

Biomarcadores en el queratocono

Biomarkers in keratoconus

MI. Lema Gesto

Resumen

La utilidad más importante de un biomarcador es el diagnóstico precoz. Para esto es necesario conocer el perfil de expresión proteico en condiciones fisiológicas y patológicas. Los mejores biomarcadores son las proteínas: pueden detectar una enfermedad, la actividad, el pronóstico y la respuesta terapéutica. En el queratocono, se pueden determinar biomarcadores en lágrima, en células sanguíneas y en células epiteliales corneales y conjuntivales. La conjunción de todos ellos es determinante para conocer la fisiopatología de la ectasia y resulta de gran ayuda para el diagnóstico precoz y para el seguimiento de la enfermedad.

Resum

La utilitat més important d'un biomarcador és per al diagnòstic precoç. Per això és necessari conèixer el perfil d'expressió proteic en condicions fisiològiques i patològiques. Els millors biomarcadors són les proteïnes: poden detectar una malaltia, l'activitat, el pronòstic i la resposta terapèutica. Al queratocono es poden determinar biomarcadors en llàgrima, en cèl·lules sanguínies i en cèl·lules epitelials corneals i conjuntivals. La conjunció de tots ells és determinant per conèixer la fisiopatologia de la èctasi i resulta de gran ajuda per al diagnòstic precoç i el seguiment de la malaltia.

Abstract

The most important utility of a biomarker is for early diagnosis. For this it is necessary to know the protein expression profile in physiological and pathological conditions. The best biomarkers are proteins: they can detect disease, activity, prognosis and therapeutic response. In keratoconus, biomarkers can be determined in tears, in blood cells and in corneal and conjunctival epithelial cells. The combination of all of them is crucial to know the physiopathology of ectasia and a great help for early diagnosis and monitoring of the disease.

9. Biomarcadores en el queratocono

Biomarkers in keratoconus

MI. Lema Gesto

Profesora Titular de Oftalmología, Facultad de Medicina y Facultad de Óptica y Optometría. Universidad de Santiago de Compostela. Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas (LINC). Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS). Santiago de Compostela. Instituto Galego de Oftalmoloxía (INGO). Complexo Hospitalario Clínico Universitario. Santiago de Compostela.

Correspondencia:

M.^a Isabel Lema Gesto

E-mail: mariaisabel.lema@usc.es

Introducción

Un biomarcador es aquella sustancia que puede medirse objetivamente y ser evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, estado patológico o de respuesta a un tratamiento farmacológico. Son medidas a nivel molecular, bioquímico o celular.

El desarrollo de la genómica, proteómica y metabolómica, supuso la aparición de biomarcadores moleculares que permiten identificar los genes involucrados en el desarrollo de una enfermedad y los factores de riesgo de desarrollo de la patología; integrando la información procedente del genotipo y del fenotipo.

Las proteínas son buenos biomarcadores, porque desempeñan muchas funciones en el organismo (estructurales, de transporte, de defensa) o pueden actuar como mensajeros en rutas de señalización de procesos biológicos. Su mal funcionamiento, su ausencia o sobreexpresión, se traduce en el desarrollo de diferentes patologías. Mediante la comparación de perfiles proteicos de individuos sanos y enfermos, se puede llegar a determinar las proteínas que están relacionadas con el curso de una patología. Los síntomas de la enfermedad aparecen por los cambios proteicos y los fármacos actúan sobre las proteínas (son las dianas terapéuticas).

El análisis proteico del perfil de expresión asociado a una patología concreta, como el queratocono (QC), hace posible identificar

proteínas que permitirán diagnosticar la enfermedad o pronosticar su evolución. Estas proteínas se conocen con el nombre genérico de biomarcadores.

Biomarcadores en lágrima

La película lagrimal es muy importante para mantener la homeostasis ocular. La composición de la lágrima se modifica ante diferentes condiciones oculares, por eso el análisis de los marcadores moleculares en este ámbito son una fuente de información con valor diagnóstico. Actualmente, la inflamación y la inmunidad se consideran unos de los principales componentes de la fisiopatología del QC (Figura 1).

La expresión de mediadores inflamatorios, como las citoquinas proinflamatorias, las moléculas de adhesión celular y las metaloproteasas de matriz, son responsables de la degradación del tejido corneal¹.

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular que intervienen en la comunicación entre células. Desempeñan un papel muy importante en el ámbito inmunológico, pueden iniciar, amplificar o regular negativamente la respuesta inmune, así como influir en los procesos inflamatorios. El equilibrio entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias es esencial en la defensa inmunitaria.

