



BIOMARCADORES OCULARES

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Irene María Rodríguez Copete



BIOMARCADORES OCULARES

UNIVERSIDAD DE SEVILLA, FACULTAD DE
FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO DE CARÁCTER
BIBLIOGRÁFICO. GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

Irene María Rodríguez Copete

Sevilla. 8 Julio. Facultad de Farmacia.
Departamento de Química inorgánica
Prof. Dr. José Manuel Córdoba Gallego

BIOMARCADORES OCULARES

Irene María Rodríguez Copete, Faculta de Farmacia C/Prof. García González s/n. Prof.
Dr. José Manuel Córdoba Gallego. Dpto. de Química Inorgánica, Facultad de Química,
C/Prof. García González s/n.

RESUMEN

La actual revisión bibliográfica está enfocada en el uso de los biomarcadores en cuanto a las enfermedades oculares. La capacidad de estas moléculas respecto a las enfermedades varía en cuanto a, ventajas que llegan desde su detección, evaluación hasta la prevención. Además, también se tratan los diferentes tipos de biomarcadores, su diferenciación según su lugar de actuación y la función que realizan allí. La búsqueda de biomarcadores es una de las investigaciones que siguen en proceso actualmente, numerosos estudios se basan en su búsqueda para que en un futuro puedan llevarse aún más a la práctica clínica. Se expone en el presente trabajo también los biomarcadores actualmente conocidos y aquellos que están aún en ensayo clínico.

Las alteraciones oculares son muchas, hay algunas que pueden perjudicar más al paciente de una forma u otra e incluso afectar más a un paciente que a otro, y lo que se pretendemos es, estudiar diferentes investigaciones que hayan dado efectos concluyentes para perfeccionar los tratamientos existentes, tanto con métodos analíticos ya usados, como aquellos que aún se están evaluando, con la finalidad de aumentar la eficacia en la detección, la especificidad en el menor tiempo posible, y hacer terapias más exactas y menos invasivas.

Para ello hemos estudiado las cuatro zonas que más abarcan la búsqueda de biomarcadores en el ámbito ocular como son la lágrima, conjuntiva, humor acuoso y humor vítreo especificando las enfermedades que más afectan a cada uno de ellos y los biomarcadores encontrados más comunes.

Palabras clave: biomarcadores, biomarcadores oculares, biomarcadores lagrimales.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Anatomía y fisiología del ojo.....	5
1.2. Biomarcadores	6
2. OBJETIVO	10
3. METODOLOGÍA.....	11
4. RESULTADOS	12
4.1. Lágrima.....	12
4.2. Conjuntiva.....	18
4.3. Humor acuoso	24
4.4 Humor vítreo.....	29
5. CONCLUSIÓN	34
6. GLOSARIO.....	36
7. ACRÓNIMOS	37
8. BIBLIOGRAFÍA.....	38

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anatomía y fisiología del ojo.

El ojo es una estructura compleja cuya característica principal es la conducción y conversión de la luz natural en impulsos eléctricos con los que se forma la imagen en el cerebro. Lo podemos dividir en la parte anterior y posterior del ojo. (“Adler: Fisiología del ojo/,” 2004)

El examen somero del ojo nos permite observar partes como la pupila, que parece ocupar una posición central, estando ligeramente desplazada hacia la zona inferior y nasal. Una de las funciones principales de la pupila es el ajuste de su diámetro en función de la cantidad de luz que entre en la pupila, para optimizar la iluminación de la retina. Una pupila pequeña aumenta la profundidad de enfoque del sistema óptico del ojo de forma similar al *agujero estenopeico*, cuyo centro es el iris, músculo que le da color al ojo, siendo el que controla el tamaño de la pupila dependiendo de la intensidad de la luz recibida. (“Adler: Fisiología del ojo/,” 2004)

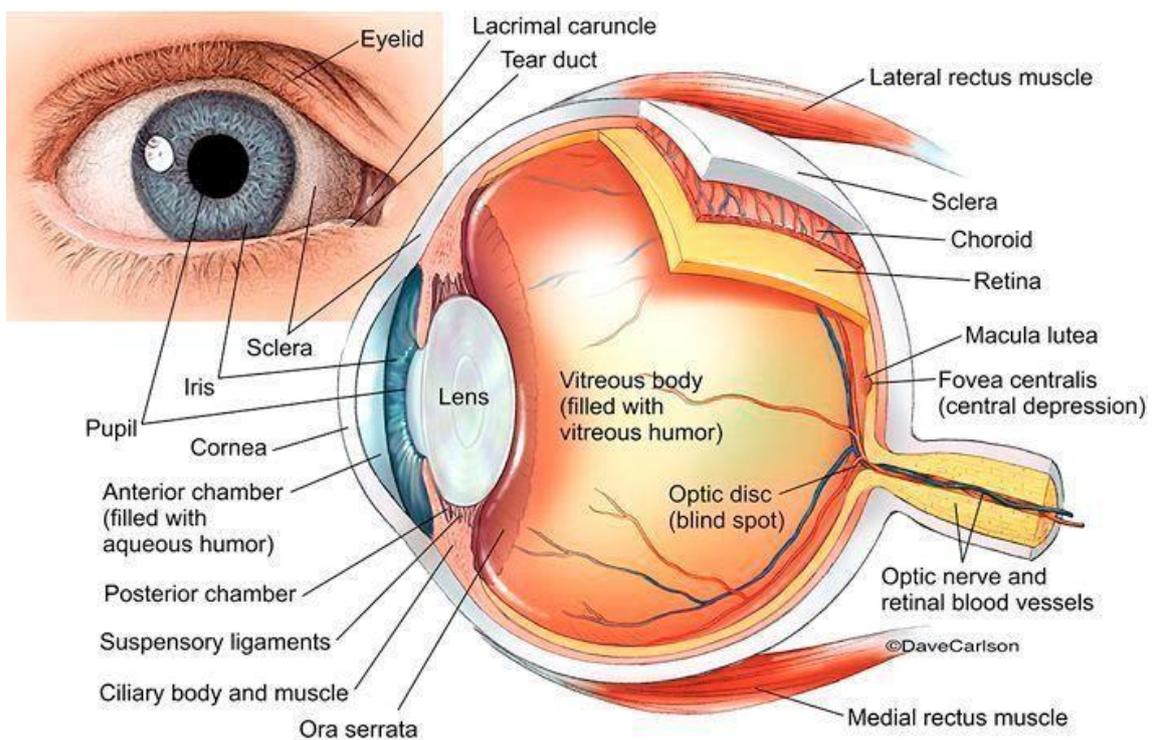


Figura 1. Anatomía del ojo. Dave Carlson.

Observando la Fig., vemos que la córnea es una estructura transparente, a-vascular y superficial del ojo, siendo la estructura con la capacidad de refracción más importante del ojo produciendo que la luz enfoque en la retina, además también actúa como barrera física frente a agentes externos. Consta de una capa externa de células epiteliales en constante renovación, una capa estromal media formada por fibras de colágeno y proteoglicanos interaccionando entre sí para formar una matriz extracelular de gran protección mecánica. En la parte más interna

encontramos una capa de células no regenerables esenciales para el mantenimiento de la transparencia, formando una barrera que permite la entrada de nutrientes en el estroma a-vascular. La parte adyacente a la córnea es la esclera, parte blanca a simple vista, cuya función principal es de barrera frente a agentes externos. (“Adler: Fisiología del ojo/ ,” 2004)

Probablemente, una de las partes más importantes de las percepciones sensoriales es la retina, que posee receptores que transforman toda la información lumínica que le llega en forma de impulsos nerviosos y las envía al cerebro a través de una cadena neuronal. (“Adler: Fisiología del ojo/ ,” 2004)

1.2. Biomarcadores

Los biomarcadores son aquellas sustancias cuyo estudio nos permiten diagnosticar una enfermedad o la susceptibilidad a padecerla. Con ello podemos analizar la acción frente a un organismo patógeno o bien ante un fármaco para ver cómo actúa o cuál es su respuesta. (Ortega Ortiz de Apodaca, 2010)

La OMS ha declarado que una verdadera definición de biomarcadores incluye "casi cualquier medida que refleje una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial, que puede ser químico, físico o biológico". La respuesta medida puede ser funcional y fisiológica, bioquímica a nivel celular o una interacción molecular” (Strimbu & Tavel, 2010)

Actualmente, los biomarcadores en el área de desarrollo de fármacos, son exploratorios y su progreso se ha iniciado en modelos preclínicos para evaluar su perfil de seguridad antes de llevarlo a la evaluación en la clínica, es decir, antes de comprobarlo en humanos.(Ortega Ortiz de Apodaca, 2010)

Esta revisión bibliográfica se focaliza en los biomarcadores ya establecidos y algunos estudios clínicos nuevos, siendo las matrices más estudiadas: el humor acuoso, humor vítreo, la lágrima y la córnea. Evaluando estas matrices se ha proporcionado información sobre el diagnóstico de una enfermedad, su progresión o modulación ya sea con intervención farmacéutica o no, lo que hace que sea un componente decisivo para el descubrimiento y evaluación del desarrollo de fármacos para enfrentar las enfermedades oculares.(Ortega Ortiz de Apodaca, 2010)

La identificación de los biomarcadores en un estudio con respecto a una patología requiere de dos aspectos esenciales, relevancia y validez. Con relevancia nos referimos “a la capacidad de un biomarcador para proporcionar información clínicamente relevante sobre cuestiones de interés para el público, los proveedores de atención médica o los funcionarios de políticas de salud”. Y a la validez nos referimos a “la necesidad de caracterizar la efectividad o utilidad de un biomarcador como un punto final”. La validez no puede ser un extremo o el otro, sino un rango amplio de

posibilidades, es decir, puede ser válido para algunas personas o ser más válido en unas que en otras, también de que tanto un fármaco como un biomarcador puede ser válido en un tanto por ciento, por ejemplo, un 50%. De hecho, muchos científicos que investigan los biomarcadores lo han rechazado interpretándose como "inadecuado", ya que "que puede haber una comprensión biológica completa de la relación entre un biomarcador dado y un punto final clínico, una suposición que rechazan". (Strimbu & Tavel, 2010)

Así, podemos tener diferentes tipos de biomarcadores como: de diagnóstico, que son aquellos que son capaces de pronosticar un proceso patológico o fisiológico; de pronóstico, los cuales pueden predecir una respuesta farmacológica; de respuesta, capaces de identificar la respuesta que obtendría un organismo ante una patología o un medicamento, de predicción terapéutica, ante un tratamiento farmacológico la respuesta terapéutica desencadenante; etc. Por lo tanto, no sólo se limita a la detección de enfermedades sino al desarrollo y análisis de los medicamentos, teniendo algunos muy específicos a nivel celular, mucho más complejos o bien unos más asiduamente conocidos, como la alta temperatura corporal, correspondiente a un cuadro de fiebre.(Ortega Ortiz de Apodaca, 2010)

Podemos encontrar por ejemplo biomarcadores de exposición que nos permiten detectar mediante el estudio del ADN, las personas o grupos que han sido expuestos durante cierto tiempo a algún tóxico o químico, pudiendo haber alterado la estructura y desarrollar en un cierto periodo de tiempo una enfermedad, o conjunto de enfermedades. Uno de estos tóxicos más comúnmente estudiados es el tabaco.(Ortega Ortiz de Apodaca, 2010)

Algunos de los biomarcadores más actuales nos permiten seleccionar o descartar la efectividad de un tratamiento en diferentes pacientes, ya que, un mismo tratamiento puede afectar a cada persona diferente además de poder ajustar la cantidad de dosis más afín a cada paciente. En un futuro, se espera que se vaya incrementando la cifra de biomarcadores para llegar a un análisis más adecuado en cada paciente.(Ortega Ortiz de Apodaca, 2010)

