenadantes (del apartado 6.2.2) fueron descongelados en frío con el fin de evitar un choque térmico que pudiese alterar la integridad de las citoquinas. A continuación, mediante la técnica multiplex, se analizó la concentración de IL-6 y TNF $\alpha$  en cada muestra siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Se utilizó un kit Milliplex (Milliplex MapKit. Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, ref. HCYTOMAG-60K-04, EMD Millipore, Massachusetts, Estados Unidos) para IL-6 y TNF $\alpha$ , cuyo rango de detección de ambos analitos iba de 0.8 a 10.000 pg/mL. El coeficiente de variación intra- e inter-ensayo fue del 2% y 18.3% para IL-6, y del 2.6% y 13% para TNF $\alpha$ . La medición de la fluorescencia se realizó mediante el programa Bio-Plex Manager de un lector de placas Luminex (BioRad, California, Estados Unidos), dispositivo que utiliza láseres para identificar simultáneamente los diversos marcadores estudiados.

Debido a la posible variabilidad en la cantidad de células sembradas tras la electroporación, los resultados inflamatorios obtenidos en cada muestra fueron corregidos por cantidad total de proteína.

### **6.2.4 Bloqueo de la respuesta inflamatoria.**

Se llevaron a cabo dos métodos de bloqueo en cultivos HCEC:

- Mediante anticuerpos neutralizantes de TLR2 y TLR4.
- Mediante inmunomodulación con lactoferrina humana.

La utilización de estos compuestos promueve la neutralización de la respuesta inflamatoria, evitando la interacción entre los TLRs y sus ligandos activadores. La capacidad de bloqueo se evaluó funcionalmente analizando la respuesta inflamatoria final.

El bloqueo de los TLRs estimulados en las células HCEC se realizó durante el proceso de electroporación, posibilitando así la entrada del tratamiento al espacio intracelular y su acceso a los receptores TLR2 y TLR4.

Para ello, las células previamente levantadas y contadas según el protocolo descrito en el *apartado 6.1.1*, fueron repartidas en tubos Falcon de 15mL estériles a una densidad de  $1 \times 10^6$  células por tubo. A cada tubo se le añadió 1mL de medio de cultivo específico de HCEC [**Anexo 4**] para resuspender y mantener las células durante 1 hora a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se centrifugó cada tubo a 150g durante 5 minutos y, tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular estableciendo varios grupos experimentales:

- **Grupo A:** células sin tratar; resuspendidas en 100µL de PBS.
- **Grupo B:** células tratadas con ligandos activadores de TLR2 y TLR4; resuspendidas en 100µL de PBS con 1µg/mL de LPS (Escherichia Coli 055:B5, ref.L2880, SIGMA, Misuri, Estados Unidos) y 300ng/mL de Pam3CSK4 (CASRN.112208-00-1, InvivoGen, California, Estados Unidos).<sup>192,193</sup>
- **Grupo C:** células bloqueadas y tratadas con ligandos activadores de TLR2 y TLR4; resuspendidas en 100µL de PBS con anticuerpos neutralizantes de TLR2 y 4 o con Lf humana + con 1µg/mL de LPS y 300ng/mL de Pam3CSK4.
- **Grupo D:** células bloqueadas; resuspendidas en 100µL de PBS con anticuerpos neutralizantes de TLR2 y TLR4 o con Lf humana.

Del mismo modo en todos los grupos de estudio, los 100µL de suspensión celular fueron transferidos a una cubeta de electroporación (Amaxa Biosystem, Colonia, Alemania). La cubeta se insertó en el electroporador Amaxa Nucleofector II (Amaxa Biosystem, Colonia, Alemania) y se ejecutó el programa V-023. Inmediatamente después de la electroporación, la suspensión celular se resuspendió cuidadosamente con 200µL de medio de cultivo específico para HCEC [**Anexo 4**]. Las células electroporadas se sembraron de manera equitativa entre 6 pocillos estériles de una placa de 24 (Corning - Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), recubiertos con polilisina-D (Poly-D-lysine hydrobromide, ref.P6407, SIGMA, Misuri, Estados Unidos) diluida al 1:10.

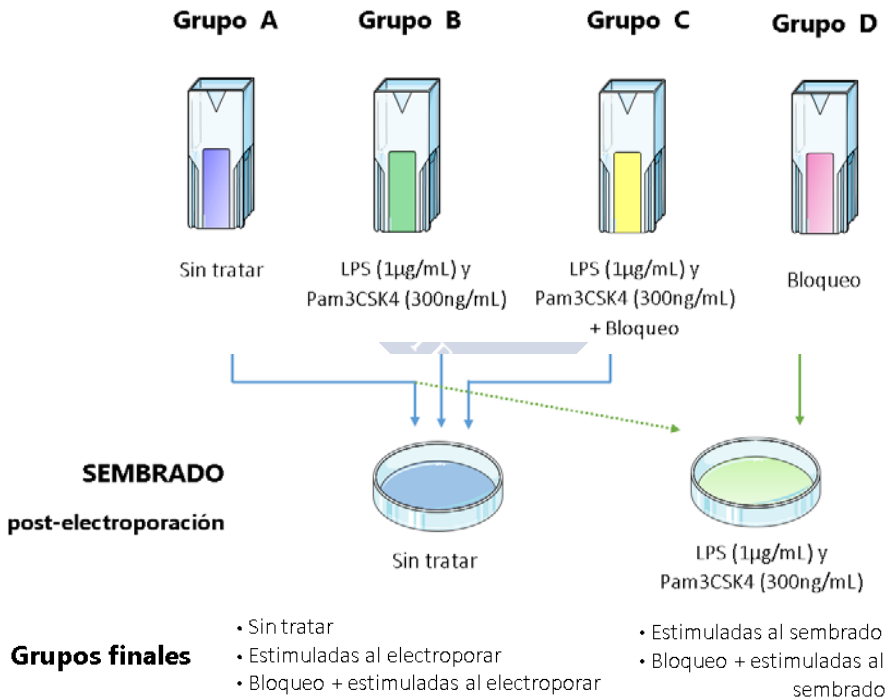
Además, se utilizaron dos tipos de medio de cultivo durante el sembrado:

- I. Medio de cultivo específico de HCEC sin tratar.
- II. Medio de cultivo específico de HCEC tratado con  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS y  $300\text{ng}/\text{mL}$  de Pam3CSK4.<sup>192,193</sup>

Permitiendo establecer las siguientes combinaciones con los grupos de estudio: Grupo B y Grupo C sembrados en medio sin tratar, Grupo D sembrado en medio tratado y Grupo A sembrados en medio sin tratar y en medio tratado. **[Figura.24]**

Tras una incubación de 24 horas (a  $37^\circ\text{C}$ , 95% de humedad y 5% de  $\text{CO}_2$ ), los sobrenadantes fueron recogidos, centrifugados y almacenados a  $-80^\circ\text{C}$  para un análisis posterior, con el fin de evaluar la presencia de citoquinas pro-inflamatorias.

## ELECTROPORACIÓN



**Figura.24.** Grupos de estudio utilizados en el experimento de bloqueo e inmunomodulación con anti-TLR2 y anti-TLR4, Lf o anti-Lf. Figura propia. (CC)

#### 6.2.4.1 Bloqueo con anticuerpos neutralizantes de TLR2 y TLR4.

Para el bloqueo con anticuerpos neutralizantes se utilizaron simultáneamente 20µg/mL<sup>194</sup> de anticuerpo monoclonal anti-TLR2 [TLR2.1] (ref. ab9100, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y 20µg/mL<sup>194</sup> de anticuerpo monoclonal anti-TLR4 [HTA125] (ref. ab30667, Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante el proceso de electroporación de las HCEC.

#### 6.2.4.2 Bloqueo e inmunomodulación con lactoferrina.

Para evaluar la capacidad de la Lf como inmunomodulador de TLR2 y TLR4, se utilizaron 50µg/mL<sup>195</sup> de lactoferrina recombinante humana (rLf) (ref. L1294, SIGMA, Misuri, Estados Unidos) y 20µg/mL<sup>195</sup> de anticuerpo monoclonal de lactoferrina (anti-Lf) (ref. NBP2-29961, NovusBio, Colorado, Estados Unidos); de forma que un aumento de rLf actuaría como bloqueante de la respuesta inflamatoria y la presencia de anti-Lf actuaría realizando el efecto contrario.

#### 6.2.4.3 Evaluación de la respuesta inflamatoria tras el bloqueo.

Se utilizó el mismo método de análisis que el descrito en el *apartado* 6.2.3. Los sobrenadantes obtenidos tras el experimento de bloqueo fueron descongelados en frío y analizados, mediante la técnica multiplex, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Esta vez, se utilizó un kit Milliplex de alta sensibilidad para IL-6, TNFα e IL-10 (Milliplex MapKit. Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel, ref. HSTCMAG-28SK-03, EMD Millipore, Massachusetts, Estados Unidos); mejorando así la sensibilidad de detección de los analitos estudiados (rangos de detección para IL-6, TNFα e IL-10 de: 0.18 a 750 pg/mL, 0.43 a 1750 pg/mL, y 1.46 a 6000 pg/mL; respectivamente).

Los coeficientes intra- e inter-ensayo fueron respectivamente: <5% e <20% para la IL-6, <5% e <15% para el TNFα, e <5% e <20% para la IL-10. La fluorescencia se midió con el programa Bio-Plex Manager del lector de placas Luminex (BioRad, California, Estados Unidos) y los resultados obtenidos en cada muestra fueron corregidos por cantidad total de proteína.

### **6.3 Determinación del contenido proteico.**

La concentración de proteína total presente en cada pocillo se determinó con el fin de ajustar los valores de las citoquinas inflamatorias obtenidos tras el análisis de los sobrenadantes.

Así, tras la recogida de sobrenadante realizada en los experimentos 6.2.2.2 y 6.2.4, las células HCEC de cada pocillo se levantaron mediante tripsinización, utilizando la solución tripsinizadora y neutralizante adecuadas [ver Anexo 4]. Posteriormente, las células fueron transferidas a tubos Eppendorf de 1.5mL estériles, correctamente etiquetados, que se centrifugaron a 150g durante 5 minutos. El pellet celular resultante fue resuspendido en 900  $\mu$ L de PBS (Biowest, Misuri, Estados Unidos), 100 $\mu$ L de buffer RIPA (ref.RO278, SIGMA, Misuri, Estados Unidos) y 2 $\mu$ L de inhibidor de proteasa (ref.04693116001, Roche, Basilea, Suiza) promoviendo la lisis celular. Las muestras se mantuvieron 10 minutos en hielo y agitación antes de su procesado.

El contenido proteico total de los lisados celulares se determinó mediante el Kit de ensayo de proteínas Micro BCA (Micro BCA™ Protein Assay Kit, ref.23235, Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), con un rango de detección proteica de 0.5 a 200 $\mu$ g/mL. Las muestras se cargaron por duplicado en una placa de 96 pocillos (Corning - Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y se realizó su procesado siguiendo los pasos detallados en el protocolo del kit. La lectura de la absorbancia se realizó a 562 nm en el lector de placas Synergy 2 (Biotek, Vermont, Estados Unidos).

### **6.4 Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el Software SPSS 20.0 para Windows (IBM, Nueva York, Estados Unidos). La distribución de los datos se comprobó con el test estadístico Kolmogorov-Smirnov. Ante una distribución normal, las comparaciones bivariadas entre grupos se realizaron con el test t-Student y las comparaciones entre más de 2 grupos con el análisis estadístico ANOVA seguido del test estadístico post-hoc Bonferroni. Los resultados se representaron como media y

desviación estándar de la media (SD) (media  $\pm$ SD) con gráficas de barras. Se consideraron significativos todos los resultados con una  $p < 0.05$ .



## Resultados

### 7.1 Expresión de TLR2 y TLR4 en cultivos de epitelio corneal.

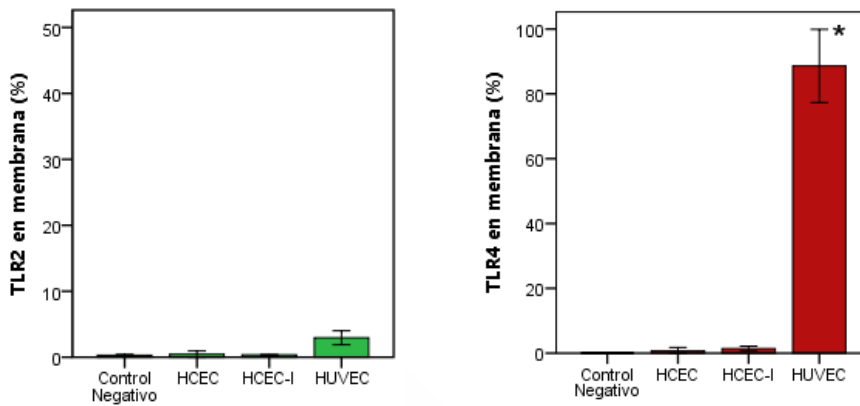
Inicialmente, se evaluó la expresión de TLR2 y TLR4 localizados a nivel de membrana en las células epiteliales corneales del cultivo primario (HCEC) y de la línea inmortalizada (HCEC-I). En la **Tabla.12** se muestran los resultados obtenidos mediante citometría de flujo.

	TLR2 [%]		TLR4 [%]	
	HCEC	HCEC-I	HCEC	HCEC-I
Control Negativo	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
En membrana	0.5 ± 0.5	0.4 ± 0.1	0.7 ± 1.0	1.4 ± 0.8

**Tabla.12.** Porcentaje de expresión de TLR2 y TLR4 a nivel de membrana en HCEC y HCEC-I.

El porcentaje de expresión de TLR2 y TLR4 en membrana celular fue inferior al 1.5%, tanto en los cultivos celulares primarios como en los inmortalizados; indicando una expresión ínfima de proteína TLR2 y TLR4 superficial en células de epitelio corneal.

Para corroborar que estos valores de expresión no se debían a un fallo de protocolo, se utilizó como control positivo un cultivo de células HUVEC. Siguiendo la misma metodología experimental, las células HUVEC presentaron una expresión media de TLR2 del 3% y una expresión media de TLR4 del 84%, a nivel de membrana. La **Figura.25** representa los resultados obtenidos mediante citometría de flujo en epitelio corneal y en células HUVEC (como control positivo).



**Figura.25.** Porcentaje de expresión de TLR2 y TLR4 a nivel de membrana en HCEC, HCEC-I y HUVEC. \* $p < 0.05$  con respecto a las demás variables. (N= 3 por grupo).

Debido a la escasa expresión de TLR2 y TLR4 a nivel de membrana en las células epiteliales corneales, se evaluó la expresión de ambos receptores a nivel intracelular. La **Tabla.13** muestra la expresión de TLR2 y TLR4 intracelular, analizada mediante citometría de flujo tras un proceso de permeabilización de las membranas celulares.

	TLR2 [%]		TLR4 [%]	
	HCEC	HCEC-I	HCEC	HCEC-I
Control Negativo	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
Intracelular	35.1 ± 12.0	0.6 ± 0.0	44.1 ± 5.3	16.7 ± 3.8

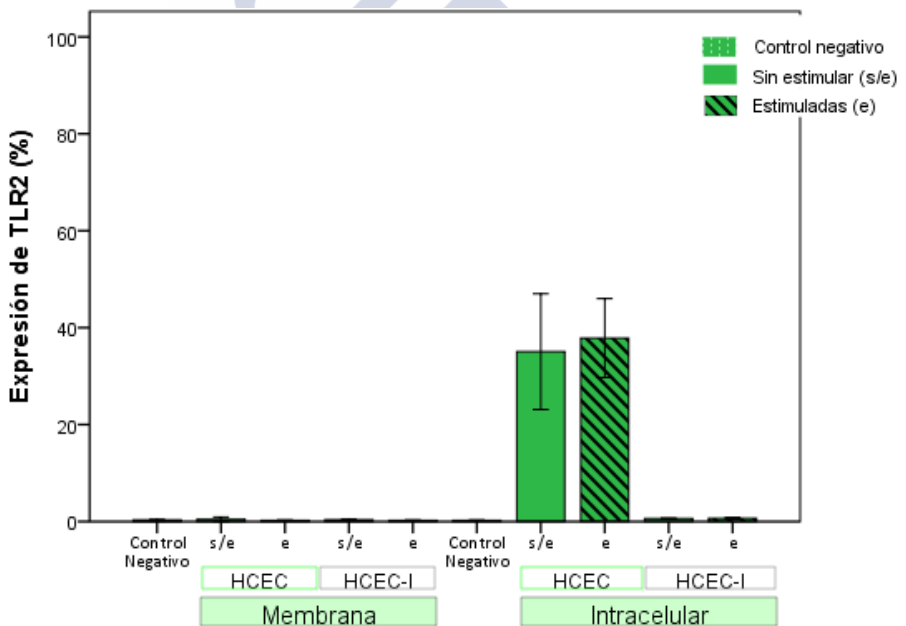
**Tabla.13.** Porcentaje de expresión de TLR2 y TLR4 intracelular en HCEC y HCEC-I.

Los resultados evidencian la expresión de TLR2 y TLR4 intracelular en cultivos de células epiteliales corneales. Siendo significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) la expresión intracelular media de TLR4 en el cultivo primario (44%) que en la línea inmortalizada (17%); y a su vez, ambos con respecto a los controles negativos. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión intracelular de TLR2 entre HCEC y HCEC-I ( $p = 0.153$ ), ni entre ambos y los controles negativos ( $p > 0.05$ ).