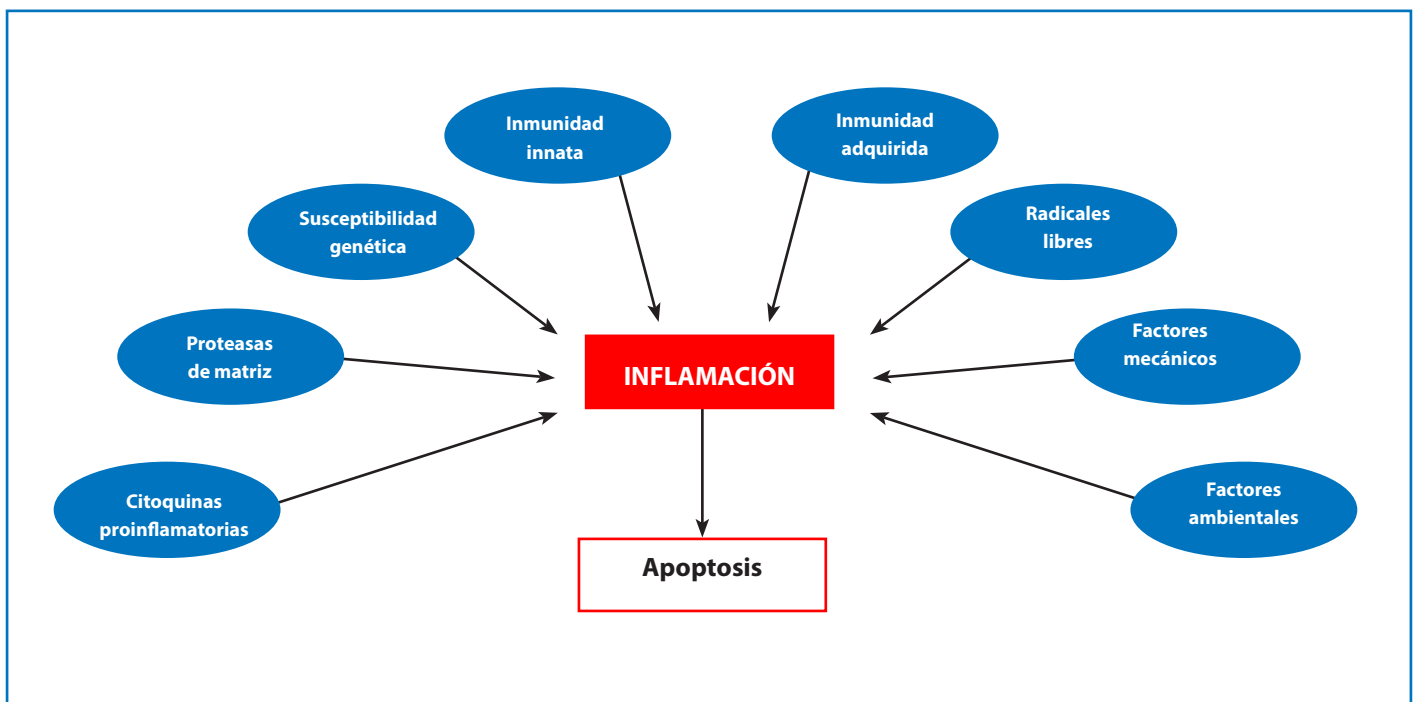


Figura 1. Esquema de los condicionantes fisiopatológicos del queratocono (QC).

En el 2005, Lema *et al.*² publicaron el primer estudio en el que se demostró que en la lágrima de los pacientes con QC se sobreexpresaban citoquinas proinflamatorias, y que la sobreexpresión de interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) estaban relacionados con el grado de progresión del QC. Además, demostraron un aumento muy significativo de la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9), siendo el factor predictivo más potente en relación con la progresión de la ectasia. Posteriormente, en queratoconos unilaterales³, se evidenció el aumento en el nivel de IL-6 y TNF- α en ojos con queratocono y subclínicos, mientras que el aumento de MMP-9 solo se detectó en la lágrima de pacientes con queratocono manifiesto. Varios estudios posteriores corroboraron estos hallazgos. Jun *et al.*⁴, 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. Balasubramanian *et al.*⁵ evidenciaron que los pacientes con QC tenían los niveles de citoquinas IL-6, TNF- α y el factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), de gelatinasas y collagenasas, y de MMP significativamente superiores a los ojos normales. Sorkhabi *et al.*⁶ también demostraron el aumento de IL-6, interleuquina-1

beta (IL-1 β) e interferón, y la disminución de la interleuquina 10 (IL-10), que es antiinflamatoria, en lágrima de pacientes con QC.

Algunos estudios reflejaron además la correlación entre los mediadores inflamatorios en lágrima y el grado de progresión de la ectasia corneal. Koložsvári *et al.*⁷ encontraron una asociación positiva entre el nivel de expresión de la IL-6 y el valor de máxima curvatura corneal, así como una relación negativa entre la interleuquina 13 (IL-13) y la gravedad del QC. Pásztor *et al.*⁸ observaron que los niveles de sobreexpresión de MMP-9 se asociaron con el meridiano más curvo (K2) del estudio con Pentacam.