La búsqueda de nuevos biomarcadores es un desafío no sólo para la clínica, sino también para la química analítica, debido a la necesidad de descubrimiento de nuevos métodos para la identificación con matrices complejas a partir de fluidos y tejidos comunes. Uno de los problemas es que estos tejidos y fluidos contienen concentraciones de proteína y péptidos de diez órdenes de magnitud mientras que un *espectrómetro de masas* apenas puede cubrir un intervalo de cuatro órdenes de magnitud. Si bien en la lágrima tenemos seis proteínas fundamentales que enmascaran proteínas en menores cantidades, pero son mucho más interesantes en el sentido de búsqueda de biomarcadores. La parte más importante es la preparación de las muestras evitando la excesiva cantidad de proteínas mayoritarias para que no camuflen a las minoritarias. En la actualidad hay un gran número de empresas que proporcionan las muestras utilizando anticuerpos de procedencia

aviar cuya ventaja principal es una exclusividad incrementada como consecuencia de una menor **reactividad cruzada** con las proteínas de los mamíferos.(Ortega Ortiz de Apodaca, 2010)

Uno de los inconvenientes principales de la reducción de proteínas en la preparación de las muestras arraiga en la tendencia que tienen las proteínas principales, especialmente la albúmina de unirse a otras proteínas o parte de ellas, teniendo como consecuencia la eliminación de algunas proteínas que se podrían considerar de interés, para ello, se utiliza la tecnología ``ProteoMiner`` que aporta una serie de **hexapéptidos** enlazados cada uno a una secuencia proteica determinada, los ligandos específicos con las proteínas mayoritarias hacen que se sature rápidamente. En el caso contrario, las proteínas minoritarias se concentrarán en sus ligandos, enriqueciéndose y permitiendo la preparación de subgrupos específicos de proteínas. Pero no todos se basan en la expresión génica, hay un gran número de investigaciones actuales que estudian los cambios epigenéticos, que son a que se refieren a cambios en el **fenotipo**, que se producen en el desarrollo de las enfermedades, pero que no involucran cambios en el ADN, es decir, es la unión del medio ambiente y el genoma. Uno de los mayores méritos en las últimas décadas es el hallazgo de biomarcadores de **expresión génica** que proporcionan una gran cantidad de información sobre las enfermedades.(Ortega Ortiz de Apodaca, 2010)

Centrándonos en la oftalmología, en las enfermedades oculares, se deben buscar biomarcadores efectivos sobre muestras de fácil acceso como son, la lágrima, la córnea y la conjuntiva, que darían una información muy valiosa sobre el segmento anterior. Sin duda, son el humor acuoso y el vítreo las zonas más adecuadas para que estos biomarcadores den una información más veraz y eficiente, pero su difícil acceso nos llevaría a un método invasivo y complejo, por ello, los desaconsejan para la profundización del estudio en biomarcadores en esas zonas oculares.(Tamhane et al., 2019)

Un conjunto de enfermedades crónicas de la superficie del ojo origina síntomas como molestias oculares crónicas, entre los trastornos más graves encontramos la blefaritis, la enfermedad ocular alérgica, el ojo seco hiposecretivo y la conjuntivitis, jugando un papel muy importante la inflamación en la patogénesis. En la actualidad, no se tiene mucha información de los componentes del fluido lagrimal que cambian cuando aparecen estas enfermedades además también se desconoce la concentración que puede inducir cambios en la fisiología de la película lagrimal.(Tamhane et al., 2019)

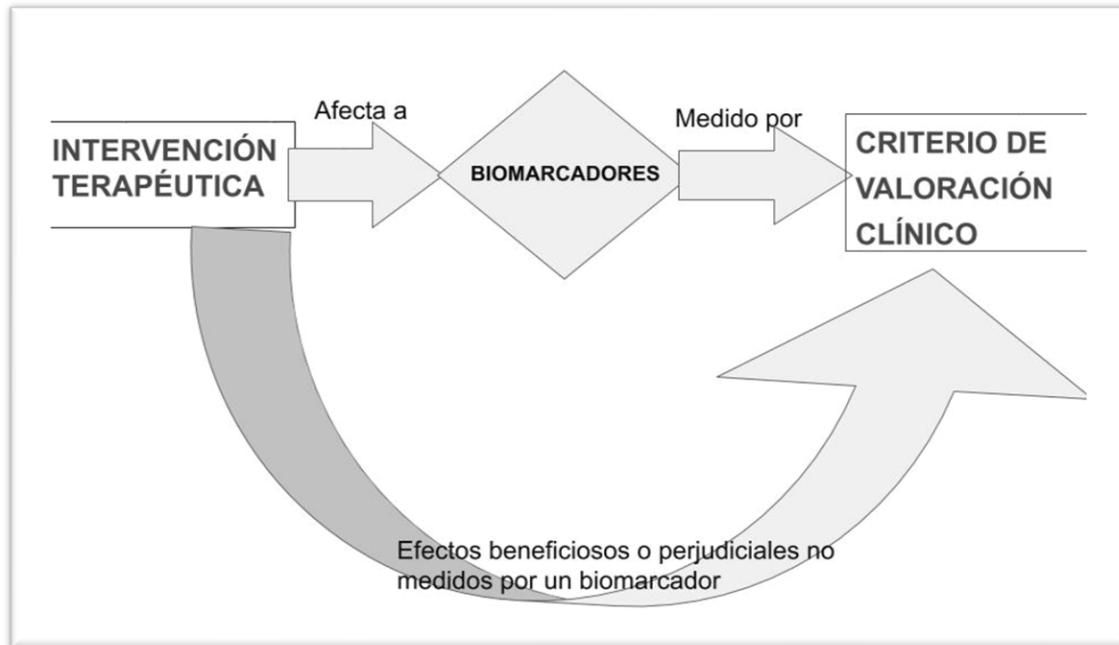


Figura 2. Aclaración de una intervención terapéutica.

Observando la figura 2, al comenzar una intervención terapéutica, los biomarcadores conllevan una amplia gama de propósitos para el desarrollo de medicamentos, estrategias y ensayos clínicos y son, por tanto, una base, muy importante para el desarrollo de ensayos clínicos, la profundización en el conocimiento del funcionamiento farmacológico y la determinación de los subtipos de enfermedades. (Atkinson et al., 2001)

Concluyendo, usando un mismo biomarcador en los diferentes métodos de clínica resaltan su importancia práctica. Gracias a la oportunidad que nos ofrecen los biomarcadores podemos explorar mecanismos fisiopatológicos complejos de una forma más sencilla, poco invasiva y sin riesgo ni incomodidad para el paciente. Desde este enfoque, amplían el conocimiento clínico y, comparando su conocimiento en diferentes escenarios clínicos contribuyen a mejorar la comprensión de la complejidad de los mecanismos fisiopatológicos que median en estos procesos. (Torres Courchoud et al., 2016)

2. OBJETIVO

El objetivo de la revisión bibliográfica es recopilar la mayor cantidad de datos relevantes acerca de los biomarcadores además de su aplicación clínica y farmacéutica con respecto a las enfermedades oculares, ya sea bien para el control de la enfermedad o su diagnóstico.

Nos centramos en los diferentes tipos de biomarcadores existentes, así como su aplicación a los tratamientos para las enfermedades oculares más comunes como la DMAE, glaucoma, queratitis, uveítis y también para las enfermedades retinianas como la distrofia de los conos, mejorando y acortando el tratamiento y ayudando a su diagnóstico, demostrándolo mediante la cantidad de investigaciones.

3. METODOLOGÍA

El trabajo de investigación empleado en esta revisión bibliográfica se ha realizado de forma deductiva, es decir, se parten de datos e ideas generales para determinarse premisas particulares. La revisión se comienza con la recopilación de artículos partiendo de la base como de términos fisiología y anatomía, biomarcadores, para ir enfocándolo a la oftalmología.

Para llevar a cabo la revisión bibliográfica se han empleado diferentes bases de datos y diferentes buscadores como PubMed, Scopus, Fama, MedLine o Google Académico, introduciendo palabras claves en lenguaje inglés, como biomarcarkers, ocular biomarkers, oftalmology, eye's anatom, etc. Buscando en lenguaje español también en Google Académico introduciendo las palabras claves mencionadas anteriormente. Utilizando así la bibliografía de los primeros documentos que se encontraban, para adentrarnos más en el tema a tratar.

A continuación, en la figura 3 se muestra cómo poniendo las palabras biomarcadores oculares en Google Académico encontramos un total de 62.000 resultados. Este valor se fue acotando a medida que introducíamos más palabras clave como ocular y lagrimal, para afinar la búsqueda.

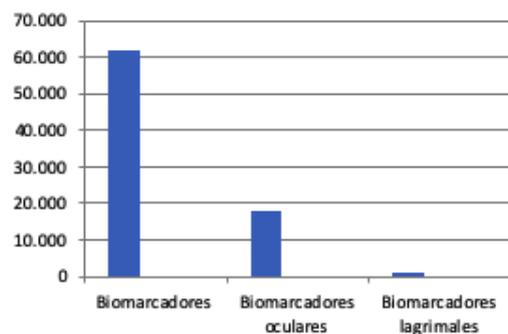


Figura 3. Número de publicaciones encontradas por palabra clave buscada.

Además, debemos incluir el uso de libros y documentos en papel obtenidos en la biblioteca CRAI Antonio Ulloa como el ya referenciado (Biomarcadores: Analítica, diagnóstico y terapéutica) de la Real Academia Nacional de Farmacia y otros recursos electrónicos que nos han servido para contrastar las diferentes informaciones tomadas de artículos, libros electrónicos, capítulos de libros, conferencias, etc. para entender mejor nuestro tema de estudio.

Por último, se han elaborado un listado de acrónimos y un glosario con palabras que están señaladas en el texto en **negrita** y *cursiva* ya que pueden ser desconocidas para el lector, ayudando así a una mejor comprensión del texto.

