

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 456**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2016 PCT/EP2016/053293**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2016 WO16131840**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2016 E 16705123 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3259599**

54 Título: **Biomarcadores para el diagnóstico y el pronóstico de trastornos de ectasia corneal**

30 Prioridad:

16.02.2015 EP 15382060

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.06.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (50.0%)
Reitorado da Universidade de Santiago de
Compostela Colexio de San Xerome
Praza do Obradoiro s/n
15782 Santiago de Compostela (A Coruña), ES y
SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (SERGAS) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEMA GESTO, MARÍA ISABEL;
CASTILLO SÁNCHEZ, JOSÉ ANTONIO;
SOBRINO MOREIRAS, TOMÁS y
CAMPOS PEREZ, FRANCISCO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 764 456 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores para el diagnóstico y el pronóstico de trastornos de ectasia corneal

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de métodos moleculares de diagnóstico y pronóstico para patologías. En particular, la invención se refiere a métodos para determinar el diagnóstico de una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, para determinar el desenlace clínico de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea y para seleccionar un sujeto que va a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea basándose en la determinación de los niveles de expresión de marcadores de receptores de tipo Toll (TLR) TLR2 y/o TLR4. La invención también se refiere al uso de TLR2 y/o TLR4 como marcadores de diagnóstico y pronóstico para una enfermedad ectásica de la córnea.

15 **Antecedentes de la invención**

La ectasia corneal es una enfermedad progresiva que afecta adversamente a la integridad estructural de la córnea. La córnea debilitada presenta un abultamiento, y empieza a desarrollarse astigmatismo irregular incapacitante. El astigmatismo degrada la visión y a medida que progresa la enfermedad, se produce cicatrización de la córnea. La ectasia corneal incluye queratocono, degeneración marginal pelúcida, ectasia tras cirugía refractiva y otras enfermedades raras tales como queratoglobo. Se han desarrollado nuevas modalidades para el tratamiento de ectasia corneal, tales como reticulación de colágeno corneal que usa luz UV y riboflavina para reforzar la córnea y detener la progresión de la enfermedad. Es deseable detener la progresión de la enfermedad en una fase muy temprana, antes de que se degrade la visión por astigmatismo irregular o cicatrización. La causa más común de la ectasia tras cirugía refractiva que amenaza la visión en esos pacientes es realizar la cirugía refractiva en un paciente con ectasia temprana que no se detectó mediante las técnicas de diagnóstico actuales convencionales. Esto destaca la necesidad de un signo específico y sensible que pueda usarse para detectar esos pacientes de forma temprana para salvarlos de una complicación tan devastadora.

El grosor y la topografía corneal se encuentran entre los criterios de diagnóstico actuales de ectasia. Su uso es complicado por sus variaciones entre las poblaciones generales. El intervalo normal de grosor corneal es amplio, y el solapamiento entre córneas delgadas normales y pacientes con ectasia temprana complica el uso de este criterio en el diagnóstico de casos tempranos de ectasia. Por tanto, la falta de especificidad es una limitación significativa del uso del engrosamiento corneal para el diagnóstico de la ectasia. El uso de la topografía corneal en el diagnóstico de ectasia comparte las mismas limitaciones que el adelgazamiento corneal. Se observa astigmatismo irregular en sujetos normales y en pacientes con ectasia que complica su uso para realizar el diagnóstico, especialmente en casos leves.

El documento WO 2011/066621 A1 da a conocer el diagnóstico de ectasia corneal determinando el nivel de expresión de SFRP1, PITX2, LEF1, WNT16 o WNT5A.

El documento US 2007/248970 A1 da a conocer un método para detectar queratocono que comprende someter a ensayo la expresión AQP5.

El documento WO 2013/107826 A2 da a conocer anticuerpos contra TLR2 o TLR4 en un kit para diagnosticar sepsis. De-Quan Li *et al.* (De-Quan Li *et al.* Capítulo 4. Recent Advances in Mucosal Immunology and Ocular Surface Diseases. En "Advances in Ophthalmology" editado por Shimon Rumelt. IntechOpen, 2012) da a conocer un anticuerpo contra TLR4 y que los TLR podrían convertirse en nuevos biomarcadores para enfermedades inflamatorias alérgicas.

Micera *et al.* (Micera *et al.*, 2005. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 5(5): 451-458), Li Yingchao *et al.* (Li Yingchao *et al.* 2013. IOVS, 54(6):4261-4270), Xiaoyong Yuan *et al.* (Xiaoyong Yuan *et al.* 2010. IOVS, 51(4):2094-2100), Lambiase *et al.* (Lambiase *et al.* 2011. Clinical Science, 161(10):7054-450), Johnson *et al.* (Johnson *et al.* 2005. IOVS, 46(2):589-595) dan a conocer la implicación de los TLR en enfermedades oculares inflamatorias o infecciones oculares o alergias.

La orientación innovadora de la investigación es necesaria en este contexto para proporcionar biomarcadores para diagnosticar ectasia corneal en un sujeto así como para determinar el riesgo de inicio y progresión de dicha enfermedad.

60 **Breve descripción de la invención**

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, que comprende:

a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y

b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia

en el que, si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece una enfermedad ectásica de la córnea.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, que comprende:

a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y

10 b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia.

En el que, si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que el sujeto presenta un alto riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el desenlace clínico de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea, que comprende:

a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y

20 b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia

en el que si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de un desenlace clínico negativo.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar un sujeto que va a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea que comprende:

a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y

30 b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia

en el que si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto es candidato a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea.

35 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de TLR2 y/o TLR4 como marcador para determinar el diagnóstico de una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de TLR2 y/o TLR4 como marcador para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto.

40 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de TLR2 y/o TLR4 como marcador para determinar el desenlace clínico de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de TLR2 y/o TLR4 como marcador para seleccionar un sujeto que va a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea.

45 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit que comprende un anticuerpo, un polipéptido, un cebador y/o una sonda que se enlaza específicamente a TLR2 y/o TLR4 para determinar el diagnóstico de una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, para determinar el desenlace clínico de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea o para seleccionar un sujeto que va a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea.

Finalmente, en otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de que un sujeto padezca ectasia tras cirugía refractiva que comprende:

55 a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y

b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia

60 en el que si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto presenta un alto riesgo de padecer ectasia tras cirugía refractiva.

Breve descripción de las figuras

65 **Figura 1:** Mediana [cuartiles] de los niveles de expresión de TLR2 en células corneales por grupos de estudio en la cohorte A. Se observa un aumento gradual en la expresión de TLR2 en una ectasia corneal como queratocono en

comparación con sujetos control: control < queratocono subclínico < queratocono.

Figura 2: Mediana [cuartiles] de los niveles de expresión de TLR4 en células corneales por grupos de estudio en la cohorte A. Se observa un aumento gradual en la expresión de TLR4 en una ectasia corneal como queratocono en comparación con sujetos control: control < queratocono subclínico < queratocono.

Figura 3: Mediana [cuartiles] de los niveles de expresión de TLR2 en células corneales por grupos de estudio en la cohorte B. Se observa un aumento gradual en la expresión de TLR2: control < familiares < queratocono. Asimismo, los pacientes con queratocono (QC) mostraron una expresión mayor de TLR2 en células corneales que los pacientes con degeneración marginal pelúcida (DMP).

Figura 4: Mediana [cuartiles] de los niveles de expresión de TLR4 en células corneales por grupos de estudio en la cohorte B. Se observa un aumento gradual en la expresión de TLR4: control < familiares < queratocono. Asimismo, los pacientes con queratocono (QC) mostraron una expresión mayor de TLR4 en células corneales que los pacientes con degeneración marginal pelúcida (DMP).

Figura 5: Mediana [cuartiles] de los niveles de expresión de TLR4 en células conjuntivales por grupos de estudio en la cohorte B. Se observa un aumento gradual en la expresión de TLR4: control < familiares < degeneración marginal pelúcida. Sin embargo, los pacientes con queratocono (QC) mostraron una expresión similar de TLR4 en células conjuntivales a la de los pacientes con degeneración marginal pelúcida (DMP).

Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención han descubierto que el proceso de ectasia está relacionado con la respuesta de inmunidad. A este respecto, los inventores han mostrado que, inesperadamente, los niveles de expresión de las proteínas TLR2 y TLR4 están aumentados en sujetos a los que se les ha diagnosticado una ectasia como queratocono o degeneración marginal pelúcida. Además, los inventores de la presente solicitud de patente han mostrado una correlación entre el nivel de expresión aumentado de TLR2 y TLR4 y determinados parámetros que están asociados con la progresión de dicha enfermedad. Por tanto, esto permite el uso de TLR2 y TLR4 no sólo como marcadores de diagnóstico de la enfermedad, sino también como marcadores sustitutos para predecir el riesgo de inicio y progresión de la enfermedad.

Basándose en estos hallazgos, los inventores han desarrollado los métodos de la presente invención en sus diferentes realizaciones que se describirán a continuación en detalle.

Método para diagnosticar ectasia corneal en un sujeto

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, a continuación en el presente documento, "el primer método de la invención", que comprende:

- a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y
- b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia

en el que, si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece una enfermedad ectásica de la córnea.

El término "diagnóstico" tal como se usa en el presente documento, se refiere tanto al proceso de intentar determinar y/o identificar una posible enfermedad en un sujeto, es decir el procedimiento de diagnóstico, como a la opinión a la que se llega mediante este proceso, es decir la opinión de diagnóstico. Como tal, también puede considerarse como un intento de clasificación del estado de un individuo en categorías independientes y diferenciadas que permiten tomar decisiones médicas sobre el tratamiento y el pronóstico a realizar. Como entenderá el experto en la técnica, un diagnóstico de este tipo puede no ser correcto para el 100% de los sujetos que han de diagnosticarse, aunque se prefiere. Sin embargo, el término requiere que pueda identificarse una proporción estadísticamente significativa de sujetos que padecen tales patologías (en este caso, ectasia corneal). El experto en la técnica puede determinar si una parte es estadísticamente significativa usando diferentes herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, mediante la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba de Student, la de Mann-Whitney, etc. Intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95%. Los valores de p son preferiblemente de 0,05, 0,025, 0,001 o menores.

El término "enfermedad ectásica de la córnea" o "ectasia corneal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un estado que implica el adelgazamiento progresivo del grosor de la córnea, que afecta por tanto a la integridad estructural de la misma dando lugar a una alteración de la curvatura corneal. La córnea debilitada presenta un abultamiento, y empieza a desarrollarse astigmatismo irregular incapacitante. La ectasia corneal incluye queratocono, (que puede clasificarse en queratocono subclínico y queratocono clínico), degeneración marginal pelúcida,

queratoglobo y ectasia tras cirugía corneal refractiva.

La curvatura de la córnea puede determinarse por medio de métodos de topografía corneal tales como videoqueratografía que permite determinar varios parámetros relacionados con la curvatura corneal, tales como:

- K1: determina el poder de curvatura del meridiano plano de la superficie anterior de la córnea medido dentro de la zona de 3 mm central y expresado en dioptrías (D);

- K2: determina el poder de curvatura del meridiano curvo de la superficie anterior de la córnea medido dentro de la zona de 3 mm central y expresado en dioptrías (D);

- Kc: determina el poder dióptrico máximo del vértice.

- Km: determina el poder de curvatura medio de la superficie anterior de la córnea dentro de la zona de 3 mm central expresado en dioptrías (D);

- Kmax: determina el poder de curvatura máximo de toda la superficie anterior de la córnea expresado en dioptrías (D);

- Ubicación más delgada: determina el área de grosor y la ubicación del punto más delgado de la córnea (μm).

- Elevación corneal posterior (μm).

Dichos parámetros medidos en sujetos sanos pueden resumirse como: K1 (dioptrías centrales) entre 41,8 y 45,3 D; K2 entre 42,2 y 45,3 D; elevación posterior entre 0,024-0,036 μm ; punto de grosor mínimo entre 513,5-567 μm .