## 7.2 Estimulación de TLR2 y TLR4.

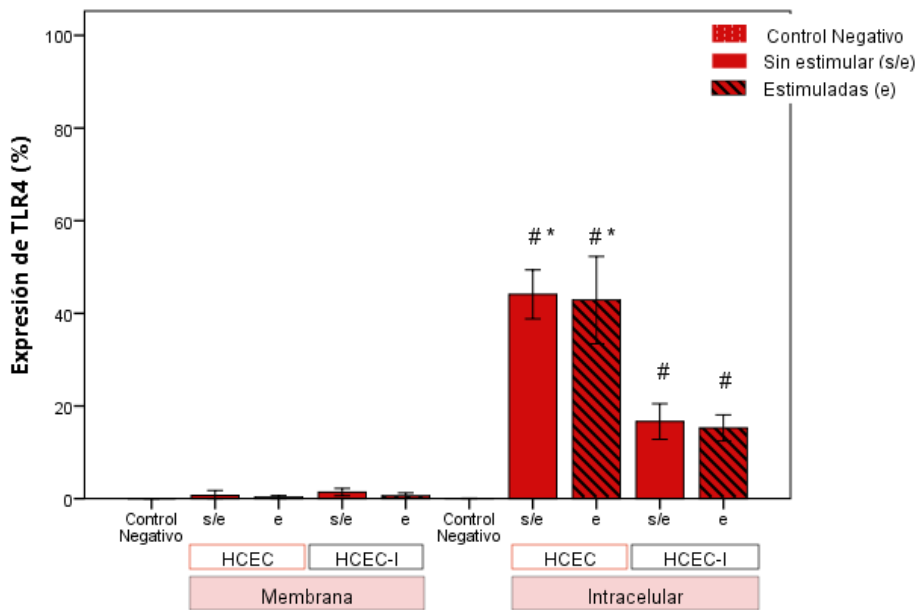
### 7.2.1 Estimulación con LPS y Pam3CSK4.

La incubación de HCEC y HCEC-I durante 24 horas con 1 $\mu$ g/mL de LPS y 300ng/mL de Pam3CSK4, no modificó los patrones de expresión de TLR2 y TLR4. En la **Figura.26**, se representan los valores de expresión de TLR2 sin estimular y post-estimulación, tanto a nivel de membrana como intracelular, para cultivos HCEC y HCEC-I. La estimulación con Pam3CSK4 a la dosis previamente descrita no modificó el patrón de expresión del TLR2 intracelular ( $p=0.488$  para HCEC).



**Figura.26.** Porcentajes de expresión de TLR2, en membrana e intracelular, obtenidos mediante citometría de flujo en cultivos HCEC y HCEC-I, sin estimular y tras una estimulación de 24 horas con 300ng/mL de Pam3CSK4. (N= 3 por grupo).

La **Figura.27**, representa el porcentaje de expresión de TLR4 sin estimular y post-estimulación, en membrana e intracelular, para HCEC y HCEC-I. La estimulación con LPS tampoco modificó el patrón de expresión del TLR4 intracelular ( $p=0.858$  y  $p=0.748$ , respectivamente para HCEC y HCEC-I).

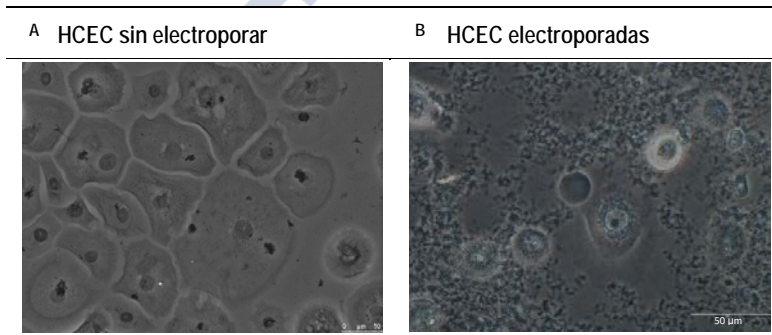


**Figura.27.** Porcentajes de expresión de TLR4, en membrana e intracelular, obtenidos mediante citometría de flujo en cultivos HCEC y HCEC-I, sin estimular y tras una estimulación de 24 horas con  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS. \* $p<0.05$  con respecto a HCEC-I intracelular; # $p<0.05$  con respecto a los valores obtenidos en membrana y a los controles negativos. (N= 3 por grupo).

Debido al mayor porcentaje de TLR2 y TLR4 intracelular obtenido en los cultivos HCEC con respecto a los cultivos HCEC-I, los experimentos realizados a continuación se llevaron a cabo solamente en cultivos primarios de epitelio corneal.

### 7.2.2 Electroporación y estimulación con LPS y Pam3CSK4.

Puesto que la incubación con LPS y Pam3CSK4 no generó la sobreexpresión de TLR2 y TLR4 esperada, se utilizó la técnica de electroporación celular para una mayor internalización de los estimuladores de TLR2 y TLR4. La **Figura.28** muestra células HCEC sin electroporar y electroporadas, por microscopía de campo claro a 40x. Se evidencia la alteración que sufre la membrana plasmática celular tras el proceso de electroporación, al producirse la apertura de poros y el aumento de restos celulares en el medio de cultivo.



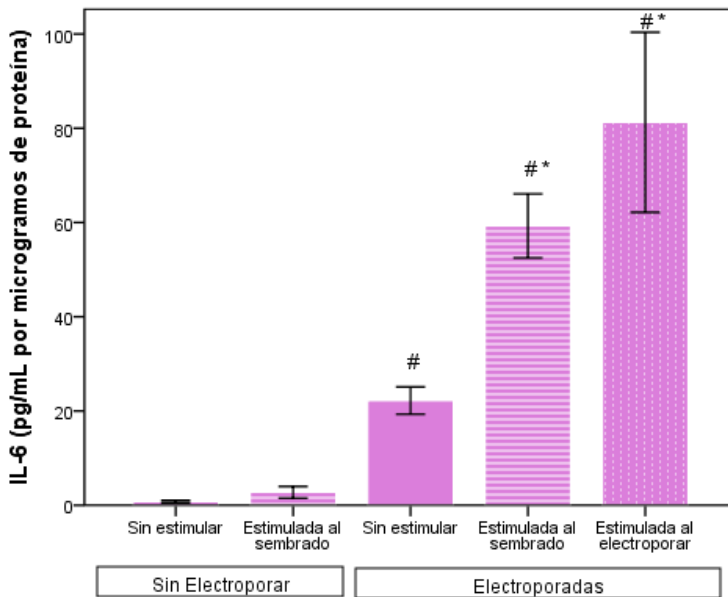
**Figura.28.** A) células HCEC sin electroporar; B) células HCEC electroporadas. Ambas fotografiadas a las 8 horas del sembrado. (Escala: 50µm).

Para evaluar la efectividad de estimulación de TLR2 y TLR4 intracelular se analizó la respuesta inflamatoria generada, comparando la concentración de citoquinas proinflamatorias liberadas al medio de cultivo en los siguientes grupos:

1. Cultivos sin estimular.
2. Cultivos estimulados según el método del *apartado 7.2.1*.
3. Cultivos electroporados, sin y con estimulación.

La **Figura.29** muestra las concentraciones de IL-6, encontradas en el sobrenadante de cultivos HCEC, para los grupos previamente descritos. Se observa como la electroporación induce un aumento de expresión de IL-6 ( $p < 0.05$ ). Además, al combinar electroporación y estimulación, se genera una expresión de IL-6

significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que al electroporar sin estimular. Sin embargo, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.265$ ) entre realizar la estimulación durante el proceso de electroporación o, posterior a ella, durante el sembrado.

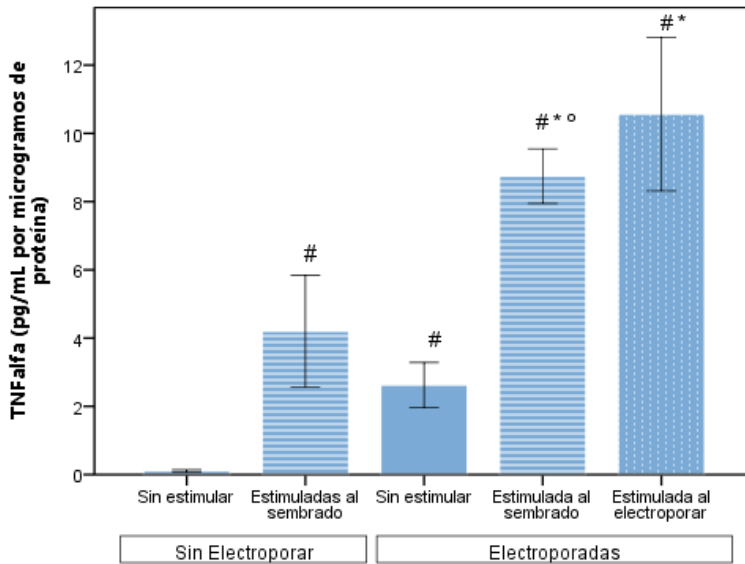


**Figura.29.** Concentraciones de IL-6 (ajustadas a  $\mu\text{g}$  de proteína) en el sobrenadante de cultivos HCEC sometidos a varios tipos de estimulación. #  $p < 0.05$  con respecto a las células no electroporadas (sin o con estimulación), \* $p < 0.05$  con respecto a las células electroporadas sin estimular. (N=4 por grupo).

Al igual que ocurre con IL-6, la expresión de  $\text{TNF}\alpha$  es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) al combinar electroporación y estimulación, que al electroporar sin estimular. Por otro lado, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en los niveles de concentración de  $\text{TNF}\alpha$  al realizar la estimulación durante la electroporación o, después de ella, durante el sembrado ( $p = 0.389$ ). Estos resultados se muestran en la **Figura.30**.

Los resultados obtenidos para IL-6 y  $\text{TNF}\alpha$ , evidencian que la utilización combinada de electroporación y estimulación (con  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS y  $300\text{ng}/\text{mL}$  de

Pam3CSK4) proporciona una respuesta inflamatoria exacerbada. Confirmándose así, indirectamente, la funcionalidad de la estimulación de los receptores TLR2 y TLR4. De este modo se obtiene una simulación *in vitro* del mecanismo inflamatorio presente en las ectasias corneales. Utilizaremos este modelo para evaluar el posible efecto terapéutico del bloqueo de la actividad inflamatoria de TLR2 y TLR4.



**Figura.30.** Concentraciones de TNF $\alpha$  (ajustadas a  $\mu\text{g}$  de proteína) en el sobrenadante de cultivos HCEC sometidos a varios tipos de estimulación. #  $p < 0.05$  con respecto a células sin electroporar ni estimular; \*  $p < 0.05$  con respecto a células electroporadas sin estimular. °  $p < 0.05$  con respecto a células sin electroporar pero estimuladas. (N=4 por grupo)

### 7.3 Bloqueo de la respuesta inflamatoria obtenida tras la estimulación de TLR2 y TLR4.

Para inmunomodular la respuesta inflamatoria, las células HCEC se trataron con anticuerpos neutralizantes de TLR2 y TLR4 ( $20\mu\text{g/mL}$  cada uno), con Lf recombinante

humana (50µg/mL) y con anti-Lf (20µg/mL). El tratamiento se llevó a cabo durante el proceso de electroporación, combinándolo además con dos tipos de estimulación: una durante la electroporación y otra tras ella, durante el sembrado; ambas con 1 µg/mL de LPS y 300ng/mL de Pam3CSK4.

Como control negativo se utilizaron células HCEC electroporadas sin estimular. Como controles positivos, para evaluar la modulación de la respuesta inflamatoria, se utilizaron células HCEC electroporadas, estimuladas durante la electroporación y estimuladas al sembrado. Los sobrenadantes obtenidos a las 24 horas, se recogieron para el análisis de moléculas inflamatorias como IL-6, TNFα e IL-10.

### 7.3.1 Bloqueo con anticuerpos neutralizantes de TLR2 y TLR4.

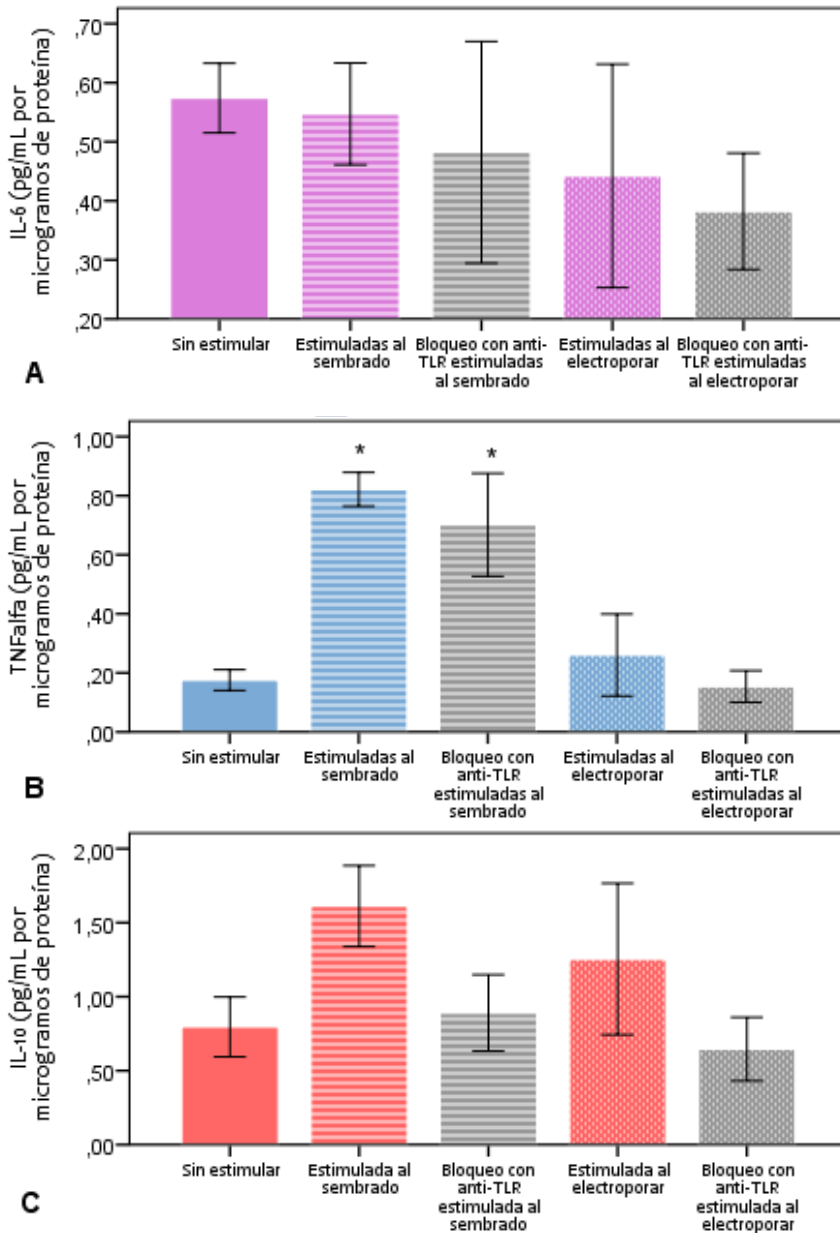
La expresión de IL-6, TNFα e IL-10 tras el bloqueo simultáneo con 20µg/mL de anticuerpo neutralizante de TLR2 y 20µg/mL de anticuerpo neutralizante de TLR4, se representa en la **Figura.31**.

El bloqueo simultáneo de TLR2 y TLR4 con anticuerpos neutralizantes induce una disminución de la respuesta inflamatoria evaluada por los niveles de IL-6, TNFα e IL-10; aunque en ningún caso esta reducción fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

De las tres moléculas inflamatorias analizadas, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los niveles de TNFα generados por células estimuladas durante el sembrado (con o sin bloqueo) frente a los generados por células estimuladas durante la electroporación (con o sin bloqueo).

Desafortunadamente, la estimulación con LPS y Pam3CSK4 no indujo la sobreexpresión inflamatoria previamente observada; hecho que puede estar minimizando el efecto del bloqueo de TLR2 y TLR4 con los anticuerpos neutralizantes.

Cabría esperar que la expresión de IL-6 e IL-10 fuese significativamente mayor en las muestras estimuladas que en las no estimuladas, tal y como ocurre en el apartado 7.2.2 y en la gráfica B de la **Figura.31**. Debido a ello, no se pueden sacar conclusiones sobre la efectividad del bloqueo de la respuesta inflamatoria con anticuerpos neutralizantes de los TLRs.



**Figura.31.** Expresión de IL-6 (A), TNF $\alpha$  (B) e IL-10 (C); en HCEC electroporadas sin estimular, estimuladas, y bloqueadas con anticuerpos neutralizantes de TLR2 y TLR4. \* $p < 0.05$  con respecto a HCEC “sin estimular”, “estimuladas al electroporar” y “bloqueadas con anti-TLR, estimuladas al electroporar”. (N=6 por grupo).