4. RESULTADOS

4.1. Lágrima

El fluido lagrimal tiene varias funciones principales dentro del ojo, su principal función es abastecer a la córnea de proteínas y nutrientes puesto que ésta es a-vascular, convirtiéndola en una superficie de gran calidad óptica y conservando el buen estado del epitelio corneal además del conjuntival. Otra de las funciones principales de la lágrima es lubricar los párpados durante el parpadeo y, además, conocemos que el líquido lagrimal está formado por proteínas bactericidas para atacar a los agentes externos que entren en el ojo. Por tanto, la lágrima contiene una serie de capas envueltas de una forma compleja que contienen lípidos, proteínas, péptidos, metabolitos múltiples de moléculas pequeñas secretadas de glándulas, enzimas y sales ocasionadas por sistemas glandulares del ojo. Tenemos la certeza que un cambio en la composición y concentraciones en el líquido lagrimal puede impactar significativamente a la homeostasis de la película lagrimal y a la salud del ojo. (Hernández-Martínez et al., 2016) (“Adler: Fisiología del ojo/,” 2004)

Podemos diferenciar, por tanto, varios tipos de lágrimas según el modo en el que se sintetizan, como las lágrimas basales que son aquellas que envuelven nuestra superficie ocular permanentemente y son muy necesarias para la salud ocular, éstas son las que se encuentran reducidas ante como por ejemplo el *síndrome de Sjögren (SS)*. Encontramos también la que se sintetiza de forma refleja como por ejemplo la “estimulación nasal del reflejo del estornudo”, las lágrimas cerradas son aquellas sintetizadas exclusivamente en periodo de somnolencia, muy importantes para la regulación de la homeostasis y el último tipo son las emocionales producidas por sensaciones como el bienestar o pena. (Tamhane et al., 2019)

Frecuentemente, la lágrima se encuentra en unas cantidades ilimitadas siendo ésta un componente biológico fundamental para evaluar el estado en el que se encuentra la salud ocular del ojo. Se han usado distintos procedimientos para recoger la muestra de la película lagrimal de forma no invasiva como las tiras de Schirmer, en la cual se coloca una tira especial dentro del párpado inferior, en ambos ojos al mismo tiempo, cerrándolos durante cinco minutos y midiendo hasta dónde el papel está húmedo, también se utiliza otros materiales de tipo absorbentes como las mini esponjas, tubos “microcapilares pulidos al fuego” los cuales son tubos muy finos con los que se extrae tanto la sangre de los capilares como en este caso la lágrima y por último la limpieza ocular con suero fisiológico. Se ha demostrado que la diferencia de procedimiento en la recogida de la lágrima influye en el resultado observado de las investigaciones. Una circunstancia

que suele pasar es la reacción activar los nervios corneales e inducir un *desgarro reflejo* que puede alterar la composición de la película lagrimal. Otros factores externos que pueden afectar a la composición de la lágrima son las lentes de contacto, anestesia, lágrimas artificiales, etc.(Tamhane et al., 2019)

Varias enfermedades oculares tienen que ver con la película lagrimal, aunque no se sabe todavía de qué manera influyen en cada componente de ella, pero sí que se ve afectada ya que su proximidad al foco de la enfermedad hace que cambie algún componente. Entre los trastornos oculares más frecuentes encontramos el ojo hiposecretivo, ojo seco, alergia, etc. Siendo la inflamación un papel importante en cada una de ellas. El SS además de afectar a la lágrima también afecta a la saliva y otras secreciones. Este síndrome sólo es diagnosticable mediante una biopsia y puesto que es un método altamente invasivo, la mayoría de los pacientes no lo acaban aceptando retrasando así el diagnóstico de la enfermedad. En una investigación actual se estudió el proteoma de la saliva, pero no se llegó a una conclusión clara debido a la gran complejidad de los métodos utilizados, aunque sí se llegó a tener varios candidatos a biomarcadores. Con todo esto múltiples estudios intentan detectar esos biomarcadores y su sensibilidad con la enfermedad ya sea en la saliva o la lágrima. (Chen et al., 2015)

Las proteínas fundamentales comprenden lactoferrina, lisozima, secretoria, inmunoglobulina A, lipocalina, albúmina y lipofilina. La concentración de proteínas en cada lágrima varía de 6 a 10 (mg/ml). La variación bien sea ascendente o descendente de la regulación de las proteínas pueden darnos pistas sobre la aparición de una patología. Hay diversos métodos para estudiar la totalidad de la concentración de proteínas, pudiendo ser cualitativos o cuantitativos como el gel electroforesis, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y *cromatografía* líquida de alto rendimiento. (Fidel Ortega, 2010)

Diversos tipos de espectrometría de masas se utilizan para detectar el cambio en la composición de la lágrima después de una lesión o daño en el ojo así se abarcan algunos avances ``como la desorción asistida por matriz de ionización por tiempo de vuelo de ionización (MALDITOF), la ionización por desorción láser de superficie mejorada-TOF (SELDITOF), la trampa lineal de iones-transformada de Fourier y la cromatografía líquida junto con la ionización por electropulverización (LC / MS) así como sistemas de análisis de cuentas multiplex`` . Con todo esto se emprende un estudio para reconocer y determinar la utilidad de las proteínas en cuanto a las enfermedades oculares.(Tsuji, 2012)

Así pues, se identifican un grupo de proteínas mayoritarias (lisozima, lipocalina y lactoferrina) son un porcentaje elevado de las proteínas de la lágrima, por ello la identificación del otro tanto por ciento de proteínas se ve perjudicada. Pero en general, se han realizado pocos estudios que comparen la lágrima de una persona sana con la de una enferma. (Fidel Ortega, 2010)

En cuanto a la glándula de meibomio, se pensaba hasta no hace mucho que era productora y secretora sólo de lípidos, pero en uno de los últimos estudios se ha demostrado que se secretan más de 90 proteínas en esta glándula que no sólo incluyen celulares sino también mitocondriales, nucleares, etc.

En el fluido lagrimal, podemos encontrar también, como hemos dicho anteriormente, lípidos compuestos por triglicéridos, ácidos grasos, diésteres, colesterol y ésteres de cera, colesterol libre, hidrocarburos y lípidos polares generados en la glándula de meibomio. En la película hallamos tres componentes principales lípidos, glucocálix y mucina acuosa. En la actualidad, se propone una capa laminar estable de fosfolípidos polares de más que es crítica para la divulgación del lípido no polar sobre la capa acuosa, actuando como tensoactivos y como anclaje mientras que la capa más externa pospone la evaporación de la capa de la película lagrimal. La oscilación de la capa externa por los cambios, la concentración de los lípidos se ha identificado como uno de los signos de la identificación el síndrome de ojo seco. Si bien se sabe que hay una falta de métodos y la agrupación de muestras se ve perjudicada por la manipulación ya que pasa igual que con las proteínas. Aun así, Para controlar las composiciones de las secreciones de la glándula de meibomio se utiliza la ``resonancia magnética pico-nuclear y cromatografía'' en la capa más fina.(Tsuji, 2012)

Uno de los mecanismos pioneros fue el Advanced, una ``prueba de desgarro de la lactoferrina ocular de Tear Diagnostics'', la lactoferrina es una glucoproteína de unión al hierro y que la podemos encontrar en múltiples dosis en la lágrima normal encontrando como función la modulación de la respuesta inflamatoria ocular y el crecimiento de las células haciendo que se mantenga la salud de la superficie del ojo. Cuando hallamos una patología en el ojo y revisamos los niveles de lactoferrina los encontramos muy disminuidos, por ejemplo, cuando tenemos un herpes simple, queratitis, infecciones sistémicas, etc. Otra de las pruebas que se llevó a cabo es la de la inmunoglobulina E, que es un kit de diagnóstico que se usa para cuantificar una conjuntivitis alérgica. (Tamhane et al., 2019)

En cuanto la alteración de la osmolaridad ha sido el factor más importante para el diagnóstico de DED y la osmolaridad del Tearlab. Se trata de un semiautomático que consiste en cuantificar la osmolaridad, es decir, alteraciones en la concentración de electrolitos y en proteínas de las capas de la lágrima. También puede medir la evaporación de la lágrima que se produce constantemente y que contribuye a la hiperosmolaridad de la película. Estos cambios en la osmolaridad, variando de 308 mOsm/L a 316 mOsm/L se pueden utilizar como medio para el diagnóstico de DED.(Tamhane et al., 2019)

La matriz Metaloproteinasa-9 es una endopeptidasa muy importante en la matriz extracelular que actúa recomponiendo las lesiones ocasionadas en la superficie corneal, por ello

varios estudios han demostrado que las cantidades de MMP-9 están elevadas en pacientes con SS, DED y OGVHD. Uno de los test de MMP-9 más destacados es el llamado InflammDry que se usa en la clínica para analizar la situación de inflamación en la que se encuentra el ojo y tomar la terapia antiinflamatoria determinada. Esta prueba es muy utilizada para detectar en pacientes como ojo seco severo siendo una vez ya diagnosticados como síndrome de ojo seco. (Tamhane et al., 2019)

Diversos estudios han mostrado la evidencia de la relación de varios métodos inflamatorios y las citocinas/quimiocinas con el sistema inmune ante la presencia de DED, alergia, SS u otras condiciones inflamatorias que producen un aumento de la lágrima. Por ejemplo, la Interleucina-8 (IL-8) se ha encontrado elevada en lágrimas de ojo seco en diferentes concentraciones. Aunque en estos datos se vea claro, hay unas diferencias por la recolección de las muestras, su procesamiento, su rigurosidad, etc., que hace que la comparación de las citocinas y quimiocinas entre diversos estudios sea diferente. En un estudio se comprobó el efecto de CGC (carboximetilcelulosa glicerina), unas gotas que se echaban unos pacientes con ojo seco cuatro veces al día, los resultados obtenidos fueron muy efectivos ya que redujeron la rotura asociada al DED además de mejorar todas las pruebas lagrimales hechas anteriormente. Así pues, se demuestra que, aunque la mayoría de los pacientes usa una o más formulaciones de lágrimas artificiales para controlar y aliviar los síntomas también podrían recibir un tratamiento antiinflamatorio como los esteroides o laticlosporina. (Martin et al., 2018)

El interferón gamma (IFN- γ) es una citocina sintetizada por las células T-helper 1 (Th-1) y las Natural Killer (NK), etc. y está en conexión con funciones inmunes como la captación y la polarización del Clúster de Diferenciación 4 células Th1 positivas (CD4 +) y de muchas citocinas y quimiocinas Th1. Niveles altos de IFN- γ en la película lagrimal de personas con DED y SS ha sido encontrado. Varios del mismo grupo de estudios y otros tantos también han estudiado niveles altos de necrosis tumoral factor alfa (TNF- α) que se piensa que simboliza una situación inflamatoria general de la superficie ocular en un paciente con algún trastorno DED. Este factor TNF- α también se ha mostrado elevado en pacientes con TAO. (Tamhane et al., 2019)

Una de las enfermedades más comunes referidas anteriormente de la lágrima es el síndrome de ojo seco, que se identifica como un complejo autoinmune multifactorial con una patogénesis desconocida que ha aumentado rápidamente en los últimos años. Se caracteriza por un sistema inmune e inflamatorio que afecta a la superficie ocular y, en casos muy severos puede inducir a la ceguera debido a la ulceración corneal o la aparición de cicatrices en su superficie. Estos pacientes manifiestan algunos síntomas como ardor, irritación, molestias, fotofobia y visión borrosa, además de tener un riesgo más elevado de infección corneal y un daño irreversible en los tejidos. Se han estudiado algunos biomarcadores para identificar un ojo seco, la regulación

diferencial de la lactoferrina, EGF y acuaporina fueron los claves para su asociación con algunos tipos de ojo seco como el no Sjögren, Sjögren y Stevens-Johnson.(Zhou et al., 2009)

Además, en la lágrima de una persona con ojo seco podemos observar una reducción en las proteínas que contenían prolina. Se descubrió que diez proteínas no identificadas eran reguladoras diferenciales en el síndrome de Sjögren. Estas proteínas fueron identificadas por sus masas, siete de ellas fueron reguladas negativamente y las otras tres fueron reguladas positivamente.