En una realización particular, el primer método de la invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad ectásica de la córnea, en el que la enfermedad ectásica de la córnea se selecciona del grupo que consiste en queratocono subclínico, queratocono clínico, degeneración marginal pelúcida y ectasia corneal tras refracción.

El término “queratocono” tal como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad progresiva de la córnea que produce mala visión, en la que la córnea adopta una forma cónica irregular debido a la alteración de las fibras de colágeno en su estructura interna. Es bilateral en la mayoría de los casos y su progresión es asimétrica. El principal síntoma anatómico del queratocono es el adelgazamiento en el área central o paracentral, es decir, la córnea se vuelve más delgada a medida que se desarrolla el queratocono, lo que conduce a deterioro de la visión a medida que progresa el queratocono. El queratocono puede clasificarse según las directrices videoqueratográficas propuestas por Rabinowitz & McDonnell, es posible clasificar un ojo como “queratocono subclínico” si el poder corneal central simulado es mayor de 47,2 D pero menor de 48,7 D, con una asimetría dióptrica inferior-superior mayor de 1,4 D, pero menor de 1,9 D. Los ojos que presentan una curvatura corneal central que supera las 48,7 D, así como una asimetría dióptrica inferior-superior mayor de 1,9 D pueden clasificarse como “queratocono clínico”; 2) la agudeza visual de lejos (AVL) del ojo con QC subclínico con valor de 1,0 (sin corrección o con compensación esférica y/o cilíndrica < 1,50 D).

El término “degeneración marginal pelúcida” o “DMP” tal como se usa en el presente documento se refiere a un estado corneal degenerativo caracterizado por un claro adelgazamiento bilateral en la región inferior y periférica de la córnea aunque algunos casos afectan sólo a un ojo. A diferencia del queratocono, normalmente no está presente dolor en la degeneración marginal pelúcida, y aparte de la pérdida de visión, ningún síntoma acompaña al estado. Sin embargo, en casos poco frecuentes, DMP puede presentarse con pérdida de visión de aparición repentina y dolor ocular insoportable, que se produce si el adelgazamiento de la córnea conduce a perforación. Normalmente, DMP no se presenta con vascularización de la córnea, cicatrización ni ningún depósito de lípido.

El término “queratoglobo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un trastorno no inflamatorio degenerativo del ojo en el que cambios estructurales dentro de la córnea hacen que se vuelva extremadamente delgada y cambie a una forma más globular que su curva gradual normal. Provoca adelgazamiento corneal, principalmente en los márgenes, dando como resultado un ojo esférico, ligeramente agrandado.

El término “ectasia tras cirugía corneal refractiva” tal como se usa en el presente documento se refiere a un estado debido al debilitamiento de la capa interna de la córnea que se produce durante la cirugía. Da como resultado visión borrosa y distorsionada debido a un aumento de la miopía y el astigmatismo.

El término “TLR2” o “receptor de tipo Toll 2” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen TLR2. TLR2 también se ha designado como CD282 (grupo de diferenciación 282). TLR2 es uno de los receptores de tipo Toll y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína TLR2 humana se proporciona en la entrada NP_003255 de la base de datos del NCBI (versión del 25 de mayo de 2014).

El término “TLR4” o receptor de tipo Toll 2” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que

en seres humanos está codificada por el gen TLR4. TLR4 también se ha designado como CD284 (grupo de diferenciación 284). El peso molecular de TLR4 es de aproximadamente 95 kDa. En particular, la secuencia de la proteína TLR4 humana se proporciona en la entrada NP_003257 de la base de datos del NCBI (versión del 25 de mayo de 2014).

El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no se restringe a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el paciente es un ser humano de sexo masculino o femenino de cualquier edad o raza.

En la presente invención, el término "muestra" o "muestra biológica" significa material biológico aislado del ojo de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar el biomarcador deseado y puede comprender material celular y/o acelular del sujeto. En una realización preferida, la muestra es cualquier muestra que contiene células del tejido de la córnea. En otra realización preferida, la muestra es cualquier muestra que contiene células del tejido de la conjuntiva. La muestra puede aislarse usando cualquier método convencional conocido en la técnica. En resumen, pueden obtenerse células epiteliales corneales de un sujeto mediante desbridamiento mecánico usando un raspador corneal estéril, mediante citología de impresión o mediante la recogida de células que son muestras de lágrimas en suspensión, tales como células epiteliales corneales liberadas en la película lagrimal al frotar los ojos y recogidas con micropipetas usando técnicas convencionales, o mediante cualquier otra técnica conocida. Cuando la muestra son células de la conjuntiva del tejido de la conjuntiva, pueden obtenerse usando técnicas de toma de muestras conocidas tales como tejido del que se toman muestras usando un micro trépano.

En una realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.

En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR4 en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.

En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 y TLR4 en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.

Tal como se usa en el presente documento, el término "nivel de expresión" se refiere al valor de un parámetro que mide el grado de expresión de un gen específico o del polipéptido correspondiente. En una realización particular, dicho valor puede determinarse midiendo el nivel de ARNm del gen de interés o un fragmento del mismo o midiendo la cantidad de proteína codificada por dicho gen de interés o una variante del mismo. Por tanto, en el contexto de la presente invención, en una realización particular, dicho nivel de expresión comprende determinar el nivel del ARNm codificado por el gen de TLR2 y/o TLR4 o determinar el nivel de la proteína TLR2 y/o TLR4.

Puede usarse prácticamente cualquier método convencional para detectar y cuantificar el nivel de expresión de un gen dentro del marco de la presente invención para detectar y cuantificar el nivel de expresión de un gen específico. A modo de ilustración no limitativa, el nivel de expresión de un gen puede determinarse por medio de cuantificación del nivel de ARNm de dicho gen o por medio de cuantificación del nivel de proteína codificada por dicho gen. Se conocen bien métodos para determinar la cantidad de ARNm en el estado de la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en la muestra, tal como la muestra procedente del ojo del sujeto en estudio, se extrae según métodos convencionales, por ejemplo, por medio del uso de enzimas líticas, disoluciones químicas o resinas fijadoras. El ARNm extraído puede detectarse mediante hibridación (por ejemplo, por medio de análisis de transferencia de tipo Northern o alineamientos de ADN o ARN (microalineamientos) tras convertir el ARNm en ADNc marcado) y/o amplificación por medio de una reacción en cadena enzimática. En general, se prefieren métodos de amplificación enzimáticos cuantitativos o semicuantitativos. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o RT-PCR en tiempo real cuantitativa o RT-PCR semicuantitativa es particularmente ventajosa. Se diseñan preferiblemente pares de cebadores para el fin de superponer un intrón para distinguir la amplificación de ADNc de la contaminación por ADN genómico (ADNg). Se diseñan opcionalmente sondas o cebadores adicionales, que se marcan preferiblemente, por ejemplo con fluorescencia, que se hibridan específicamente en regiones ubicadas entre dos exones, para el fin de distinguir la amplificación de ADNc de la contaminación por ADNg. Si se desea, pueden diseñarse dichos cebadores de tal manera que aproximadamente los nucleótidos comprendidos desde el extremo 5' hasta la mitad de la longitud total del cebador se hibriden con uno de los exones de interés, y aproximadamente los nucleótidos comprendidos desde el extremo 3' hasta la mitad de la longitud total de dicho cebador se hibriden con el otro exón de interés. Pueden diseñarse fácilmente cebadores adecuados por un experto en la técnica. Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) y amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA). La cantidad de ARNm se mide preferiblemente de manera cuantitativa o de manera semicuantitativa. Puede encontrarse información relevante sobre métodos convencionales para cuantificar el nivel de expresión de un gen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001 [Sambrook, J., *et al.*, "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., vol. 1-3].

Para normalizar los valores de expresión de un gen entre diferentes muestras, es posible comparar el nivel de ARNm

del gen de interés (es decir, TLR2 y/o TLR4) en las muestras procedentes del sujeto objeto de estudio con un nivel de ARN control. Tal como se usa en el presente documento, un "ARN control" es ARN de un gen cuyo nivel de expresión no difiere dependiendo de si el sujeto padece una enfermedad ectásica de la córnea o no; un ARN control es preferiblemente un ARNm derivado de un gen de mantenimiento que codifica para una proteína que se expresa de manera constitutiva y que lleva a cabo funciones celulares esenciales. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de genes de mantenimiento para su uso en la presente invención incluyen GUSB (beta-glucuronidasa), PPIA (peptidil-prolil isomerasa A), β -2-microglobulina, GAPDH, PSMB4 (subunidad beta del proteasoma tipo 4), ubiquitina, receptor de transferrina, ARN ribosómico 18-S, ciclofilina, tubulina, β -actina, proteína de activación de tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa (YWHAZ), etc. Si se determina el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 midiendo el nivel de expresión del producto de transcripción (ARNm) de dicho gen en una muestra del sujeto en estudio, la muestra puede tratarse para romper física o mecánicamente la estructura del tejido o la célula con el fin de liberar los componentes intracelulares en una disolución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos para su análisis adicional. Se tiene cuidado preferiblemente para impedir la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

En una realización preferida y particular de la invención, también es posible que se determine el nivel de expresión de TLR2 por medio de la determinación del nivel de expresión de la proteína codificada por el gen de TLR2 o una variante del mismo, porque también es posible que la expresión aumentada de un gen esté acompañada habitualmente por un aumento en la cantidad de la proteína correspondiente. El término "variante" tal como se usa en el presente documento, se refiere a aquellas variantes de TLR2 humano que aparecen de manera natural en otras especies, es decir los ortólogos de TLR2. Dichas variantes incluyen, sin limitación, TLR2 de ratón, que corresponde a la secuencia con número de registro NP_036035 con fecha del 25 de mayo de 2014 en la base de datos del NCBI; TLR2 de cerdo, que corresponde a la secuencia con número de registro NP_998926 con fecha del 10 de enero de 2014 en la base de datos del NCBI; TLR2 de macaco, que corresponde a la secuencia con número de registro NP_001123897 con fecha del 2 de marzo de 2014 en la base de datos del NCBI; TLR2 de rata, que corresponde a la secuencia con número de registro NP_942064 con fecha del 10 de agosto de 2014 en la base de datos del NCBI.

En otra realización preferida y particular de la invención, se determina el nivel de expresión de TLR4 por medio de la determinación del nivel de expresión de la proteína codificada por el gen de TLR4 o una variante del mismo. Dichas variantes incluyen, sin limitación, TLR4 de ratón, que corresponde a la secuencia con número de registro NP_067272 con fecha del 4 de mayo de 2014 en la base de datos del NCBI; TLR4 de cerdo, que corresponde a la secuencia con número de registro NP_001280245 con fecha del 7 de junio de 2014 en la base de datos del NCBI; TLR4 de macaco, que corresponde a la secuencia con número de registro NP_001032169 con fecha del 26 de febrero de 2014 en la base de datos del NCBI; TLR4 de rata, que corresponde a la secuencia con número de registro NP_062051 con fecha del 10 de agosto de 2014 en la base de datos del NCBI.

Las variantes naturales de TLR2 y/o TLR4 adecuadas para su uso en la presente invención también se derivan de dicha secuencia mediante inserción, sustitución o delección de uno o más aminoácidos e incluyen alelos naturales, variantes que resultan de procesamiento alternativo y formas truncadas que aparecen de manera natural. El término "variante" también incluye fragmentos, isoformas y análogos o derivados de TLR2 y/o TLR4. Preferiblemente, variantes de TLR2 y/o TLR4 son (i) polipéptidos en los que uno o más residuos de aminoácido se sustituyen por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente, un residuo de aminoácido conservado) y tal aminoácido sustituido puede estar codificado o no por el código genético, (ii) polipéptidos en los que hay uno o más residuos de aminoácido modificados, por ejemplo, residuos modificados mediante enlaces sustituyentes, (iii) polipéptidos que resultan del procesamiento alternativo de un ARNm similar, (iv) fragmentos de polipéptido y/o (iv) polipéptidos que resultan de la fusión de TLR2 y/o TLR4 o el polipéptido definido en los puntos (i) a (iii) con otro polipéptido, tal como una secuencia líder secretora o una secuencia que está usándose para purificación (por ejemplo, cola de His) o para detección (por ejemplo, cola de epitopo Sv5). Los fragmentos incluyen polipéptidos generados a través de corte proteolítico (incluyendo proteólisis en múltiples sitios) de una secuencia original. Las variantes pueden modificarse de manera postraduccional o químicamente. Se supone que tales variantes resultan evidentes para los expertos en la técnica.