### 7.3.2 Tratamiento con Lf recombinante (rLf).

La expresión de IL-6, TNF $\alpha$  e IL-10 tras el tratamiento con 50 $\mu$ g/mL de rLf se representa en la **Figura.32**. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de IL-6 e IL-10 en las muestras estimuladas con respecto a las muestras sin estimular. Tan solo se obtuvieron diferencias significativas entre la concentración de TNF $\alpha$  en las muestras estimuladas al sembrado frente a las muestras sin estimular ( $p < 0.001$ ).

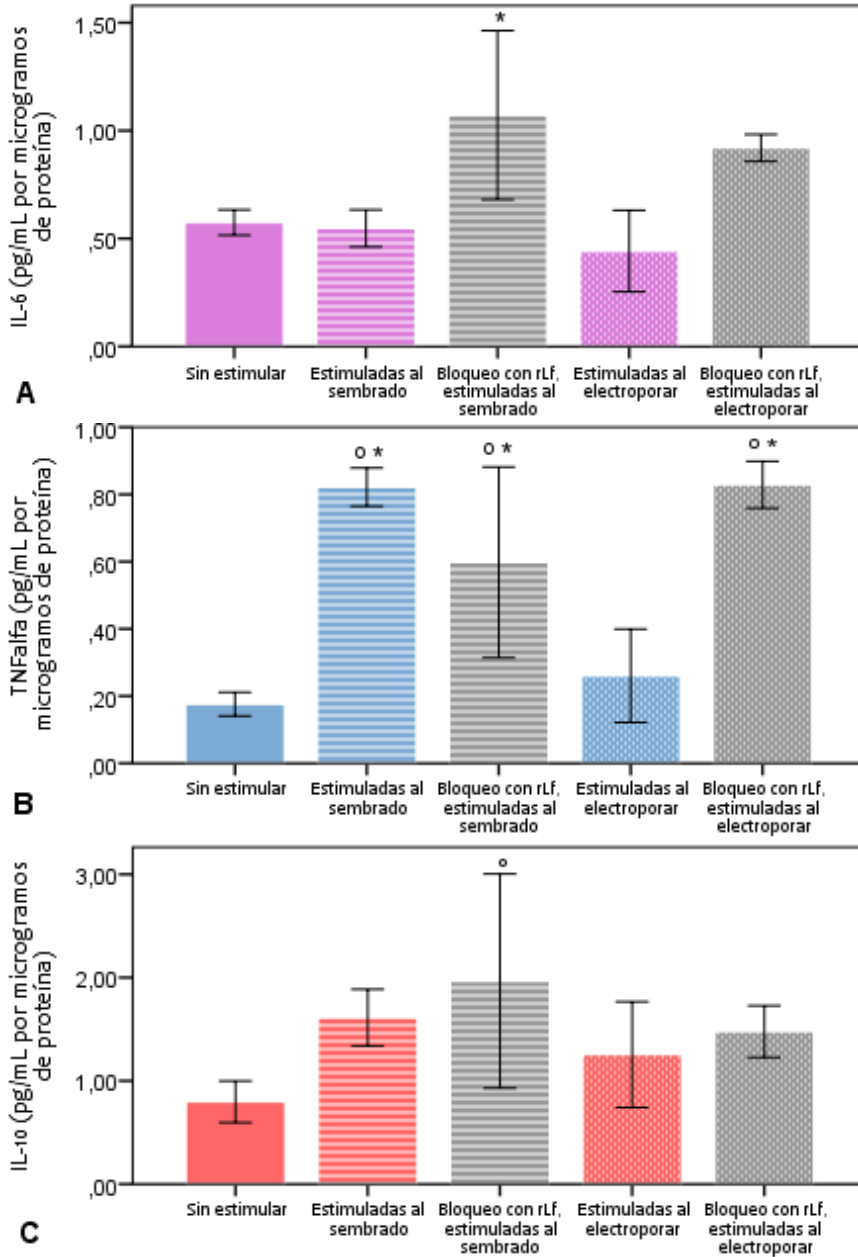
Por otro lado, para evaluar el efecto proporcionado por el tratamiento con rLf en cada molécula inflamatoria, se comparó la expresión obtenida tras el bloqueo con respecto a la expresión obtenida en sus controles “positivos” estimulados. Como resultado, los niveles de IL-6 e IL-10 aumentaron tras el tratamiento con rLf; sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo. En cuanto a la expresión de TNF $\alpha$ , el tratamiento con rLf durante la electroporación supuso un aumento con respecto a su control positivo estimulado; siendo este aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ). Por la contra, el valor de TNF $\alpha$  obtenido tras el tratamiento con rLf en la muestra estimulada al sembrado disminuyó con respecto al valor de su control positivo, aunque no de manera significativa.

### 7.3.3 Bloqueo con anticuerpo de Lf (anti-Lf).

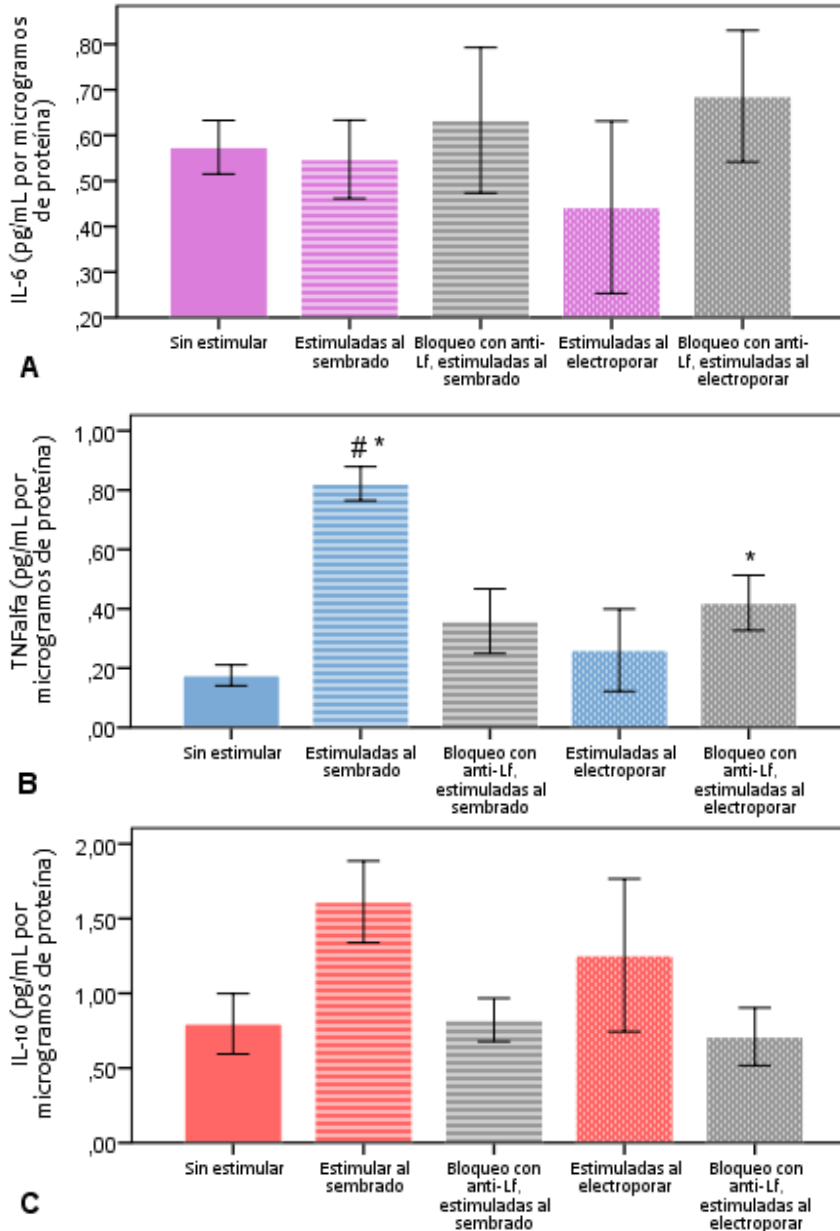
La **Figura.33** muestra la expresión de IL-6, TNF $\alpha$  e IL-10 tras el bloqueo con el anticuerpo de Lf.

La expresión de TNF $\alpha$  tras el bloqueo con 20 $\mu$ g/mL de anti-Lf es diferente según se aplique sobre células estimuladas durante el sembrado o sobre células estimuladas durante la electroporación. En el primer caso, el bloqueo induce una disminución estadísticamente significativa de la concentración de TNF $\alpha$  ( $p < 0.001$ ); mientras que en el segundo, se aprecia un leve aumento aunque sin relevancia estadística.

La expresión de IL-6 tras el tratamiento con anti-Lf se ve aumentada, pero sin mostrar diferencias estadísticas significativas con respecto al control “positivo” estimulado. La expresión de IL-10 tras el bloqueo con anti-Lf muestra valores más reducidos que sus controles estimulados; aunque esta reducción tampoco es estadísticamente significativa.



**Figura.32.** Expresión de IL-6 (A), TNFα (B) e IL-10 (C); en HCEC electroporadas sin estimular, estimuladas, y tratadas con rLf. °  $p < 0.05$  con respecto a HCEC “sin estimular”, \* $p < 0.05$  con respecto a HCEC “estimuladas al electroporar”. (N=6 por grupo).



**Figura.33.** Expresión de IL-6 (A), TNF $\alpha$  (B) e IL-10 (C); en HCEC electroporadas sin estimular, estimuladas, y bloqueadas con anti-Lf. \* $p < 0,05$  con respecto a HCEC “sin estimular”, # $p < 0,05$  con respecto a HCEC “estimuladas al electroporar” y “bloqueadas con anti-Lf, estimuladas al sembrado”. (N=6 por grupo).

INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

ESTUDIO CLÍNICO

ESTUDIO *IN VITRO*

**DISCUSIÓN**

CONCLUSIONES





En este trabajo se ha evaluado la utilidad diagnóstica y pronóstica de los receptores TLR2 y TLR4 en pacientes con ectasia corneal (QC y DPM) y en sus familiares de primer orden. A su vez, se ha examinado la asociación de estos receptores con posibles ligandos endógenos presentes en lágrima (cFn, HSP60 y Lf). Por otro lado, mediante un estudio *in vitro* en cultivos celulares primarios e inmortalizados de epitelio corneal humano, se ha investigado la expresión y estimulación de TLR2 y TLR4, y el bloqueo de ambos receptores como posible diana terapéutica anti-inflamatoria para la ectasia corneal.

### **8.1 Expresión de TLR2 y TLR4 en los grupos de estudio: correlación con el grado de ectasia corneal e influencia de las características de la muestra.**

Desde hace años, el estudio de la inflamación como mecanismo fisiopatológico del QC ha sido el objetivo de numerosas investigaciones, viéndose que el desequilibrio entre moléculas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, así como entre enzimas que causan la degradación de la matriz extracelular y sus inhibidores, y el estrés oxidativo son eventos que actúan simultáneamente y que conducen a la progresión de la enfermedad.<sup>196-199</sup> Sin embargo, todavía no está claro si estas alteraciones son una causa o un efecto de ella. En este sentido, varios estudios clínicos apoyan la idea de que su patogenia implica un componente inmune además del inflamatorio.<sup>139,179,200</sup>

En este trabajo se demuestra la alteración de la inmunidad innata en la superficie ocular de pacientes con ectasia corneal respecto a sujetos familiares y control. El análisis de TLR2 y TLR4 en el tejido epitelial corneal y conjuntival de nuestros grupos de estudio (QC, DPM, familiares de primer orden y controles), evidenció que la expresión de estos receptores inmunes es superior en pacientes con QC y DPM que en sus familiares de primer orden, y en ambos casos mayor que en sujetos control. Los biomarcadores estudiados, tanto en córnea como en conjuntiva, permiten diferenciar claramente a los pacientes con ectasia corneal de los sujetos control, aunque de todos ellos, el TLR2 corneal y el TLR4 conjuntival son los que mejor discriminan, respectivamente, entre los pacientes con QC y DPM, y los sujetos sanos.

Por lo tanto, la inflamación en el QC y en la DPM podría ser inmuno-innata dependiente; constituyendo, al igual que ocurre en otras enfermedades degenerativas, un proceso progresivo crónico en el que la alteración de la inmunomodulación y de la reparación conlleva a la destrucción tisular.

Nuestros resultados corroboran la alteración conjuntival en la patología ectásica. Dicha alteración parece tener más relevancia en la DPM, y quizás, esto pueda contribuir a las diferencias morfológicas existentes con respecto al QC. El hecho de que la DPM sea una condición menos común, hace que el estudio de su fisiopatología sea muy limitado. Hasta el momento, tan solo Páztor et al,<sup>53</sup> han estudiado la concentración de diversos mediadores inflamatorios (IL-6, IL-10, MMP9, TIMP1...) con el fin de determinar desigualdades bioquímicas entre DPM y QC. Concluyeron que la MMP9 fue el único mediador que presentaba diferencias relevantes entre ambos grupos de pacientes; y consecuentemente, el ratio entre esta metaloproteasa y su inhibidor (TIMP1), fue superior en la DPM frente al QC y los sujetos control (2.45, 0.40 y 0.23, respectivamente). Estos resultados sugieren que la degradación tisular podría ser más pronunciada en la DPM. Las alteraciones inflamatorias e inmunes en ambos tipos de ectasia corneal apoyan la afirmación del Consenso Global de Queratocono y Enfermedades Ectásicas<sup>11</sup> acerca de que el QC y la DPM constituyen diferentes presentaciones clínicas de la misma enfermedad, pudiendo representar un final común de similares procesos patológicos.

En nuestro estudio, los familiares de primer orden de pacientes con ectasia corneal presentaron cierta alteración tisular. En ellos, tal y como cabría esperar, la expresión de TLR2 y TLR4 fue inferior que en los grupos patológicos (QC y DPM) pero notablemente superior al grupo control, mostrando, con respecto a este último grupo, diferencias estadísticamente significativas en TLR2, corneal y conjuntival, y en TLR4 conjuntival. Este hallazgo corrobora la hipótesis de que los familiares de pacientes con ectasia corneal presentan mayor predisposición para el posible desarrollo de la enfermedad. Si bien es cierto que, en muchos casos, este grupo de sujetos suelen tener una elevada prevalencia de ectasia no diagnosticada,<sup>201</sup> nuestro estudio fue muy estricto en la selección de los sujetos, de manera que, en ningún caso, se incluyeron ectasias subclínicas. Prueba de ello es la similitud en los valores clínicos, siempre pareados, entre los familiares y el grupo control. Naderan et al<sup>96</sup> sugieren que la elevada prevalencia de H<sup>a</sup> familiar entre los pacientes con QC puede deberse tanto a factores ambientales como genéticos. En consecuencia, es importante tener especial cuidado con este grupo de estudio, realizar un seguimiento más exhaustivo y valorar con extremada atención si van a ser sometidos a cirugía refractiva. La detección de biomarcadores en familiares en los que no existe sospecha diagnóstica de ectasia corneal sería muy útil como prueba preoperatoria decisiva.

Por otro lado, estudios recientes demuestran que los cambios moleculares asociados a la ectasia corneal no solo se reflejan en la superficie ocular, sino que también pueden reflejarse a nivel sistémico. Toprak et al<sup>202</sup> observaron que, en la patogénesis del QC, el estrés oxidativo no solo tiene un papel local, sino que también existen alteraciones sanguíneas en el estado oxidativo y antioxidante. En línea con

estos resultados, a finales de 2017, nuestro grupo de trabajo publicó un estudio en el que se evaluó la expresión de TLR2 y TLR4 en monocitos y neutrófilos de pacientes con QC en comparación con sujetos control.<sup>179</sup> La expresión de TLR2 y TLR4 en ambos tipos celulares fue significativamente superior en los pacientes con QC; observándose, además, una fuerte correlación entre la expresión de TLR2 (en monocitos y neutrófilos) y de TLR4 (en monocitos) con los niveles séricos de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , MMP9 y NF- $\kappa$ B. Estos hallazgos a nivel sistémico podrían relacionarse con la afectación de la superficie ocular, pero no se encontró ninguna correlación entre la expresión de TLR2 y TLR4 (en monocitos y neutrófilos) y el grado de evolución en el ojo más avanzado de QC.

En este estudio, sin embargo, al comparar el grado de afectación del QC y de la DPM con la expresión de TLR2 y TLR4 en tejido corneal y conjuntival, observamos cómo, localmente, sí que se establece una fuerte correlación entre ambos parámetros. Para corroborar la consistencia de esta correlación utilizamos diferentes variables topográficas y tomográficas como indicadores cuantitativos del grado de ectasia. Los índices topográficos permiten valorar la evolución de la ectasia corneal.<sup>203</sup> En nuestro trabajo, todos los índices topográficos utilizados (PDmáx, KPI y asimetría I-S) mostraron una fuerte correlación positiva con los TLRs; especialmente el índice KPI con TLR2 y TLR4 corneal en el QC, y con TLR4 corneal y conjuntival en la DPM. Los valores aberrométricos también son buenos indicadores de la afectación. Delgado et al<sup>204</sup> y Colak et al<sup>205</sup>, confirman que las aberraciones de alto orden en la cara anterior de la córnea se correlacionan de forma positiva con el grado de QC, y por tanto, suponen una herramienta útil para el abordaje diagnóstico y para la clasificación de la enfermedad. En nuestro estudio, los valores aberrométricos obtenidos en ambos tipos de ectasia corneal mostraron una correlación positiva con los TLRs estudiados; de modo que, a mayor valor de  $Z_3^{+1}$  y de Coma-like, mayor expresión de TLR2 y TLR4 corneal y conjuntival. Los valores tomográficos de elevación, tanto de la cara anterior como de la cara posterior, siguieron una correlación similar a la obtenida con los valores aberrométricos. En cuanto a la paquimetría mínima, también definida como un parámetro de gradación,<sup>11</sup> se observó una correlación negativa con la expresión de TLR2 y TLR4 en QC; de modo que a menor valor paquimétrico, mayor expresión de estos receptores inmunes corneales y conjuntivales. Todo ello, confirma que cuanto más avanzada es la enfermedad más altos son los valores de los receptores Toll-like.

