



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

**EXPRESIÓN COMPARATIVA DE MARCADORES INFLAMATORIOS EN
BOTONES CORNEALES DE PACIENTES CON QUERATOCONO VS TEJIDO
CORNEAL SANO**

**TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN OFTALMOLOGÍA**

PRESENTA:
DRA. PAULINA CAMACHO CHOZA

TUTORES PRINCIPALES
DRA. CRISTINA PACHECO DEL VALLE

M en C. ATZÍN ROBLES CONTRERAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE:

1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	3
3. Pregunta de investigación.....	11
Planteamiento del Problema	
4. Justificación.....	12
5. Objetivos.....	13
6. Hipótesis.....	14
7. Material y Métodos.....	15
8. Resultados.....	19
9. Discusión.....	22
10. Conclusión.....	26

INTRODUCCIÓN

El queratocono, primeramente descrito en 1854 es la ectasia corneal primaria mas común, caracterizada por adelgazamiento corneal localizado que conlleva a la protrusión de la misma. Con presentación bilateral y asimétrica, de inicio clásico en la pubertad y suele ceder su progresión hasta la tercera o cuarta década de la vida. Tiene una incidencia en la población general de 5.4 por cada 10,000 habitantes. Se conoce que afecta a todas las etnias sin embargo evidenciado un aumento de su incidencia en asiáticos comparados con caucásicos de 4.4:1. ^{1,2}

Los síntomas y signos dependerán de su gravedad. En estadios incipientes, subclínicos o frustro no produce ningún síntoma. La progresión de la enfermedad es manifestada por baja visual importante la cual no puede compensarse con el uso de corrección óptica. ¹

A pesar de la intensa búsqueda por parte de los investigadores en las últimas décadas hacia la etiología y patogénesis del queratocono, las causas y posibles mecanismo de su desarrollo y evolución continúan pobremente entendidas. ¹

Aunque clásicamente se ha definido como una entidad de etiología degenerativa, con el trauma mecánico definido como su mecanismo de progresión. Recientemente se ha considerado como una enfermedad multifactorial causada por factores ambientales como el trauma mecánico secundario a frote corneal y factores endógenos debidos al estrés oxidativo corneal y respuestas de hipersensibilidad en sujetos genéticamente susceptibles. ²

ANTECEDENTES

Recientemente se ha sugerido como fisiopatología una pérdida de regulación del microambiente corneal, que favorece a un desequilibrio entre la actividad enzimática de metaloproteinasas (MMP) y sus contrareguladoras, situación crítica para la homeostasis del tejido conectivo. Además de la participación de moléculas inflamatorias que cambian los paradigmas convencionales y ponen en duda la etiología “no inflamatoria” del queratocono.²

Se ha sugerido según los estudios una conducta de herencia autosómico dominante con expresión variable, se ha demostrado que más del 50% de los sujetos con queratocono tienen por lo menos un familiar cercano afectado con la enfermedad. Familiares de pacientes con diagnóstico de queratocono tienen un riesgo de 15 a 67 veces más de desarrollar la enfermedad que aquellos sin el antecedente.¹ Sin embargo estudios genéticos recientes no han descifrado la compleja arquitectura genética, incluso se ha buscado su correlación con los tipos de antígeno leucocitario humano, sin poder llegar a resultados conclusos. Es posible que exista en corneas con queratocono una susceptibilidad celular a la apoptosis en respuesta a mecanismos de trauma con la secundaria pérdida de queratocitos.²

Histopatológicamente existen tres signos que caracterizan al queratocono: adelgazamiento estromal, ruptura de la membrana de Bowman y depósitos de hierro dentro del epitelio corneal en su membrana basal.¹

Las células basales del epitelio corneal disminuyen en tamaño comparadas con las células basales de córneas sanas; se degeneran y crecen a través de la membrana de Bowman, evidenciado al observar acumulación de ferritina entre las células epiteliales. La membrana de Bowman además muestra rupturas las cuales son llenadas con colágena del estroma y nódulos ácidos Schiff positivos.¹

En el estroma corneal se ha observado una disminución del número de lamelas de queratocitos, degradación de los fibroblastos, cambios en el grosor y organización de las lamelas particularmente alrededor del ápex del cono. Se ha encontrado diferencias en los tipos de colágena: XIII, XV Y XVIII; entre corneas con queratocono y corneas sanas. ¹

La membrana de Descemet usualmente no se muestra afectada excepto en los casos donde existen rupturas de la misma causando hydrops corneal agudo. En el endotelio se ha observado pleomorfismo celular y elongación de las células endoteliales. ¹

El complejo intercambio e interacción de las múltiples citocinas inflamatorias actualmente asociadas a queratocono sugiere la activación de vías de respuesta inmunológica e inflamatoria en el epitelio, estroma y endotelio corneal. ²

Mecanismos propuestos de fisiopatología de queratocono.