Las variantes según la presente invención incluyen secuencias de aminoácidos que son similares o idénticas en al menos el 60%, el 65%, el 70%, el 72%, el 74%, el 76%, el 78%, el 80%, el 90% o el 95% a la secuencia de aminoácidos original. El grado de identidad entre dos proteínas se determina usando algoritmos informáticos y métodos que se conocen ampliamente por los expertos en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

Las proteínas pueden modificarse de manera postraduccional. Por ejemplo, las modificaciones postraducionales que se encuentran dentro del alcance de la presente invención incluyen escisión de péptido señal, glicosilación, acetilación, isoprenilación, proteólisis miristoilación, plegamiento de proteínas y procesamiento proteolítico, etc. Adicionalmente, las proteínas pueden incluir aminoácidos no naturales formados mediante modificación postraduccional o mediante la introducción de aminoácidos no naturales durante la traducción.

La determinación de la cantidad de una proteína correspondiente a la expresión de un gen específico puede realizarse

usando cualquier método convencional para la detección y cuantificación de proteínas, por ejemplo por medio de un inmunoensayo, etc. A modo de ilustración no limitativa, dicha determinación puede realizarse usando anticuerpos con la capacidad para unirse específicamente a la proteína que va a determinarse (o fragmentos de la misma con los determinantes antigénicos) y la posterior cuantificación de los derivados del complejo antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos humanizados, etc. Dichos anticuerpos pueden marcarse (o no) con un marcador. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de marcadores que pueden usarse en la presente invención incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, cofactores enzimáticos, sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, etc.

Existe una amplia gama de ensayos bien conocidos que pueden usarse en la presente invención, tales como, por ejemplo, ensayos basados en técnicas de inmunotransferencia o transferencia de tipo Western, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA (inmunoensayo enzimático), DAS-ELISA (ELISA de tipo sándwich de doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas tales como citometría de flujo, etc. Otras maneras de detectar y cuantificar la proteína incluyen cromatografía de afinidad, técnicas de ensayo de unión a ligandos, inmunoensayo turbidimétrico potenciado por partículas (PETIA) etc.

En una realización particular, la determinación del nivel de expresión de la proteína TLR2 y/o TLR4 se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica o ELISA o alineamiento de proteínas. En una realización preferida, se determina el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 mediante citometría de flujo. En resumen, la citometría de flujo es una tecnología biofísica basada en láser que permite el análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas y químicas de hasta miles de partículas por segundo. Se basa en usar marcadores fluorescentes o fluoróforos que se unen normalmente a un anticuerpo que reconoce una característica diana sobre o en la célula; también pueden unirse a una entidad química con afinidad por la membrana celular u otra estructura celular. Cada fluoróforo tiene una longitud de onda de excitación y de emisión máximas características, y los espectros de emisión a menudo se solapan. Por consiguiente, la combinación de marcadores que pueden usarse depende de la longitud de onda de la(s) lámpara(s) o el/los láser(es) usado(s) para excitar los fluorocromos y de los detectores disponibles.

Si se desea, para normalizar los valores de expresión de una proteína, es decir TLR2 y/o TLR4, entre diferentes muestras, es posible comparar el nivel de proteína de la proteína de interés en las muestras procedentes del sujeto objeto de estudio con un nivel de proteína control. En una realización particular, se determina el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en términos absolutos, es decir proporcionando la concentración de TLR2 y/o TLR4 en una muestra. En otra realización particular, se mide el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 con relación con la cantidad de proteína total en una muestra.

La segunda etapa del primer método de la invención comprende comparar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 obtenido en la primera etapa de dicho método con un valor de referencia. El término "valor de referencia" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un valor de laboratorio usado como referencia para los valores/datos obtenidos a partir de muestras obtenidas de los sujetos. El valor de referencia (o nivel de referencia) puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, una serie de valores, un valor promedio, una mediana, un valor medio o un valor expresado mediante referencia a un valor de control o referencia. Un valor de referencia puede basarse en el valor obtenido a partir de una muestra individual, tal como, por ejemplo, un valor obtenido a partir de una muestra del sujeto objeto de estudio pero obtenido en un punto en el tiempo anterior. El valor de referencia puede basarse en un alto número de muestras, tales como los valores obtenidos en una población de los sujetos del grupo de edad cronológica que coincide con la del sujeto objeto de estudio o basarse en un conjunto de muestras de inclusión o exclusión de la muestra que va a analizarse. El valor de referencia puede basarse en los valores de expresión del marcador que va a compararse obtenidos a partir de muestras de sujetos sanos que no tienen un estado patológico o un fenotipo particular. Por ejemplo, el valor de referencia puede basarse en el nivel de expresión del marcador que va a analizarse obtenido de sujetos que no tienen ectasia corneal, preferiblemente de sujetos sanos que no padecen ningún traumatismo corneal ni enfermedad córneo-conjuntival ni ninguna enfermedad ocular. En una realización preferida, el valor de referencia se obtiene a partir de una muestra o un conjunto de muestras de sujetos sanos o sujetos sin historial previo de ectasia corneal.

El valor de referencia también puede basarse en los valores de expresión del marcador que va a compararse obtenidos a partir de muestras de sujetos que tienen un fenotipo particular.

Una vez que se ha establecido el valor de referencia, se compara el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto en estudio con el valor de referencia. Como consecuencia de esta comparación, el nivel de expresión del marcador de interés (por ejemplo, TLR2 y/o TLR4 en el primer método de la invención) en la muestra del sujeto puede ser "mayor que", "menor que" o "igual a" dicho valor de referencia para dicho gen. En el contexto de la presente invención, se considera que un nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto es "mayor que" o "superior a" el valor de referencia para dicho marcador cuando el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto aumenta, por ejemplo, el 5%, el 10%, el 25%, el 50%, el 100% o incluso más en comparación con el valor de referencia para dicho gen, o cuando aumenta, por ejemplo, al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más en comparación con el valor de referencia para dicho marcador. En el contexto de la presente invención, también se considera que un nivel de expresión del marcador de interés (por ejemplo, TLR2 y/o TLR4 en el primer método de la

invención) en la muestra del sujeto es “menor que” el valor de referencia para dicho marcador cuando el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto disminuye, por ejemplo, el 5%, el 10%, el 25%, el 50%, el 75%, o incluso el 100% en comparación con el valor de referencia para dicho marcador.

5 En el contexto de la presente invención, también se considera que un nivel de expresión del marcador de interés (es decir, TLR2 y/o TLR4 en el primer método de la invención) en la muestra del sujeto es “igual a” el valor de referencia para dicho marcador cuando el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 permanece sustancialmente inalterado con respecto al valor de referencia; por ejemplo, se considera que el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto en estudio es “igual a” el valor de referencia cuando los niveles difieren en no más del 0,1%, no más del 10
10 0,2%, no más del 0,3%, no más del 0,4%, no más del 0,5%, no más del 0,6%, no más del 0,7%, no más del 0,8%, no más del 0,9%, no más del 1%, no más del 2%, no más del 3%, no más del 4%, no más del 5% o no más del valor porcentual que es igual al error asociado con el método experimental usado en la determinación.

15 Una vez que se realiza la comparación entre el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto y el valor de referencia para dicho marcador, el primer método de la invención permite determinar si un sujeto padece una enfermedad ectásica de la córnea basándose en si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia.

20 En una realización particular del primer método de la invención, se tiene como objetivo diagnosticar que un sujeto padece queratocono subclínico, en cuyo caso el valor de referencia corresponde a los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 medidos en una muestra de un sujeto procedente de un sujeto sano, preferiblemente de sujetos que no tienen ectasia corneal, preferiblemente de sujetos sanos que no padecen ningún traumatismo corneal ni enfermedad córneo-conjuntival ni ninguna enfermedad ocular. En una realización preferida, el valor de referencia se obtiene a partir de una muestra o un conjunto de muestras de sujetos sanos o sujetos sin historial previo de ectasia corneal. En esta
25 realización particular, una vez que se realiza la comparación entre el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto y el valor de referencia para dicho marcador, el primer método de la invención permite determinar si un sujeto padece queratocono subclínico basándose en si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia. Tal como se muestra en los ejemplos de la presente solicitud, los valores de TLR2 medidos mediante citometría de flujo en el tejido de la conjuntiva de sujetos sanos son de aproximadamente 213 (90-295) UAF (unidades arbitrarias de fluorescencia); los valores de TLR2 medidos mediante citometría de flujo en el tejido corneal de sujetos sanos son de aproximadamente 185 (113-286) UAF; los valores de TLR4 medidos mediante citometría de flujo en el tejido de la conjuntiva de sujetos sanos son de aproximadamente 1581 (1281-2265) UAF (unidades arbitrarias de fluorescencia); los valores de TLR4 medidos mediante citometría de flujo en el tejido corneal de sujetos sanos son de aproximadamente 1654 (1134-2587) UAF. Por tanto, si se desea, dichos valores pueden usarse como
30 valor de referencia en la segunda etapa del primer método de la invención.

35 En otra realización particular, el primer método de la invención tiene como objetivo diagnosticar que un sujeto padece queratocono clínico, en cuyo caso el valor de referencia corresponde a los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 medidos en una muestra de un sujeto que padece queratocono subclínico. En esta realización particular, una vez que se realiza la comparación entre el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto y el valor de referencia para dicho marcador, el primer método de la invención permite determinar si un sujeto padece queratocono clínico basándose en si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia. Tal como se muestra en los ejemplos de la presente solicitud, los valores de TLR2 medidos mediante citometría de flujo en el tejido de la conjuntiva de sujetos que padecen queratocono subclínico son de aproximadamente 207 (124-398) UAF; los valores de TLR2 medidos mediante citometría de flujo en el tejido corneal de sujetos que padecen queratocono subclínico son de aproximadamente 977 (647-1330) UAF; los valores de TLR4 medidos mediante citometría de flujo en el tejido de la conjuntiva de sujetos que padecen queratocono subclínico son de aproximadamente 1922 (1574-2778) UAF (unidades arbitrarias de fluorescencia); los valores de TLR4 medidos mediante citometría de flujo en el tejido corneal de sujetos que padecen queratocono subclínico son de aproximadamente 2569 (2071-3808) UAF. Por tanto, si se
40 desea, dichos valores pueden usarse como valor de referencia en la segunda etapa del primer método de la invención.

45 En aún otra realización particular, el primer método de la invención tiene como objetivo diagnosticar que un sujeto padece degeneración marginal pelúcida, en cuyo caso el valor de referencia corresponde a los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 medidos en una muestra de un sujeto sano. En esta realización particular, una vez que se realiza la comparación entre el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto y el valor de referencia para dicho marcador, el primer método de la invención permite determinar si un sujeto padece degeneración marginal pelúcida basándose en si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia. Tal como se muestra en los ejemplos de la presente solicitud, los valores de TLR2 medidos mediante citometría de flujo en el tejido de la conjuntiva de sujetos sanos son de aproximadamente 733 (560-946) UAF; los valores de TLR2 medidos mediante citometría de flujo en el tejido corneal de sujetos sanos son de aproximadamente 580 (413-976) UAF; los valores de TLR4 medidos mediante citometría de flujo en el tejido de la conjuntiva de sujetos sanos son de aproximadamente 2380 (1781-3283) UAF (unidades arbitrarias de fluorescencia); los valores de TLR4 medidos mediante citometría de flujo en el tejido corneal de sujetos sanos son de aproximadamente 1572 (949-2353) UAF. Por tanto, si se desea, dichos valores pueden usarse como valor de referencia en la segunda etapa del primer método de la invención. En una realización particular, el primer método de la invención tiene como objetivo diagnosticar que un
50 sujeto padece degeneración marginal pelúcida si el nivel de expresión de TLR2 en el tejido corneal es mayor que dicho

valor de referencia.