Con respecto a la influencia de las variables epidemiológicas en los resultados obtenidos, el cumplimiento estricto de los criterios de selección contribuye a evitar cualquier sesgo de inclusión. Sin embargo, algunas variables, como la edad o la distribución por sexos, podrían suponer una limitación en este estudio.

La diferencia de edad entre los grupos de estudio se debe al distinto curso de progresión que sigue cada patología. La edad media de presentación de la DPM es más elevada que la del QC;<sup>20</sup> esto explica que, para poder estudiar ambas patologías en similares condiciones de gravedad, el reclutamiento de pacientes será realizado a distintas edades. Lo mismo ocurre con el grupo de familiares de primer orden que, por tratarse de hijos o hermanos de los pacientes con ectasia corneal, la edad media en este grupo será menor. Páztor et al<sup>53</sup> afirman haber demostrado que la concentración de MMP9 lagrimal en su muestra de estudio no se alteró significativamente con la edad. Podríamos deducir que si a nivel inflamatorio no existen cambios con la edad, tampoco tendría porque haberlos a nivel inmune, pero a día de hoy no encontramos ningún estudio que resolviese esta cuestión. La distribución de hombres y mujeres difirió significativamente entre los grupos de estudio debido a la alta prevalencia de hombres en la DPM. La predominancia de hombres en la DPM es un hecho ampliamente estudiado.<sup>19,20</sup> Goto et al<sup>206</sup> observaron que las diferencias entre sexos no influían en los resultados de su estudio topográfico. Si extrapolamos este hallazgo a nuestro estudio, la diferencia entre sexos no debería de suponer una limitación.

Podemos destacar que ni la enfermedad alérgica ni el porte de LC influyeron en los resultados obtenidos. Tal y como mencionamos en el *apartado 4.3*, incluimos como “enfermedad alérgica” a las condiciones atópicas (como rinitis, asma y dermatitis atópica) y a las alergias alimenticias, a medicamentos, a picaduras de insectos y a animales. A pesar de que numerosos estudios confirman la asociación entre QC y enfermedad atópica o alérgica, no solo como factor que desencadena una manifestación más temprana de la enfermedad,<sup>207</sup> sino también como factor asociado a su gravedad,<sup>208</sup> en nuestra muestra, la presencia de esta afectación fue similar en todos los grupos estudiados y no mostró ninguna correlación con la expresión de los receptores Toll-like. Del mismo modo, podemos confirmar que el porte de LC no interfirió en los niveles de TLR2 y TLR4. Sabiendo el efecto que causan las LC en los marcadores inflamatorios,<sup>58</sup> como criterio de inclusión, en este trabajo suspendimos el uso de LC una semana antes de la recogida de muestra.

Por otro lado, nuestros resultados respaldan que el picor y el frotamiento ocular sí son factores de riesgo asociados al desarrollo de la ectasia corneal, y además establecen una correlación positiva con la expresión de los receptores Toll-like corneales y conjuntivales. Además, el grupo de familiares presenta cierta predisposición al picor y al frotamiento ocular cuando se compara con el grupo control, aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo. Es sabido que el frotamiento intenso aumenta los niveles de proteasas y mediadores inflamatorios en la superficie ocular.<sup>9</sup> Varios estudios confirman la elevada prevalencia de frotamiento ocular en los pacientes con ectasia,<sup>41,42,96</sup> sugiriendo que dicho frotamiento puede

estar asociado con su patogénesis y progresión. Todo esto recuerda la importancia de guiar a los pacientes para que eviten el frotamiento ocular continuado.

El estudio de la AVL y de los signos biomicroscópicos evidenció el cumplimiento de los criterios de inclusión, ya que estas variables clínicas junto con el examen topográfico, aberrométrico y tomográfico, distinguen entre sano y patológico e indican el grado de afectación de la enfermedad.

Finalmente, cabe destacar que en córneas con QC, incluso en estados leves, se ha demostrado una morfología anómala del nervio subbasal, pudiendo deberse a que estas córneas presentan una alteración del receptor del factor de crecimiento nervioso.<sup>209,210</sup> En 2015 se publicó el primer estudio en familiares de pacientes con QC en el que se observó la presencia de nervios corneales prominentes en las córneas de parientes no afectados.<sup>209</sup> Observaron que, en ocasiones, esta presencia se asociaba a variaciones topográficas mínimas, y concluyeron que si este signo se suma a otras alarmas topográficas o tomográficas podría utilizarse para la discriminación de formas subclínicas de QC. En nuestro estudio, ninguno de los familiares de primer orden seleccionados tenía valores característicos de ectasia corneal subclínica, sin embargo, observamos una alta presencia de nervios corneales visibles. Este hallazgo justifica, una vez más, la especial atención que se debe de poner en estos pacientes ante la posibilidad de que lleguen a desarrollar la ectasia.

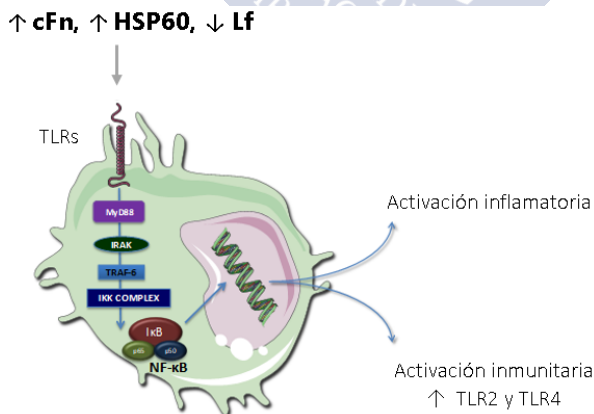
## **8.2 Expresión de ligandos endógenos en lágrima y su correlación con los TLRs.**

Estudiar la composición proteómica, lipidómica y metabolómica de la película lagrimal supone una herramienta útil para la detección de enfermedades oculares y sistémicas; además, no solo proporciona información sobre el origen y el desarrollo de la enfermedad, sino que permite diseñar herramientas diagnósticas y nuevas opciones terapéuticas.<sup>211</sup> El análisis lagrimal, en la ectasia corneal, permitió establecer a la inflamación como un importante mecanismo molecular implicado en la patogenia de la enfermedad.<sup>52,120,134,139</sup>

La forma mínimamente invasiva y la poca incomodidad que padece el paciente durante el proceso de recogida, convierten a la lágrima en un fluido biológico óptimo para su estudio. El método más comúnmente utilizado para recoger muestra lagrimal es por microtubo capilar, aunque también existen otros métodos como los filtros de acetato o las tiras de Schirmer.<sup>53,212</sup> La prueba de Schirmer se utiliza rutinariamente

en la evaluación de la sequedad ocular para medir el volumen lagrimal. La utilización de estas tiras como método de recogida lagrimal tiene un valor añadido frente al resto de métodos, ya que, ofrece la oportunidad de evaluar tanto la cantidad como la calidad de la lágrima y evita la realización de un paso adicional en el examen clínico, ahorrando tiempo al paciente y al investigador.<sup>211,212</sup> Sin embargo, su utilización puede inducir lagrimeo reflejo como consecuencia de la irritación provocada por la tira en el tejido conjuntival; por este motivo, en nuestro estudio fuimos extremadamente cuidadosos durante la recogida, con el fin de minimizar errores metodológicos. La prueba se realizó siempre en iguales condiciones y tiempos para todos los pacientes y sujetos de estudio.

El análisis lagrimal también puede suponer un desafío, ya que, debido al pequeño volumen de muestra recogida, se necesitan métodos de detección muy sensibles.<sup>211</sup> La técnica ELISA es el método más comúnmente utilizado, por ser un ensayo cuantitativo que ofrece una elevada sensibilidad y fiabilidad para este tipo de análisis. Por otro lado, la tecnología multiplex permite medir simultáneamente numerosas moléculas en pequeños volúmenes de muestra.<sup>53</sup> En este estudio examinamos la expresión de tres potenciales ligandos endógenos lagrimales (cFn, HSP60 y Lf) implicados en la activación de TLR2 y TLR4. A pesar de las ventajas que ofrece la tecnología multiplex, actualmente no se ha diseñado ninguna placa que incluya el análisis simultáneo de estos tres analitos, por ello empleamos la técnica ELISA. Según nuestra hipótesis la expresión de TLR2 y TLR4, corneal y conjuntival, debería correlacionarse con cambios de concentración en los ligandos endógenos lagrimales estudiados. [Figura.34]



**Figura.34.** Asociación entre los cambios de concentración en los posibles ligandos endógenos lagrimales y la expresión de TLRs. Figura propia. (CC).

La fibronectina es una glucoproteína de alto peso molecular que se encuentra en la matriz extracelular y en fluidos corporales como el plasma, el líquido amniótico y la lágrima.<sup>213</sup> La fibronectina lagrimal puede proceder de los vasos sanguíneos conjuntivales, de la glándula lagrimal o de la propia córnea.<sup>213,214</sup> Estudios recientes han confirmado que las córneas con QC muestran una mayor deposición de esta glucoproteína, en la membrana basal epitelial<sup>215</sup> y en el estroma medio-anterior<sup>216</sup>, al compararlos con controles normales. La fibronectina tiene una serie de funciones biológicas, que incluyen la promoción de la adhesión, la migración y la diferenciación celular, así como la mejora de la actividad fagocítica; además, juega un papel importante en la curación de heridas de la superficie ocular.<sup>217</sup> El aumento de los niveles de fibronectina celular en lágrima tras la cirugía refractiva corneal, parecen contribuir a la curación del defecto epitelial provocado.<sup>218</sup> Por otro lado, cabe destacar, que también se ha observado un aumento de cFn durante procesos inflamatorios en los pulmones, en las articulaciones y en la película lagrimal durante el cierre palpebral (que induce un estado de inflamación subclínica en la superficie ocular).<sup>213</sup> Sabiendo que la cFn es un ligando de TLR2 y TLR4, y que su alteración en córneas con QC y en procesos inflamatorios es evidente; cabría esperar que nuestros resultados mostrasen una correlación positiva entre la concentración de cFn lagrimal y la expresión de los receptores Toll-like. Sin embargo, la concentración de cFn obtenida en el grupo QC no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los sujetos sanos; tampoco se correlacionó con la expresión de TLRs ni con los marcadores de evolución de la enfermedad. En contraste con estos resultados, los niveles de cFn se correlacionaron fuertemente y de manera positiva con la expresión de TLR2 conjuntival y con  $Z_3^{+1}$  en los pacientes con DPM. La concentración de cFn en la DPM fue casi 3 veces mayor a la obtenida en QC y en controles, y aproximadamente 4 veces mayor a la obtenida en familiares de primer orden.

Las proteínas de choque térmico (HSP) constituyen un grupo heterogéneo de moléculas asociadas, generalmente, a la respuesta frente al estrés oxidativo.<sup>219</sup> La HSP60 puede actuar como un agente anti- o pro- inflamatorio y, aunque se considera una chaperona típicamente mitocondrial, también puede localizarse en el citosol, en la superficie celular, en el espacio extracelular y en la sangre periférica. El aumento de HSP60 extracelular sirve como una señal de peligro que conlleva a la activación del sistema inmune,<sup>220</sup> pudiendo interactuar con TLR2 y TLR4. Cuando actúa como un agente pro-inflamatorio, la HSP60 induce la secreción de citoquinas, la liberación de TNF $\alpha$  y la activación de NF- $\kappa$ B.<sup>219,221</sup> Este es el primer estudio que evalúa la presencia y la participación de la HSP60 en la ectasia corneal, como resultado, obtuvimos que su concentración lagrimal en todos los grupos muestrales fue inferior al límite de detección del ELISA utilizado; sugiriendo que no existe HSP60 a nivel lagrimal o que se encuentra en cantidades mínimas de modo que nuestra metodología no permite detectarla. En concordancia con nuestros resultados, la evaluación de chaperonas en

el proceso inflamatorio conjuntival implicado en la queratoconjuntivitis vernal, aseguró la ausencia de HSP60 en biopsias conjuntivales de pacientes con esta afectación, sin embargo confirmó la participación de otras chaperonas como la HSP27, HSP40, HSP70 y HSP90, todas ellas con carácter pro-inflamatorio.<sup>222</sup> Sería interesante evaluar, en futuros estudios, el papel de éstas otras chaperonas pro-inflamatorias en la ectasia corneal.

En cuanto a la lactoferrina, se trata de una glicoproteína multifuncional que desempeña un papel defensivo clave en la película lagrimal gracias a su acción antimicrobiana, antiinflamatoria e inmunomoduladora.<sup>223</sup> Según Kijlstra et al,<sup>224</sup> representa el 25% del total de proteínas lagrimales, siendo invariable con la edad y con el sexo. Otros estudios, sin embargo, han encontrado variaciones con la edad y con situaciones asociadas a la inflamación, como son el sueño, el ojo seco o la conjuntivitis vernal.<sup>225</sup> El análisis lagrimal en pacientes con QC, realizado en varios estudios, mostró una reducción de esta glicoproteína en comparación con los valores obtenidos en sujetos control.<sup>52,140,226</sup> La Lf en lágrima procede principalmente de la glándula lagrimal, aunque Santagati et al<sup>227</sup> han demostrado que las células epiteliales de la superficie ocular también producen cantidades detectables de Lf, siendo mayor la expresión en el tejido epitelial conjuntival que en el corneal. Además, se ha demostrado que la Lf ejerce un efecto inhibitor sobre la respuesta inflamatoria mediada por TLR2 y TLR4;<sup>228</sup> por tanto, la reducción de Lf podría inducir la exacerbación de dicha respuesta. En nuestro estudio, debido a las altas desviaciones estándar, no hemos observado diferencias estadísticamente significativas en los valores de Lf lagrimal entre el QC y los demás grupos. Sin embargo, sí se pudo apreciar una reducción gradual con el siguiente patrón: controles > familiares > QC > DPM. Por otro lado, la concentración de Lf en QC, sí parece evidenciar una leve correlación negativa con el TLR4 conjuntival. Con respecto al grupo DPM, los valores de Lf lagrimal mostraron diferencias significativas frente al grupo control, y se correlacionaron negativamente con la expresión de los TLRs y con el grado de afectación de la ectasia.

En conjunto, se puede concluir que la cFn y la Lf, como ligandos endógenos de los TLRs, tienen un gran valor en la DPM; pero, a diferencia de lo que observan otros trabajos, nuestro estudio no muestra que ambos ligandos tengan tanto valor en el QC. Concretamente, un trabajo reciente realizado en nuestro grupo evidenció la implicación de la Lf en el QC subclínico y en el QC establecido, confirmando su papel como ligando inhibitor de los receptores Toll-like.<sup>229</sup> Esta diferencia de resultados puede deberse al rango de detección del ELISA utilizado. En nuestro trabajo, el rango de detección de la Lf fue menor que el utilizado en el otro estudio; implicando, consecuentemente, una mayor dilución de las muestras. La mayor dilución de las muestras podría ser la causa de la superposición de las desviaciones estándar resultantes entre los grupos QC y control. Teniendo en cuenta todo esto, podríamos

postular que, tanto el incremento lagrimal de cFn en la DPM, como la disminución de la Lf en ambos tipos de ectasia corneal (QC y DPM); se asocian con la expresión de receptores Toll-like y se correlacionan con el grado de afectación de la enfermedad.

### **8.3 Evolución de los TLRs tras año y medio de seguimiento.**

En este trabajo se ha investigado la evolución de los receptores Toll-like a lo largo del tiempo. Para ello, 19 meses después de haber realizado el análisis inicial, se volvió a repetir el examen en una muestra reducida de nuestros pacientes y sujetos de estudio. Como resultado, se observó que los receptores TLR2 y TLR4 presentaban una tendencia a la disminución en el tejido corneal y una tendencia al aumento en el tejido conjuntival. Aunque, en todo momento, se mantuvieron las diferencias estadísticas significativas entre el grupo control y los grupos de estudio patológicos (QC y DPM).

Cabe destacar, que ninguna de estas variaciones se asoció a cambios morfológicos, topo- ni tomo-gráficos, en las muestras estudiadas (resultados no mostrados). Para poder establecer una asociación entre la alteración de los TLRs en el tiempo y la progresión de la ectasia corneal sería necesario un estudio con más años de seguimiento.