IL-1: Interleucina con fuerte potencial pro inflamatorio, promueve regulación del crecimiento, diferenciación y movilización de las células inflamatorias en infecciones virales, bacterianas o fúngicas. Se ha postulado como la interleucina moduladora de la interacción epitelio-estroma, con su rol en la regulación en la proliferación, diferenciación y muerte de los queratocitos. Se presume que situaciones de microtrauma como el frote corneal o el uso de lente de contacto terminan en un aumento de la liberación de IL-1 del epitelio corneal. ^{2,3}

Corneas con queratocono muestran expresión incrementada hasta cuatro veces más de IL-1 alfa y beta; las cuales inducen apoptosis celular del endotelio corneal mediante sinergia con el TNF alfa. En general IL-1 alfa se ha encontrado en condiciones de trauma o inflamación corneal, más se ha demostrado que se encuentra asociada al daño oxidativo exclusivo del queratocono, donde ocasiona una desregulación de la síntesis de la superóxido dismutasa extracelular. Además favorece la producción, hasta 10 veces más, por parte de los fibroblastos de prostaglandina E2, condición que ocasiona una menor producción de colágena. La IL-1 beta participa en parte en la

regulación de la vía de las MMP. Antes de que induzca la apoptosis, esta interleucina induce la producción de MMP resultando en un daño tisular incrementado y mayor alteración de la arquitectura corneal.^{1,2,3}

La excesiva degradación de el estroma corneal comúnmente observada en queratocono puede ser resultado de aumento de enzimas proteolíticas como ácido esterasa, ácido fosfatasa y ácido lipasa así como las metaloproteinasas en especial MMP-9; o niveles disminuidos de inhibidores de las mismas como alfa 2 microglobulina o alfa 1 antiproteasa e inhibidores tisulares de metaloproteinasas como TIMP-1 Y 2. ^{1,3,4}

Estudios previos reportan que no existe alteración en queratocono de las enzimas inhibidoras, otros mas recientes reportan un aumento de TIMP-1 en queratocono asociado al inicio del uso de lentes de contacto, valor el cual se invierte a las 6 semanas de iniciar su uso. Otro estudio realizado en botones corneales con queratocono reporta no diferencia detectada en los niveles de TIMP 1 o MMP 9 comparado con controles, por lo que no se ha podido encontrar su relación con los niveles altos previamente descritos de MMP-9 (gelatinasa B) en la córnea. ^{4,5}

Se ha reportado un aumento de la actividad y el nivel de las enzimas catepsinas B y G. La catepsina B es una cistein-proteasa y la catepsina G es una serin-proteasa neutral. Conocidas como degradadoras de proteoglicanos y colágeno. Los dos componentes principales del estroma corneal. Asociadas incluso de forma mas fuerte que la MMP-9 a la fisiopatología del queratocono. ⁴

IL-6: Interleucina con un rol pivote en la estimulación de la respuesta inmune. Puede ser secretada por muchas células incluyendo las células dendríticas, células endoteliales, células T y macrófagos. Estudios *in vitro* reportan aumento de esta interleucina en patología de superficie ocular además de en queratocono, incluso en sus formas iniciales. Los queratocitos producen IL-6 ante la estimulación de IL-1, lo que soporta la teoría de la cascada inflamatoria crónica en la patogénesis de la enfermedad. Más estudios previos reportan que los niveles de IL-6 en lágrima

no se relacionan con la severidad de la enfermedad sino mas bien al adelgazamiento arquitectónico corneal asociado a factores exógenos. ^{1,2,6}

IL-8: interleucina mas importante de quimiotaxis de neutrófilos. Se han reportado en estudios *in vitro* el aumento significativo de IL-8 a las 48hr posterior a tratamientos con laser o uso de lente de contacto; confirmando su producción por los fibroblastos corneales en respuesta al daño. ^{5,6}

IL-10: Interleucina antiinflamatoria e inmunoreguladora, reguladora de angiogénesis y con ciertas propiedades activadoras en los macrófagos. Usualmente ausente en córnea sana sin datos de inflamación, mas se ha descrito un aumento importante durante situaciones de inflamación e infiltrados de predominio por macrófagos. Se ha reportado una disminución en su expresión, hasta 8 veces menos, en lágrima de pacientes con queratocono, asociado a uso de lente de contacto. La deficiencia de IL-10 en la vida córnea tiene como resultado una respuesta inflamatoria mas severa. Estudios recientes reportan que regula la linfangiogénesis corneal. ^{1,7}

IL-17: Interleucina pro inflamatoria, asociada con condiciones de inflamación crónica. En situaciones corneales se ha asociado a la estimulación de las células estromales a la secreción de otras citocinas como IL-6, IL-8 y moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1); las cuales se han observado expresados de 2 a 40 veces mas en queratocono. Su receptor se encuentra en los fibroblastos corneales residentes, los cuales al estimularse por esta citocina producen múltiples MMP contribuyendo al daño corneal en el queratocono por activación de los fibroblastos y subsecuente producción de MMP. Además es la citocina principal producida por los linfocitos Th 17, su expresión se ha reportado incrementada en corneas con queratocono asociado al aumento de TFG beta e IL-6. ²

TNF-alfa: Factor de necrosis tumoral alfa. Puede ser producido por epitelio, células estromales y endoteliales. Considerado como el factor patogénico mayor en situaciones de inflamación tanto sistémica como corneal, se ha encontrado en concentración aumentada en lagrima y muestras corneales de pacientes con queratocono, además que en los fibroblastos de estos pacientes

muestran además receptores para TNF-alfa, incluso en estadios subclínicos de la enfermedad. Esta citocina contribuye a la producción de IL-6 por los queratocitos, induce la producción de MMP-9 la cual se ha correlacionado con adelgazamiento corneal, resultado de la degradación del colágeno estromal. ²

TGF-B2: Factor de crecimiento transformante beta2. Su expresión es inducida por TNF alfa. Controla la proliferación y diferenciación de las células epiteliales y endoteliales. En la cámara anterior mantiene funciones respecto al privilegio inmunológico natural del ojo pero paradójicamente induce citocinas pro inflamatorias en condiciones de inflamación. Interactúa con los tipos de colágena y estimula la secreción de MMP, pudiendo influir en la estructura y distribución de las fibras de colágena corneales. Se ha reportado la presencia del aumento de TFGB en epitelio de corneas cadavéricas con queratocono severo. Esta proteína esta involucrada en la formación de fibrosis y cicatriz. ^{2,8}