5 En otra realización particular, el primer método de la invención tiene como objetivo diagnosticar que un sujeto padece degeneración marginal pelúcida si el nivel de expresión de TLR4 en el tejido de la conjuntiva es mayor que dicho valor de referencia, preferiblemente en tejido de la conjuntiva.

En otra realización particular, el primer método de la invención también comprende determinar al menos un parámetro seleccionado de: dioptrías, grosor corneal y elevación corneal.

10 El término “dioptría” tal como se usa en el presente documento se refiere a una unidad de poder de aumento de una lente o sistema de lentes. Debido a que el poder de una lente es proporcional a la unidad (uno) dividido entre la longitud focal, el poder de una lente en dioptrías es numéricamente igual a 1 m dividido entre la longitud focal en metros. Los signos algebraicos del poder de aumento indican si la lente hace que un haz estrecho incidente de rayos de luz
15 paralelos converja o diverja. Por tanto, una lente divergente que tiene una longitud focal de 1 m tiene un poder de -1 dioptría. La dioptría también puede usarse como medición de la curvatura igual a la inversa del radio medido en metros.

Método para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto

20 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, a continuación en el presente documento, “el segundo método de la invención” que comprende:

a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y

25 b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia

en el que, si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que el sujeto presenta un alto riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea.

30 La expresión “determinar el riesgo” o “predicción del riesgo”, o similar, tal como se usa en el presente documento, es sinónimo de la expresión “evaluar el riesgo” o “evaluación del riesgo”, significa que la presente invención hace que sea posible predecir, estimar o evaluar el riesgo de que un sujeto desarrolle una enfermedad ectásica de la córnea. La predicción del riesgo implica generalmente que el riesgo o bien aumenta o bien se reduce. Tal como entenderán los expertos en la técnica, la predicción (o el riesgo), aunque se prefiere, no es necesario que sea correcta para el
35 100% de los pacientes que padecen enfermedades ectásicas de la córnea evaluados. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos puedan ser identificados como que tienen una probabilidad aumentada de tener una enfermedad ectásica de la córnea. Puede determinarse si un sujeto es estadísticamente significativo sin más preámbulos por el experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba de la t de Student, la de Mann-Whitney, etc. Pueden encontrarse detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% al menos el 95%. Los valores de p son preferiblemente de 0,05, 0,025, 0,001, 0,0001 o menores.

45 El segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto.

En una realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 en una muestra del sujeto en estudio.

50 En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR4 en una muestra del sujeto en estudio.

En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 y TLR4 en una muestra del sujeto en estudio.

55 Los términos “sujeto”, “muestra” y “enfermedad ectásica de la córnea” se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al segundo método de la invención.

60 En una realización particular, la muestra de dicho sujeto se selecciona de tejido conjuntival y corneal. Se han detallado métodos para obtener muestras de tejidos conjuntivales y corneales en el primer método de la invención.

65 En otra realización particular, la enfermedad ectásica se selecciona de queratocono subclínico, queratocono clínico, degeneración marginal pelúcida, queratoglobo y ectasia tras cirugía corneal refractiva. Los términos “queratocono subclínico”, “queratocono clínico”, “degeneración marginal pelúcida”, “keratoglobo” y “ectasia tras cirugía corneal refractiva” se han definido previamente.

Los términos “TLR2”, “TLR4” y “nivel de expresión” se han definido previamente. En una realización particular, dicho nivel de expresión comprende determinar el nivel de ARNm codificado por el gen de TLR2 y/o TLR4 o determinar el nivel de la proteína TLR2 y/o TLR4. Se han detallado métodos para determinar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR2 en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al segundo método de la invención.

En una realización particular, la determinación del nivel de expresión de la proteína TLR2 y/o TLR4 se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica o ELISA o alineamiento de proteínas. En una realización preferida, se determina el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 mediante citometría de flujo.

La segunda etapa del segundo método de la invención comprende comparar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 con un valor de referencia. El término “valor de referencia” se ha definido previamente en el contexto del primer método de la invención.

Una vez que se realiza la comparación entre el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto en estudio y el valor de referencia, el segundo método de la invención permite determinar si un sujeto presenta un alto riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea basándose en si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia. Los términos “mayor que”, “menor que” e “igual a” se han definido previamente.

En una realización particular, el segundo método de la invención tiene como objetivo determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto al que se le ha diagnosticado previamente que tiene un defecto refractivo.

El término “defecto refractivo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un error en el enfoque de luz por el ojo sobre la retina. Los defectos refractivos incluyen:

- miopía que se refiere a un defecto refractivo en el ojo en el que rayos paralelos de luz desde una distancia convergen en un punto focal ubicado delante de la retina en vez de en la propia retina, como se produciría normalmente;

- astigmatismo que se refiere a un defecto ocular que se caracteriza por una refracción diferente entre dos meridianos del ojo, que impide enfocar claramente objetos y se debe generalmente a una alteración en la curvatura delantera de la córnea;

- hiperopía (o hipermetropía) que es un defecto de la visión provocado por una imperfección del ojo (a menudo cuando el globo ocular es demasiado corto o el cristalino no puede volverse lo suficientemente redondo), provocando dificultad al enfocar objetos cercanos;

- presbicia que es un estado asociado con el envejecimiento en el que el ojo presenta una capacidad disminuida progresivamente para enfocar objetos cercanos.

En una realización preferida, al sujeto se le ha diagnosticado previamente que tiene queratocono subclínico (el poder corneal central simulado es mayor de 47,2 D pero menor de 48,7 D, con una asimetría dióptrica inferior-superior mayor de 1,4 D, pero menor de 1,9 D).

En otra realización particular de la invención, el sujeto en estudio ha desarrollado una patología ocular previa seleccionada de: picor ocular, frotamiento ocular, signos biomicroscópicos e hiperemia conjuntival.

El término “picor ocular” tal como se usa en el presente documento se refiere a prurito ocular que puede estar provocado por queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis primaveral conjuntivitis alérgica y dermatitis atópica entre otros. Otras causas incluyen síndrome de sequedad ocular, disfunción de las glándulas de Meibomio, blefaritis, conjuntivitis inducida por lentes de contacto, conjuntivitis papilar gigante y dermatoblefaritis de contacto.

El término “signos biomicroscópicos” tal como se usa en el presente documento, se refiere a anomalías en las áreas en la parte delantera del ojo, incluyendo los párpados, la conjuntiva, el iris, el cristalino, la esclerótica y la córnea. También pueden observarse la retina y el nervio óptico.

El término “hiperemia conjuntival” tal como se usa en el presente documento se refiere a una congestión de los vasos sanguíneos en la conjuntiva debido a una reacción de inflamación.

Método para determinar el desenlace clínico de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el desenlace clínico de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea, a continuación en el presente documento, “el tercer método de la invención” que comprende:

a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y

b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia

5 en el que, si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de un desenlace clínico negativo.

10 El término “determinar el desenlace” o “predecir el desenlace”, se usa en el presente documento para referirse a la posibilidad de que un paciente tenga un desenlace clínico particular, ya sea positivo o negativo. Los métodos predictivos de la presente invención pueden usarse clínicamente para tomar decisiones de tratamiento mediante la elección de las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente particular. Los métodos predictivos de la presente invención son herramientas valiosas en la predicción de si es probable que un paciente responda favorablemente a un régimen de tratamiento, tal como cirugía refractiva. La predicción puede incluir factores de pronóstico.

15 Tal como entenderán los expertos en la técnica, la predicción, aunque se prefiere, no es necesario que sea correcta para el 100% de los sujetos evaluados. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de sujetos puedan ser identificados como que tienen una probabilidad aumentada de tener un desenlace determinado. Puede determinarse si un sujeto es estadísticamente significativo sin más preámbulos por el experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, índices de clasificación con validación cruzada y similares, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, de 0,01, 0,005 o menores.

25 El tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto.

30 En una realización preferida, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 en una muestra del sujeto en estudio.

En otra realización preferida, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR4 en una muestra del sujeto en estudio.

35 En otra realización preferida, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 y TLR4 en una muestra del sujeto en estudio.

La primera etapa del tercer método de la invención comprende determinar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra para el sujeto en estudio.

40 Los términos “sujeto”, “muestra” y “enfermedad ectásica de la córnea” se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al tercer método de la invención.

45 En una realización particular, la muestra de dicho sujeto se selecciona de tejido conjuntival y corneal. Se han detallado métodos para obtener muestras de tejidos conjuntivales y corneales en el primer método de la invención.

50 En otra realización particular, la enfermedad ectásica se selecciona de queratocono subclínico, queratocono clínico, degeneración marginal pelúcida, queratoglobo y ectasia tras cirugía corneal refractiva. Los términos “queratocono subclínico”, “queratocono clínico”, “degeneración marginal pelúcida”, “keratoglobo” y “ectasia tras cirugía corneal refractiva” se han definido previamente.

55 Los términos “TLR2”, “TLR4” y “nivel de expresión” se han definido previamente. En una realización particular, dicho nivel de expresión comprende determinar el nivel de ARNm codificado por el gen de TLR2 y/o TLR4 o determinar el nivel de la proteína TLR2 y/o TLR4. Se han detallado métodos para determinar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR2 en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al tercer método de la invención.

En una realización particular, la determinación del nivel de expresión de la proteína TLR2 y/o TLR4 se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica o ELISA o alineamiento de proteínas. En una realización preferida, se determina el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 mediante citometría de flujo.

60 La segunda etapa del tercer método de la invención comprende comparar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 con un valor de referencia. El término “valor de referencia” se ha definido previamente. En una realización particular, dicho valor de referencia se obtiene a partir de una muestra o un conjunto de muestras de sujetos sanos o sujetos sin historial previo de ectasia corneal.

65 En otra realización particular, dicho valor de referencia se refiere a los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto obtenida en un punto de tiempo anterior. Por tanto, según el tercer método de la invención,

5 los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 determinados en una muestra de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea obtenida por primera vez se comparan con los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 determinados en una muestra de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea obtenida en un segundo periodo de tiempo. La muestra del segundo sujeto puede tomarse en cualquier momento tras el primer periodo de tiempo, por ejemplo, un día, una semana, un mes, dos meses, tres meses, seis meses 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más tras la muestra del primer sujeto.

10 En último lugar, el sujeto se clasifica entonces como que tiene un desenlace negativo si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dichos niveles de expresión en la muestra de referencia.

10 El término “desenlace positivo” en relación con enfermedad ectásica de la córnea significa que la degeneración de la córnea no avanza. Dicho término también abarca una disminución en la tasa de degeneración de la córnea.

15 El término “desenlace negativo” en relación con enfermedad ectásica de la córnea significa que la degeneración de la córnea progresa.

Método para seleccionar un sujeto que va a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea

20 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar un sujeto que va a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea, a continuación en el presente documento, “el cuarto método de la invención” que comprende:

25 a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y

25 b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia

en el que, si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto es candidato a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea.

30 La expresión “seleccionar un sujeto para una terapia”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la identificación de un sujeto para una terapia diseñada para curar una enfermedad o paliar los síntomas asociados con una o más enfermedades o estados. En el caso particular de terapia para enfermedad ectásica de la córnea, se entiende cualquier terapia que suprima, retarde o reduzca los síntomas asociados con ectasia corneal. Las terapias adecuadas que pueden usarse según la invención para tratar enfermedades ectásicas de la córnea incluyen reticulación corneal, anillos intracorneales y cirugía refractiva.

35 La reticulación corneal es una técnica que usa luz ultravioleta o luz en el espectro del azul y un fotosensibilizador para fortalecer los enlaces químicos en la córnea y aumentar de ese modo la rigidez corneal.