Actualmente, debido a la falta de información que existe en esta materia y por ser pioneros en este campo de trabajo, no podemos establecer de forma sólida a qué se deben las tendencias en el perfil temporal de expresión de los TLRs corneales y conjuntivales. Una causa que explicase los resultados obtenidos podría ser la implicación de los cambios estacionales. Las muestras del estudio inicial se recogieron y analizaron predominantemente durante meses cálidos con respecto a las muestras recogidas y analizadas en el seguimiento. Bind et al<sup>230</sup> y Khoo et al<sup>231</sup> especulan acerca de la implicación de la temperatura y de la exposición solar en la expresión de dichos receptores inmunes; sin embargo, sus resultados son contradictorios. Bind et al<sup>230</sup> postulan que un aumento de temperatura (como ocurre en primavera-verano) conlleva a una hipometilación del gen encargado de transcribir la proteína TLR2, y consecuentemente, a su infraexpresión. Por la contra, Khoo et al<sup>231</sup> justifican que la vitamina D3 (cuya presencia es directamente proporcional a la exposición solar) puede inducir un aumento de TLR2 y TLR4. Con respecto a nuestros resultados, las variaciones de expresión observadas en los TLRs conjuntivales coinciden con la hipótesis de Bind et al<sup>230</sup>, mientras las variaciones de expresión observadas en los TLRs corneales coinciden con la hipótesis de Khoo et al<sup>231</sup>.

Futuros estudios permitirán determinar a que se deben estas tendencias. Además, sería muy importante incluir la evaluación de los receptores Toll-like en familiares de pacientes con ectasia corneal para observar su progresión en el tiempo.

## **8.4 Cultivos de epitelio corneal: expresión y estimulación de TLRs.**

El epitelio de la superficie ocular forma una barrera física contra el medio ambiente externo y actúa como primera línea de defensa. La inmunidad innata corneal difiere de la inmunidad innata convencional; ya que, ante la falta de un sistema vascular o linfático establecido, las células epiteliales son las responsables de inducir inflamación mediante los TLRs.<sup>157,232</sup> Aunque la detección de microorganismos patógenos es posiblemente su tarea más importante, una reacción de defensa exagerada contra ligandos endógenos podría iniciar y perpetuar la respuesta inmune innata, y promover la respuesta inmune adaptativa.<sup>173</sup>

Tal y como pudimos observar en nuestros resultados clínicos, TLR2 y TLR4 parecen estar involucrados en la ectasia corneal. La activación de estos receptores tiene efectos inflamatorios, tanto beneficiosos como perjudiciales, sobre la córnea.<sup>172</sup> La comprensión de los TLRs corneales y de las consecuencias inflamatorias de su activación puede permitir el desarrollo de nuevas terapias específicas que, mediante administración tópica, prevengan la ectasia. Por ello, el objetivo del estudio *in vitro* fue evaluar la capacidad de estos TLRs como posible diana terapéutica antiinflamatoria.

El ARNm de TLR2 y TLR4 ha sido detectado en el epitelio corneal humano sano por varios estudios;<sup>157,233–237</sup> sin embargo, es importante tener en cuenta que la presencia del transcriptor no indica necesariamente la expresión de la proteína. Las evidencias sobre la expresión de proteína receptora TLR2 y TLR4 en el epitelio corneal son bastante conflictivas, ya que, si bien es cierto que la mayoría de estudios confirman su presencia; su localización a nivel celular y su funcionalidad todavía generan debate.<sup>157,172,192,233,237</sup>

Algunos receptores Toll-like se localizan en la membrana celular y responden a PAMPs extracelulares, otros, se localizan en el interior celular y responden a PAMPs que atraviesan la membrana plasmática. TLR2 y TLR4 son receptores típicamente de superficie.<sup>172</sup> Sin embargo, en este trabajo evidenciamos que los cultivos de epitelio corneal sano (HCEC y HCEC-I) poseen TLR2 y TLR4 intracelular y no en membrana, siendo mayor la expresión en el cultivo primario que en el inmortalizado. En

concordancia con nuestro resultado, Ueta et al<sup>233,235</sup> observaron una expresión intracelular, con localización citoplasmática perinuclear, de TLR2 y TLR4 en HCEC. En contraste, Song et al<sup>192</sup> determinaron que el TLR4 se expresaba en membrana en los cultivos celulares de epitelio corneal primario e inmortalizado. Por otro lado, Kumar et al<sup>238</sup> encontraron que, en HCEC y HCEC-I, el TLR2 se expresa en superficie y el TLR4 se expresa intracelular. Dado que estos estudios mencionados anteriormente se han llevado a cabo con células cultivadas, la variabilidad en los datos resultantes puede estar relacionada con la variación del donante (en cultivos primarios) y con las diferencias acerca de cómo se derivaron las líneas celulares (en las inmortalizadas).<sup>237</sup> Teniendo esto presente, es importante recalcar que, aunque de una manera u otra, los receptores inmunes sean detectados en cultivos de epitelio corneal, la distribución que presenten a nivel celular puede influir en su funcionalidad.

De los distintos ligandos que pueden reconocer los TLRs, muchos son moléculas indicativas de daño en el tejido, productos de descomposición de la matriz extracelular o microorganismos incitadores de infección.<sup>239,240</sup> Se ha demostrado que Pam3CSK4 y LPS, como agonistas de TLR2 y TLR4, tienen la capacidad de inducir reacciones hiperinflamatorias en diferentes tipos celulares.<sup>172,241</sup> Estudios realizados en cultivos de epitelio corneal sano, en los que la expresión de TLR2 y 4 se localizaba en membrana, observaron una adecuada funcionalidad de los receptores frente a sus agonistas, con aumento de secreción de IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ , y con activación del NF- $\kappa$ B.<sup>192,234,238</sup> En nuestro estudio, al igual que ocurre en otros trabajos donde TLR2 y 4 se encuentran localizados intracelularmente, no obtuvimos ninguna sobreexpresión de los receptores inmunes estudiados tras 24 horas de incubación con dosis elevadas de Pam3CSK4 y LPS; indicando que la expresión intracelular de ambos receptores no es capaz de transducir señales al interior de la célula epitelial corneal sana.<sup>157,233,235,238,242</sup> Por tanto, los factores pro-inflamatorios no siempre inducen una respuesta de defensa en las células epiteliales corneales. Ueta et al<sup>235</sup> sugieren que este hallazgo es indicativo de una condición “inmunesilente” en la superficie ocular. Esta condición parece contribuir al mantenimiento de una relación simbiótica entre el epitelio corneal y los microorganismos que habitan en la superficie ocular, con el fin de prevenir una respuesta inflamatoria innecesaria a la flora bacteriana normal.<sup>243</sup>

De manera similar, el reconocimiento inmune en el epitelio conjuntival e intestinal sano también provoca controversia.<sup>244-247</sup> En ellos, al igual que ocurre en el epitelio corneal, la ubicación intracelular de TLR2 y TLR4 y su falta de respuesta a determinados agentes, también parecen ser mecanismos utilizados para aportar tolerancia frente a las bacterias comensales y a la vez conservar latente la capacidad de respuesta a los patógenos, aunque, por el momento, no está clara la explicación específica para este hallazgo.

Un estudio realizado sobre un modelo experimental animal con ojo seco confirmó que la expresión de TLR4 era intracelular en situación normal, pero que, durante la enfermedad, su expresión celular aumentaba a nivel de membrana.<sup>248</sup> Esta afirmación da a entender que las células epiteliales corneales podrían ser capaces de expresar TLR superficial cuando se encuentran ante una situación comprometida. Esto nos hizo pensar que si la exposición a LPS y a Pam3CSK4 no era suficiente para generar un estímulo en nuestros cultivos celulares, quizá el sometimiento de los cultivos a electroporación no solamente serviría para crear poros e internalizar los ligandos estimuladores, sino también para crear una alteración que permitiese inducir la sobreexpresión de los TLRs en la superficie celular. Dado que la activación de TLR2 y TLR4 conduce a la producción de citoquinas pro-inflamatorias, en este trabajo evaluamos la respuesta inmune analizando los cambios de concentración en IL-6 y TNF $\alpha$ . Como resultado, observamos que las células electroporadas proporcionan niveles de IL-6 y TNF $\alpha$  significativamente mayores que las células sin electroporar, y que la combinación electroporación-estimulación genera una expresión inflamatoria significativamente mayor que electroporar sin estimular. Estos resultados confirman la funcionalidad de los receptores TLR2 y TLR4 intracelulares. Este modelo de inflamación fue utilizado para evaluar el efecto del bloqueo de los TLRs.

En un experimento similar de Ueta et al<sup>233</sup> se introdujo LPS artificialmente en el citoplasma de células HCEC mediante un agente de transfección; sin embargo, en su caso, la translocación experimental del LPS al citoplasma no produjo respuesta inmune. Zhang et al<sup>242</sup> sugirieron que la falta de respuesta al LPS en las células epiteliales corneales humanas podría deberse a la expresión deficiente de MD2, un componente esencial para la señalización de LPS-TLR4. Lang et al<sup>249</sup> confirmaron que la adición de MD2 exógeno al medio de cultivo permitía restablecer la capacidad de respuesta al LPS. Blais et al<sup>250</sup> observaron, en secciones de tejido epitelial corneal humano, que las células basales y aladas expresaban MD2, pero no las superficiales; sugiriendo que el TLR4 solo se activa cuando existe una brecha en el epitelio, para así prevenir la inflamación inapropiada mientras el epitelio esté intacto.

A pesar de toda esta información, actualmente no está claro el mecanismo que contribuye al funcionamiento de los receptores Toll-like 2 y 4 intracelulares. Por ello, sería interesante realizar más estudios acerca de su respuesta a otros ligandos (como cFn y Lf endógenos) en el epitelio corneal.

## 8.5 Cultivos de epitelio corneal: bloqueo de TLRs.

En este trabajo, para inmunomodular la respuesta inflamatoria mediada por los receptores Toll-like, las células HCEC fueron tratadas con anticuerpos neutralizantes de TLR2 y TLR4, con Lf y con anti-Lf. El tratamiento se realizó durante el proceso de electroporación y estimulación. Contrariamente a lo esperado, la amplia variabilidad de los resultados obtenidos no nos permitió sacar conclusiones firmes acerca del efecto inmunomodulador, y consecuentemente, puso en duda la efectividad del modelo *in vitro* utilizado.

El bloqueo de TLR2 mediante anticuerpos neutralizantes, ya había sido estudiado en otros tipos celulares (RAW264.7), confirmando que la unión específica del anti-TLR2 al TLR2 inhibía significativamente la producción de IL-6 y TNF $\alpha$  inducida por Pam3CSK4.<sup>251</sup> Del mismo modo, la respuesta inflamatoria inducida por LPS a través del receptor Toll-like 4, fue inhibida (en cultivos celulares de miocitos cardiacos) mediante la unión del anticuerpo neutralizante anti-TLR4 a dicho receptor.<sup>221</sup> Estudios realizados en epitelio corneal,<sup>237,238</sup> revelan que anti-TLR2 y anti-TLR4 inhiben la función de TLR2 y TLR4 presentes en membrana; sin embargo, ningún estudio evaluó el papel inmunomodulador en los TLRs intracelulares, ni de Lf y anti-Lf, en HCEC. Es sabido que, aunque la Lf puede estimular y/o reprimir la producción de ciertas citoquinas, el efecto general es la atenuación de la inflamación excesiva.<sup>228,252</sup> Por ello, la Lf puede ejercer un importante papel terapéutico en las ectasias corneales caracterizadas por sobreexpresión de receptores Toll-like. Los anticuerpos monoclonales frente a Lf (anti-Lf) parecen ser herramientas útiles para identificar regiones de la molécula que son importantes en su actividad biológica,<sup>253</sup> de modo que, el uso de anti-Lf debería bloquear la actividad de la Lf y contrarrestar su efecto. Por todo ello, sería interesante que, en un futuro, se evaluase el papel de estos inmunomoduladores en HCEC.

Creemos que la principal limitación en nuestro estudio de los TLRs como diana terapéutica fue el modelo *in vitro* utilizado. Recientemente, en Abril de 2018, se describió un nuevo modelo de ectasia corneal en conejos que implica el tratamiento con colagenasa.<sup>181</sup> Según Qiao et al<sup>181</sup> este modelo simula la topografía, el adelgazamiento y la biomecánica corneal del QC, por lo que podría servir para investigar más a fondo la patogénesis de la ectasia corneal y evaluar nuevos tratamientos. Otra opción podría ser el cultivo de córneas donantes con ectasia corneal; aunque se ha observado una cantidad significativa de estrés oxidativo en este tipo de cultivos, que evidencia un efecto biológico alterado y un tiempo de viabilidad limitado.<sup>254</sup> Otro estudio reciente de 2017,<sup>255</sup> propone la utilización de un modelo tridimensional de cultivos HCEC-I, disponible comercialmente (SkinEthic™ de Episkin),

con el objetivo de crear una estructura similar morfológica y funcionalmente al tejido humano *in vivo*. Este modelo ha demostrado ser útil en el estudio del efecto *in vitro* de fármacos<sup>256</sup> y en valoraciones experimentales con cuantificación objetiva, pero, una vez más, la vida útil es muy limitada (5 días).<sup>255</sup> Desde nuestro punto de vista, lo más interesante sería buscar la manera de realizar el estudio directamente en células epiteliales de ojos con QC o con DPM.

Como conclusión, un cambio de modelo experimental permitirá llevar a cabo futuras investigaciones que evalúen con efectividad el bloqueo de TLR2 y TLR4 como estrategia terapéutica antiinflamatoria.



INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

ESTUDIO CLÍNICO

ESTUDIO *IN VITRO*

DISCUSIÓN

**CONCLUSIONES**





## Estudio Clínico

---

1. La expresión corneal y conjuntival de receptores Toll-like 2 y 4 es significativamente mayor en ojos con ectasia corneal (queratocono o degeneración pelúcida marginal) que en ojos sanos.
2. El receptor Toll-like 2 corneal está más elevado en pacientes con queratocono que en los demás grupos de estudio.
3. En el grupo de familiares, el receptor Toll-like 4 conjuntival muestra valores inferiores a los patológicos pero superiores a los controles.
4. Los valores topográficos, tomográficos y aberrométricos corneales se correlacionan con la expresión de receptores Toll-like 2 y 4, en córnea y conjuntiva.
5. La expresión lagrimal de fibronectina celular y lactoferrina se encuentra, respectivamente, aumentada y reducida en pacientes con degeneración pelúcida marginal.
6. El perfil temporal de expresión de los receptores Toll-like 2 y 4 evidencia una tendencia a una disminución en córnea y a un aumento en conjuntiva. Son necesarios más estudios para concluir a que se deben estas tendencias.

## Estudio *in Vitro*

---

1. El porcentaje de receptores Toll-like 2 y 4 en membrana celular es inferior al 1% en cultivos primarios e inmortalizados de epitelio corneal humano.
2. El porcentaje de receptores Toll-like 2 y 4 intracelular es mayor en cultivos primarios de epitelio corneal humano que en cultivos inmortalizados.
3. Por sí solos, los lipopolisacáridos y el Pam3CSK4 no estimulan la expresión de receptores Toll-like 2 y 4 en cultivos de epitelio corneal humano; no siendo válido como modelo *in vitro* para el estudio de los receptores Toll-like como diana terapéutica.

4. La combinación de electroporación y lipopolisacáridos-Pam3CSK4 genera una respuesta inflamatoria aumentada; aunque debido a su falta de homogeneidad, no aporta valores sólidos que permitan evaluar el bloqueo de los receptores Toll-like.
5. Es necesario optimizar un modelo *in vitro* o *in vivo* de ectasia corneal para evaluar dianas terapéuticas que bloqueen la inmunidad innata.