Cuando comparamos la lágrima de una persona con ojo seco y una persona normal, varios tipos de esfingomielina y fosfatidilserina se ven afectados, de esta forma se predice que la glándula de meibomio compensa la película lagrimal. Se explicó la causa que completa el andrógeno, ``síndrome de insensibilidad y envejecimiento tienen en el lípido polar y neutro fracciones de muestras de meibomio del paciente. Así pues, el meibomio obtenido de las mujeres con síndrome de insensibilidad a los andrógenos completos tuvo diferencias significativas en los niveles de expresión de lípidos no polares, incluyendo ésteres de cera y colesterol. Las fracciones lipídicas polares también exhibieron diferencias asociadas con la insensibilidad completa a los andrógenos, que incluyó cierta fosfatidilcolina y especies de fosfatidiletanolamina. Finalmente, diferencias significativas fueron observadas en los perfiles lipídicos no polares y polares asociados con el envejecimiento, sugiriendo que las alteraciones en los lípidos podrían estar relacionadas con la edad aumento de casos observados de síndrome del ojo seco``.(Tamhane et al., 2019)

La citocina Interleucina-1 (IL-1) está formada por: la interleucina-1 alfa (IL-1 α) y la interleucina-1beta (IL-1 β) se ha encontrado presente en el líquido lagrimal. Hay estudios clínicos que han hallado que en las lágrimas de los pacientes con ojo seco se encuentran en elevados niveles de IL-1 α e IL-1 β maduro que se correlacionó con la tinción de fluoresceína corneal. Un factor muy evidente es la Interleucina-8 (IL-8), una citocina esencial que conduce la migración de neutrófilos, basófilos y linfocitos T a través de la intervención innata de la respuesta inmune y angiogénica, ha sido muy alta en lágrimas de pacientes con ojo seco.(Tamhane et al., 2019)

Otro estudio de la película lagrimal tiene que ver con la polifosfato de diadenosina que se adiciona entre 100–345 veces, así cuanto más incrementado se encuentre esta polifosfato más gravedad en el en síndrome de ojo tendremos. Así pues, se podrá utilizar en aquellos con una disminución de la secreción lagrimal y ojo seco sintomático tanto para su identificación como su gravedad. Este descubrimiento se puede ver como un nuevo objetivo para la identificación precoz de ojo seco.(Tamhane et al., 2019)

Se realizó un estudio de 21 pacientes con TAO y 10 pacientes asintomáticos normales. Los pacientes con TAO se dividieron en TAO activo e inactivo sobre el fundamento de una formulación de 7 puntos de la calificación de actividad clínica. Se consiguió la puntuación del índice de enfermedad de la superficie ocular, contar el tiempo que tarda en romperse la película lagrimal, bien sea hecho con topógrafo o lámpara de hendidura (BUT) y se hizo la prueba de las tiras de Schirmer que ha sido explicada anteriormente y tiñeron con fluoresceína a todos los pacientes. Se recolectaron diez microlitros de líquido lagrimal para distinguir las concentraciones de interleucina (IL) -1 β , IL-2, IL-6, IL-10, interferón IL-17 (IFN) - γ , factor de necrosis tumoral (TNF) - α y uno quimiocina (IL-8) a través de un análisis de perlas múltiples.(Tamhane et al., 2019)

Cuando se examinó a los pacientes con fluoresceína la cantidad de lágrima fue más elevada en pacientes con TAO, en cambio las pruebas de Schirmer y BUT dieron valores más bajo en pacientes con TAO activo y TAO inactivo en comparación con personas sin patología activa. Las concentraciones de IL-1 β , IL-6 e IL-8 en la lágrima aumentaron en pacientes con TAO activo más que en TAO inactivo y los pacientes sin enfermedades. La concentración de TNF- α fue elevada en ambas TAO, activo e inactivo, comparando con las personas sin patologías. El IL-17 fue significativamente mayor en TAO activo que los asintomáticos, y el nivel de IL-2 fue notoriamente mayor en TAO inactivo. Hubo una conexión positiva entre los niveles de lágrimas de IL-1 β , IL-6 e IL-8 y CAS en TAO. No se encontró la relación entre estos factores.(Tamhane et al., 2019)

Por tanto, las desigualdades de las citocinas inflamatorias en la película lagrimal entre personas con TAO activo e inactivo muestran que la inflamación del ojo puede estar implicada en el mal encontrado en el ámbito lagrimal del ojo del TAO.(Chauhan et al., 2009)

Algunos investigadores, creen que la proximidad de la lágrima con el epitelio corneal hace que también cambie su composición ya que tiene la capacidad de alterar su espesor y compensar las irregularidades de la superficie estromal pudiendo enmascarar en su totalidad o parcialidad alteraciones topográficas epiteliales de la cara anterior de la córnea. Por ello se estudian los mapas epiteliales que pueden ayudar a confirmar o descartar el diagnóstico, a través del epitelial doughnut pattern. Este método se desarrolla actualmente en el análisis clínico de un paciente con queratocono que es una enfermedad no inflamatoria que se caracteriza por la disminución progresiva y la protrusión apical. A través de la OCT que es un examen de diagnóstico que nos permite analizar diferentes partes de la retina y también mapear espesores corneales, epiteliales y estromales. Así pues, a través de los cambios característicos en la córnea se permitió la detección del queratocono temprano. (Hagan, 2017)(Li et al., 2016)

Es obvio que el examen de la película lagrimal se ha convertido en un punto fundamental en la patología de la superficie del ojo por su comodidad de acceso a la hora de tomar la muestra de la lágrima y progreso en procedimiento analítico. El avance además de pautas generalizadas de la metodología de recogida de lágrimas, análisis y el depósito posibilita la confrontación entre investigaciones y autoriza biomarcadores adicionales.

4.2. Conjuntiva

La conjuntiva es una membrana mucosa muy delgada que se encuentra en el segmento anterior del globo ocular, es semitransparente recubriendo la parte blanca del ojo, es decir, la esclera, y está muy vascularizada. Cubre la cara posterior e interior de los párpados para proteger al ojo de agentes externos. Una de las funciones principales es la formación de los componentes de la lágrima tanto la parte acuosa como la mucosa contribuyendo también a la defensa inmunológica del ojo y a la homeostasis. Además, también sirve para preservar los tejidos blandos de la órbita y el párpado. La conjuntiva consta de tres partes, la parte conjuntival palpebral, forniceal y bulbar como parte anatómica. La histología de la conjuntiva está compuesta por el epitelio que tiene células columnares estratificadas junto con células caliciformes que fabrican mucina y una sustancia exclusiva del tejido conectivo. (“Adler: Fisiología del ojo/,” 2004)

Actualmente, el tejido de la conjuntiva se ha convertido en un gran objeto de estudio con técnicas de muestreo para encontrar y evaluar biomarcadores de los trastornos o patologías del ojo, encontrando una gran cantidad de biomarcadores notables.

La conjuntiva tiene algunas glándulas lagrimales accesorias como el tejido linfoide, mastocitos y células caliciformes que producen una parte de la mucina de la lágrima a partir de MUC5AC cuya función es formar gel que es esencial para las alteraciones del líquido lagrimal. Encontramos un tejido en conjunto con la conjuntiva (CALT) que está compuesta por todos los integrantes asociados de la respuesta inmune.(Tamhane et al., 2019)

Como ya hemos mencionado en otras instancias, la inflamación forma una parte muy importante que se resuelve a través de la mucosa. Los eosinófilos, basófilos y mastocitos son células inflamatorias que habitualmente no se encuentran en el epitelio de la conjuntiva, pero cuando está presente una inflamación se encuentran en niveles elevados sobre todo los mastocitos de tipo mucosa. Algunos moduladores inflamatorios por ejemplo el TNF- α , IL-6 y la interleucina-10 como también otras células de adhesión como ICAM-1 así como otras células mononucleares y linfocitos positivos en la capa de células epiteliales.(Tamhane et al., 2019)

Para evaluar y recoger las células de la capa de la superficie con el fin de encontrar la mayoría de biomarcadores posibles realizamos el método a través de la citología de impresión (IC) que es una técnica muy utilizada y que recolecta de forma mínimamente invasiva y de corto tiempo para el muestreo de las células epiteliales conjuntivales superficiales de forma que cause el menor dolor posible. Se utilizan diferentes filtros absorbentes sobre las capas superficiales de la conjuntiva.(Hagan, 2017)

Se realizó un estudio en 20 personas con una técnica de un filtro de membrana PES y utilizado el método IC, teniendo como finalidad la comparación del ARN recuperado en células epiteliales de la conjuntiva. Se llegó a la conclusión de que el ARN tenía un rendimiento igual en ambos métodos.(Tamhane et al., 2019)

La citología con cepillo es otra de las técnicas empleadas como otra opción a IC, y además puede emplearse como complemento para recoger células conjuntivales de diferentes sitios. El cepillo es de usar y tirar y se puede utilizar un anestésico previo a coger las células de la superficie conjuntival del ojo. Se descubrió que la citología de pincel era más elevada que la IC en una investigación realizada a 63 personas en las cuales se examinó la cantidad y calidad de las células recolectadas con técnicas de tinción. Muchas investigaciones descubrieron el beneficio de los cepillos e IC en la medida de biomarcadores en las células de la superficie del ojo. Los modelos recolectados en la conjuntiva también pueden ser recogidos a través de biopsias del tejido conjuntival que es una técnica más intrusiva que los descritos anteriormente. Una vez recogidas las muestras se utilizaron diferentes métodos para su análisis y el descubrimiento de los biomarcadores, como la microscopía, la inmunohistoquímica, la citometría de flujo además de la `` reacción en cadena de la transcripasa polimerasa (RT-PCR) `` , son los más habitualmente utilizados. La microscopía se empleó para visibilizar la célula, su morfología y numerar las células calciformes de la superficie de la conjuntiva. El IC se queda fijando en las membranas de las células calciformes examinando la densidad, además se utilizan la inmunohistoquímica o la citometría se usan para evaluar la inflamación en la clínica a partir de los marcadores inflamatorios. Otra técnica muy utilizada es RT-PCR que separa el ARN en los modelos de IC aportando información de la genética en el tejido conjuntival analizado.(Tamhane et al., 2019)

Una de las nuevas técnicas introducidas en la búsqueda de biomarcadores es la microscopía confocal in vivo cuya función principal es examinar la alteración de la célula en la conjuntiva y en la córnea además de emplearse como un instrumento de diagnóstico de forma que no se invada la superficie del ojo. Hay diferentes retos en cuanto a la técnica mencionada anteriormente como puede ser campos de visión reducidos y la estandarización del reclutamiento de imágenes, su interpretación y cuantía además de mencionar el alto coste que requiere estas técnicas.(Tamhane et al., 2019)

Una de las glucoproteínas fundamentales que se encuentra en las células epiteliales, principalmente en las inmunocompetentes, es el antígeno leucocitario humano D (HLA-DR). Esta glucoproteína se ha asociado a patologías como DED. La técnica de IC se utilizó para la cuantificación del HLA-DR y demostrando su elevada cuantía en pacientes con DED en comparación con la de un ojo normal. Además, no solo permite su diagnóstico sino también el examen de su gravedad permitiendo clasificarlo de leve a grave y por tanto permitiendo tener un diagnóstico del tratamiento a elegir en cada paciente., el único inconveniente que se encontró fueron las limitaciones de la integridad de la muestra. Otra conclusión que se sacó en este estudio fue que las muestras no debían tener más de 14 días puesto que su calidad iba disminuyendo considerablemente y los resultados se veían afectados.(Tamhane et al., 2019)

Una molécula a destacar es la de adhesión molecular 1 (ICAM-1) que podemos encontrarla en diferentes tipos de células como las endoteliales, fibroblastos, leucocitos, queratinocitos y las células epiteliales. Como función principal tenemos la mediación de la cantidad de mediadores inflamatorios. La molécula ICAM-1 podemos encontrarla elevada en pacientes con SS además de otros marcadores que la rastreamos a partir de IC. En otro estudio se calculó en 28 pacientes asociados a la patología de síndrome de ojo seco y se encontró un elevado número de estos dos biomarcadores mencionados anteriormente, además de una gran correlación entre el ICAM-1 y el HLA-DR en personas con DED.(Tamhane et al., 2019)