40 Los anillos corneales intraestromales o anillos intracorneales son pequeños dispositivos implantados en el ojo para corregir la visión. Una corrección de la visión típica usando anillos corneales implicaría que un oftalmólogo practicase una pequeña incisión en la córnea del ojo e insertase dos segmentos de anillos de forma semicircular o de media luna entre las capas del estroma corneal, uno a cada lado de la pupila. La inclusión de los anillos en la córnea tiene el efecto de aplanar la córnea y cambiar la refracción de la luz que pasa a través de la córnea en su camino al interior del ojo.

45 La cirugía ocular refractiva se usa para mejorar el estado refractivo del ojo y disminuir o eliminar la dependencia de gafas o lentes de contacto. Esto puede incluir diversos métodos de remodelación quirúrgica de la córnea. Los métodos más comunes hoy en día, tales como queratoplastia lamelar automatizada (ALK), queratomileusis in situ asistida por láser (LASIK) o ReLEx, usan láseres de excímeros para volver a conformar la curvatura de la córnea.

50 El cuarto método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto.

55 En una realización preferida, el cuarto método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 en una muestra del sujeto en estudio.

60 En otra realización preferida, el cuarto método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR4 en una muestra del sujeto en estudio.

60 En otra realización preferida, el cuarto método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 y TLR4 en una muestra del sujeto en estudio.

65 La primera etapa del cuarto método de la invención comprende determinar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra para el sujeto en estudio.

Los términos “sujeto”, “muestra” y “enfermedad ectásica de la córnea” se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al cuarto método de la invención.

5 En una realización particular, la muestra de dicho sujeto se selecciona de tejido conjuntival y corneal. Se han detallado métodos para obtener muestras de tejidos conjuntivales y corneales en el primer método de la invención.

10 En otra realización particular, la enfermedad ectásica se selecciona de queratocono subclínico, queratocono clínico, degeneración marginal pelúcida, queratoglobo y ectasia tras cirugía corneal refractiva. Los términos “queratocono subclínico”, “queratocono clínico”, “degeneración marginal pelúcida”, “keratoglobo” y “ectasia tras cirugía corneal refractiva” se han definido previamente.

15 Los términos “TLR2”, “TLR4” y “nivel de expresión” se han definido previamente. En una realización particular, dicho nivel de expresión comprende determinar el nivel de ARNm codificado por el gen de TLR2 y/o TLR4 o determinar el nivel de la proteína TLR2 y/o TLR4. Se han detallado métodos para determinar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR2 en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al tercer método de la invención.

20 En una realización particular, la determinación del nivel de expresión de la proteína TLR2 y/o TLR4 se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica o ELISA o alineamiento de proteínas. En una realización preferida, se determina el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 mediante citometría de flujo.

25 La segunda etapa del cuarto método de la invención comprende comparar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 con un valor de referencia. El término “valor de referencia” se ha definido previamente. En una realización particular, dicho valor de referencia se obtiene a partir de una muestra o un conjunto de muestras de sujetos sanos o sujetos sin historial previo de ectasia corneal.

30 Una vez que se realiza la comparación entre el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto en estudio y el valor de referencia, el cuarto método de la invención permite seleccionar un sujeto que va a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea basándose en si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia. Los términos “mayor que”, “menor que” e “igual a” se han definido previamente.

Método para seleccionar una cirugía refractiva como terapia para un sujeto que padece un defecto refractivo

35 También se da a conocer un método *in vitro* para determinar si un sujeto que padece un defecto refractivo es un candidato a una terapia de cirugía refractiva, que comprende:

- a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y
- b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia

40 en el que si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto no es candidato a tratarse con una cirugía refractiva para dicho defecto refractivo.

45 Preferiblemente, este método comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 y TLR4 en una muestra del sujeto en estudio.

El término “cirugía refractiva” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier cirugía ocular usada para mejorar el estado refractivo del ojo basándose en la remodelación de la curvatura de la córnea.

50 La primera etapa de este método comprende determinar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra para el sujeto en estudio.

Los términos “sujeto”, “muestra” y “defecto refractivo” se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables a este método.

55 Particularmente, la muestra de dicho sujeto se selecciona de tejido conjuntival y corneal. Se han detallado métodos para obtener muestras de tejidos conjuntivales y corneales en el primer método de la invención.

60 Particularmente, la determinación del nivel de expresión de la proteína TLR2 y/o TLR4 se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica o ELISA o alineamiento de proteínas. Preferiblemente, se determina el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 mediante citometría de flujo.

La segunda etapa de este método comprende comparar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 con un valor de referencia. El término “valor de referencia” se ha definido previamente.

65 Una vez que se realiza la comparación entre el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto en estudio y el valor de referencia, este método permite seleccionar un sujeto que va a tratarse con una terapia para una

enfermedad ectásica de la córnea basándose en si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia. Los términos “mayor que”, “menor que” e “igual a” se han definido previamente.

Usos de la invención

5 En un sexto aspecto, la invención se refiere al uso de TLR2 y/o TLR4 como marcador para determinar el diagnóstico de una enfermedad ectásica de la córnea.

10 En un séptimo aspecto, la invención se refiere al uso de TLR2 y/o TLR4 como marcador para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto.

En un octavo aspecto, la invención se refiere al uso de TLR2 y/o TLR4 como marcador para determinar el desenlace clínico de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea.

15 Finalmente, la invención se refiere al uso de TLR2 y/o TLR4 como marcador para seleccionar un sujeto que va a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea.

20 Los términos “TLR2”, “TLR4”, “diagnóstico”, “determinar el riesgo”, “determinar el desenlace clínico”, “seleccionar un sujeto que va a tratarse con terapia”, “enfermedad ectásica de la córnea” y sus detalles y realizaciones preferidas se han definido previamente en el contexto del primer, segundo, tercer y cuarto métodos de la invención y son igualmente aplicables a los usos de la invención.

Método para determinar el riesgo de que un paciente padezca ectasia tras cirugía refractiva

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de que un paciente padezca ectasia tras cirugía refractiva, que comprende:

a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y

30 b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia

en el que si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto muestra un alto riesgo de padecer ectasia tras cirugía refractiva.

35 En una realización preferida, el método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de TLR2 y TLR4 en una muestra del sujeto en estudio.

El término “cirugía refractiva” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier cirugía ocular usada para mejorar el estado refractivo del ojo basándose en la remodelación de la curvatura de la córnea.

40 La primera etapa del quinto método de la invención comprende determinar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra para el sujeto en estudio.

45 Los términos “sujeto”, “muestra” y “defecto refractivo” se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al quinto método de la invención.

En una realización particular, la muestra de dicho sujeto se selecciona de tejido conjuntival y corneal. Se han detallado métodos para obtener muestras de tejidos conjuntivales y corneales en el primer método de la invención.

50 En una realización particular, la determinación del nivel de expresión de la proteína TLR2 y/o TLR4 se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica o ELISA o alineamiento de proteínas. En una realización preferida, se determina el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 mediante citometría de flujo.

55 La segunda etapa del quinto método de la invención comprende comparar los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 con un valor de referencia. El término “valor de referencia” se ha definido previamente.

60 Una vez que se realiza la comparación entre el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en la muestra del sujeto en estudio y el valor de referencia, el cuarto método de la invención permite seleccionar un sujeto que va a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea basándose en si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia. Los términos “mayor que”, “menor que” e “igual a” se han definido previamente.

65 Se proporciona el siguiente ejemplo como meramente ilustrativo y no ha de interpretarse como limitativo del alcance de la invención.

Ejemplos

Materiales y Métodos

5 Se han incluido 2 cohortes de pacientes diferentes:

1) En una cohorte A se han incluido pacientes con QC unilateral y sujetos control con el fin de someter a prueba si la expresión de TLR2 y TLR4 en células del epitelio corneal y la conjuntiva bulbar de pacientes con QC patológica o clínica es mayor que en QC subclínica y mayor que en muestras de sujetos control.

10 2) En una cohorte B se han incluido pacientes con QC bilateral, familiares de pacientes, pacientes con DMP y sujetos control con el fin de someter a prueba si la expresión de TLR2 y TLR4 en células del epitelio corneal y la conjuntiva bulbar de pacientes con QC patológica o clínica es mayor que en sus familiares, y mayor que en muestras de sujetos control. Asimismo, se sometió a prueba si la expresión de TLR2 y TLR4 en células del epitelio corneal y la conjuntiva bulbar de pacientes con DMP es mayor que en sujetos control.

Pacientes y sujetos control en la cohorte A

20 Se ha diseñado un estudio prospectivo, transversal en el que se incluyeron 50 pacientes con QC unilateral (50 ojos con QC y 50 con QC subclínico) y 19 sujetos control (38 ojos). Se seleccionaron los pacientes con QC unilateral (64% de hombres; edad media, $33,3 \pm 9,5$ años) de una base de datos de pacientes con QC en el Servicio Galego de Saúde, Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela, España. Se estudiaron los dos ojos de cada paciente o sujeto control. Se pidió a los pacientes que no se pusieran sus lentes de contacto durante una semana antes del estudio. Los sujetos control (45,9% de hombres; edad media, $28,5 \pm 4,7$ años) no tenían un historial previo de QC o frotamiento ocular, y tampoco alteraciones topográficas. Se citó expresamente a todos los pacientes y sujetos control para los fines de este estudio, y se realizaron todos los exámenes por el mismo investigador. Los datos recopilados incluyeron el sexo, la edad, el historial ocular del paciente, el historial médico (alergia, frotamiento ocular) y el historial de QC. Se llevó a cabo esta investigación según la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2008) y fue aprobada por el Comité Ético de Investigación en el Servicio Galego de Saúde. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente o sujeto control tras una explicación completa de los procedimientos.

30 Los criterios de inclusión fueron: 1) pacientes con QC asimétrico (1 ojo con QC y 1 ojo con QC subclínico). Se usó el criterio de Rabinowitz/McDonnell para el diagnóstico de QC (Rabinowitz Y.S. Keratoconus. Surv Ophthalmol. 1998; 42:297-319). Según las directrices videoqueratográficas propuestas por Rabinowitz & McDonnell, es posible clasificar un ojo como con queratocono subclínico si el poder corneal central simulado es mayor de 47,2 D pero menor de 48,7 D, con una asimetría dióptrica inferior-superior mayor de 1,4 D, pero menor de 1,9 D. Los ojos que presentan una curvatura corneal central que supera las 48,7 D, así como una asimetría dióptrica inferior-superior mayor de 1,9 D pueden clasificarse como "queratocono verdadero"; 2) la agudeza visual de lejos (AVL) del ojo con QC subclínico con un valor de 1,0 (sin corrección o con compensación esférica y/o cilíndrica $< 1,50$ D).

40 Los criterios de exclusión incluyeron: 1) intervención quirúrgica previa en el segmento anterior, o traumatismo corneal en la infancia o enfermedad córneo-conjuntival; 2) existencia de inflamación activa o sistémica, o enfermedad ocular, o tratamiento actual con fármacos antiinflamatorios sistémicos o locales; 3) enfermedades hepáticas, renales, hematológicas e inmunológicas, trastornos de la función tiroidea, diabetes no controlada, infecciones en los días que precedieron a la recogida de la muestra y tumores sólidos; ya que pueden interferir con los resultados del estudio de marcadores moleculares de inmunidad innata.