## Referencias

1. Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol.* 1984;28(4):293-322.
2. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998;42(4):297-319.
3. Belin MW, Asota IM, Ambrosio R, Khachikian SS. What's in a name: keratoconus, pellucid marginal degeneration, and related thinning disorders. *Am J Ophthalmol.* 2011;152(2):157-162.
4. Kymes SM, Walline JJ, Zadnik K, Gordon MO, Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus study group. Quality of life in keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2004;138(4):527-535.
5. Kymes SM, Walline JJ, Zadnik K, Sterling J, Gordon MO, Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus Study Group. Changes in the quality-of-life of people with keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2008;145(4):611-617.
6. Rebenitsch RL, Kymes SM, Walline JJ, Gordon MO. The lifetime economic burden of keratoconus: a decision analysis using a markov model. *Am J Ophthalmol.* 2011;151(5):768-773.
7. Lema I, Duran J. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology.* 2005;112(4):654-659.
8. Lema I, Sobrino T, Duran JA, Brea D, Diez-Feijoo E. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol.* 2009;93(6):820-824.
9. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in tears: relevance in keratoconus. *Clin Exp Optom.* 2013;96(2):214-218.
10. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Are proteinases the reason for keratoconus? *Curr Eye Res.* 2010;35(3):185-191.
11. Gomes JA, Tan D, Rapuano CJ, Belin MW, Ambrósio R, Guell JL. Global Consensus on Keratoconus and Ectatic Diseases. *Cornea.* 2015;34(4):359-369.
12. Peris-Martinez C, Lanzagorta-Aresti A, Aviñó-Martinez J. Ectasias corneales naturales. In: Del Buey Sayas MA, Peris-Martinez C, eds. *Biomecánica Y Arquitectura Corneal.*

- Barcelona, España; 2014:153-164.
13. Binder PS. Ectasia after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(12):2419-2429.
  14. Fogla R, Rao SK, Padmanabhan P. Keratectasia in 2 cases with pellucid marginal corneal degeneration after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(4):788-791.
  15. Lee BW, Jurkunas U V, Harissi-Dagher M, Poothullil AM, Tobaigy FM, Azar DT. Ectatic disorders associated with a claw-shaped pattern on corneal topography. *Am J Ophthalmol.* 2007;144(1):154-156.
  16. Jinabhai A, Radhakrishnan H, O'Donnell C. Pellucid corneal marginal degeneration: A review. *Contact Lens Anterior Eye.* 2011;34(2):56-63.
  17. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1986;101(3):267-273.
  18. Pearson AR, Soneji B, Sarvananthan N, Sandford-Smith JH. Does ethnic origin influence the incidence or severity of keratoconus? *Eye.* 2000;14(4):625-628.
  19. Shimazaki J, Maeda N, Hieda O, Ohashi Y, Murakami A, Group Japan Pellucid Marginal Corneal Degeneration Study. National survey of pellucid marginal corneal degeneration in Japan. *Jpn J Ophthalmol.* 2016;60(5):341-348.
  20. Sridhar MS, Mahesh S, Bansal AK, Nutheti R, Rao GN. Pellucid marginal corneal degeneration. *Ophthalmology.* 2004;111(6):1102-1107.
  21. Basu S, Vazirani J. Keratoconus: current perspectives. *Clin Ophthalmol.* 2013;7:2019-2030.
  22. Davidson AE, Hayes S, Hardcastle AJ, Tuft SJ. The pathogenesis of keratoconus. *Eye.* 2014;28(2):189-195.
  23. Nowak DM, Gajecka M. The genetics of keratoconus. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2011;18(1):2-6.
  24. Karolak JA, Gajecka M. Genomic strategies to understand causes of keratoconus. *Mol Genet genomics.* 2017;292(2):251-269.
  25. Tuft SJ, Hassan H, George S, Frazer DG, Willoughby CE, Liskova P. Keratoconus in 18 pairs of twins. *Acta Ophthalmol.* 2012;90(6):482-486.
  26. Zadnik K, Barr JT, Edrington TB, Everett DF, Jameson M, et al. Baseline Findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(13):2537-2546.
  27. Kaya V, Utine CA, Altunsoy M, Oral D, Yilmaz OF. Evaluation of corneal topography with Orbscan II in first-degree relatives of patients with keratoconus. *Cornea.*

- 2008;27(5):531-534.
28. Rabinowitz YS, Garbus J, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in family members of patients with keratoconus. *Arch Ophthalmol*. 1990;108(3):365-371.
  29. Salabert D, Cochener B, Mage F, Colin J. Keratoconus and familial topographic corneal anomalies. *J Fr Ophthalmol*. 1994;17(11):646-656.
  30. Morrow GL, Stein RM, Racine JS, Siegel-Bartelt J. Computerized videokeratography of keratoconus kindreds. *Can J Ophthalmol*. 1997;32(4):233-243.
  31. Levy D, Hutchings H, Rouland JF, Guell J, Burillon C, et al. Videokeratographic anomalies in familial keratoconus. *Ophthalmology*. 2004;111(5):867-874.
  32. Santo RM, Bechara SJ, Kara-José N. Corneal topography in asymptomatic family members of a patient with pellucid marginal degeneration. *Am J Ophthalmol*. 1999;127(2):205-207.
  33. Cullen JF, Butler HG. Mongolism (Down's Syndrome) and Keratoconus. *Br J Ophthalmol*. 1963;47:321-330.
  34. Vincent AL, Weiser BA, Cupryn M, Stein RM, Abdoell M, Levin A V. Computerized corneal topography in a paediatric population with Down syndrome. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2005;33(1):47-52.
  35. Robertson I. Keratoconus and the Ehlers-Danlos syndrome: a new aspect of keratoconus. *Med J Aust*. 1975;1(18):571-573.
  36. Hameed A, Khaliq S, Ismail M, Anwar K, Ebenezer ND, et al. A novel locus for Leber congenital amaurosis (LCA4) with anterior keratoconus mapping to chromosome 17p13. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(3):629-633.
  37. Rabinowitz YS, Maumenee IH, Lundergan MK, Puffenberger E, Francomano CA, et al. Molecular genetic analysis in autosomal dominant keratoconus. *Cornea*. 1992;11(4):302-308.
  38. Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination. *Am J Med Genet*. 2000;93(5):403-409.
  39. Gordon-Shaag A, Millodot M, Shneor E, Liu Y. The genetic and environmental factors for keratoconus. *Biomed Res Int*. 2015:1-19.
  40. McMonnies CW. The biomechanics of keratoconus and rigid contact lenses. *Eye Contact Lens*. 2005;31(2):80-92.
  41. Lindsay RG, Bruce AS, Gutteridge IF. Keratoconus associated with continual eye rubbing due to punctal agenesis. *Cornea*. 2000;19(4):567-569.

42. Weed KH, MacEwen CJ, Giles T, Low J, McGhee CNJ. The Dundee University Scottish Keratoconus study: demographics, corneal signs, associated diseases and eye rubbing. *Eye*. 2008;22(4):534-541.
43. Krachmer JH. Eye rubbing can cause keratoconus. *Cornea*. 2004;23(6):539-540.
44. Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. *Br J Ophthalmol*. 2000;84(8):834-836.
45. Rahi A, Davies P, Ruben M, Lobascher D, Menon J. Keratoconus and coexisting atopic disease. *Br J Ophthalmol*. 1977;61(12):761-764.
46. Tuft SJ, Moodaley LC, Gregory WM, Davison CR, Buckley RJ. Prognostic factors for the progression of keratoconus. *Ophthalmology*. 1994;101(3):439-447.
47. Wojcik K, Kaminska A, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus and fuchs endothelial corneal dystrophy. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):19294-19308.
48. Behndig A, Karlsson K, Johansson BO, Brännström T, Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(10):2293-2296.
49. Kenney MC, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye*. 2003;26(3):139-146.
50. Fini ME, Yue BY, Sugar J. Collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases in normal and keratoconus corneas. *Curr Eye Res*. 1992;11(9):849-862.
51. Chaerkady R, Shao H, Scott S-G, Pandey A, Jun AS, Chakravarti S. The keratoconus corneal proteome: loss of epithelial integrity and stromal degeneration. *J Proteomics*. 2013;87:122-131.
52. Lema I, Brea D, Rodríguez-González R, Díez-Feijoo E, Sobrino T. Proteomic analysis of the tear film in patients with keratoconus. *Mol Vis*. 2010;16:2055-2061.
53. Pásztor D, Kolozsvári BL, Csutak A, Berta A, Hassan Z, et al. Tear mediators in corneal ectatic disorders. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153186.
54. Jun AS, Cope L, Speck C, Feng X, Lee S, et al. Subnormal cytokine profile in the tear fluid of keratoconus patients. *PLoS One*. 2011;6(1):e16437.
55. Bureau J, Fabre EJ, Hecquet C, Pouliquen Y, Lorans G. Modification of prostaglandin E2 and collagen synthesis in keratoconus fibroblasts, associated with an increase of interleukin 1 alpha receptor number. *C R Acad Sci III*. 1993;316(4):425-430.
56. Kaldawy RM, Wagner J, Ching S, Seigel GM. Evidence of apoptotic cell death in keratoconus. *Cornea*. 2002;21(2):206-209.
57. Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, et al. Epithelial injury induces keratocyte

apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res.* 1996;62(4):325-327.

58. Lema I, Durán JA, Ruiz C, Díez-Feijoo E, Acera A, Merayo J. Inflammatory response to contact lenses in patients with keratoconus compared with myopic subjects. *Cornea.* 2008;27(7):758-763.
59. Ollivier FJ, Gilger BC, Barrie KP, Kallberg ME, Plummer CE, et al. Proteinases of the cornea and precorneal tear film. *Vet Ophthalmol.* 2007;10(4):199-206.
60. Fini ME, Cook JR, Mohan R. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res.* 1998;290:12-23.
61. Mackiewicz Z, Määttä M, Stenman M, Konttinen L, Tervo T, Konttinen YT. Collagenolytic proteinases in keratoconus. *Cornea.* 2006;25(5):603-610.
62. Seppälä HPS, Määttä M, Rautia M, Mackiewicz Z, Tuisku I, et al. EMMPRIN and MMP-1 in keratoconus. *Cornea.* 2006;25(3):325-330.
63. Sawaguchi S, Yue BY, Sugar J, Gilboy JE. Lysosomal enzyme abnormalities in keratoconus. *Arch Ophthalmol.* 1989;107(10):1507-1510.
64. Matthews FJ, Cook SD, Majid MA, Dick AD, Smith VA. Changes in the balance of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. *Exp Eye Res.* 2007;84(6):1125-1134.
65. Balasubramanian SA, Mohan S, Pye DC, Willcox MD. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol.* 2012;90(4):303-309.
66. Sugar J, Macsai MS. What causes keratoconus? *Cornea.* 2012;31(6):716-719.
67. Fukuchi T, Yue BY, Sugar J, Lam S. Lysosomal enzyme activities in conjunctival tissues of patients with keratoconus. *Arch Ophthalmol.* 1994;112(10):1368-1374.
68. Meghpara B, Nakamura H, Macsai M, Sugar J, Hidayat A, et al. Keratectasia after laser in situ keratomileusis: a histopathologic and immunohistochemical study. *Arch Ophthalmol.* 2008;126(12):1655-1663.
69. Gondhwardjo TD, van Haeringen NJ. Corneal aldehyde dehydrogenase, glutathione reductase, and glutathione S-transferase in pathologic corneas. *Cornea.* 1993;12(4):310-314.
70. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(3):341-351.
71. Brown DJ, Lin B, Chwa M, Atilano SR, Kim DW, Kenney MC. Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity. *Mol Vis.* 2004;10:281-288.

72. Chwa M, Atilano SR, Hertzog D, Zheng H, Langberg J, et al. Hypersensitive response to oxidative stress in keratoconus corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(10):4361-4369.
73. Ku JY, Niederer RL, Patel D V, Sherwin T, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal analysis of keratocyte density in keratoconus. *Ophthalmology*. 2008;115(5):845-850.
74. Bilgihan K, Hondur A, Sul S, Ozturk S. Pregnancy-induced progression of keratoconus. *Cornea*. 2011;30(9):991-994.
75. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Desemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 2013;120(9):1778-1785.
76. Joseph R, Srivastava OP, Pfister RR. Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas. *Exp Eye Res*. 2011;92(4):282-298.
77. Sherwin T, Brookes NH. Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis. *Clin Exp Ophthalmol*. 2004;32(2):211-217.
78. Sykakis E, Carley F, Irion L, Denton J, Hillarby MC. An in depth analysis of histopathological characteristics found in keratoconus. *Pathology*. 2012;44(3):234-239.
79. Meek KM, Tuft SJ, Huang Y, Gill PS, Hayes S, et al. Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2005;46(6):1948-1956.
80. Robin JB, Schanzlin DJ, Verity SM, Barron BA, Arffa RC, et al. Peripheral corneal disorders. *Surv Ophthalmol*. 1986;31(1):1-36.
81. Rodrigues MM, Newsome DA, Krachmer JH, Eiferman RA. Pellucid marginal corneal degeneration: a clinicopathologic study of two cases. *Exp Eye Res*. 1981;33(3):277-288.
82. Jinabhai A, O'Donnell C, Radhakrishnan H. Changes in refraction, ocular aberrations, and corneal structure after suspending rigid gas-permeable contact lens wear in keratoconus. *Cornea*. 2012;31(5):500-508.
83. Ambrósio JR, Klyce SD, Smolek MK, Wilson SE. Pellucid marginal corneal degeneration. *J Refract Surg*. 2002;18(1):86-88.
84. Krachmer JH. Pellucid marginal corneal degeneration. *Arch Ophthalmol*. 1978;96(7):1217-1221.
85. Fuchihata M, Maeda N, Toda R, Koh S, Fujikado T, Nishida K. Characteristics of corneal topographic and pachymetric patterns in patients with pellucid marginal corneal degeneration. *Jpn J Ophthalmol*. 2014;58(2):131-138.
86. Belin MW, Ambrósio R. Scheimpflug imaging for keratoconus and ectatic disease. *Indian J Ophthalmol*. 2013;61(8):401-406.

87. Walker RN, Khachikian SS, Belin MW. Scheimpflug photographic diagnosis of pellucid marginal degeneration. *Cornea*. 2008;27(8):963-966.
88. Tummanapalli SS, Maseedupally V, Mandathara P, Rathi VM, Sangwan VS. Evaluation of corneal elevation and thickness indices in pellucid marginal degeneration and keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2013;39(1):56-65.
89. Alió JL, Shabayek MH. Corneal higher order aberrations: a method to grade keratoconus. *J Refract Surg*. 2006;22(6):539-545.
90. Kosaki R, Maeda N, Bessho K, Hori Y, Nishida K, et al. Magnitude and orientation of zernike terms in patients with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(7):3062-3068.
91. Oie Y, Maeda N, Kosaki R, Suzuki A, Hirohara Y, et al. Characteristics of ocular higher-order aberrations in patients with pellucid marginal corneal degeneration. *J Cataract Refract Surg*. 2008;34(11):1928-1934.
92. Bao F, Geraghty B, Wang Q, Elsheikh A. Consideration of corneal biomechanics in the diagnosis and management of keratoconus: is it important? *Eye Vis*. 2016;3(1):18.
93. Ambekar R, Toussaint KC, Wagoner Johnson A. The effect of keratoconus on the structural, mechanical, and optical properties of the cornea. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(3):223-236.
94. Wolffsohn JS, Safeen S, Shah S, Laiquzzaman M. Changes of corneal biomechanics with keratoconus. *Cornea*. 2012;31(8):849-854.
95. Piñero DP, Alio JL, Barraquer RI, Michael R, Jiménez R. Corneal biomechanics, refraction, and corneal aberrometry in keratoconus: an integrated study. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2010;51(4):1948-1955.
96. Naderan M, Shoar S, Rezagholizadeh F, Zolfaghari M, Naderan M. Characteristics and associations of keratoconus patients. *Contact Lens Anterior Eye*. 2015;38(3):199-205.
97. Seiler T, Koufala K, Richter G. Iatrogenic keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg*. 1998;14(3):312-317.
98. Moshirfar M, Edmonds JN, Behunin NL, Christiansen SM. Current options in the management of pellucid marginal degeneration. *J Refract Surg*. 2014;30(7):474-485.
99. Jhanji V, Sharma N, Vajpayee RB. Management of keratoconus: current scenario. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(8):1044-1050.
100. Romero-Jiménez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: a review. *Contact lens anterior eye*. 2010;33(4):157-166.
101. Tzelikis PF, Cohen EJ, Rapuano CJ, Hammersmith KM, Laibson PR. Management of pellucid marginal corneal degeneration. *Cornea*. 2005;24(5):555-560.

102. Biswas S, Brahma A, Tromans C, Ridgway A. Management of pellucid marginal corneal degeneration. *Eye (Lond)*. 2000;14(4):629-634.
103. Wagner H, Barr JT, Zadnik K. Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) study: methods and findings to date. *Contact Lens Anterior Eye*. 2007;30(4):223-232.
104. Nau AC. A comparison of synergeyes versus traditional rigid gas permeable lens designs for patients with irregular corneas. *Eye Contact Lens*. 2008;34(4):198-200.
105. Rathi VM, Dumpati S, Mandathara PS, Taneja MM, Sangwan VS. Scleral contact lenses in the management of pellucid marginal degeneration. *Contact Lens Anterior Eye*. 2016;39(3):217-220.
106. Ortiz-Toquero S, Perez S, Rodriguez G, de Juan V, Mayo-Iscar A, Martin R. The influence of the refractive correction on the vision-related quality of life in keratoconus patients. *Qual Life Res*. 2016;25(4):1043-1051.
107. Moschos MM, Nitoda E, Georgoudis P, Balidis M, Karageorgiadis E, Kozeis N. Contact lenses for keratoconus- current practice. *Open Ophthalmol J*. 2017;11:241-251.
108. Mandathara PS, Stapleton FJ, Willcox MDP. Outcome of keratoconus management: review of the past 20 years' contemporary treatment modalities. *Eye Contact Lens Sci Clin Pract*. 2017;43(3):141-154.
109. Kompella VB, Aasuri MK, Rao GN. Management of pellucid marginal corneal degeneration with rigid gas permeable contact lenses. *CLAO J*. 2002;28(3):140-145.
110. Ozbek Z, Cohen EJ. Use of intralimbal rigid gas-permeable lenses for pellucid marginal degeneration, keratoconus, and after penetrating keratoplasty. *Eye Contact Lens*. 2006;32(1):33-36.
111. Arnalich-Montiel F, Alió del Barrio JL, Alió JL. Corneal surgery in keratoconus: which type, which technique, which outcomes? *Eye Vis*. 2016;3(1):2.
112. Parker JS, Van Dijk K, Melles GR. Treatment options for advanced keratoconus: a review. *Surv Ophthalmol*. 2015;60(5):459-480.
113. Beniz LA, Queiroz GH, Queiroz CF, Lopes WL, Moraes LF, Beniz J. Intrastromal corneal ring segments delay corneal grafting in patients with keratoconus. *Arq Bras Oftalmol*. 2016;79(1):30-32.
114. Hashemi H, Amanzadeh K, Miraftab M, Asgari S. Femtosecond-assisted intrastromal corneal single-segment ring implantation in patients with keratoconus: a 12-month follow-up. *Eye Contact Lens*. 2015;41(3):183-186.
115. Piñero DP, Alio JL, Morbelli H, Uceda-Montanes A, El Kady B, et al. Refractive and corneal aberrometric changes after intracorneal ring implantation in corneas with pellucid marginal degeneration. *Ophthalmology*. 2009;116(9):1656-1664.