TGF-B1: Factor de crecimiento transformante beta1. Los queratocitos y fibroblastos son particularmente sensibles y bajo su influencia se diferencian a miofibroblastos. Se ha vinculado a la formación de cicatrices corneales (colágeno tipo III) y reparación celular. Altos niveles de esta citocina incrementan la viabilidad de los miofibroblastos, mientras la IL-1 induce apoptosis de estas células. Se ha encontrado bajos niveles de esta citocina en corneas con queratocono mas los fibroblastos se muestran mas sensibles a los niveles de la misma. ^{2,8}

NGF: Factor de crecimiento nervioso. Constituyente normal en la película lagrimal, promueve la función corneal nerviosa, se ha reportado incrementado en queratocono y se ha sugerido que juega un papel en su fisiopatología. Los nervios corneales en pacientes con queratocono tienen fibras mas gruesas pero con disminución de la densidad de los mismos y de los plexos subepiteliales comparado con corneas normales. Un estudio reporta disminución de los niveles de NGF posterior al inicio de lentes de contacto rígidos, asociado a un aumento de IL-8 Y MMP-9.

1,2,5

Daño oxidativo: El daño oxidativo se ha descrito como un cofactor en la progresión de queratocono. Los mas importantes asociados a esto son la radiación UV, atopia y trauma mecánico. Las corneas con queratocono tienen niveles disminuidos de aldehído deshidrogenasa clase 3 y supeóxido dismutasas. Ambas juegan un importante rol en los procesos reactivos de oxígeno ; el acúmulo de reactivos de oxígeno causa depósitos de malondialdehído y peroxinitritos los cuales son citotóxicos y pueden dañar los tejidos corneales.¹

Radio neutrófilo-linfocito: Marcador de estado inflamatorio sistémico y de pronóstico actual en enfermedades como infarto al miocardio, diabetes mellitus, hipertensión, psoriasis y cáncer. Definido como el total de la cuenta de neutrófilos dividido entre los linfocitos. Los neutrófilos están asociados a la activación de metaloproteinasas, las cuales se saben que cursan con papel protagónico en la fisiopatología del queratocono. Se ha encontrado una asociación entre el radio neutrófilo-linfocito con la progresión del queratocono observando un aumento del radio correlacionado al aumento de las queratometrías.^{2,9}

Actualmente no existen drogas disponibles en el mercado que apoyen a disminuir la progresión del queratocono, se ha propuesto como buen objetivo terapéutico la regulación de la expresión de la MMP 9 ya que se ha encontrado en múltiples estudios elevada en pacientes con queratocono y asociada a progresión. La inflamación de las células epiteliales se ha demostrado que contribuye a la exacerbación del estatus inflamatorio del queratocono, en estudios donde se intervino con tratamiento a base de ciclosporina tópica en pacientes con queratocono se demostró la reducción de MMP 9, por lo que existe la propuesta de que podría detener la progresión del queratocono.¹⁰

Endostatina: Conocido como colágeno tipo XVIII la cual forma parte de los colágenos no fibrilares, con fuertes propiedades antiangiogénicas suprimiendo la proliferación de células endoteliales e induciendo apoptosis de las mismas. Encontrándose de forma abundante en el limbo corneal manteniendo la transparencia de la córnea. Su expresión esta restringida a las membranas basales, hablando de ojos humanos siendo previamente reportada en membrana

basal epitelial y membrana de Descemet en la córnea, epitelio pigmentario y capilares de la coroides. Existe la teoría de la participación de la endostatina en el proceso de cicatrización corneal activa y se mantiene por tiempo prolongado.¹²

Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGFBP2): Es una proteína que regula la proliferación celular, y atenúa la conversión de fibroblastos en miofibroblastos. Por lo que se le ha dado un importante rol en la fibrosis corneal.¹³ Estudios previos han reportado que la disminución de IGFBP2 promueve la formación de miofibroblastos, lo que sugiere que tiene un potencial antifibrótico en mantener el fenotipo corneal en contra de la formación de miofibroblastos, y evitar la progresión de la cicatrización corneal.¹⁴

Se han encontrado receptores para esta proteína en el estroma y células epiteliales corneales, y de forma elevada en situaciones de lesión corneal sobretodo en la capa estromal.¹³ No se encontró en la literatura su relación específica con el queratocono hasta el momento.

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF): Promueve la diferenciación de miofibroblastos a fibroblastos. Estudios han evidenciado que el tratamiento con factor de crecimiento fibroblástico tipo 1 o 2 induce que los miofibroblastos tomen forma de fibroblastos, aunque no se ha estudiado en modelos in vivo.¹⁵

Dipeptidil peptidasa IV: es una proteasa de serina con propiedades catalíticas multifuncionales dependiendo de las condiciones extra o intracelulares. Se ha reportado previamente aumentada en modelos de ratones in vivo en situaciones de lesión corneal por lente de contacto, quemadura térmica y química.¹⁶

Angiogenina: Es una proteína de cadena simple asociada a la respuesta inflamatoria, angiogénesis y ya conocido como componente de la película lagrimal con funciones antibacterianas. Regulador de la respuesta pro inflamatoria inhibiendo la producción de péptidos inflamatorios por los fibroblastos corneales por medio de bloqueo de TNF alfa y lipopolisacáridos, observando una disminución en la expresión de TNFalfa, IL-6 , IL.8, posterior al

tratamiento con angiogenina y además observando un aumento de IL-10 ayudando a controlar la respuesta inflamatoria.¹⁷

Metaloproteinasas de matriz extracelular: Son una familia de enzimas zinc y calcio ion dependientes que regulan interacciones célula a célula y célula a matriz mediante la modulación de la activación, inactivación o liberación de moléculas de adhesión, receptores de factores de crecimiento, citocinas y proteólisis de matriz extracelular. MM8 y MM9 se han asociado a nivel corneal con infiltración de neutrófilos a nivel de estroma.¹⁸