Pacientes y sujetos control en la cohorte B

50 Se ha diseñado un estudio prospectivo, transversal en el que se incluyeron 53 pacientes con QC bilateral (106 ojos con QC), 24 familiares (48 ojos), 13 pacientes con DMP (26 ojos) y 34 sujetos control (68 ojos). Se seleccionaron los pacientes con QC bilateral (56% de hombres; edad media, $33,3 \pm 8,4$ años) y los pacientes con DMP (69% de hombres; edad media, $47,7 \pm 8,9$ años) de una base de datos de pacientes con enfermedad ectásica de la córnea en el Servicio Galego de Saúde, Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela, España. Los familiares (52% de hombres; edad media $26,7 \pm 9,9$ años) tenían un historial familiar de QC, pero sin alteraciones topográficas. Los sujetos control (41% de hombres; edad media, $30,5 \pm 9,6$ años) no tenían un historial familiar de QC o frotamiento ocular, y tampoco alteraciones topográficas. Se estudiaron los dos ojos de cada paciente con QC o DMP, familiar o sujeto control. Se pidió a los pacientes, familiares y sujetos control que no se pusieran sus lentes de contacto durante una semana antes del estudio. Se citó expresamente a todos los pacientes y sujetos control para los fines de este estudio, y se realizaron todos los exámenes por el mismo investigador. Los datos recopilados incluyeron el sexo, la edad, el historial ocular del paciente, el historial médico (alergia, frotamiento ocular) y el historial familiar de QC. Se llevó a cabo esta investigación según la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2008) y fue aprobada por el Comité Ético de Investigación en el Servicio Galego de Saúde. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente o sujeto control tras una explicación completa de los procedimientos.

65

Los criterios de inclusión fueron: 1) pacientes con QC bilateral (2 ojos con QC). Se usó el criterio de Rabinowitz/McDonnell para el diagnóstico de QC (Rabinowitz Y.S. Keratoconus. Surv Ophthalmol. 1998; 42:297-319). Según las directrices videoqueratográficas propuestas por Rabinowitz & McDonnell, es posible clasificar un ojo como con queratocono subclínico si el poder corneal central simulado es mayor de 47,2 D pero menor de 48,7 D, con una asimetría dióptrica inferior-superior mayor de 1,4 D, pero menor de 1,9 D. Los ojos que presentan una curvatura corneal central que supera las 48,7 D, así como una asimetría dióptrica inferior-superior mayor de 1,9 D pueden clasificarse como "queratocono verdadero"; 2) la agudeza visual de lejos (AVL) del ojo con QC subclínico con un valor de 1,0 (sin corrección o con compensación esférica y/o cilíndrica < 1,50 D). 2) Pacientes con DMP (2 ojos con QC). Se consideró la DMP cuando se identificó un aplanamiento corneal central marcado a lo largo del eje vertical con astigmatismo contra la regla grave y elevación marcada de la córnea periférica inferior y muestra de manera típica un patrón en pinza de cangrejo. 3) Familiares: familiares de primer grado de pacientes con trastornos ectásicos (DMP o QC) pero sin alteraciones topográficas.

Los criterios de exclusión incluyeron: 1) intervención quirúrgica previa en el segmento anterior, o traumatismo corneal en la infancia o enfermedad córneo-conjuntival; 2) existencia de inflamación activa o sistémica, o enfermedad ocular, o tratamiento en curso con fármacos antiinflamatorios sistémicos o locales; 3) enfermedades hepáticas, renales, hematológicas e inmunológicas, trastornos de la función tiroidea, diabetes no controlada, infecciones en los días que precedieron a la recogida de la muestra y tumores sólidos; ya que pueden interferir con los resultados del estudio de marcadores moleculares de inmunidad innata.

Variables clínicas

- Variables epidemiológicas: edad, sexo, año del diagnóstico de QC, historial personal y familiar,

- Variables terapéuticas: antihistamínicos, antiinflamatorios sistémicos o locales o antibióticos.

- Variables asociadas con QC: picor ocular y su intensidad, frotamiento ocular y su intensidad, AVL y AVP con y sin corrección óptica, signos biomicroscópicos, escala de hiperemia conjuntival, prueba de Schirmer, uso de lentes de contacto.

- Variables topográficas: PDC (simK), Kmax, Kmin, K1, K2, Ka, Dk, MPD y distancia al centro. Clasificación de Krumeich y clasificación de CLEK para el grado de QC. Valores aberrométricos y elevación.

Grupos de estudio

Para análisis comparativo, se han definido los siguientes grupos:

Cohorte A

Grupo 1: controles sin alteraciones topográficas.

Grupo 2: QC subclínico.

Grupo 3: QC.

Cohorte B:

Grupo 1: controles sin alteraciones topográficas.

Grupo 2: QC bilateral.

Grupo 3: DMP.

Grupo 4: familiares sin alteraciones topográficas.

Se establecieron estos grupos para determinar el valor predictivo de TLR como biomarcador de riesgo para el inicio o la progresión de QC o DMP.

Instrumentación

Los instrumentos de examen básicos fueron un biomicroscopio Topcon, una columna de refracción Topcon y la prueba alfabética de agudeza visual de Snellen. Como instrumentos de examen específicos se usaron un sistema TOPCON CA-100 (Topcon Medical Systems, Inc., NJ, EE.UU.) y un topógrafo corneal top Orbscan II (Orbtek, Utah, EE.UU.).

Procedimiento

Este protocolo recopiló la siguiente información: tiempo transcurrido desde el diagnóstico de QC en el primer ojo, lateralidad, picor y frotamiento, historial familiar de QC y alergias.

5 Tras obtener la mejor corrección, se realizó el examen de biomicroscopía para detectar signos de QC. Se realizó el estudio de topografía corneal usando los topógrafos TOPCON y Orbscan. Se analizaron cinco parámetros topográficos cuantitativos: lecturas de queratometría simulada (K), elevación posterior y la paquimetría en el punto más delgado de la córnea.

10 Análisis de expresión de TLR2 y TLR4

15 Se realizaron análisis de expresión de TLR2 y 4 mediante citometría de flujo en células conjuntivales y corneales, extraídas de todos los sujetos control y pacientes con QC subclínico por medio de una lanceta quirúrgica de espuma de PVA (SOFT CELL®, OASIS®, CA, EE.UU.). Para el análisis de expresión de TLR2 y TLR4, se separaron células conjuntivales y corneales mediante sus características de señal de dispersión frontal y lateral. Se usaron el anticuerpo contra FITC-TLR2 (IMMUNOSTEP, Salamanca, España) y el anticuerpo contra PE-TLR4 (IMMUNOSTEP, Salamanca, España) para cuantificar la expresión de TLR. Se analizaron muestras en un citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences, NJ, EE.UU.). Se midió la fluorescencia celular inmediatamente tras tinción, y se analizaron los datos con el uso del software FACSDiva (BD Biosciences, NJ, EE.UU.). Para la cohorte A, se analizó la expresión media de TLR2 y TLR4 en células conjuntivales (1250 acontecimientos) y corneales (500 acontecimientos) y se expresó como UAF (unidades arbitrarias de fluorescencia). Para la cohorte B, se analizó la expresión media de TLR2 y TLR4 en células conjuntivales (2000 acontecimientos) y corneales (1000 acontecimientos) y se expresó como UAF (unidades arbitrarias de fluorescencia).

25 Análisis estadístico

30 Se expresaron los resultados como porcentajes para variables categóricas y como la media (D.E.) o la mediana [cuartiles] para las variables continuas dependiendo de su distribución normal o no, respectivamente. Se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para someter a prueba la normalidad de la distribución. Se compararon proporciones usando la prueba de chi cuadrado, mientras que se compararon las variables continuas entre grupos con las pruebas de la t de Student (variables con distribución normal) o la de Mann-Whitney (variables con distribución no normal). Se usó ANOVA para analizar la relación entre grupos de estudio y TLR2 y TLR4 en células corneales y conjuntivales. Se configuraron curvas de características operativas del receptor (ROC) para establecer puntos de corte de TLR2 y TLR4 en células corneales y conjuntivales que predijeron de manera óptima el riesgo de aparición o progresión de QC o DMP. Se consideró que un valor de $p < 0,05$ era estadísticamente significativo. Se realizó el análisis estadístico usando SPSS 16.0 para Mac.

Ejemplo 1

40 Características clínicas para la cohorte A

45 No se detectaron diferencias estadísticas relacionadas con el sexo entre los grupos de estudio, sin embargo los pacientes con QC tenían más edad y mostraron un historial más frecuente de QC (tabla 1). El tiempo transcurrido desde el primer diagnóstico de ojo con QC osciló entre 1 y 30 años (media, $8,3 \pm 6,2$ años). Veintitrés pacientes con QC (46%) y 19 sujetos control (51,4%) notificaron enfermedad alérgica y 15 pacientes con QC (30%) un historial familiar de QC. Trece sujetos control (35,1%) y 31 pacientes (62%) notificaron picor de ojos. Para los pacientes que notificaron picor de ojos, el 71% admitió un frotamiento ocular frecuente y vigoroso en el ojo con QC. Trece sujetos control (35,1%) también notificaron frotamiento ocular.

50 La tabla 1 muestra los valores de K2 medios para todos los grupos de estudio. El K2 medio fue mayor en el ojo con QC frente a los otros grupos de estudio ($p < 0,0001$).

Estudio descriptivo

Variable	Control	QC subclínico	QC	Valor de p
Edad (años)	28,5 ± 4,7	33,3 ± 9,5	33,3 ± 9,5	0,029
Sexo (% de hombres)	45,9	64,0	64,0	0,538
Historial de QC (%)	0	30,0	30,0	0,002
K central (dioptrías)	43,4 [41,8 - 45,3]	43,6 [42,3 - 44,7]	48,1 [45,1 - 52,1]	<0,0001
Punto de grosor mínimo (µm)	552,0 [513,5 - 567,0]	519,0 [487,5 - 546,0]	480,0 [417,0 - 502,0]	<0,0001
Elevación posterior (µm)	0,038 [0,024 - 0,036]	0,036 [0,029 - 0,047]	0,089 [0,062 - 0,122]	<0,0001
K2 (dioptrías)	43,7 [42,3 - 45,3]	44,0 [43,0 - 44,8]	48,0 [46,4 - 50,5]	<0,0001
TLR2 conjuntiva (UAF)	213 [90 - 295]	207 [124 - 398]	422 [178 - 1065]	<0,0001
TLR4 conjuntiva (UAF)	1581 [1281 - 2265]	1922 [1574 - 2778]	2377 [1817 - 3032]	<0,0001
TLR2 córnea (UAF)	185 [113 - 286]	977 [647 - 1330]	2569 [2071 - 3808]	<0,0001
TLR4 córnea (UAF)	1654 [1134 - 2587]	2569 [2071 - 3808]	4125 [3233 - 5076]	<0,0001

5 **Tabla 1: Características clínicas de nivel basal y expresión en células conjuntivales y corneales de TLR en los grupos de estudio de la cohorte A.** Se expresan los valores en mediana [cuartiles]. QC: queratocono; TLR2: receptor de tipo Toll 2); TLR4: receptor de tipo Toll 4); UAF: unidad arbitraria de fluorescencia

10 Expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales y conjuntivales para la cohorte A

En la tabla 1, también se muestran los niveles de expresión de TLR2 y TLR4 en grupos con QC, QC subclínico y control tanto en células corneales como conjuntivales. La expresión de TLR2 y TLR4 tanto en células corneales como conjuntivales fue mayor en los grupos con QC. Además, cuanto mayor fue la expresión de TLR2 y TLR4, mayor fue la progresión de QC (tabla 1). Sin embargo, se encontró la principal diferencia de expresión de TLR de los grupos control con los grupos con QC subclínico y QC para la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales. Por tanto, se centraron los análisis predictivos exclusivamente en la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales.

15 Valor predictivo de la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales para el riesgo de inicio y progresión a QC para la cohorte A

20 Según el análisis de ROC, la expresión de TLR2 en células epiteliales corneales puede predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC (tanto QC subclínico como QC) en comparación con los controles (área bajo la curva de 0,995, IC del 95%: 0,987-1,000; p < 0,0001). Asimismo, la expresión de TLR2 en células corneales también es útil para predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC subclínico en comparación con los controles (área bajo la curva de 0,989, IC del 95%: 0,975-1,000; p < 0,0001). Finalmente, la expresión corneal de TLR2 también predice con la alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC no subclínico en comparación con el QC (área bajo la curva de 0,893, IC del 95%: 0,834-0,953; p < 0,0001). En resumen, la tabla 2 muestra la sensibilidad y especificidad para la utilidad de varios puntos de corte para la expresión de TLR2 en células corneales para detectar el riesgo de inicio y progresión de QC.