116. Spadea L, De Rosa V. Current techniques of lamellar keratoplasty for keratoconus. *Saudi Med J*. 2016;37(2):127-136.
117. Peyman A, Kamali A, Khushabi M, Nasrollahi K, Kargar N, et al. Collagen cross-linking effect on progressive keratoconus in patients younger than 18 years of age: A clinical trial. *Adv Biomed Res*. 2015;4(1):245.
118. Chatzis N, Hafezi F. Progression of keratoconus and efficacy of pediatric corneal collagen cross-linking in children and adolescents. *J Refract Surg*. 2012;28(11):753-758.
119. Dartt DA, Willcox MD. Complexity of the tear film: importance in homeostasis and dysfunction during disease. *Exp Eye Res*. 2013;117:1-3.
120. Nishtala K, Pahuja N, Shetty R, Nuijts RM, Ghosh A. Tear biomarkers for keratoconus. *Eye Vis*. 2016;3(1):19.
121. Sullivan DA. Immunology of the lacrimal gland and tear film. *Dev Ophthalmol*. 1999;30:39-53.
122. Pieragostino D, D'Alessandro M, Di Iorio M, Di Iorio C, Sacchetta P, Del Boccio P. Unraveling the molecular repertoire of tears as a source of biomarkers: beyond ocular diseases. *Proteomics Clin Appl*. 2015;9(1-2):169-186.
123. Dogru M, Karakaya H, Özçetin H, Ertürk H, Yücel A, et al. Tear function and ocular surface changes in keratoconus. *Ophthalmology*. 2003;110(6):1110-1118.
124. Abalain JH, Dossou H, Colin J, Floch HH. Levels of collagen degradation products (telopeptides) in the tear film of patients with keratoconus. *Cornea*. 2000;19(4):474-476.
125. Mathew JH, Goosey JD, Bergmanson JP. Quantified histopathology of the keratoconic cornea. *Optom Vis Sci*. 2011;88(8):988-997.
126. Teng CC. Electron microscope study of the pathology of keratoconus: I. *Am J Ophthalmol*. 1963;55:18-47.
127. Jongebloed WL, Worst JF. The keratoconus epithelium studied by SEM. *Doc Ophthalmol*. 1987;67(1-2):171-181.
128. Sawaguchi S, Fukuchi T, Abe H, Kaiya T, Sugar J, Yue BY. Three-dimensional scanning electron microscopic study of keratoconus corneas. *Arch Ophthalmol*. 1998;116(1):62-68.
129. Tuori AJ, Virtanen I, Aine E, Kalluri R, Miner JH, Uusitalo HM. The immunohistochemical composition of corneal basement membrane in keratoconus. *Curr Eye Res*. 1997;16(8):792-801.
130. Wilson SE, Netto M, Ambrósio R. Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease. *Am J Ophthalmol*. 2003;136(3):530-536.

131. Contreras-Ruiz L, Schulze U, García-Posadas L, Arranz-Valsero I, López-García A, et al. Structural and functional alteration of corneal epithelial barrier under inflammatory conditions. *Curr Eye Res.* 2012;37(11):971-981.
132. Ziangirova GG, Antonova O V. The causes of necrobiosis and apoptosis of corneal epithelial cells during primary acquired keratoconus. *Izv Akad Nauk Seriia Biol.* 2002;(5):517-521.
133. Attur MG, Dave M, Akamatsu M, Katoh M, Amin AR. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthr Cartil.* 2002;10(1):1-4.
134. McMonnies CW. Inflammation and keratoconus. *Optom Vis Sci.* 2015;92(2):35-41.
135. Ghosh A, Shetty R, Chaurasia SS. Author response: causal management of keratoconus: controlling inflammation. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2016;57(4):2165.
136. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997;2:12-26.
137. Alió JL, García CH. Fisiopatología. In: Alió JL, Carreras B, Ruíz JM, eds. *Inflamaciones Oculares.* Edika Med. Barcelona; 1995:3-44.
138. Abdelsadik A, Trad A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol.* 2011;72(12):1188-1193.
139. Galvis V, Sherwin T, Tello A, Merayo J, Barrera R, Acera A. Keratoconus: an inflammatory disorder? *Eye.* 2015;29(7):843-859.
140. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Levels of lactoferrin, secretory IgA and serum albumin in the tear film of people with keratoconus. *Exp Eye Res.* 2012;96(1):132-137.
141. Acera A, Vecino E, Rodríguez-Agirretxe I, Aloria K, Arizmendi JM, et al. Changes in tear protein profile in keratoconus disease. *Eye.* 2011;25(9):1225-1233.
142. Balasubramanian SA, Wasinger VC, Pye DC, Willcox MD. Preliminary identification of differentially expressed tear proteins in keratoconus. *Mol Vis.* 2013;19:2124-2134.
143. Zhou L, Sawaguchi S, Twining SS, Sugar J, Feder RS, Yue BY. Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(7):1117-1124.
144. Pflugfelder SC, Farley W, Luo L, Chen LZ, De Paiva CS, Al E. Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye. *Am J Pathol.* 2005;166(1):61-71.
145. Fabre EJ, Bureau J, Pouliquen Y, Lorans G. Binding sites for human interleukin 1 alpha, gamma interferon and tumor necrosis factor on cultured fibroblasts of normal cornea

- and keratoconus. *Curr Eye Res.* 1991;10(7):585-592.
146. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 1999;18(3):293-309.
147. Sorkhabi R, Ghorbanihaghjo A, Taheri N, Ahoor MH. Tear film inflammatory mediators in patients with keratoconus. *Int Ophthalmol.* 2015;35(4):467-472.
148. Wisse RP, Kuiper JJ, Gans R, Imhof S, Radstake TR, Van der Lelij A. Cytokine expression in keratoconus and its corneal microenvironment: a systematic review. *Ocul Surf.* 2015;13(4):272-283.
149. Kolozsvári BL, Petrovski G, Gogolák P, Rajnavölgyi É, Tóth F, et al. Association between mediators in the tear fluid and the severity of keratoconus. *Ophthalmic Res.* 2014;51(1):46-51.
150. Pásztor D, Kolozsvári BL, Csutak A, Berta A, Hassan Z, et al. Scheimpflug imaging parameters associated with tear mediators and bronchial asthma in keratoconus. *J Ophthalmol.* 2016;2016:9392640.
151. Nemet AY, Vinker S, Bahar I, Kaiserman I. The association of keratoconus with immune disorders. *Cornea.* 2010;29(11):1261-1264.
152. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science (80- ).* 1999;284(5418):1313-1318.
153. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388(4):621-625.
154. Hori J. Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. *J Ocul Biol Dis Infor.* 2008;1(2-4):94-100.
155. Kijlstra A. The role of cytokines in ocular inflammation. *Br J Ophthalmol.* 1994;78(12):885-886.
156. Wang J, Tian Z. Recent advances in lactoferrin research and development during the past two years (2007-2009): in lieu of a preface of the special issue lactoferrin. *Biometals.* 2010;23(3):355-357.
157. Ueta M, Kinoshita S. Innate immunity of the ocular surface. *Brain Res Bull.* 2010;81(2-3):219-228.
158. Philpott DJ, Girardin SE, Sansonetti PJ. Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Curr Opin Immunol.* 2001;13(4):410-416.
159. Anderson K V. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(1):13-19.
160. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394-397.

161. Anderson K V, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*. 1985;42(3):779-789.
162. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-983.
163. Weissmann G. Pattern recognition and gestalt psychology: the day Nüsslein-Volhard shouted "Toll." *FASEB J*. 2010;24(7):2137-2141.
164. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(1):1-14.
165. Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;311:1-16.
166. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
167. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007;19(1):24-32.
168. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(2):135-145.
169. Zhang Z, Schluesener HJ. Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(24):2901-2907.
170. Lee SJ, Lee S. Toll-like receptors and inflammation in the CNS. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002;1(2):181-191.
171. Takeda K, Akira S. Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *Jpn J Infect Dis*. 2001;54(6):209-219.
172. Redfern RL, McDermott AM. Toll-like receptors in ocular surface disease. *Exp Eye Res*. 2010;90(6):679-687.
173. Lambiase A, Micera A, Sacchetti M, Mantelli F, Bonini S. Toll-like receptors in ocular surface diseases: overview and new findings. *Clin Sci*. 2011;120(10):441-450.
174. Bolaños-Jiménez R, Navas A, López-Lizárraga EP, de Ribot FM, Peña A, et al. Ocular surface as barrier of innate immunity. *Open Ophthalmol J*. 2015;9:49-55.
175. Hozono Y, Ueta M, Hamuro J, Kojima K, Kawasaki S, et al. Human corneal epithelial cells respond to ocular-pathogenic, but not to nonpathogenic-flagellin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;347(1):238-247.
176. O'Neill LA, Bryant CE, Doyle SL. Therapeutic targeting of Toll-Like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev*. 2009;61(2):177-197.

177. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med.* 2007;13(5):552-559.
178. O'Neill LA. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(4):396-403.
179. Sobrino T, Regueiro U, Malfeito M, Vieites-Prado A, Pérez-Mato M, et al. Higher expression of Toll-like receptors 2 and 4 in blood cells of keratoconus patients. *Sci Rep.* 2017;7(1):12975.
180. Redfern RL, Barabino S, Baxter J, Lema C, McDermott AM. Dry eye modulates the expression of toll-like receptors on the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2015;134:80-89.
181. Qiao J, Li H, Tang Y, Song W, Rong B, et al. A rabbit model of corneal ectasia generated by treatment with collagenase type II. *BMC Ophthalmol.* 2018;18(1):94.
182. Efron N. Grading scales for contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt.* 1998;18(2):182-186.
183. Rabinowitz YS. Videokeratographic indices to aid in screening for keratoconus. *J Refract Surg.* 1995;11(5):371-379.
184. Rabinowitz YS, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in keratoconus. *Refract Corneal Surg.* 1989;5(6):400-408.
185. Maeda N, Klyce SD, Smolek MK, Thompson HW. Automated keratoconus screening with corneal topography analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(6):2749-2757.
186. Fam H-B, Lim K-L. Corneal elevation indices in normal and keratoconic eyes. *J Cataract Refract Surg.* 2006;32(8):1281-1287.
187. Rao SN, Raviv T, Majmudar PA, Epstein RJ. Role of Orbscan II in screening keratoconus suspects before refractive corneal surgery. *Ophthalmology.* 2002;109(9):1642-1646.
188. Organización Mundial de la Salud. *Manual de Bioseguridad En El Laboratorio.* 3<sup>o</sup> ed. Ginebra; 2005.
189. BD Biosciences. Manual BD Kit Fixation Permeabilization Cytoperm (554714).
190. Rodríguez-González R, Baluja A, Veiras Del Río S, Rodríguez A, Rodríguez J, et al. Effects of sevoflurane postconditioning on cell death, inflammation and TLR expression in human endothelial cells exposed to LPS. *J Transl Med.* 2013;11(1):87.
191. Alvarez E, Rodriño-Janeiro BK, Ucieda-Somoza R, González-Juanatey JR. Pravastatin counteracts angiotensin II-induced upregulation and activation of NADPH oxidase at plasma membrane of human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55(2):203-212.
192. Song PI, Abraham TA, Park Y, Zivony AS, Harten B, et al. The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and toll-like receptor 4 in human corneal cells. *Invest*

- Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(12):2867-2877.
193. Li J, Shen J, Beuerman RW. Expression of toll-like receptors in human limbal and conjunctival epithelial cells. *Mol Vis.* 2007;13:813-822.
  194. Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis.* 2002;185(10):1483-1489.
  195. Pecorini C, Rebutti R, Truchet S, Baldi A. In vitro effects of lactoferrin on intestinal and mammary epithelial cell lines. *Ital J Anim Sci.* 2009;1:643-645.
  196. Soiberman U, Foster JW, Jun AS, Chakravarti S. Pathophysiology of keratoconus: what do we know today. *Open Ophthalmol J.* 2017;11:252-261.
  197. Khaled ML, Helwa I, Drewry M, Seremwe M, Estes A, Liu Y. Molecular and histopathological changes associated with keratoconus. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7803029.
  198. Nita M, Grzybowski A. 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. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3164734.
  199. Wojcik KA, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Role of biochemical factors in the pathogenesis of keratoconus. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(1):55-62.
  200. Ionescu C, Corbu CG, Tanase C, Jonescu-Cuypers C, Nicula C, et al. Inflammatory biomarkers profile as microenvironmental expression in keratoconus. *Dis Markers.* 2016;2016:1243819.
  201. Karimian F, Aramesh S, Rabei HM, Javadi MA, Rafati N. Topographic evaluation of relatives of patients with keratoconus. *Cornea.* 2008;27(8):874-878.
  202. Toprak I, Kucukatay V, Yildirim C, Kilic-Toprak E, Kilic-Erkek O. Increased systemic oxidative stress in patients with keratoconus. *Eye (Lond).* 2014;28(3):285-289.
  203. Choi JA, Kim MS. Progression of keratoconus by longitudinal assessment with corneal topography. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2012;53(2):927-935.
  204. Delgado S, Velazco J, Delgado Pelayo RM, Ruiz-Quintero N. Correlation of higher order aberrations in the anterior corneal surface and degree of keratoconus measured with a Scheimpflug camera. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 2016;91(7):316-319.
  205. Colak HN, Kantarci FA, Yildirim A, Tatar MG, Goker H, et al. Comparison of corneal topographic measurements and high order aberrations in keratoconus and normal eyes. *Cont Lens Anterior Eye.* 2016;39(5):380-384.
  206. Goto T, Klyce SD, Zheng X, Maeda N, Kuroda T, Ide C. Gender- and age-related differences in corneal topography. *Cornea.* 2001;20(3):270-276.

207. Shajari M, Eberhardt E, Müller M, Al Khateeb G, Friderich S, et al. Effects of atopic syndrome on keratoconus. *Cornea*. 2016;35(11):1416-1420.
208. Naderan M, Rajabi MT, Zarrinbakhsh P, Bakhshi A. Effect of allergic diseases on keratoconus severity. *Ocul Immunol Inflamm*. 2017;25(3):418-423.
209. Kriszt Á, Losonczy G, Berta A, Takács L. Presence of Fleischer ring and prominent corneal nerves in keratoconus relatives and normal controls. *Int J Ophthalmol*. 2015;8(5):922-927.
210. Spadea L, Salvatore S, Vingolo EM. Corneal sensitivity in keratoconus: a review of the literature. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:683090.
211. Von Thun und Hohenstein-Blaul N, Funke S, Grus FH. Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. *Exp Eye Res*. 2013;117:126-137.
212. VanDerMeid KR, Su SP, Krenzer KL, Ward KW, Zhang JZ. A method to extract cytokines and matrix metalloproteinases from Schirmer strips and analyze using Luminex. *Mol Vis*. 2011;17:1056-1063.
213. Fukuda M, Fullard RJ, Willcox MD, Baleriola-Lucas C, Bestawros F, et al. Fibronectin in the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(2):459-467.
214. Awata T, Nishida T, Nakagawa S, Manabe R. Differential regulation of fibronectin synthesis in three different types of corneal cells. *Jpn J Ophthalmol*. 1989;33(1):132-143.
215. Greene CA, Kuo C, Sherwin T. Aberrant patterns of key epithelial basement membrane components in keratoconus. *Cornea*. 2017;36(12):1549-1555.
216. Fan Gaskin JC, Loh I-P, McGhee CNJ, Sherwin T. An immunohistochemical study of inflammatory cell changes and matrix remodeling with and without acute hydrops in keratoconus. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2015;56(10):5831-5837.
217. Morishige N, Uemura A, Morita Y, Nishida T. Promotion of corneal epithelial wound healing in diabetic rats by the fibronectin-derived peptide PHSRN. *Cornea*. 2017;36(12):1544-1548.
218. Virtanen T, Ylätupa S, Mertaniemi P, Partanen P, Tuunanen T, Tervo T. Tear fluid cellular fibronectin levels after photorefractive keratectomy. *J Refract Surg*. 11(2):106-112.
219. Cappello F, Conway de Macario E, Marasà L, Zummo G, Macario AJ. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(6):801-809.
220. Bajzert J, Stefaniak T. Heat shock protein HSP60 and the perspective for future using as vaccine antigens. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015;69:1149-1168.
221. Kim SC, Stice JP, Chen L, Jung JS, Gupta S, et al. Extracellular heat shock protein 60,

- cardiac myocytes, and apoptosis. *Circ Res*. 2009;105(12):1186-1195.
222. Leonardi A, Tarricone E, Corrao S, Alaibac M, Corso AJ, et al. Chaperone patterns in vernal keratoconjunctivitis are distinctive of cell and Hsp type and are modified by inflammatory stimuli. *Allergy*. 2016;71(3):403-411.
223. Wang J, Tian Z. Recent advances in lactoferrin research and development during the past two years (2007-2009): in lieu of a preface of the Special Issue Lactoferrin. *Biometals*. 2010;23(3):355-357.
224. Kijlstra A, Jeurissen SH, Koning KM. Lactoferrin levels in normal human tears. *Br J Ophthalmol*. 1983;67(3):199-202.
225. Flanagan J, Willcox M. Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie*. 2009;91(1):35-43.
226. Pannebaker C, Chandler HL, Nichols JJ. Tear proteomics in keratoconus. *Mol Vis*. 2010;16:1949-1957.
227. Santagati MG, La Terra Mulè S, Amico C, Pistone M, Rusciano D, Enea V. Lactoferrin expression by bovine ocular surface epithelia: a primary cell culture model to study lactoferrin gene promoter activity. *Ophthalmic Res*. 2005;37(5):270-278.
228. Drago-Serrano ME, Campos-Rodríguez R, Carrero JC, De la Garza M. Lactoferrin: balancing ups and downs of inflammation due to microbial infections. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):501.
229. Malfeito Jiménez M. Participación de la inmunidad innata en la progresión del queratocono: estudio tisular en queratoconos unilaterales. (Tesis Doctoral). USC. Santiago de Compostela. 2017.
230. Bind MA, Coull BA, Baccarelli A, Tarantini L, Cantone L, et al. Distributional changes in gene-specific methylation associated with temperature. *Environ Res*. 2016;150:38-46.
231. Khoo AL, Chai LY, Koenen HJ, Sweep FC, Joosten I, et al. Regulation of cytokine responses by seasonality of vitamin D status in healthy individuals. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(1):72-79.
232. Akpek EK, Gottsch JD. Immune defense at the ocular surface. *Eye*. 2003;17(8):949-956.
233. Ueta M, Nochi T, Jang MH, Park EJ, Igarashi O, et al. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J Immunol*. 2004;173(5):3337-3347.
234. Kumar A, Zhang J, Yu FS. Innate immune response of corneal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection: role of peptidoglycan in stimulating proinflammatory cytokine secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(10):3513-3522.
235. Ueta M, Hamuro J, Kiyono H, Kinoshita S. Triggering of TLR3 by poly:I:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(1):285-294.