MM8 actúa a nivel de gránulos específicos. Se ha reportado que a diferencia de MM9, la MM8 tiene un rol importante en la migración de neutrófilos a nivel de la matriz extracelular, ya que tiene un efecto de clivaje sobre el colágeno, en ausencia de esta, se ha reportado una disminución de los neutrófilos en el estroma corneal en modelos in vitro.¹⁸

MMP9 esta regulada por procesos epigenéticos, interacción célula a célula y vías mediadas por citocinas. Se une a CD18 en los neutrófilos y regula la migración de los mismos en modelos in vitro e in vivo.¹⁸

Serpina B5: Conocida como maspina o inhibidor de peptidasa 5, es un aminoácido con funciones no del todo conocidas, se le ha mencionado como gen supresor tumoral para cáncer de colon y mama, se ha sugerido que suprime angiogénesis, reduce la invasividad del tumor, crecimiento y metástasis. En la córnea se ha reportado su presencia en el estroma, siendo la primera célula no epitelial que la sintetiza. Juega un rol regulador de la adhesión celular de la matriz extracelular, y en la migración de fibroblastos activados durante la reparación corneal.¹⁹

Uroquinasa (uPA): es una proteína estudiada previamente en modelos in vivo, donde se ha observado su sobre expresión en corneas con lesiones químicas, térmicas o mecánicas. Existe la teoría de que esta proteína contribuye a la migración celular epitelial durante el proceso de reparación corneal.²⁰

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los marcadores inflamatorios sobre expresados en el tejido corneal de pacientes con queratocono en comparación con los expresados en estroma de corneas sanas ?

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El queratocono es una patología corneal que afecta principalmente a adultos jóvenes; su curso característicamente progresivo lo califica como una de las principales causas de baja visión en la población en edad productiva. No existen hasta el momento intervenciones terapéuticas no invasivas claramente establecidas que ayuden a frenar la progresión del daño por queratocono.

Varios mediadores de la inflamación han sido reportados en queratocono, como moduladores del microambiente corneal y a la contribución del daño tisular. La mayoría de los estudios existentes hasta el momento se basan en el estudio de las citocinas en la película lagrimal, la cual juega un factor importante en el microambiente de la córnea, pero las alteraciones de las citocinas en la lágrima no reflejan con exactitud procesos de índole intracorneal. Los estudios recientes sostienen el concepto emergente de que la fisiopatología del queratocono tiene un trasfondo inflamatorio.

JUSTIFICACIÓN

La importancia de encontrar una fuerte asociación entre citocinas inflamatorias con la presencia y aun mas importante, la progresión del queratocono, facilitara en un futuro el desarrollo de fármacos que intervengan en la modulación de estas citocinas para el cese de la progresión del queratocono y favorecer la preservación de la visión en los pacientes.

Ya se ha comenzado a estudiar por Shetty et al. la administración de fármacos como la ciclosporina para la reducción de la estimulación inflamatoria en especial de las metaloproteinasas , proponiéndolo como nueva terapéutica en el queratocono, mas existe la necesidad de mayores estudios en tejido corneal para valorar comparativamente la presencia de citocinas en corneas con queratocono y cuales además se encuentran en condiciones de normalidad para que esta información sea utilizada como fundamento en futuros estudios experimentales donde se busque implementar fármacos que tengan como mecanismo de acción disminuir la expresión o desregulación de las citocinas encontradas en el estroma de corneas con queratocono.

La intención de este estudio es determinar la sobre expresión de marcadores inflamatorios y de daño tisular en el estroma corneal en queratocono en comparación con estroma corneal sano, para así poder planear estrategias terapéuticas futuras con fármacos dirigidos a disminuir la expresión o desregulación encontrada y poder frenar la progresión del queratocono a estadios avanzados donde la pérdida de capacidad visual llega a ser incapacitante en algunas situaciones o de requerir de procedimientos invasivos como la queratoplastia penetrante.

OBJETIVOS

Principal

1. Detectar la expresión de marcadores de inflamación y daño tisular en el tejido corneal con queratocono.

Secundarios

1. Determinar los marcadores de daño tisular y/o inflamación presentes en el estroma de corneas sana
2. Comparar la expresión de marcadores de inflamación y daño tisular en el tejido corneal con queratocono en comparación con la expresión de los mismos en estroma corneal sano.

HIPÓTESIS

Existe un aumento en la expresión de citocinas pro inflamatorias en botones de corneas con queratocono en comparación con las encontradas en estroma de cornea sana.

Hipótesis nula: no existe diferencia entre la expresión de citocinas en el estroma corneal con queratocono versus estroma de cornea sana.

Hipótesis alterna: Se encontrará un aumento de las citocinas pro inflamatorias en las muestras de estroma corneal sano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo comparativo, transversal y prospectivo en el departamento de córnea y el centro de investigación biomédica de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz en la Ciudad de México. Donde se tomaron muestras de tejido corneal de botones corneales obtenidos mediante queratoplastia penetrante y como controles el estroma corneal sano obtenido mediante procedimiento de SMILE® por láser de femtosegundo de pacientes sometidos a cirugía refractiva. Lo anterior bajo firma de consentimiento informado por parte del paciente sobre el uso de su tejido para este estudio.

Criterios de inclusión en el grupo de queratoplastia penetrante (QPP)

Edad mayor de 15 años, sexo indistinto.

Pacientes con diagnóstico de queratocono grado IV según la clasificación de Amsler Krumeich, aprobados para queratoplastia penetrante por el comité de trasplantes del departamento de córnea y cirugía refractiva.