30 Pacientes control frente a pacientes con QC (QC subclínico + QC)

Expresión de TLR2 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 330 UAF	99%	84%
330 - 660 UAF	89 - 98%	85 - 99%
> 660 UAF	88%	100%

Control frente a QC subclínico

Expresión de TLR2 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 330 UAF	98%	84%
330 - 660 UAF	75 - 97%	85 - 99%
> 660 UAF	74%	100%

QC subclínico frente a QC

Expresión de TLR2 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 330 UAF	100%	2%
> 660 UAF	100%	26%
660 - 1500 UAF	69 - 99%	27-87%
> 1500 UAF	68%	88%

Tabla 2: Valores de sensibilidad y especificidad para la utilidad de la expresión de TLR2 en células corneales para detectar el riesgo de inicio de progresión de QC para la cohorte A.

- 5 Por otra parte, según el análisis de ROC, la expresión de TLR4 en células epiteliales corneales también puede predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC (tanto QC subclínico como QC) en comparación con los controles (área bajo la curva de 0,846, IC del 95%: 0,776-0,915; $p < 0,0001$). Asimismo, la expresión de TLR4 en células corneales también es útil para predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC subclínico en comparación con los controles (área bajo la curva de 0,756, IC del 95%: 0,653-0,860; $p < 0,0001$). Finalmente, la expresión corneal de TLR4 también predice con la alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC no subclínico en comparación con el QC (área bajo la curva de 0,767, IC del 95%: 0,673-0,860; $p < 0,0001$). La tabla 3 muestra la sensibilidad y especificidad para la utilidad de varios puntos de corte para la expresión de TLR4 en células corneales para detectar el riesgo de inicio de progresión de QC.
- 10
- 15 En conclusión, la expresión de TLR2 en células corneales mostró un mayor valor predictivo para detectar el riesgo de inicio y progresión de QC que la expresión de TLR4.

Pacientes control frente a pacientes con QC (QC subclínico + QC)

Expresión de TLR4 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 1500 UAF	94%	46%
1500 - 4000 UAF	36 - 93%	45 - 96%
> 4000 UAF	35%	97%

Control frente a QC subclínico

Expresión de TLR4 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 1500 UAF	88%	46%
1500 - 4000 UAF	23 - 87%	45 - 96%
> 4000 UAF	22%	97%

QC subclínico frente a QC

Expresión de TLR4 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 1500 UAF	100%	22%
> 4000 UAF	520%	80%
> 5000 UAF	28%	90%

Tabla 3

- 20 **Valores de sensibilidad y especificidad para la utilidad de la expresión de TLR4 en células corneales para detectar el riesgo de inicio de progresión de QC para la cohorte A.**

25 **Correlación entre la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales y parámetros clínicos de progresión de QC (K2 y Kc) para la cohorte A.**

- 30 Se analizaron los niveles de expresión de TLR2 y TLR4 en células de la córnea de pacientes con QC clínico y subclínico con relación a dos parámetros cuantitativos relacionados con la progresión de queratocono, concretamente K2 y Kc. Se usó un análisis de regresión lineal más simple, calculando correlaciones bivariantes con la prueba de Pearson. Se expresan los resultados como el coeficiente de correlación r:

K2

TLR2; $r=0,525$; $p < 0,0001$

5 TLR4; $r=0,359$; $p < 0,001$

Kc

TLR2; $r=0,439$; $p < 0,0001$

10 TLR4; $r=0,379$; $p < 0,0001$

Estos resultados confirman una asociación entre la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales con la progresión y la gravedad de QC subclínico y clínico.

15 **Ejemplo 2**

Características clínicas para la cohorte B

20 No se detectaron diferencias estadísticas relacionadas con el sexo entre los grupos de estudio, sin embargo, los pacientes con DMP tenían más edad y los pacientes con QC mostraban un historial más frecuente de trastornos ectásicos que los sujetos control y los pacientes con DMP (tabla 4). Veintiocho pacientes con QC (65%), 6 pacientes con DMP (46%), 9 familiares (39%) y 14 sujetos control (41,2%) notificaron enfermedad alérgica. Asimismo, el 88% de los pacientes con QC, el 84% de los pacientes con DMP, el 39% de los familiares y el 26% de los sujetos control notificaron picor de ojos. Para los pacientes que notificaron picor de ojos, el 76% de los pacientes con QC, el 76% de los pacientes con DMP, el 35% de los familiares y el 35% de los sujetos control admitieron un frotamiento ocular frecuente y vigoroso en el ojo con QC.

30 La tabla 4 muestra los valores de K2 medio, K central, punto de grosor mínimo y elevación posterior para todos los grupos de estudio. K2 medio y K central fueron mayores en los ojos con QC frente a los otros grupos de estudio ($p<0,0001$). Asimismo, la elevación posterior fue mayor en los ojos con QC y DMP frente a los sujetos control y los familiares ($p<0,0001$). En cambio, el punto de grosor mínimo fue inferior para los ojos con QC y DMP en comparación con los otros grupos ($p<0,0001$).

Estudio descriptivo

Variable	Control	DMP	QC	Familiares	Valor de p
Edad (años)	30,5 ± 9,6	47,7 ± 8,9	33,3 ± 8,4	26,7 ± 9,9	<0,0001
Sexo (% hombres)	41,2	69,2	55,8	52,2	0,335
Historial de QC (%)	0	7,7	25,6	100	<0,0001
K central (dioptrías)	44,0 [42,7 - 45,3]	43,5 [41,1 - 45,5]	47,8 [44,2 - 51,7]	44,3 [43,7 - 45,0]	<0,0001
Punto de grosor mínimo (µm)	560,0 [536,0 - 582,5]	496,5 [410,8 - 544,0]	471,0 [400,0 - 509,0]	544,5 [512,5 - 573,0]	<0,0001
Elevación posterior (µm)	0,029 [0,021 - 0,038]	0,085 [0,049 - 0,107]	0,087 [0,056 - 0,117]	0,027 [0,019 - 0,037]	<0,0001
K2 (dioptrías)	44,4 [43,0 - 45,8]	45,5 [44,1 - 50,8]	48,6 [45,5 - 51,7]	44,5 [43,7 - 45,2]	<0,0001
TLR2 conjuntiva (UAF)	733 [560 - 946]	815 [669 - 1163]	1184 [943 - 1491]	1178 [655 - 1441]	<0,0001
TLR4 conjuntiva (UAF)	2380 [1781 - 3283]	4080 [3392 - 4610]	4230 [3496 - 5163]	3331 [2702 - 4000]	<0,0001
TLR2 córnea (UAF)	580 [413 - 976]	743 [639 - 1106]	1782 [1254 - 3119]	891 [575 - 1316]	<0,0001
TLR4 córnea (UAF)	1572 [949 - 2353]	2251 [1711 - 2982]	3812 [2774 - 5408]	1904 [1466 - 2522]	<0,0001

Tabla 4

Características clínicas de nivel basal y expresión en células conjuntivales y corneales de TLR en los grupos de estudio de la cohorte B. Se expresan los valores en mediana [cuartiles]. QC: queratocono; DMP: degeneración marginal pelúcida; TLR2: receptor de tipo Toll 2; TLR4: receptor de tipo Toll 4; UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia

Expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales y conjuntivales para la cohorte B

En la tabla 4, también se muestran los niveles de expresión de TLR2 y TLR4 en grupos con QC, DMP, familiares y control tanto en células corneales como conjuntivales. La expresión de TLR2 y TLR4 tanto en células corneales como conjuntivales fue mayor en los grupos con QC con respecto a los otros grupos. Además, el grupo con DMP también mostró expresión mayor de TLR2 en células corneales y de TLR4 tanto en células corneales como especialmente en células conjuntivales que en el grupo control (tabla 4). Resulta interesante que los familiares mostraron expresión mayor de TLR2 y TLR4 tanto en células corneales como conjuntivales que los sujetos control, pero esta expresión es mucho menor que en pacientes con QC (tabla 4). Sin embargo, se encontró la principal diferencia de expresión de TLR del grupo control con el grupo con QC para la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales. Por otra parte, se encontró la principal diferencia de expresión de TLR del grupo control con el grupo con DMP para la expresión de TLR4 en células conjuntivales. Por tanto, se centraron los análisis predictivos exclusivamente en la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales para QC, y TLR4 en células conjuntivales para DMP.

Valor predictivo de la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales para el riesgo de inicio y progresión a QC para la cohorte B

Según el análisis de ROC, la expresión de TLR2 en células epiteliales corneales puede predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC en comparación con los controles (área bajo la curva de 0,874, IC del 95%: 0,815-1,000; $p < 0,0001$). Asimismo, la expresión de TLR2 en células corneales también es útil para predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC en comparación con los familiares (área bajo la curva de 0,802, IC del 95%: 0,723-0,882; $p < 0,0001$). En resumen, la tabla 5 muestra la sensibilidad y especificidad para la utilidad de varios puntos de corte para la expresión de TLR2 en células corneales para detectar el riesgo de inicio y progresión de QC.

Por otra parte, según el análisis de ROC, la expresión de TLR4 en células epiteliales corneales puede predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC en comparación con los controles (área bajo la curva 0,877, IC del 95%: 0,818-0,936; $p < 0,0001$). Asimismo, la expresión de TLR4 en células corneales también es útil para predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de QC en comparación con los familiares (área bajo la curva 0,882, IC del 95%: 0,821-0,943; $p < 0,0001$).

Sujetos control frente a pacientes con QC

Expresión de TLR2 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 327 UAF	99%	86%
327 - 1269 UAF	75 - 98%	76 - 91%
> 1269 UAF	89%	92%

Familiares frente a pacientes con QC

Expresión de TLR2 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 521 UAF	95%	84%
521- 1352 UAF	71 - 94%	28 - 88%
> 1352 UAF	71%	91%

Tabla 5

Valores de sensibilidad y especificidad para la utilidad de la expresión de TLR2 en células corneales para detectar el riesgo de inicio de progresión de QC en la cohorte B.

La tabla 6 muestra la sensibilidad y la especificidad para la utilidad de varios puntos de corte para la expresión de TLR4 en células corneales para detectar el riesgo de inicio y progresión de QC.

En conclusión, la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales mostró un alto valor predictivo para detectar el riesgo de inicio y progresión de QC.

Sujetos control frente a pacientes con QC

Expresión de TLR4 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 1508 UAF	95%	53%
1508 - 4000 UAF	42 - 94%	52 - 96%
> 4000 UAF	41%	97%

Familiares frente a pacientes con QC

Expresión de TLR4 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 1697 UAF	95%	41%
1697 - 3794 UAF	51 - 99%	42 - 99%
> 3794 UAF	50%	100%

5 **Tabla 6**

Valores de sensibilidad y especificidad para la utilidad de la expresión de TLR4 en células corneales para detectar el riesgo de inicio o progresión de QC en la cohorte B.

10 Valor predictivo de la expresión de TLR4 en células conjuntivales para el riesgo de inicio y progresión a DMP para la cohorte B

15 Finalmente, según el análisis de ROC, la expresión de TLR4 en células epiteliales conjuntivales también puede predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de DMP en comparación con los sujetos control (área bajo la curva 0,823, IC del 95%: 0,733-0,913; $p < 0,0001$). La tabla 7 muestra la sensibilidad y especificidad para la utilidad de varios puntos de corte para la expresión de TLR4 en células conjuntivales para detectar el riesgo de inicio de progresión de QC.

20 En conclusión, la expresión de TLR4 en células conjuntivales también mostró alto valor predictivo para detectar el riesgo de inicio y progresión de DMP.