Otro estudio investigó la relación del ICAM-1 y el HLA-DR en personas con GO, orbitopatía de Graves que se caracteriza por la inflamación del tejido orbital. Esta alteración se encuentra presente en la mayoría de enfermedades graves. Se realizó citología de impresión en 10 personas con GO no clasificado en activo e inactivo y 10 controles. La presencia de HLA-DR presenta antígenos en pacientes con GO activo en comparación con los controles, pero además también se identificaron en pacientes con enfermedades graves sugiriendo así que esta activación se deba a diferentes vías inmunológicas. Además, con respecto al ICAM-1 parece ser un marcador más sensible aún que la resonancia magnética que identifica el GO activo puesto que fue encontrado elevado en pacientes con GO activa. (Pawlowski et al., 2014)

En cuanto a los biomarcadores encontrados en las células calciformes que se encuentran en la parte del epitelio conjuntival y cuya principal función es producir mucinas en la parte superior del ojo y lubricar la parte más superficial del ojo y la lágrima para prever de patógenos inflamatorios. Cuando tenemos un paciente con síndrome de ojo seco encontramos una disminución de la cantidad de estas células puesto que además tiene una menor densidad de película lagrimal y un poco de inflamación en la superficie del ojo que podemos observar en patologías como SS, Stevens-Johnson, etc. Como consecuencia de tener un menor número de estas células en los pacientes ya mencionados, tenemos una disminución de sus funciones como

la de secretar mucinas y una superficie ocular perjudicada. Con visión al tratamiento de la enfermedad lo podríamos usar como biomarcador en el sentido de que un incremento de estas células sería una pista del buen funcionamiento del tratamiento. (Tamhane et al., 2019)

Uno de los componentes principales de la conjuntiva es la mucina que como bien se dijo anteriormente y existen varios tipos de mucinas dependiendo de quién las ha producido, las células caliciformes, solubles y las mucinas de la membrana (MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC7 y MUC16). Una de las mucinas más importantes es la productora de gel que es la MUC5AC y las que encontramos en las células de la conjuntiva del ojo son la MUC1, MUC4 y MUC16. La función de las mucinas más importantes es la estandarización de la película lagrimal. Además, estas mucinas forman parte de la lubricación, retención de agua y como barrera para los patógenos.

Entrando más en cuestión uno de los tipos de mucina, la MUC7 que es la más soluble y se encuentra en la superficie del ojo funciona como barrera frente a agentes patológicos. Estudiando las alteraciones de las mucinas en el ojo en la parte de las células de la conjuntiva puede ayudar a saber cómo funcionan las enfermedades del ojo como alergias atópicas o DED y también identificar los biomarcadores más valiosos de la sucesión de la enfermedad. En personas con AKC (queratoconjuntivitis atópica) grave, las pruebas conjuntivales captadas mediante IC y citología con cepillo mostraron que en los ojos de los enfermos con AKC, el ARNm de MUC16 fue relevantemente reguladas positivamente y se disminuyó la regulación de la expresión de ARNm de MUC5AC, en paralelismo con los pacientes sanos. Los investigadores sostienen que la disminución de la regulación de MUC5AC sería el resultado de una respuesta primaria de la superficie del ojo a la inflamación en forma de regulación negativa de mucinas del epitelio y una disminución de células caliciformes, con una posterior regulación positiva de MUC16 para preservar la superficie del ojo. En otra investigación las pruebas de IC recogidas de enfermos con SS demuestran los descubrimientos anteriores. Utilizando al instante RT-PCR, las expresiones genéticas de mucinas se tomaron nota en las diferentes pruebas de IC y la información indujo que la expresión de MUC5AC se disminuyó en 11 pruebas de SS que en personas de control. Los niveles de proteína MUC5AC, tomadas en pruebas de lagrimales también disminuyeron considerablemente, confirmándola información captada en la capa del epitelio de la conjuntiva. Así pues, la disminución de MUC5AC en la película lagrimal o el epitelio de la superficie del ojo, sería un biomarcador de un grado de enfermedad y una muestra de estabilidad del líquido lagrimal muy fiable. Algún cambio en los niveles de MUC5AC y MUC16 también se probaron para detectar en qué punto se encuentra la enfermedad cuando estamos en un tratamiento.(Tamhane et al., 2019)

En conjunto, el epitelio corneal y la conjuntiva constituye la superficie ocular, por tanto, un cambio en la conjuntiva hace que también cambie la composición del epitelio corneal ya que tiene la capacidad de alterar su espesor y compensar las irregularidades de la superficie estromal pudiendo enmascarar en su totalidad o parcialidad alteraciones topográficas epiteliales de la cara anterior de la córnea. Por ello se estudian los mapas epiteliales que pueden ayudar a confirmar o descartar el diagnóstico, a través del epitelial doughnut pattern. Este método se desarrolla actualmente en el análisis clínico de un paciente con queratocono que es una enfermedad no inflamatoria que se caracteriza por la disminución progresiva de la agudeza visual y la protrusión apical. A través de la OCT analizamos diferentes partes de la retina y también mapeamos espesores corneales, epiteliales y estromales. Así pues, a través de los cambios característicos en la córnea se permitió la detección del queratocono temprano. (Li et al., 2016)

Los tumores en la conjuntiva pueden ser diagnosticados de diferente manera, pudiendo encontrar 3 tipos principales de tumores malignos: el melanoma, la neoplasia escamosa (OSSN) y el linfoma. El OSSN puede aparecer por factores como la radiación solar crónica, el VIH, trasplante, etc. y puede tratarse de diferentes formas que incluyen desde la cirugía hasta quimioterapia. Hablando del melanoma tiene otros tratamientos diferentes que se aplican al tumor como "la evitación de la manipulación directa del tumor o la resección con márgenes limpios". Para prevenir una metástasis de estos tumores se utilizan los biomarcadores BRAF, TERT y PTEN además de dar información de los fármacos pertinentes. (Shields et al., 2017a)

Hablando de la neoplasia que es la más común y conocida que normalmente se manifiesta unilateralmente como una "masa limbal gelatinosa vascularizada", podemos encontrar también características como vasos dilatados, infiltración espumosa y leucoplasia supra yacente. Una larga exposición a los rayos ultravioletas o al humo de un cigarro pueden ser factores que inducen este tumor además de otros como la piel clara o enfermedades inmunitarias. En un estudio se demostró la veracidad de las células epiteliales en este tipo de tumores conjuntivales que se extienden por la superficie de la conjuntiva formando parte también de la membrana basal además de la presencia de un genoma llamado TERT, encontrado también en otros tipos de cáncer y que tiene como significado que el cáncer se encuentra en uno de sus estadios más avanzados con no muy buen pronóstico. Otro de los tumores más comunes en la conjuntiva es el melanoma, se sabe que también está relacionado con una gran exposición a rayos ultravioletas. Podemos clasificarlo en pigmentado o no pigmentado y lo encontramos en las diferentes partes de la conjuntiva. Actualmente hay varios estudios en curso sobre el vemurafenib que es un fármaco oral inhibidor del gen humano BRAF y sobre su evaluación como biomarcadores de la enfermedad y de su terapia. (Shields et al., 2017b)

Por tanto, un descubrimiento de las cualidades clínicas típicas de estos tumores, el conocimiento de las características que influyen en su aparición y biomarcadores tisulares, y un uso idóneo son cruciales para resultados superiores del enfermo. A continuación, se expresan los biomarcadores, a modo que se vea mejor, más importante de la conjuntiva:

Tabla 1. Clasificación de los biomarcadores de la conjuntiva

Biomarcadores	Enfermedad ocular	Función del biomarcador
HLA-DR	DED	Glucoproteína que presenta péptidos extraños capaces de desencadenar la respuesta inmune.
ICAM-1	DED, SS, OGVHD	Molécula de adhesión que es muy importante en la respuesta inmune.
Células caliciformes	SS, Stevens-Johnson, DED, Glaucoma y enfermedad de injerto contra huésped	Producen mucinas para la superficie del ojo.
Mucinas- MUC5AC	AKC, SS, DED	Glucoproteína que se encarga de producir gel para prevenir de daño
Mucinas-MUC16	AKC, DED	Glucoproteína que actúa como barrera frente a agentes externos
Galectina-3	DED	Suscita la producción de membrana plástica
IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8	AKC, VKC, SS, GPC, TO, DE, DED, MGD, OGVHD	IL-1 α : Citocina que forma parte de la hematopoyesis IL-1 β : Citocina que causa la distinción de Th17 IL-3: Examina la formación, distinción y función de los granulocitos y monocitos / macrófagos IL-6: Promover la respuesta de fase aguda IL-8: Guía el transporte de neutrófilos, basófilos y linfocitos T que intervienen en la respuesta inmune y angiogénica
TNF- α	DED, SS	Citocinas que pueden estimular la proliferación celular
INF- γ	DED, OGVHD	Tiene una función en la respuesta inmune de TH1 en la superficie del ojo
TGF- β 1	MGD, SS	Hace un seguimiento de la proliferación y distinción de células B y células mieloides
CCR5	DED	Quimosinas CC
CCL2, CXCL 12, CCR2, CXCR4	DED	CCL2: capta monocitos y basófilos CXCL12: activa la quimiocina CXC CCR2: receptor CCL13: transductor CXCR4: receptor para CXC y ubiquitina. Eleva los iones de calcio

Para concluir, se han reconocido muchos tipos de biomarcadores en la conjuntiva que han agrandado nuestro conocimiento y ha posibilitado la exanimación de la respuesta al tratamiento. El uso del método del muestreo IC ha permitido mejorar más la evaluación de estos biomarcadores asegurándolos y permitiendo un acceso fácil. Al igual que con la evaluación de la película

lagrimal, mejorando la sensibilidad en el estudio de las proteínas y en la genética, podrían incrementar la identificación de biomarcadores en el tejido de la conjuntiva más adelante.

4.3. Humor acuoso

El humor acuoso es un líquido fino e incoloro que se sitúa ocupando el segmento anterior del ojo, es decir, entre el cristalino y la córnea. Su composición se basa en agua principalmente además de otras sustancias que nutren a las partes avasculares del ojo como azúcares, vitaminas, proteínas, etc. Consta de tres funciones muy importantes para mantener la salud ocular: mantiene la estructura de la cámara anterior del ojo ya que no compone de ninguna otra estructura rígida para su soporte y necesita ser ocupada por un líquido que mantenga la estructura, así también mantiene la relación entre segregación y drenaje para mantener la estabilidad de la presión intraocular (PIO) que suele alcanzar unos niveles estándar de 12-22 mmHg., ya que su alteración podría provocar la aparición de patologías como el glaucoma y otra de las funciones que ocupa el humor acuoso es, como ya hemos comentado, nutrir las zonas avasculares del segmento anterior como la córnea y la capa anterior del cristalino ya que, aunque su componente principal sea el agua, tiene un 1% de otros componentes fundamentales para las células. Por ello el humor acuoso no es constante puesto que experimenta variaciones en el día, hora y dependiendo del ciclo vital que se encuentre la persona. La última función que realiza es formar parte de las funciones refractivas en menor medida que otros elementos como la córnea, contribuye ya que su índice de refracción es 1,336 y el del aire 1 por lo que se produce una desviación de los rayos de luz. (“Adler: Fisiología del ojo/ ,” 2004)

Además, el humor acuoso se encuentra regulado por el sistema nervioso central, el sistema autónomo, las hormonas, sistema vascular y el metabolismo en el que se encuentre involucrada la persona. Puesto que fluye a través de los músculos ciliares y hacia el espacio supra coroideo sabemos que los procesos ciliares tienen una inervación simpática y para simpática además de tener una inervación similar en las células del tejido trabecular, así pues, el sistema autónomo puede formar parte de la activamente del humor acuoso en diferentes niveles a la vez. (“Adler: Fisiología del ojo/ ,” 2004)

Una de las enfermedades más comunes en las personas y que tiene que ver con el humor acuoso y su estabilidad es el glaucoma, que se caracteriza por una elevación de la presión intraocular de la persona que ocasiona una lesión en el nervio óptico llevando a la persona a la ceguera. El objetivo principal de su terapia sería evitar la progresión de la neuritis óptica evitando la ceguera, por tanto, empezaríamos por disminuir la producción de humor acuoso en el epitelio ciliar y a aumentar su evacuación por la vía uveoscleral o por la vía trabecular. Debido a la ubicación del humor acuoso y su aproximación al sitio de patogénesis del glaucoma, encontrar y

descubrir biomarcadores en el humor acuoso podría ayudar a la detección precoz y la evaluación de la terapia que se utilizaría y proporcionar una gran información.(Farmacéutico et al., n.d.)