Firma de consentimiento informado para la utilización del tejido para la investigación.

Criterios de inclusión en el grupo SMILE®

Edad mayor de 21 años, sexo indistinto.

Pacientes sin otra patología corneal, con diagnóstico de ametropía (miopía/astigmatismo miópico) sometidos a cirugía refractiva mediante técnica SMILE® por laser de femtosegundo.

Firma de consentimiento informado para la utilización del tejido para la investigación.

Criterios de exclusión

Pacientes con alguna otra patología corneal que no sea queratocono o ametropía.

Pacientes con antecedente de trasplante corneal previo en cualquier ojo.

Pacientes que se nieguen ante la firma del consentimiento informado para la utilización del tejido para la investigación.

Criterios de eliminación

Manipulación excesiva de la muestra al momento de obtener el lentículo.

Muestra inadecuada o insuficiente.

Decisión del paciente de abandonar el estudio.

Obtención de lentículos: Todas las cirugías se realizaron con femtosegundo VisuMax® sistema láser 2.0 (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Alemania) con una tasa de repetición de 500 kHz y una energía de pulso de 180nJ por un solo cirujano. Se colocó anestésico tópico (tetracaína al 0.5%) previo al procedimiento. El ojo quirúrgico es ubicado bajo un cono de contacto de aspiración de VisuMax®, una vez que el ojo se fijó correctamente, el cirujano inició la succión automática y comienza el tratamiento. El espesor de la tapa fue de 120 micras. El diámetro de la tapa fue de 7.3mm, 0.8mm mayor que el diámetro de la lentícula de refracción. La zona de corte para acceder al lentículo se fijó en 90°, con una anchura circunferencial de 2.0mm. El lentículo de refracción se disecó al separar la lamela anterior de la posterior a través del corte lateral y se retiró manualmente a través de la incisión. El lentículo obtenido se colocó en tubos de PBS y buffer de lisis con inhibidores de proteasas y se almacenó a -80° C hasta su procesamiento.

Obtención de muestra de botones corneales:

Todas las muestras de estroma corneal con queratocono fueron obtenidos por medio de queratoplastia penetrante. No se realizaron modificaciones en la técnica quirúrgica convencional para la toma de la muestra de estroma corneal. Previa asepsia y antisepsia, se colocan campos estériles, colocación de blefaróstato, anillo de fijación escleral, marcaje corneal, trepanación de córnea con un corte de 8mm con un trepano de succión. Se obtiene el tejido corneal del receptor y se procede a realizar la disección del epitelio y endotelio corneal manualmente, esto realizado por un solo cirujano. El estroma obtenido se colocó en tubos de PBS y buffer de lisis con inhibidores de proteasas y se almacenó a -80° C hasta su procesamiento.

Extracción de proteínas. Se descongelaron los lentículos y fueron lisados con ayuda del Tissue extraction reagent (Invitrogen) y un coctel de inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich). Los tejidos fueron homogeneizados con la ayuda de un mortero y un pistilo. El extracto total se recolectó en tubos y se centrifugaron a 10,000rpm durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante el cual contiene las proteínas totales y se almacenó a -80°C hasta su uso. Las proteínas totales fueron cuantificadas con ayuda del NanoDrop. Una vez cuantificada la cantidad de proteína se ajustó la cantidad de proteína a 1mg/mL en un volumen de 50 microlitros.

Análisis proteómico: La cuantificación de citocinas y marcadores de daño tisular se realizó por medio de un arreglo de proteínas en membranas de nitrocelulosa usando el kit de Proteome Profiler Array-Human Angiogenesis (R&D Systems) que incluye las siguientes marcadores: Activin A, ADAMTS-1, Angiotensina, Angiopoyetina 1 y 2, angiostatina/plasminógeno, anfiregulina, artemina, factor coagulación III, CXCL 16, DPPIV, EGF, EG-VEGF, endoglina, endostatina/colágena XVIII, endotelina, FGF 1 Y 2, FGF 4, FGF 7, GDMF, GM-CSF, HB-EGF, HGF, IGFBP-1,2 y 3, IL-1 beta, IL-8, TGF beta 1, leptina, MCP-1, MIP-1a, MMP 8, MMP 9, NRG-beta 1, Pentraxina 3, PD-ECGF, PDGF-AA, PDFG-AB/PDGF-BB, persefina, factor plaquetario 4, PIGF, prolactina, serpin B5, E1 y F1, TIMP 1, TIMP 4, trombospondina 1 y 2, uPA, vasoinhibina, VEGF, VEGF-C. Siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados fueron obtenidos con un fotodocumentador G-BOX imaging system y analizados con el software Vision Works LS.

Análisis estadístico: Los datos fueron analizados en base al control negativo y control positivo. Se consideró una diferencia biológicamente significativa a >2 tasas de cambio (fold change).

Variables:

Metaloproteinasas: Variable cuantitativa, definida como enzima proteolítica, degradadora principalmente de matriz extracelular. Se realizó la medición en base a su expresión relativa.

Antimetaloproteinasas: Variable cualitativa ordinal, definida como enzima reguladora de metaloproteinasas, disminuyendo su actividad proteolítica. Se realizó la medición en base a su expresión relativa.

Citocinas: Variable cualitativa ordinal, definida como conjunto de proteínas que regulan las interacciones del sistema inmunológico, se realizó su medición con base a su expresión relativa.

RESULTADOS

Se incluyó un total de 22 pacientes. 7 del grupo de queratoplastia penetrante (QPP) de los cuales todos fueron del sexo masculino y la media de edad fue de 27.8 años (16-43). 15 pacientes fueron incluidos del grupo SMILE® de los cuales el 33% fueron del sexo masculino y 66.6% femenino, con una media de edad de 25.4 (21-30) años.