Con estas evidencias, Shetty *et al.*⁹ trataron con ciclosporina A tópica a pacientes con QC que tenían sobreexpresión de marcadores de inflamación en lágrima. Después de 6 meses, observaron una disminución de IL-6, TNF- α y MMP-9, así como una reducción de la curvatura media. También se demostró una disminución de la IL-6 a los 12 meses del tratamiento con *cross-linking*¹⁰.

La glándula lagrimal es el principal efector en el sistema inmune secretor del ojo, produce componentes inmunológicos con actividad antibacteriana y antiinflamatoria, como inmunoglobulinas y lactoferrina (Lf), que juegan un papel muy importante en la

defensa inmune específica e inespecífica. La Lf es una proteína inmunomoduladora de las reacciones inflamatorias oculares, y disminuye la formación de peróxidos inducidos por la radiación ultravioleta en las células epiteliales corneales.

En el 2010, Lema *et al.*¹¹ demostraron una disminución de los niveles de Lf en un análisis proteómico del film lagrimal en pacientes con QC, así como una disminución de la inmunoglobulina G constante kappa (IGKC) y zinc alfa 2 glicoproteína (ZAG). Otro estudio posterior¹² también evidencia la disminución de Lf e inmunoglobulina A (IG-A) en la lágrima de pacientes con QC. Estos resultados sugieren que en la patogénesis de la ectasia están implicados procesos inmunológicos, posiblemente una alteración en la inmunomodulación.

Biomarcadores en células sanguíneas

Varios estudios demuestran que los cambios moleculares asociados a la ectasia corneal se reflejan también a nivel sistémico. Toprak *et al.*¹³ observaron que, en la patogénesis del QC, también existen alteraciones sanguíneas en el estado oxidativo y antioxidante. En otro estudio¹⁴, se ha monitorizado la inflamación sistémica en la ratio neutrófilos-linfocitos (NLR) en el suero, asociándose con la progresión del QC. El aumento de neutrófilos indica una condición proinflamatoria e implica la activación de MMP.

La lactoferrina, en el ámbito sistémico y local, modula la función de componentes humorales y celulares de la respuesta innata y adaptativa. A través de su interacción con receptores, induce vías de señalización extracelular e intracelular que implican los receptores *Toll-like* (TLR), que regulan la expresión de genes involucrados en la producción de citoquinas y otros mediadores inflamatorios. El sistema inmune innato, a través de los receptores de membrana de la familia TLR, detecta la presencia de agentes exógenos (infecciosos) o endógenos (que provienen del daño celular). Las vías de señalización mediadas por los TLR se han estudiado principalmente en TLR2 y TLR4 y han demostrado ser muy similares a las vías de señalización del receptor de la IL-1. Básicamente, la activación del factor nuclear kappa beta (NF- κ B) y su traslocación al núcleo media los procesos que ponen en marcha la respuesta inflamatoria secundaria a la respuesta inmune innata.

En el 2017, Sobrino *et al.*¹⁵ publican un estudio en el que se demostró la sobreexpresión de TLR2 y TLR4 en monocitos y neutrófilos

de pacientes con QC con respecto a los sujetos control, una disminución de los niveles de Lf y un incremento de NF- κ B. Asimismo, evidencia, en suero, un aumento de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) y MMP-9, y su correlación con el aumento de TLR2 en monocitos y neutrófilos. Estos hallazgos sugieren que la inmunidad innata participa en la patogénesis del QC.

Biomarcadores en células corneales y conjuntivales

Se ha observado que las córneas queratocónicas, a nivel de los queratocitos, tienen cuatro veces más receptores de unión para la IL-1 que las córneas normales¹⁶. Esta interleuquina induce la apoptosis de los queratocitos estromales *in vitro*. La apoptosis ha sido demostrada en los queratocitos y en las células epiteliales de las córneas con QC, pero no en controles normales¹⁷. En las células epiteliales y estromales corneales también se ha evidenciado la producción de varias citoquinas. Las células epiteliales actúan como primera línea de defensa, en parte, mediante la activación de la inmunidad innata. En las células epiteliales corneales y en los fibroblastos estromales se ha detectado la expresión de TLR4 y el correceptor CD14. También se ha demostrado la expresión de TLR2 en células epiteliales y conjuntivales humanas¹⁸.