Otra de las enfermedades en las que han sido analizados los biomarcadores del humor acuoso es de la retinopatía diabética, aunque también se han estudiado enfermedades neurodegenerativas como el alzhéimer.

Para recoger el ejemplar de humor acuoso para analizar lo hacemos mediante el grifo acuoso con anestesia local en pacientes que se enfrentan a alguna cirugía o faco-emulsificación. A pesar de ser muy valiosa la información que obtenemos con este análisis también tenemos algún riesgo, la recolección es muy invasiva y se generan riesgos a la córnea o al cristalino que se encuentran muy cerca. Además de dañar las estructuras cercanas también se pueden contaminar las muestras con algunas sustancias que no sean del humor acuoso. La sensibilidad de las pruebas es más elevada por el poco volumen de humor acuoso que se recoge. Una de las moléculas más analizadas son las proteínas en el HA que rondan de 676 a 865 proteínas según el método en el que se mida.(Tamhane et al., 2019)

La enfermedad que más tiene que con el humor acuoso es el glaucoma como hemos ido mencionando, esta enfermedad tiene un componente genético muy importante. Así pues, muchos parámetros oculares son hereditarios como la PIO, la dimensión ocular, etc., su asociación con diversos genes como la miocilina revela el carácter hereditario que no se encuentra en un gen solo, sino en varios. Las células neurogliales tienen funciones esenciales para conservar las neuronas que, por su relación con los vasos sanguíneos y axones ópticos, intervienen en el equilibrio electrolítico y metabolismo de neurotransmisores.(Farmacéutico et al., n.d.)

El ARN posibilita una detección y estudio rápido y exhaustivo del transcrito y tiene un elevado rendimiento frente a diferentes pruebas. Uno de los marcadores genéticos es el gen 1 de la lisil oxidasa (LOXL1) que se encarga del metabolismo de la matriz celular, un elevado número de este gen 1 están envueltos en la producción de agregados de fibra en el glaucoma. Además, este gen está relacionado con TGF- β 1 para la producción de fibras, así pues, se forman depósitos que se posicionan en el saliente de algunas estructuras que se piensa que llevan a aumentar la PIO y perjudicar al nervio óptico.(Tamhane et al., 2019)

Un estudio realizado recientemente comparó el proteoma del humor acuoso de diferentes personas diabéticas algunos de las cuales también tenían retinopatía diabética y otras no. Algunas proteínas en concreto la encargada de la inflamación, la apolipoproteína A-I se encontraron en concentraciones más altas en comparación con los pacientes sin retinopatía diabética. Adentrándonos un poco más en la enfermedad y las proteínas, en la retinopatía diabética

proliferativa tenemos un cuadro de 10 proteínas asociadas que se encuentran involucradas en una serie de mecanismos del ojo como la que hemos mencionado anteriormente.(Youngblood et al., 2019)

La autotaxina (ATX) es una proteína relacionada con el ácido lisofosfatídico extracelular, esta relación tiene un nexo de unión con el glaucoma y la PIO elevada, aunque todavía no ha sido muy estudiada. Algunas investigaciones sugieren que un incremento de ATX se da en pacientes con patologías oculares y por ello la relación que hemos mencionado antes también. (Tamhane et al., 2019)

Uno de los nuevos posibles biomarcadores en el humor acuoso identificados ha sido la miocilina que es una proteína muy relacionada con el glaucoma. En una investigación realizada en humanos y animales se notó que se elevó la concentración en un 70% de esta proteína en pacientes con glaucoma.(Tamhane et al., 2019)

Numerosos ``factores de crecimiento pro-fibróticos`` son encontrados en el humor acuoso de pacientes con glaucoma como puede ser el TGF- β se ha notado que se han elevado notablemente. Tanto TGB- β como β 2 son las isoformas fundamentales del tejido del ojo. El TGF- β 2 es un factor de crecimiento que tiene muchas funciones y es producida en la parte anterior ocular además tiene un papel muy importante para el glaucoma ya que es la molécula impulsora de la matriz celular y reduce *la proliferación celular*. Ocho estudios analizaron los niveles en el humor acuoso en los diferentes tipos de glaucoma y encontraron una elevación de TGF- β 2 y se demostró que en el glaucoma de ángulo abierto está muy incrementada. El incremento y la actividad de esta molécula dependen del tipo del tipo de glaucoma.(Tamhane et al., 2019)

En humor acuoso frente a los mediadores inflamatorios como el TFN- α se estudió que se usan pruebas de ``inmunoensayo de perlas de plex simple`` y se demostró un nivel elevado de TFN- α en personas con glaucoma en comparación con el humor acuoso de personas sin ninguna patología, además también se encontraron incrementos en el glaucoma normotensivo y en pacientes con exfoliación.(Tamhane et al., 2019)

Además, en el humor acuoso los biomarcadores también se han estudiado para otras enfermedades no oculares como el Alzheimer que en varios estudios se identificaron proteínas como ``apolipoproteínas (APO) Al., APO III, APO E, transtiretina (TTR), α 2-macroglobulina y cistatina-C ``que se demostró su incremento en personas enfermas de alzhéimer. En un estudio que se analizó el humor acuoso en pacientes con Alzheimer se descubrió una molécula de adhesión celular neural (sNCAM), molécula soluble 1 de adhesión vascular (sVCAM-1) y catepsina D que es un lisosoma proteasa encargado de la homeostasis celular y de la muerte

celular. Otra de las moléculas que se encuentran elevadas es la capthesin D en el líquido cefalorraquídeo en enfermos de Alzheimer. (Tamhane et al., 2019)

Se han estudiado múltiples biomarcadores que tienen una conexión con el tono vascular, el nivel y la estructura del glaucoma, se han visto los niveles alterados en suero, pero limitados identificados en el humor acuoso. Alguno de los que se han identificado son `` guanosina cíclica monofosfato (cGMP), óxido nítrico (NO), cerebro y péptido natriurético auricular (BNP y ANP respectivamente) `` así pues están relacionados con la dinámica y la presión intraocular.

Unos aspectos muy estudiados en cuanto a su involucración con las enfermedades oculares es el estrés oxidativo y estado antioxidante que cuando esta oxidado provocando estrés y llevando al límite la capacidad de defenderse. Así se produce un desequilibrio sobre la función de la TM que es muy susceptible al estrés ya que tiene como función proteger frente a ROS llevando a alteraciones en el sistema y empleando un papel en la aparición de enfermedades.(Tamhane et al., 2019)

Por tanto, la certeza de la inducción de la apoptosis por el estrés oxidativo y que en este suceso sea recogido por pruebas en el laboratorio no muy complicadas, llegando a relacionarse con la progresión del glaucoma en sus distintos niveles.

Uno de los tumores oculares más comunes es la retinoblastoma que es el cáncer intraocular primario más frecuente en niños. Es un tumor más peculiar puesto que la biopsia está contraindicada debido a su riesgo de diseminación. Es por ello que las técnicas actuales han permitido extraer de forma segura el humor acuoso utilizándolo como oportunidad única para usar el humor acuoso como biopsia líquida para el retinoblastoma. Es por ello que el humor acusoso es muy analizado en este tipo de situaciones. La enzima más estudiada para saber si se trata de un tumor maligno es el lactato deshidrogenasa (LDH) la cual se trata de una reguladora del metabolismo. Así pues, también se examinan los valores de LDH durante el tratamiento para saber si está haciendo efecto. (Ghiam et al., 2019)

A continuación, se presenta una tabla recogiendo un resumen de los biomarcadores encontrados además de sus funciones y enfermedades asociadas:

Tabla 2. Clasificación biomarcadores del humor acuoso.

Biomarcadores	Enfermedad ocular	Función de los biomarcadores
LOXLI	Glaucoma normotensivo, síndrome de exfoliación y glaucoma	Proteína muy importante para la biogénesis del tejido conectivo

ATX	Glaucoma	Proteína secretora relacionada con la estabilización de la PIO
Myodin	Glaucoma	La mutación del gen puede ser uno de los factores de riesgo del glaucoma
TGF-β	POAG	Es un péptido relacionada con las células T, células B y mieloides
HGF; TGF-β2	Glaucoma	HGF: crecimiento de la célula, su movilidad y morfología TGF-β2: citocina que reduce los efectos de la interleucina
TNF-α	POAG	Citocina que se encarga de la inducción de células que se encarga de la muerte de líneas tumorales
IL.1α, IL-6, IL-8	POAG	IL-1α: citocina relacionada con la hematopoyesis IL-6: induce la fase aguda y en la diferenciación de células B IL-8: se encarga en la migración de neutrófilos, basófilos y linfocitos T
ELAM-1	Glaucoma	Molécula de adhesión encargada de la activación de células endoteliales
APO AI, APOCIII, APO E, TTR, α2-macroglobulina, Cistina-C	POAG	APO AI: proteína que funciona permitiendo la salida de moléculas de grasa de los tejidos del hígado APO CIII: proteína que inhibe a la lipasa APO E: proteína relacionada con la amiloide-β TTR: proteína que se une a la hormona tiroidea Cistatina-C: inhibe a la cisteína proteasa
sNCAM, VCAM-1, Catepsina D	POAG	sNCAM: glucoproteína que facilita la adhesión de las células VCAM-1: proteína que se encarga en el reconocimiento celular Catepsina D: Causante de la descompostura celular.
BNP, ANP	POAG	Encargada de la vasodilatación, inhibición de la renina, etc.
SOD	POAG, Glaucoma	Enzima que cataliza radicales superóxidos
GPX	POAG, PACG	Protege contra el daño oxidativo
CD 445	PACG	Mediador de las interacciones de células en la matriz celular
NMDA receptor	POAG	Receptor de homocisteína

Para concluir sobre los biomarcadores oculares del humor acuoso, podemos encontrar puntos a favor y en contra de su utilización ya que otros métodos en usadas clínicas pueden disminuir el tiempo de la investigación, así como las mediciones de prueba, que también pueden concluir en un valor considerable de diferencia. A pesar de esto, usar otros métodos puede

perjudicar y llevar a un sentido falso de las conclusiones si no están correctamente validados. El poder identificar un biomarcador analizado en el AH en vez de medir la PIO ahora mismo es improbable debido al análisis que hemos realizado y teniendo muy en cuenta que se invade mucho el ojo en comparación con la prueba actual de la PIO. Así mismo, relacionando algunos de los biomarcadores y los otros métodos sustitutos podrían elevar la eficacia de los medicamentos y el pronóstico de la enfermedad.