Se encontró una sobre expresión significativa de 11 proteínas en el grupo QPP: Angiogenina, DPPIV, endostatina, FGF I, FGF II, IGFBP-2, IL-8, MMP-9, MMP-8, serpina B5 y uroquinasa.

En la *tabla 1* se describe su expresión por grupo y la tasa de cambio obtenida de la comparación entre ambos grupos, destacando como más alta la endostatina con una tasa de cambio de 6.26. Así como en la *imagen 1* se puede observar las membranas de nitrocelulosa posterior a la captación de proteínas y su revelado.

El resto de las proteínas incluidas en el kit no mostraron sobre expresión significativa las cuales fueron : Activin A, ADAMTS-1, Angiotensina, Angiopoyetina 1 y 2, angiostatina/plasminogeno, anfiregulina, artemina, factor coagulación III, CXCL 16, EGF, EG-VEGF, endoglina, endotelina, FGF 4, FGF 7, GDMF, GM-CSF, HB-EGF, HGF, IGFBP-1 y 3, IL-1 beta, TGF beta 1, leptina, MCP-1, MIP-1a, NRG-beta 1, Pentraxina 3, PD-ECGF, PDGF-AA, PDFG-AB/PDGF-BB, persefina, factor plaquetario 4, PIGF, prolactina, E1 y F1, TIMP 1, TIMP 4, vasoinhibina, VEGF, VEGF-C.

No se observó ninguna proteína infraexpresada significativamente comparando ambos grupos.

En las gráficas 1 y 2 se muestra la expresión de proteínas comparativa por grupos, en la *gráfica 1* se muestran las proteínas con mayor rol inflamatorio y en la *gráfica 2* las proteínas con mayor rol antiangiogénico.

PROTEÍNA	GRUPO QPP	GRUPO SMILE	TASA DE CAMBIO
Angiogenina	1.00	0.32	3.08
Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV)	0.58	0.14	4.25
Endostatina	0.47	0.08	6.26
Factor crecimiento fibroblástico tipo 1 (FGF I)	0.38	0.10	3.80
Factor crecimiento fibroblástico tipo II (FGF II)	0.21	0.09	2.38
Proteínas de adhesión del factor crecimiento similar insulina tipo 2 (IGFBP-2)	0.99	0.43	2.28
Interleucina 8 (IL-8)	0.23	0.07	3.27
Metaloproteinasa 8 (MMP-8)	0.82	0.16	5.24
Metaloproteinasa 9 (MMP-9)	0.52	0.22	2.36
Serpina B5 (maspin)	0.31	0.10	3.17
Uroquinasa (uPA)	0.31	0.11	2.84

Tabla 1: Proteínas encontradas significativamente sobre expresadas, unidad de medida: área de densidad (píxeles)

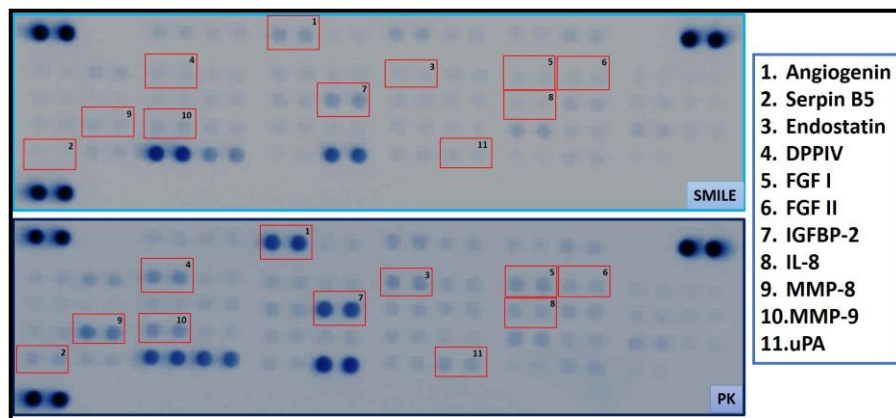
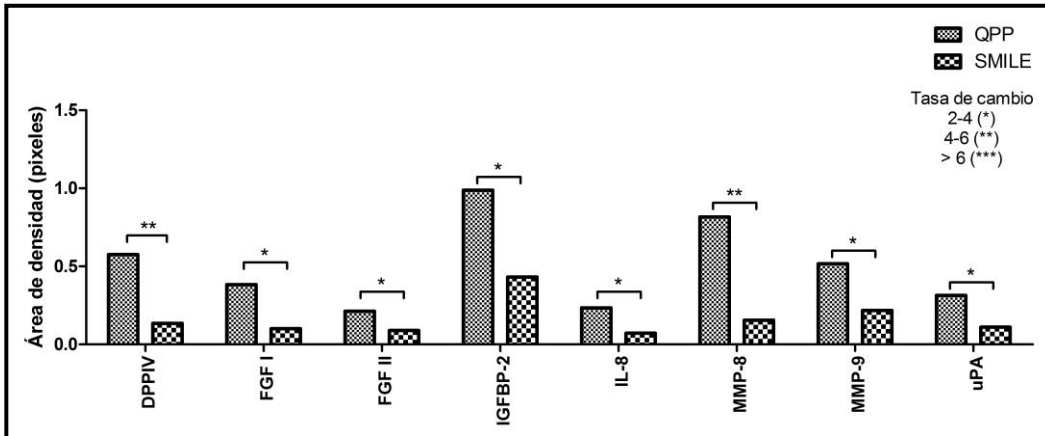
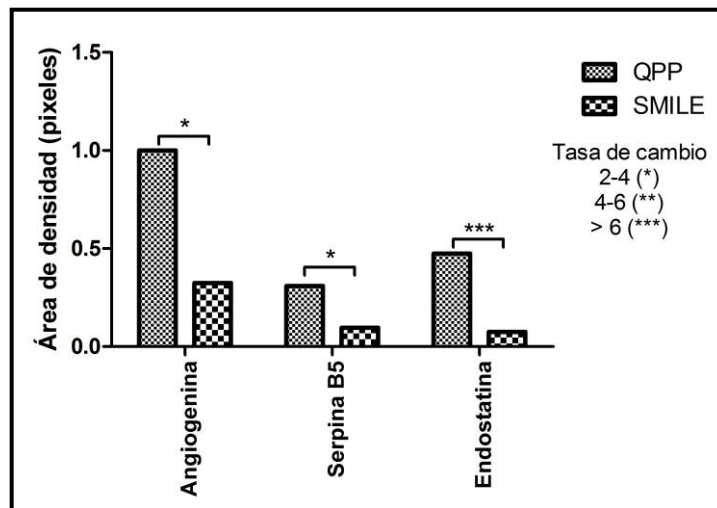