236. Jin X, Qin Q, Chen W, Qu J. Expression of toll-like receptors in the healthy and herpes simplex virus-infected cornea. *Cornea*. 2007;26(7):847-852.
237. Wu XY, Gao JL, Ren MY. Expression profiles and function of Toll-like receptors in human corneal epithelia. *Chin Med J (Engl)*. 2007;120(10):893-897.
238. Kumar A, Zhang J, Yu FS. Toll-like receptor 2-mediated expression of beta-defensin-2 in human corneal epithelial cells. *Microbes Infect*. 2006;8(2):380-389.
239. Pleyer U. Immunobiology of the cornea. Pathophysiological considerations and clinical implications. *Dev Ophthalmol*. 1999;30:110-128.
240. Kluwe J, Mencin A, Schwabe RF. Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *J Mol Med*. 2009;87(2):125-138.
241. Choi HJ, Kim MK, Ko JH, Lee HJ, Jeong HJ, et al. Effect of Toll-like receptor 2 and 4 of corneal fibroblasts on cytokine expression with co-cultured antigen presenting cells. *Cytokine*. 2011;56(2):265-271.
242. Zhang J, Kumar A, Wheeler M, Yu FS. Lack of MD-2 expression in human corneal epithelial cells is an underlying mechanism of lipopolysaccharide (LPS) unresponsiveness. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(2):141-148.
243. Ueta M, Kinoshita S. Ocular surface inflammation is regulated by innate immunity. *Prog Retin Eye Res*. 2012;31(6):551-575.
244. Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, et al. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol*. 2003;170(3):1406-1415.
245. Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2001;167(3):1609-1616.
246. Chung SH, Kweon MN, Lee HK, Choi S Il, Yang JY, Kim EK. Toll-like receptor 4 initiates an innate immune response to lipopolysaccharide in human conjunctival epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2009;88(1):49-56.
247. Talreja J, Dileepan K, Puri S, Kabir MH, Segal DM, et al. Human conjunctival epithelial cells lack lipopolysaccharide responsiveness due to deficient expression of MD2 but respond after interferon-gamma priming or soluble MD2 supplementation. *Inflammation*. 2005;29(4-6):170-181.
248. Lee HS, Hattori T, Park EY, Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Expression of toll-like receptor 4 contributes to corneal inflammation in experimental dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(9):5632-5640.

249. Lang LL, Wang L, Liu L. Exogenous MD-2 confers lipopolysaccharide responsiveness to human corneal epithelial cells with intracellular expression of TLR4 and CD14. *Inflammation*. 2011;34(5):371-378.
250. Blais DR, Vascotto SG, Griffith M, Altosaar I. LBP and CD14 secreted in tears by the lacrimal glands modulate the LPS response of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(11):4235-4244.
251. Guo T, Cai J, Peng Y, Zhang L, Lan Q, et al. Protective effect of an antibody against specific extracellular domain of TLR2 on agonists-driven inflammatory and allergic response. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9803846.
252. Puddu P, Latorre D, Valenti P, Gessani S. Immunoregulatory role of lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. *Biometals*. 2010;23(3):387-397.
253. Van Berkel PH, Van Veen HA, Geerts ME, Nuijens JH. Characterization of monoclonal antibodies against human lactoferrin. *J Immunol Methods*. 2002;267(2):139-150.
254. Johnsen-Soriano S, Haug K, Arnal E, Peris-Martinez C, Moe MC, et al. Oxidative stress gradient in a medium during human corneal organ culture. *Mol Vis*. 2012;18:1604-1608.
255. Matysik-Woźniak A, Paduch R, Turski WA, Maciejewski R, Jünemann AG, Rejdak R. Effects of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid exerted on human reconstructed corneal epithelium in vitro. *Pharmacol Rep*. 2017;69(4):722-729.
256. Alépée N, Adriaens E, Grandier MH, Meloni M, Nardelli L, Vinall CJ. Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol Vitro*. 2016;34:55-70.

**La citación de las referencias se realizó mediante el gestor bibliográfico Mendeley Ltd (versión 1.17.13) para Windows, siguiendo el estilo "American Medical Association".**

## Anexos





**ANEXO 1. PROTOCOLO DEL ESTUDIO CLÍNICO**

Código \_\_\_\_\_ Fecha examen \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

Nombre y apellidos \_\_\_\_\_

Sexo: Hombre  1 Mujer  2

Edad: \_\_\_\_\_ años

Edad diagnóstico (en caso de ectasia corneal): \_\_\_\_\_ años

**Examen:** Inicial  1 Seguimiento  2

**Grupo:** Control  1 Familiar  2 QC  3 DPM  4

Enfermedades alérgicas: Si  1 No  0 Tipo:

Enfermedades generales asociadas: Si  1 No  0 Tipo:

Enfermedades oculares asociadas: Si  1 No  0 Tipo:

Tratamientos actuales (en curso): Generales Si  1 No  0 Cuales:

Oculares Si  1 No  0 Cuales:  
T° sin él:

Antecedentes familiares con ectasia corneal: Si  1 No  0

Tipo de antecedente: QC  1 DPM  2

Grado: Hermano/a  1 Padre/Madre  2 Ambos  3 Otros  4

Anexo 1

	<b>OD</b>	<b>OI</b>
Porte de LC:	Si <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 1 No <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 0	Si <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 1 No <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 0
Tº sin ellas:	_____ horas	_____ horas
Tipo de LC:	_____	_____
Picor ocular:	Si <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 1 No <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 0	Si <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 1 No <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 0
Frotamiento ocular:	Si <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 1 No <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 0	Si <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 1 No <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 0
AVL* <sup>1</sup> :	Sin corrección _____ Con corrección _____	Sin corrección _____ Con corrección _____
Signos biomicroscópicos:	Si <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 1 No <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 0	Si <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 1 No <input style="width: 30px; text-align: center;" type="checkbox"/> 0
Tipos* <sup>2</sup> :	_____	_____
Topografía corneal:		
	PDC _____ D	PDC _____ D
	K1 _____ D	K1 _____ D
	K2 _____ D	K2 _____ D
	dK _____ D	dK _____ D
	PDmáx _____ D	PDmáx _____ D
	dPDmáx _____ mm	dPDmáx _____ mm
	asimetría I-S _____ D	asimetría I-S _____ D
	índice KPI _____ %	índice KPI _____ %
Aberrometría (RMS):		
	Coma ( $Z_3^{\pm 1}$ ) _____ $\mu\text{m}$	Coma ( $Z_3^{\pm 1}$ ) _____ $\mu\text{m}$
	Coma-Like _____ $\mu\text{m}$	Coma-Like _____ $\mu\text{m}$

<b>OD</b>				<b>OI</b>							
<b>Grado de QC</b>											
Leve (K2<45D)		1	Leve (K2<45D)		1						
Moderado (45-52D)		2	Moderado (45-52D)		2						
Avanzado (K2>52D)		3	Avanzado (K2>52D)		3						
<b>Morfología (ectasia corneal)</b>											
Redondo		1	Redondo		1						
Oval		2	Oval		2						
Pajarita		3	Pajarita		3						
Pinza de cangrejo		4	Pinza de cangrejo		4						
<b>Orbscan</b>											
Elevación anterior _____ mm				Elevación anterior _____ mm							
Elevación posterior _____ mm				Elevación posterior _____ mm							
Paquimetría central _____ μm				Paquimetría central _____ μm							
Paquimetría mínima _____ μm				Paquimetría mínima _____ μm							
dPaquiMin _____ mm				dPaquiMin _____ mm							
Recogida de lágrima: Si <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="text-align: center;">1</td></tr></table> No <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="text-align: center;">0</td></tr></table>		1	0			Si <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="text-align: center;">1</td></tr></table> No <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="text-align: center;">0</td></tr></table>		1	0		
1											
0											
1											
0											
Recogida de epitelio: Si <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="text-align: center;">1</td></tr></table> No <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="text-align: center;">0</td></tr></table>		1	0			Si <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="text-align: center;">1</td></tr></table> No <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="text-align: center;">0</td></tr></table>		1	0		
1											
0											
1											
0											
<b>OD</b>				<b>OI</b>							
Conjuntiva		Córnea		Conjuntiva		Córnea					
TLR4	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4	TLR2				
<b>Notas:</b>											

## Anexo 1

### \*1 Clasificación de la AVL

0,05 - o inferior	1	0,400 - 0,500	4	1,00 - o superior	7
0,100 - 0,160	2	0,600 - 0,700	5		
0,200 - 0,300	3	0,800 - 0,900	6		

### \*2 Clasificación de los Signos Biomicroscópicos

Nervios Corneales Visibles	1
Estrías de Vogt	2
Anillo de Fleischer	3
Varios	4
Incurvamiento Inferior	5
Leucoma corneal	6

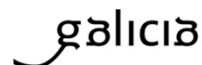
UNIVERSIDADE  
DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA

## ANEXO 2. INFORME FAVORABLE DEL COMITÉ ÉTICO



**XUNTA DE GALICIA**  
CONSELLERÍA DE SANIDADE  
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881 546425; [ceic@sergas.es](mailto:ceic@sergas.es)



## DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

## CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 21/07/2015 o estudo:

**Título:** Bloqueo de la inmunidad innata en la prevención de la progresión del queratocono

**Promotor:** Isabel Lema Gesto

**Tipo de estudo:** Outros

**Código de Rexistro:** 2015/436

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así coma os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e a Circular nº 07/2004, investigacións clínicas con produtos sanitarios.
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así coma os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo polo/a investigador/a do centro:

Centros	Investigadores Principais
C.H. Universitario de Santiago (Hospital de Conxo)	Isabel Lema Gesto

En Santiago de Compostela, a 21 de xullo de 2015  
O secretario

NOMBRE VAZQUEZ  
LAGO JUAN MANUEL  
- NIF 44829259M

Firmado digitalmente por COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE GALICIA  
Vázquez Lago Juan Manuel - NIF 44829259M  
Fecha: 2015.07.21 09:44:21 +0200

Juan M. Vázquez Lago

### ANEXO 3. EXPLORACIÓN CLÍNICA, RECOGIDA DE MUESTRA, ANÁLISIS MOLECULAR Y CELULAR



**Figura.35.** Código QR con enlace a [https://youtu.be/3Cgc\\_tUMTAU](https://youtu.be/3Cgc_tUMTAU). Protocolo de exploración clínica [vídeo explicativo].



**Figura.36.** Código QR con enlace a <https://youtu.be/LRzDGiTIirE>. Protocolo de recogida de lágrima y análisis molecular [vídeo explicativo].



**Figura.37.** Código QR con enlace a <https://youtu.be/54fiiR9lLpo>. Protocolo de recogida de epitelio y análisis celular [vídeo explicativo].

## ANEXO 4. CONDICIONES DE CULTIVO

<b>HCEC</b>	
Primary Human Corneal Epithelial Cells	PCS-700-010 (ATCC)
Precoated	0.01 mg/mL fibronectin from human plasma, F2006, SIGMA, Missouri, USA 0.03 mg/mL collagen from calf skin, C9791, SIGMA, Missouri, USA 0.01 mg/mL bovine serum albumin, A2058, SIGMA, Missouri, USA Water, 647016, Laboratorios Grifols SA, Barcelona, Spain
Medium	Corneal epithelial cell basal medium, PCS-700-030, ATCC, Virginia, USA
Medium Supplements	Corneal epithelial cell growth kit, PCS-700-040, ATCC, Virginia, USA: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 mg/mL apo-transferrin</li> <li>• 1 mM epinephrine</li> <li>• 0.4% extract P</li> <li>• 100 ng/ml hydrocortisone</li> <li>• 6 mM L-Glutamine</li> <li>• 5 mg/ml rh Insulin</li> <li>• CE growth factor</li> </ul> 33 $\mu$ M Phenol Red, PCS-999-001, ATCC, Virginia, USA 10 uds/mL Penicillin & 10 $\mu$ g/mL Streptomycin, 15140-122, GIBCO, MA, USA 25 ng/mL Amphotericin B, A2942, SIGMA, Missouri, USA
Wash Buffer	D-PBS, w/o magnesium, w/o calcium, sterile filtered; 30-2200, ATCC, Virginia, USA. 3mL for every 25cm <sup>2</sup>
Subculturing	Trypsin-EDTA, PCS-999-003, ATCC, Virginia, USA. 2mL for every 25cm <sup>2</sup> Trypsin neutralizing solution, PCS-999-004, ATCC, Virginia, USA. 2mL for every 25cm <sup>2</sup>
Centrifugation	150xg for 5 minutes

**Tabla.14.** Condiciones de cultivo para HCEC. Tabla propia.

<b>HCEC-I</b>	
Inmortalized Human Corneal Epithelial Cells	CRL-11515 (ATCC)
Precoated	0.01 mg/mL fibronectin from human plasma, F2006, SIGMA, Missouri, USA 0.03 mg/mL collagen from calf skin, C9791, SIGMA, Missouri, USA 0.01 mg/mL bovine serum albumin, A2058, SIGMA, Missouri, USA Water, 647016, Laboratorios Grifols SA, Barcelona, Spain

## Anexo 4

Medium	Keratinocyte – serum free médium, 17005-042, GIBCO, MA, USA
Medium Supplements	
	Supplements for keratinocyte-SFM, 37000-015, GIBCO, MA, USA: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 ng/mL human recombinant EGF</li> <li>• 0.05 mg/mL bovine pituitary extract</li> </ul>
	0.005 mg/mL insulin solution human, 19278, SIGMA, Missouri, USA 500 ng/mL hydrocortisone, H0888, SIGMA, Missouri, USA
	10 uds/mL Penicillin and 10 µg/mL Streptomycin, 15140-122, GIBCO, MA, USA 25 ng/mL Amphotericin B, A2942, SIGMA, Missouri, USA
Wash Buffer	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), w/o magnesium, w/o calcium, sterile filtered; L0615-1000, Biowest, Missouri, USA, 3mL for every 25cm <sup>2</sup>
Subculturing	Trypsin-EDTA, 25200-072, GIBCO, MA, USA 2mL for every 25cm <sup>2</sup> Neutralizing solution: Medium, 4mL for every 25cm <sup>2</sup> .
Centrifugation	150xg for 5 minutes

**Tabla.15.** Condiciones de cultivo para HCEC-I. Tabla propia.

<b>HUVEC</b>	
<b>Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells</b>	
<b>Dr. Ezequiel Álvarez (IDIS)</b>	
Precoated	0.2% gelatin solution type B, G1393, SIGMA, Missouri, USA Water, 647016, Laboratorios Grifols SA, Barcelona, Spain
Medium	Endothelial cell growth medium, C-22010, Promocell, Heidelberg, Germany
Medium Supplements	
	SupplementMix endothelial cell growth medium, C-39215, PromoCell, Heidelberg, Germany
	10 uds/mL Penicillin & 10 µg/mL Streptomycin, 15140-122, GIBCO,MA,USA 25 ng/mL Amphotericin B, A2942, SIGMA, Missouri, USA
Wash Buffer	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), w/o magnesium, w/o calcium, sterile filtered; L0615-1000, Biowest, Missouri, USA, 3mL for every 25cm <sup>2</sup>
Subculturing	Trypsin-EDTA, 25200-072, GIBCO, MA,USA, 2mL for every 25cm <sup>2</sup> Neutralizing solution: Medium, 4mL for every 25cm <sup>2</sup>
Centrifugation	200xg for 5 minutes

**Tabla.16.** Condiciones de cultivo para HUVEC. Tabla propia.