4.4 Humor vítreo

El humor vítreo es un gel transparente que se encuentra entre la retina y el cristalino, es decir, en el segmento posterior del ojo. La función principal del líquido vítreo es proteger tanto físicamente como estructuralmente del desprendimiento de retina. Con respecto a su composición está formado por agua, colágeno, ácido hialurónico y proteínas como albúmina, globulinas, proteínas de coagulación, etc. Su volumen ocupa la mayor parte del ojo, por su función protectora. El espesor del gel tiene que ser específico ya que toda la información visual pasa por él. Por su cercanía a la retina se convierte en una parte perfecta para la búsqueda de biomarcadores y alteraciones fisiopatológicas que afectan a la retina cuando hay una enfermedad incipiente. (“Adler: Fisiología del ojo/,” 2004)

Para analizar el gel vítreo se recoge a través de los llamados grifos vítreos en aquellos que son sometidos a una vitrectomía que consiste en una microcirugía en la cual se extrae el vítreo para tratar a la retina directamente. Claramente, esta técnica es altamente invasiva. Un método menos invasivo y actualmente aprobado es la biopsia con aguja que puede llevarse a cabo en la clínica en vez del quirófano. En un estudio realizado, usaron tiras de Schirmer para recolectar el reflujo vítreo y compararon las proteínas sacadas con las de la vitrectomía sin diluir y como consecuencia obtuvieron un porcentaje muy parecido. Además, el procedimiento más utilizado para detectar biomarcadores en las pruebas del vítreo es “ensayos inmunsorbentes ligados a enzimas ELISA”, algunos otros utilizan la fluoresceína para identificar las cantidades de proteínas o la espectroscopía para el metabolismo en el vítreo. (Youngblood et al., 2019)(Tamhane et al., 2019)

Entre los biomarcadores ya identificados podemos encontrar un factor de crecimiento como es el *VEGF* que es un angiogénico, es decir formador de vasos sanguíneos. Además, es un “mediador fisiopatológico” en el progreso y sustento de la formación de nuevos vasos dentro del ojo que se ha encontrado presente en patologías neovasculares. El logro del anti-VEGF es la finalidad principal en las enfermedades del ojo para la terapia a realizar. También se han investigado los diferentes niveles de VEGF para saber una predicción y la importancia de la enfermedad que se encuentra acechando al ojo sobre todo en la retinopatía diabética (RD) y PDR.

Otro de los aspectos muy estudiados con respecto al VEGF es la agudeza visual, aunque en los diferentes estudios se han obtenido ``resultados mixtos`` ya que la AV logMAR después de la operación fue muy inferior cuando los pacientes tenían tanto alto como bajo VEGF. Lo que sí se encontraron es una gran cantidad de dificultades un tiempo después de la operación ya que los pacientes necesitan de una vigilancia mediante monitores. Otro factor de crecimiento investigado es el placentario (PIGF) y se mostró en muy elevada cuantía en pacientes con isquemia retiniana. Además, en otra investigación que evaluaba el PIGF con la enfermedad PDR tanto activa como inactiva se llegó a la conclusión que el PIGF está muy relacionado y es muy importante en la patogénesis de PDR y que las cantidades de PIGF no estuvieron alteradas por la terapia utilizada en después de la operación. Al contrario de lo que pasa con el PIG ocurre con el PEDF que es el factor derivado del epitelio pigmentario que se encuentra disminuido en pacientes con retinopatía diabética al igual que pasa con la proteína encargada de la regulación, la clustreína (CLU), del complemento que también tuvo niveles disminuidos en pacientes con RD. (Youngblood et al., 2019)(Tamhane et al., 2019)

Otro de los factores estudiados es ``el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)`` que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular siendo liberados por las plaquetas. Muchos científicos piensan que cooperan con la formación de nuevos vasos sanguíneos en el ojo y cicatrización de las heridas. En un estudio se investigaron todas las formas de estos factores en pacientes con retinopatía diabética proliferativa y no proliferativa, además de personas no diabéticas y se encontró que en pacientes con retinopatía diabética proliferativa todas las formas de los factores PDGF se encontraron elevadas en paralelismo a las personas no diabéticas y a la persona con retinopatía diabética no proliferativa. A pesar que los PDGF no se pudieron implantar como finalidad en la terapia, se sabe que tienen una función fundamental en el conocimiento de la enfermedad de retinopatía diabética.(Tamhane et al., 2019)

En muchas alteraciones oculares los investigadores han estudiado los mediadores inflamatorios (citoquinas inflamatorias y neurotróficas) para considerar un componente inflamatorio como IL-6, IL-8 y TNF- α . Se han analizado los diferentes mediadores inflamatorios en los distintos niveles de retinopatía diabética de ambos tipos, se obtuvo un incremento en pacientes proliferativos como no proliferativos lo que lleva a pensar que están incrementados progresivamente en las primeras etapas de la retinopatía y podrían ser biomarcadores muy útiles de esta enfermedad ya que nos podría dar la información del estadio en el que se encuentra la enfermedad. En estos pacientes con retinopatía también se encontraron incrementados otros factores como la neurotrofina (neurotrofina-3, neurotrofina-4, etc.) teniendo los pacientes con retinopatía no proliferativa un número mayor que los proliferativos.(Tamhane et al., 2019)

Algunos cambios estudiados son los hemodinámicos que estudia la dinámica de la sangre en el interior de estructuras como las arterias, estos cambios llevan a un aumento del flujo sanguíneo que llega a la retina y que se correlacionan con la retinopatía diabética y están presentes en diferentes patologías vitreoretinianas. Los factores más estudiados son el óxido nítrico que es un regulador del diámetro de los vasos sanguíneos y la endotelina-1 que es un factor que contrae los vasos sanguíneos que tiene consecuencias proliferativas sobre la red de los vasos. (Tamhane et al., 2019)

Entre los factores de fase aguda encontramos algunos más destacados como la α 2-macroglobulina, proteína C, fibrinógeno, procalcitonina, etc. En un estudio se llegó a la conclusión después de estudiar el gel vítreo de algunos pacientes con enfermedades oculares que se encontraban incrementados algunos de estos factores como el fibrinógeno y la ferritina elevados en aquellos que tenían EAMD. También fueron estudiados estos factores y su relación con la agudeza visual y con los niveles de VEGF y los resultados fueron que el fibrinógeno y la procalcitonina se encontrarían elevados si tenemos una baja agudeza visual y al revés ya sea pre o post operación, pero no se encontró ninguna relación con VEGF. (Tamhane et al., 2019)

Una de las enfermedades más estudiadas en el humor vítreo es la DMAE por la proximidad de la mácula al vítreo. Dentro de los dos tipos de DMAE el más peligroso para nuestra visión es el NV conocida por el crecimiento de nuevos vasos coroideos en la retina. En un estudio se cogieron de muestra varios sujetos con DMAE NV y algunos sin patologías para estudiar pequeños ARN no codificantes, miARN además de su importancia en la expresión genética de la salud y enfermedad y como resultado se identificaron 3 miRNAs en el humor vítreo. Sabiendo qué secuencia se unen para formar éstos miARN y evitando esta formación mediante terapias, se podría modificar el resultado de la enfermedad. (Ménard et al., 2016)

Cuando una persona es diabética decimos que sus niveles de glucosa en sangre se encuentran elevados y por tanto los productos de glicación avanzada (AGE) son también investigados en la óptica por su implicación en la retinopatía diabética, por lo cual se han encontrado incrementados en pacientes diabéticos en comparación con los no diabéticos. Un grupo de investigadores estudiaron la derivación del AGE del "gluceraldehído intravítreo (AGE glicerol)" en enfermos de retinopatía diabética de ambos tipos con la finalidad de relacionar los niveles con la seriedad de la enfermedad y se llegó a la conclusión que los niveles de AGE glicerol y VEGF se encontraban incrementados en pacientes que tenían "membrana proliferativa fibrovascular" y menos elevada en los no proliferativos y en los que tenían una hemorragia vítrea simple. (Tamhane et al., 2019)

Otra de las formas en las que se ha estudiado las proteínas del humor vítreo es la proteómica en diferentes niveles de la enfermedad del ojo hasta llegar a una "oclusión venosa

retiniana (RVO) que puede aprovecharse para sacar muchos biomarcadores. Según el método de extracción y de análisis podemos identificar desde 610 proteínas en el líquido vítreo. Además, dependiendo de la enfermedad que tenga el paciente se pueden encontrar diferentes, como por ejemplo en un paciente con retinopatía diabética proliferativa que encontramos 64 proteínas únicas y 212 proteínas más en aquellos pacientes con IMH. Además, se reconocieron otras 52 proteínas reguladas y otras 10 inversas en PDR.(Tamhane et al., 2019)

Una de los tipos de desprendimiento de retina investigados es el regmatógeno asociado con un desprendimiento coroideo que es uno de los tipos más complejos y peligrosos.

En un estudio realizado y publicado en la revista española de medicina legal, se investigó la colaboración de cuatro biomarcadores séricos (Tropina T, mioglobina, fracción MB de la creatincinasa (CK-MB) y la fracción N de propéptido natriurético tipo B NT-proBNP)) en el diagnóstico post-mortem de la muerte súbita utilizando como medio analítico el humor vítreo analizando a un total de 40 personas fallecidas. Como resultado la topina T fue indetectable además de la mioglobina que tampoco tuvo una validez, en cambio, la cantidad de NT-proBNP en el humor acuoso se incrementó en pacientes que murieron por anomalías cardíacas y por último las cantidades de CK-MB fueron incrementadas, pero sin distinción según la causa de muerte. Como el objetivo del trabajo era estudiar el diagnóstico post-mortem de muerte súbita cardíaca, el único diferenciador es el NT-proBNP en humor acuoso. (Bañón González et al., 2008)

A continuación, presentamos un resumen de los diferentes tipos de biomarcadores encontrados en el humor vítreo:

Tabla 3. Clasificación de biomarcadores del humor vítreo.

Biomarcadores	Enfermedad ocular	Función del biomarcador
VEGF	DR, PDR, NVG, DM	Impulsa la proliferación de células endoteliales y la apoptosis y la permeabilización de los vasos sanguíneos
PIGF	PDR, NVG	Relacionado con la biosíntesis de glicosilfo. sfatidilinositol
sVEGFR	PDR, AMD, Glaucoma neovascular	Está relacionado con diferentes procesos como la angiogénesis
PDGF	NPDR, PDR	Regulador de la proliferación celular, migración, etc.
PEDF	PDR, AMD	Antiangiogénico
IL-1β, IL-6, IL-8 y TNF-α	PDR, DR, DM, NVG	IL-1 β : citocina inflamatoria IL-6: promueve la respuesta de fase aguda IL-8: movimiento de neutrófilos, basófilos y linfocitos T TNF- α : Promueve la proliferación celular
NGF, BNF, NT-3, NT-4, CNTF, GNF	PDR, NPDR	NGF: dirige a células por receptores de la tirosina quinasa BNF: Induce la sinapsis de las neuronas

		NT-3: relacionado con el movimiento, la proliferación y supervivencia de las neuronas NT-4: conserva las neuronas simpáticas sensoriales CNTF: prevé de la degeneración de los axones motores GNF: conserva las neuronas dopaminérgicas
TAT	RRD, PDR	Ajusta coagulación sanguínea
NO, ET-1	PDR, NPDR	NO: sintetiza el daño de las retinas diabéticas ET-1: Aumenta el diámetro de los vasos sanguíneos
Ferritina, proteína C reactiva, fibrinógeno	DME, PDR	Ferritina: fijadora de Fe, limita el acceso microbiano Proteína C reactiva: actuando sobre microbios Fibrinógeno: factor de coagulación
Pentraxin-3	PDR	Respuesta a señales inflamatorias
NT-proBNP	Muerte súbita cardíaca	Diagnóstico y diferenciación de insuficiencia cardíaca

Teniendo en cuenta la condición tan invasiva de conseguir una prueba del gel vítreo, es fundamental que se analicen muchos biomarcadores en una misma cantidad de gel, así pues, en los últimos años con nuevos métodos, se ha conseguido ampliar el uso de la muestra de humor vítreo recogida y, como consecuencia, el entendimiento de las alteraciones del segmento posterior a través de biomarcadores importantes.