Imagen 1: Fotografía de las membranas de nitrocelulosa posterior a la captación de proteínas por grupo.



Gráfica 1: Proteínas con rol inflamatorio. Comparación de la expresión en grupo QPP vs. Grupo SMILE



Gráfica 2: Proteínas con rol angiogénico. Comparación de la expresión en grupo QPP vs. Grupo SMILE.

DISCUSIÓN

La cicatrización corneal es un proceso complejo que involucra células inflamatorias, proliferación celular, remodelación de matriz extracelular por acción de proteasas como uroquinasa, plasmina y metaloproteinasas.¹³

La intención de este estudio fue demostrar la desregulación en expresión de proteínas en corneas con queratocono comparado con estroma corneal sano.

La proteína mayormente sobre expresada en el presente estudio fue endostatina, conocido como colágeno tipo XVIII la cual forma parte de los colágenos no fibrilares, con fuertes propiedades antiangiogénicas suprimiendo la proliferaciones de células endoteliales e induciendo apoptosis de las mismas. Existe la teoría de la participación de la endostatina en el proceso de cicatrización corneal activa y se mantiene por tiempo prolongado.¹² Probablemente el aumento de esta tenga relación con la ausencia de vascularización corneal en las cicatrices por queratocono.

Estudios previos han reportando que la disminución de IGFBP2 promueve la formación de miofibroblastos, lo que sugiere que tiene un potencial antifibrótico en mantener el fenotipo corneal en contra de la formación de miofibroblastos, y evitar la progresión de la cicatrización corneal, se han reportado receptores en estroma corneal previamente.^{13,14} La sobre expresión significativa de IGFBP2 en el grupo de queratocono de este estudio apoya la teoría de que el aumento de IGFBP2 en corneas con queratocono avanzado comparado con estroma corneal sano es por mecanismo compensatorio para disminuir el grado de cicatrización corneal.

La dipeptidil peptidasa IV se encontró aumentada en nuestro estudio, esto se piensa debido a la continua lesión corneal producida por el uso de lente de contacto en pacientes con queratocono y además por el estado de hidrops corneal, ésta proteína ya está reportada aumentada en modelos de ratones in vivo en situaciones de lesión corneal por lente de contacto, quemadura térmica y química.¹⁶

Angiogenina es una proteína encargada de regular la respuesta inflamatoria, controlando la actividad de las interleucinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8 y aumentando la expresión de IL-10. En nuestro estudio no medimos la expresión de IL-10 pero sí la de IL-8, la cual fue encontrada elevada significativamente en comparación con estroma corneal sano, esto se explica debido a que es producida por los fibroblastos corneales en respuesta al daño corneal, encargada de la quimiotaxis de neutrófilos.^{6,17}

El factor de crecimiento fibroblástico promueve la diferenciación reversa de miofibroblastos a fibroblastos, el encontrar significativamente elevada esta proteína habla de un efecto regulador corneal para tratar de mantener la transparencia de la córnea, al encontrarse alteradas las fibras de colágeno estromales, controlando la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos la formación de cicatriz será menor. Es importante mencionar que TGF beta no se encontró aumentado de forma significativa, lo cual es contrario a lo previamente reportado en corneas con queratocono severo, pudiera ser debido a que la actividad de conversión de fibroblastos a miofibroblastos por esta proteína ya se encontraba inactiva y la fase cicatrizal estaba estable en los tejidos.¹⁵

Respecto a la IL-1 en este estudio no encontramos la sobreexpresión de esta interleucina aunque sí de las metaloproteinasas. Como es bien sabido la IL-1 participa en la regulación de la vía de las metaloproteinasas, probablemente la ausencia de la expresión de la misma en este estudio sea debido a que ya no existía el estímulo persistente y las metaloproteinasas ya se encontraban liberadas.