La mayor parte de los estudios en tejido corneal y conjuntival se realizaron en córneas ex vivo. Uno de los primeros estudios clínicos para detectar los posibles biomarcadores en el tejido ocular es del 2018: Malfeito *et al.*¹⁹ publican una investigación en QC unilaterales en la que demuestran que la expresión de TLR2 y TLR4 en células de epitelio corneal y conjuntival es mayor en ojos con QC que en subclínicos; y en estos es mayor que en controles; además esta expresión se asocia con el grado de QC, evaluado por parámetros topográficos y tomográficos. La mayor diferencia en la expresión de TLR entre los grupos (control, subclínico y QC) se encontró en la expresión de TLR2 y TLR4 en células epiteliales corneales, enfocando los análisis predictivos de riesgo de aparición y progreso a QC en los marcadores de la córnea. De acuerdo con el análisis de las curvas ROC, la expresión de TLR2 en la córnea puede predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC (ambos, subclínico y QC), en comparación con los controles y entre QC subclínico y control. Globalmente, se demuestra que el TLR2 en células epiteliales corneales es el biomarcador con mayor capacidad predictiva para detectar el inicio y el riesgo de progresión del QC.

Conclusiones

Los biomarcadores más estudiados en lágrima, y con resultados más prometedores, son las citoquinas (IL-6 y TNF- α), la metaloproteasa (MMP-9) y la proteína inmunomoduladora (Lf).

En células sanguíneas la ratio neutrófilos-linfocitos, los TLR2 y 4 y la Lf.

Los biomarcadores más potentes para el diagnóstico precoz de QC son los TLR2 en células epiteliales corneales y, en menor medida, el TLR4 corneal y conjuntival.

Bibliografía

- Davidson AE, Hayes S, Hardcastle AJ, Tuft SJ. The pathogenesis of keratoconus. *Eye*. 2014;28:189-95.
- Lema I, Durán JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology*. 2005;112:654-9.
- Lema I, Sobrino T, Durán JA, Brea D, Díez-Feijoo E. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:820-4.
- Jun AS, Cope L, Speck C, Feng X, Lee S, Meng H, et al. Subnormal cytokine profile in the tear fluid of keratoconus patients. *PLoS One*. 2011;6:e16437.
- Balasubramanian SA, Mohan S, Pye DC, Willcox MD. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol*. 2012;90:303-9.
- Sorkhabi R, Ghorbanihaghjo A, Taheri N, Ahoor MH. Tear film inflammatory mediators in patients with keratoconus. *Int Ophthalmol*. 2015;35:467-72.
- Kolozsvári BL, Petrovski G, Gogolák P, Rajnavölgyi É, Tóth F, Berta A, et al. Association between mediators in the tear fluid and the severity of keratoconus. *Ophthalmic Res*. 2014;51:46-51.
- Pásztor D, Kolozsvári BL, Csutak A, Berta A, Hassan Z, Kettesy BA, et al. Sheimpflug imaging parameters associated with tear mediators and bronchial asthma in keratoconus. *J Ophthalmol*. 2016;2016:9392640.
- Shetty R, Ghosh A, Lim RR, Sabramani M, Mihir K, Rehman AR, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:738-50.
- Kolozsvári BL, Berta A, Petrovski G, Miháltz K, Gogolák P, Rajnavölgyi E, et al. Alterations of tear mediators in patients with keratoconus after corneal crosslinking associate with corneal changes. *PLoS One*. 2013;8:e76333.
- 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.
- 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;96:132-7.
- Toprak I, Kucukatay V, Yildirim C, Kilic-Toprak E, Kilic-Erkek O. Increased systemic oxidative stress in patients with keratoconus. *Eye*. 2014;28:285-9.
- Karaca EE, Özmen MC, Ekici F, Yüksel E, Türkoglu Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio may predict progression in patients with keratoconus. *Cornea*. 2014;33:1168-73.
- Sobrino T, Regueiro U, Malfeito M, Vieites-Prado A, Pérez-Mato M, Campos F, et al. Higher expression of Toll-like receptors 2 and 4 in blood cells of keratoconus patients. *Sci Rep*. 2017;7:12975.
- Fabre EJ, Bureau J, Pouliquen I, Lorans G. Binding sites for human interleukin 1 alfa, gamma interferon and tumor necrosis factor on cultured fibroblasts of normal cornea and keratoconus. *Cur Eye Res*. 1991;10:585-92.
- Kaldawy RM, Wagner J, Ching S, Seigel GM. Evidence of apoptotic cell death in keratoconus. *Cornea*. 2002;21:206-9.
- Ueta M, Kinoshita S. Ocular Surface inflammation is regulated by innate immunity. *Prog Ret Eye Res*. 2012;31:551-75.
- Malfeito M, Regueiro U, Pérez-Mato M, Campos F, Sobrino T, Lema I. Innate immunity biomarkers for early detection of keratoconus. *Ocul Immunol Inflamm*. 2018;19:1-7.