5. CONCLUSIÓN

En la actual revisión bibliográfica podemos observar cómo los biomarcadores se han utilizado como una importante herramienta tanto para el diagnóstico como para saber el nivel de gravedad de nuestro paciente, así como para saber la sensibilidad que presenta el paciente a la respuesta frente a la terapia de las enfermedades y, por último, conocer la fisiopatología de la enfermedad.

Más concretamente en el ámbito ocular, encontramos cuatro medios principales para la recolección de biomarcadores en los que hemos centrado la búsqueda que son la lágrima, el humor acuoso, la conjuntiva y el humor vítreo. En cada uno de ellos se han realizado diferentes métodos de toma de muestras. En la lágrima es en el único de estos lugares que podemos encontrar pruebas adaptadas a la búsqueda de biomarcadores admitidas por la FDA.

De las partes oculares que hemos estudiado, la lágrima, el humor acuoso y vítreo corresponde a líquidos gelificados siendo dificultosa su recolección. Aunque aún más obstáculos encontramos en los humores acuoso y vítreo teniendo que ser recogidos por unos métodos altamente invasivos haciendo su investigación mucho más limitada puesto que podríamos causar daños irreparables en otras partes del ojo del paciente. Así pues, cuando ya hemos recogido la muestra debemos maximizar el número de biomarcadores que sacamos de ahí aprovechando al máximo esa muestra.

Como ya sabemos, la lágrima es la primera capa del ojo y recoger sus muestras no se hace tan difícil, pero uno de los grandes inconvenientes de su recolección es que se puede activar la lágrima refleja, cambiando la composición de la lágrima y por tanto que las conclusiones sean complicadas de exponer. Otro de los inconvenientes a tener en cuenta en la recolección lagrimal es que ésta se puede ver alterada por otros factores como pueden ser las lentes de contacto o el uso de lágrima artificial.

Por su parte, la conjuntiva, siendo una parte consistente tomar una muestra de ella se vuelve muy difícil ya que también hay que conservar el estado de las células para buscar biomarcadores en un largo periodo de tiempo de incluso días después de la recolección. A pesar de las dificultades, como ya hemos comentado en los resultados, la mayoría de las muestras se toman con CI que es una prueba certera y apenas invasiva para el paciente.

En cuanto al proceso global, uno de los problemas que encontramos es que no existe un método generalizado para recolectar o analizar una muestra. Por ello, los resultados de diferentes investigaciones pueden variar simplemente por el método escogido, además de su

almacenamiento que también se realiza de diferentes formas. Siendo uno de los procedimientos más usados utilizar una muestra para sacar la mayor cantidad de información de los biomarcadores posible.

Por lo tanto, se han facilitado instrumentos para examinar la importancia y el nivel en el que se encuentra una enfermedad, así como investigar la respuesta a su tratamiento y decretar la idoneidad con la perspectiva del análisis clínico llevando como objetivo principal realizar un plano específico ideal para cada paciente haciendo que la eficacia del tratamiento sea lo mayor posible para cada uno de ellos.

Llevando el tema a la actualidad, se han iniciado investigaciones de la identificación del Covid-19 a través de la lágrima, haciendo una gran búsqueda para esta enfermedad tan desconocida. Es por ello que son tan importantes los estudios sobre los biomarcadores para que nos permitan conocer lo mejor posible una enfermedad y su tratamiento.

A día de hoy todavía existen limitaciones en la validez y fiabilidad de muchos de los biomarcadores, pero en un futuro se espera que se minimicen muchas de estas limitaciones y podamos disponer de biomarcadores validados y con un de bajo coste. Para ello es necesario seguir investigando.

6. GLOSARIO

- **Agujero estenopéico:** es un instrumento de diagnóstico en optometría y oftalmología. Consiste en un oclisor con una abertura muy pequeña en el centro. Al colocarlo en el ojo del paciente alcanza su mejor agudeza visual si se trata de un error refractivo, en cambio, si se trata de una patología la agudeza visual no mejorará.
- **Espectrometría de masas:** es una técnica de análisis que permite determinar la distribución de moléculas de una sustancia en función de su masa.
- **Reactividad cruzada:** es la reacción entre un antígeno y un anticuerpo que fue generado contra un antígeno diferente pero similar.
- **Hexapéptidos:** cadena de seis aminoácidos unidos de forma sintética.
- **Fenotipo:** conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como interacción específica entre el genotipo y el medio.
- **Cambios epigenéticos:** son cambios heredables del ADN e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican la estructura y condensación de la cromatina por lo que afectan a la expresión génica y el fenotipo.
- **Fluoresceína:** se trata de una sustancia colorante orgánica utilizada en el examen de los vasos sanguíneos del ojo.
- **Expresión génica:** es el proceso mediante el cual todos los organismos transforman información codificada por los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo, funcionamiento, y reproducción con otros organismos.
- **Desgarro reflejo:** o también llamada lágrima refleja, es un mecanismo de defensa del ojo que se produce cuando introducimos o lo tocamos, mediante el cual el organismo genera lágrima en exceso sin la misma concentración que la lágrima original para suplir esta alteración.
- **Cromatografía:** es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas cuyo objetivo es separar los distintos componentes.
- **Síndrome de Sjögren:** es una enfermedad que afecta las glándulas que producen humedad en el cuerpo. A menudo causa sequedad en la boca y en los ojos.
- **VEGF:** Proteína señalizadora implicada en la formación del sistema vascular embrionario y en el crecimiento de vasos provenientes de vasos ya existentes.

7. ACRÓNIMOS

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- **DMAE:** degeneración macular asociada a la edad.
- **ARN:** ácido ribonucleico.
- **DED:** dried eye disease (ojo seco)
- **SS:** síndrome de Sjögren
- **GVHD:** enfermedad de injerto contra huésped
- **TAO:** tratamiento anticoagulante oral
- **EGF:** factor de crecimiento epidérmico
- **IC:** citología de impresión
- **HLA-DR:** antígenos leucocitarios humanos
- **ICAM-1:** moléculas de adhesión endotelial
- **MUC:** mucina
- **ATX:** ácido tranexámico
- **RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
- **OSSN:** ocular surface squamous neoplasia
- **VIH:** virus de inmunodeficiencia humana
- **OCT:** tomografía de coherencia óptica
- **TERT:** telomerasa transcriptasa
- **PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
- **TNF:** factor de necrosis tumoral
- **TGF:** factor de crecimiento transformante
- **ROS:** especies reactivas de oxígeno
- **TM:** tasa mitótica
- **HGF:** factor de crecimiento epático
- **ELAM:** molécula de adhesión endotelial
- **BNP:** péptido natriurético tipo B
- **ANP:** adenosin monofosfato cíclico
- **SOD:** enzima super óxido dismutasa
- **POAG:** glaucoma primario de ángulo abierto
- **DMAE:** degeneración macular asociada a la edad
- **EMD:** edema macular diabético
- **TAT:** trans-activator of transcription

BIBLIOGRAFÍA

Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95.

Bañón González R, Escayola EN, Noguera Velasco JA, Benali L, de Albornoz EOC. Utilidad de la determinación de troponina T, CK-MB, NT-proBNP y mioglobina en humor vítreo en autopsias forenses. *Rev Española Med Leg [Internet].* 2008;34(1):18–24. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377473208700221>

Chauhan SK, El Annan J, Ecoiffier T, Goyal S, Zhang Q, Saban DR, et al. Autoimmunity in Dry Eye Is Due to Resistance of Th17 to Treg Suppression. *J Immunol.* 2009;182(3):1247–52.

Chen W, Cao H, Lin J, Olsen N, Zheng SG. Biomarkers for Primary Sjögren's Syndrome. Vol. 13, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. Beijing Genomics Institute; 2015. p. 219–23.

Farmacéutico Á, Glaucoma F, Benedí J, Sagrario Martín-Aragón Y. Of 71. Vol. 29.

Ghiam BK, Xu L, Berry JL. Aqueous humor markers in retinoblastoma, a review. *Transl Vis Sci Technol.* 2019;8(2).

Hagan S. Biomarkers of ocular surface disease using impression cytology. *Biomark Med.* 2017;11(12):1135–47.

Hernández-Martínez FJ, Piñas-García P, Lleó-Pérez A V., Zanón-Moreno VC, Bendalatafufanisco E, García-Medina JJ, et al. Biomarcadores de peroxidación lipídica en el humor acuoso de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 2016 Aug 1;91(8):357–62.

Kaufman PL, Alm A, editors. Adler: Fisiología del ojo/. 10a ed. Fisiología del ojo. Barcelona: Elsevier,; 2004.

Li Y, Chamberlain W, Tan O, Brass R, Weiss JL, Huang D. Subclinical keratoconus detection by pattern analysis of corneal and epithelial thickness maps with optical coherence tomography. *J Cataract Refract Surg.* 2016 Feb 1;42(2):284–95.

Martin E, Oliver KM, Pearce EI, Tomlinson A, Simmons P, Hagan S. Effect of tear supplements on signs, symptoms and inflammatory markers in dry eye. *Cytokine.* 2018 May 1;105:37–44.

Ménard C, Rezende FA, Miloudi K, Wilson A, Tétreault N, Hardy P, et al. MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. *Oncotarget.* 2016;7(15):19171–84.

Ortega Ortiz de Apodaca F, editor. Biomarcadores : analítica, diagnóstico y terapéutica . Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia; 2010. (Monografía / Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia ; 30).

Pawlowski P, Mysliwiec J, Mrugacz M, Zak J, Bakunowicz-Lazarczyk A, Rejdak R, et al. Elevated percentage of HLA-DR+ and ICAM-1+ conjunctival epithelial cells in active Graves' orbitopathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014;252(4):641–5.

Shields CL, Chien JL, Surakiatchanukul T, Sioufi K, Lally SE, Shields JA. Conjunctival tumors: Review of clinical features, risks, biomarkers, and outcomes - The 2017 J. Donald M. Gass Lecture. *Asia-Pacific J Ophthalmol.* 2017;6(2):109–20.

Shields CL, Chien JL, Surakiatchanukul T, Sioufi K, Lally SE, Shields JA. Conjunctival tumors: Review of clinical features, risks, biomarkers, and outcomes - The 2017 J. Donald M. Gass Lecture. Vol. 6, *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology; 2017. p. 109–20.

Strimbu K, Tavel J. The maturometer - Instrumental test and redesign. *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(6):463–6.

Tamhane M, Cabrera-Ghayouri S, Abelian G, Viswanath V. Review of Biomarkers in Ocular Matrices: Challenges and Opportunities. *Pharm Res.* 2019;36(3).

Torres Courchoud I, Calvo JIP, Ignacio J, Calvo P. editorial0 Biomarcadores y práctica clínica Biomarkers and clinical practice. *An Sist Sanit Navar [Internet]*. 2016;39(1):10–3. Available from: [http:](http://)

Tsuji F. Biomarker Identification of Tear Fluid. *J Postgenomics Drug Biomark Dev.* 2012;2(1).

Youngblood H, Robinson R, Sharma A, Sharma S. Proteomic biomarkers of retinal inflammation in diabetic retinopathy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):1–19.

Zhou L, Beuerman RW, Choi MC, Shao ZZ, Xiao RL, Yang H, et al. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *J Proteome Res.* 2009;8(11):4889–905.