Se estudiaron la MMP8 y MMP9, encontrando mayormente aumentada la MMP8, esta en específico se ha reportado que tiene un rol en la migración de los neutrófilos a nivel de la matriz extracelular, mayormente en estroma corneal, a diferencia de la MMP9 la cual se ha reportado previamente en alteraciones de la película lagrimal y el epitelio corneal.¹⁸

Serpina B5, conocida como proteína antiangiogénica, en la córnea se ha reportado en el estroma de la misma, siendo la primera célula no epitelial que la sintetiza. Juega un rol regulador de la adhesión celular de la matriz extracelular y en la migración de fibroblastos activados durante la reparación córnea. Al ser el queratocono avanzado una patología que ocasiona disrupción de las lamelas estromales, es esperado que esta proteína juegue un rol al tratar de mantener la arquitectura corneal conservada y avascular. ¹⁹

Uroquinasa es una proteína estudiada previamente en modelos in vivo, donde se ha observado su sobre expresión en corneas con lesiones químicas, térmicas o mecánicas. Existe la teoría de que esta proteína contribuye a la migración celular epitelial durante el proceso de reparación corneal. Su elevación en nuestro estudio pudiera ser secundaria al daño epitelial de las corneas evaluadas, hasta el momento no se le ha encontrado expresión significativa a nivel de estroma corneal. ²⁰

Esto nos ayuda como apoyo a las bases fisiopatológicas del queratocono previamente conocidas y aporta nuevas probabilidades de mecanismos de daño para conocimiento mas extenso de la enfermedad y en un futuro poder otorgar tratamientos meta para disminuir la formación de cicatriz corneal en queratocono avanzado.

Las principales limitaciones de este estudio se discuten a continuación:

El tamaño de la muestra se considera pequeña, ya que el poco acceso a los tejidos donadores y su alto costo hacen que las cirugías de queratoplastía penetrante no sean tan frecuentes, además ambos grupos tuvieron diferente cantidad de muestra, esto fue debido a la diferente cantidad de tejido obtenida por procedimiento (mayor en los botones, menor en los lentículos). Por lo que requirió de mayor muestra por parte del grupo SMILE para poder ser comparable con la cantidad de proteína obtenida de un botón corneal.

La distribución de ambos grupos es poco comparable ya que en el grupo QPP solo se pudieron incluir pacientes del sexo masculino contra el grupo SMILE donde la mayoría fueron del sexo femenino, así como la variación de las edades entre los grupos.

Hay que considerar en el grupo SMILE, la posible influencia sobre los resultados el hecho de someter al tejido a un procedimiento invasivo, pudiendo existir liberación de proteínas inflamatorias al momento del procedimiento y esto alterar el resultado de la expresión al momento del procesamiento de las muestras.

Se requieren estudios posteriores donde se correlacione el aspecto clínico con la cuantificación proteica por paciente para así poder obtener conclusiones mas específicas.

CONCLUSIONES

Existe un aumento en la expresión de proteínas reguladoras de inflamación y antiangiogénicas en córneas con queratocono en comparación con estroma corneal sano.

BIBLIOGRAFIA

1. Romero-Jiménez Miguel et al. Keratoconus: A review. *Contact lens & Anterior Eye*. 2010;33:157-166.
2. P.L Wisse Robert et al. Cytokine Expression in Keratoconus and its corneal microenvironment: A systematic review. *Ocular Surface*. 2015;13: 272-283
3. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998;42:297–319.
4. Zhou Lili, Sawaguchi Shoichi et al. Expression of Degradative Enzymes and Protease Inhibitors in Corneas with Keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1117-1124
5. Fodor Mariann, Kolozsvari Bence et al. Effect of contact lens wear on the release of tear mediators in keratoconus. *Eye & Contact Lens*. 2013;39:147-152.
6. Leonardi Andrea, Tavolato Marco et al. Cytokine and chemokine levels in tears and in corneal fibroblast cultures before and after excimer laser treatment. *J Cataract Refract Surg*. 2009; 35:240-247.
7. Hos Deniz, Bucher Franziska et al. IL-10 indirectly regulates corneal lymphangiogenesis and resolution of inflammation via macrophages. *Amjpathol*. 2016;186:159-171.
8. Engler Christoph, Chakravarti Shukti et al. Transforming Growth factor-B signaling pathway activation in keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*. 2011; 151:752-759.
9. Karaca Emine, Ozmen Mehmet et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio may predict progression in patients with keratoconus. *Cornea*. 2014;33:1168-1173.
10. Shetty Rohit, Ghosh Anuprita et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:738-750.
11. Moshirfar Majid et al. Small-incision lenticule extraction. *J Cataract Refract Surg* 2015;41: 652-665.
12. Maatta Marko et al. Differential Expression of Collagen Types XVIII/Endostatin and XV in normal, keratoconus, and scarred human corneas. *Cornea*, 2006; 25:3, 341-349.
13. Bohnsack Richard et al. Expression of Insulin-Like Growth factor 2 receptor in corneal keratocytes during differentiation and in response to wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 12, 55 :7697-7708.
14. Hyun Park Soo et al. The Role of insulin-like growth factor binding protein 2(IGFBP2) in the regulation of corneal fibroblast differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56 :7295-7302.
15. Maltseva Olga et al. Fibroblast Growth Factor Reversal of the Corneal Myofibroblast Phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42 :2490-2495.
16. Cejkova et al. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) activity in the tear fluid as an indicator of the severity of corneal injury: a histochemical and biochemical study. *Histol Histopathol*. 2004; 19:669:676
17. Hoon Lee Seung et al. Angiogenin ameliorates corneal opacity and neovascularization via regulating immune response in corneal fibroblasts. *BMC Ophthalmology*. 2016; 16:57.
18. Lin Michelle et al. Matrix metalloproteinase-8 facilitates neutrophil migration through the corneal stromal matrix by collagen degradation and production of the chemotactic peptide Pro-Gly-Pro. *Am J Pathol* 2008, 173:144–153
19. Burke JM et al. Maspin: synthesis by human cornea and regulation of in vitro stromal cell adhesion to extracellular matrix. *Invest. Ophthalmol. Visc. Sci*. 2001;42:3135-41.
20. Watanabe et al. Up-regulation of urokinase-type plasminogen activator in corneal epithelial cells induced by wounding. *Invest. Ophthalmol. Visc. Sci*. 2003;44:3332-8.