Sujetos control frente a pacientes con DMP

Expresión de TLR4 (UAF)	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 1543 UAF	100%	82%
1543 - 4500 UAF	31 - 99%	52 - 92%
> 4500 UAF	31%	93%

25 **Tabla 7**

Valores de sensibilidad y especificidad para la utilidad de la expresión de TLR4 en células conjuntivales para detectar el riesgo de inicio o progresión de DMP en la cohorte B.

30 Correlación entre la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales y parámetros clínicos de progresión de QC (K2, Kc y Kmax) para la cohorte B

35 Se analizaron los niveles de expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales de pacientes con QC con relación a tres parámetros cuantitativos relacionados con la progresión de queratocono, concretamente K2, Kc y Kmax y se realizó un análisis de regresión lineal más simple calculando correlaciones bivariantes con la prueba de Pearson. Se expresan los resultados como el coeficiente de correlación (r):

K2

40 TLR2; $r=0,286$; $p < 0,0001$

TLR4; $r=0,249$; $p < 0,0001$

Kc

45 TLR2; $r=0,266$; $p < 0,0001$

TLR4; $r=0,286$; $p < 0,0001$

Kmax

50 TLR2; $r=0,403$; $p < 0,0001$

55 TLR4; $r=0,263$; $p < 0,0001$

Estos resultados confirman una asociación entre la expresión de TLR2 y TLR4 en células corneales con la progresión y la gravedad de QC.

Correlación entre la expresión de TLR4 en células conjuntivales y parámetros clínicos de progresión de DMP (Kmax) para la cohorte B

5 Por otra parte, también se analizaron los niveles de expresión de TLR4 en células conjuntivales de pacientes con DMP con relación a Kmax, un parámetro relacionado con la progresión de DMP. Se realizó un análisis de regresión lineal más simple calculando correlaciones bivariantes con la prueba de Pearson. Se expresan los resultados como el coeficiente de correlación (r):

Kmax

10 TLR4; r=0,327; p<0,0001

15 En resumen, estos resultados también confirman una asociación entre la expresión de TLR4 en células conjuntivales con la progresión y la gravedad de DMP.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, que comprende:
- 5 a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y
- b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia
- 10 en el que, si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece una enfermedad ectásica de la córnea.
2. Método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad ectásica de la córnea se selecciona del grupo que consiste en:
- 15 a) queratocono subclínico, en cuyo caso el valor de referencia corresponde a los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 medidos en una muestra de un sujeto sano;
- b) queratocono clínico, en cuyo caso el valor de referencia corresponde a los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 medidos en una muestra de un sujeto que padece queratocono subclínico; y
- 20 c) degeneración marginal pelúcida, en cuyo caso el valor de referencia corresponde a los niveles de expresión de TLR2 y/o TLR4 medidos en una muestra de un sujeto sano.
3. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que también comprende determinar al menos un parámetro seleccionado de: dioptrías, grosor corneal y elevación corneal.
- 25 4. Método *in vitro* para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, que comprende:
- 30 a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y
- b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia
- 35 en el que, si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que el sujeto presenta un alto riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea.
5. Método *in vitro* según la reivindicación 4, en el que al sujeto se le ha diagnosticado previamente que tiene un defecto refractivo.
- 40 6. Método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en el que dicho sujeto ha desarrollado una patología ocular previa seleccionada de: picor ocular, frotamiento ocular, signos biomicroscópicos e hiperemia conjuntival.
7. Método *in vitro* para determinar el desenlace clínico de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea, que comprende:
- 45 a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y
- b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia
- 50 en el que si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de un desenlace clínico negativo.
8. Método *in vitro* para seleccionar un sujeto a tratar con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea que comprende:
- 55 a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y
- b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia
- 60 en el que si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto es candidato a tratarse con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea.
9. Método *in vitro* según la reivindicación 8, en el que dicha terapia se selecciona de reticulación corneal, anillos intracorneales y cirugía refractiva.
- 65

10. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 9, en el que dicha enfermedad ectásica de la córnea se selecciona de queratocono subclínico, queratocono clínico, degeneración marginal pelúcida, queratoglobo y ectasia tras cirugía corneal refractiva.
- 5 11. Uso de TLR2 y/o TLR4 como marcador para determinar el diagnóstico de una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, como marcador para determinar el desenlace clínico de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea o como marcador para seleccionar un sujeto a tratar con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea.
- 10 12. Uso de un kit que comprende un anticuerpo, un polipéptido, un cebador y/o una sonda que se une específicamente a TLR2 y/o TLR4 para determinar el diagnóstico de una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad ectásica de la córnea en un sujeto, para determinar el desenlace clínico de un sujeto que padece una enfermedad ectásica de la córnea o para seleccionar un sujeto a tratar con una terapia para una enfermedad ectásica de la córnea.
- 15 13. Método *in vitro* para determinar el riesgo de que un sujeto padezca ectasia tras cirugía refractiva, que comprende:
- 20 a) determinar el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 en una muestra de dicho sujeto; y
- b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia
- 25 en el que si el nivel de expresión de TLR2 y/o TLR4 es mayor que dicho valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto muestra alto riesgo de padecer ectasia tras cirugía refractiva.

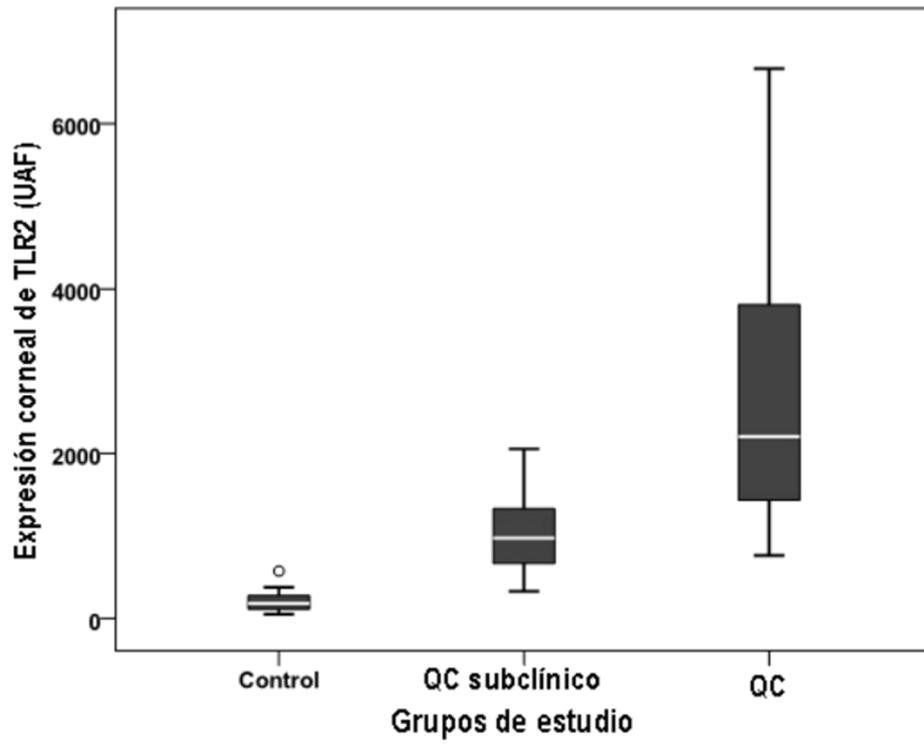


Figura 1

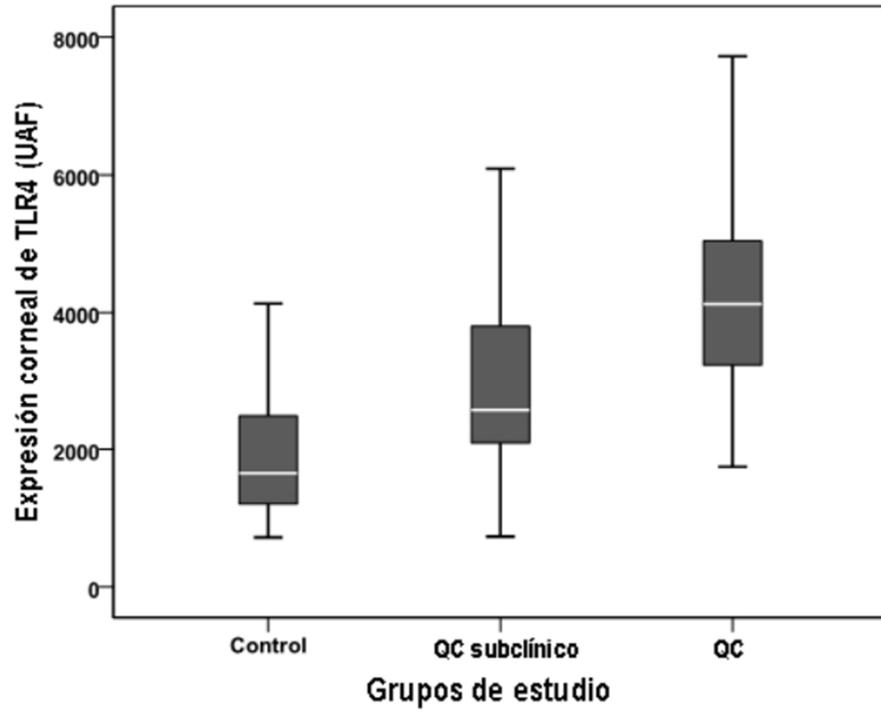


Figura 2

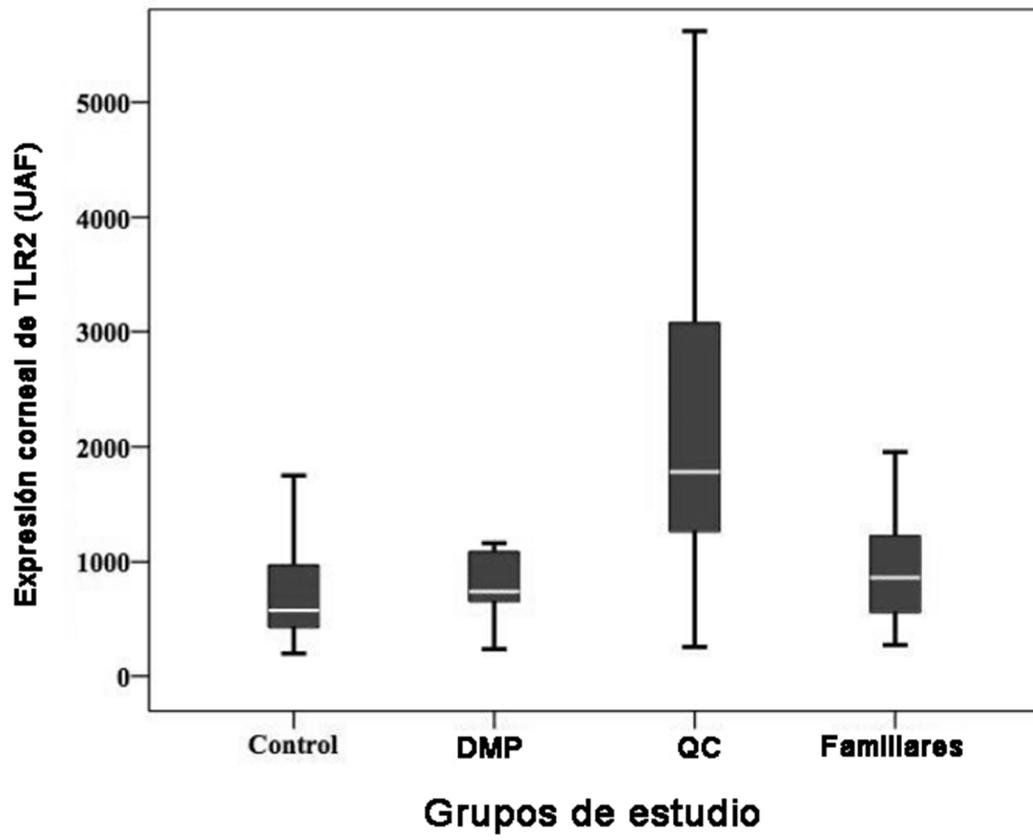


Figura 3

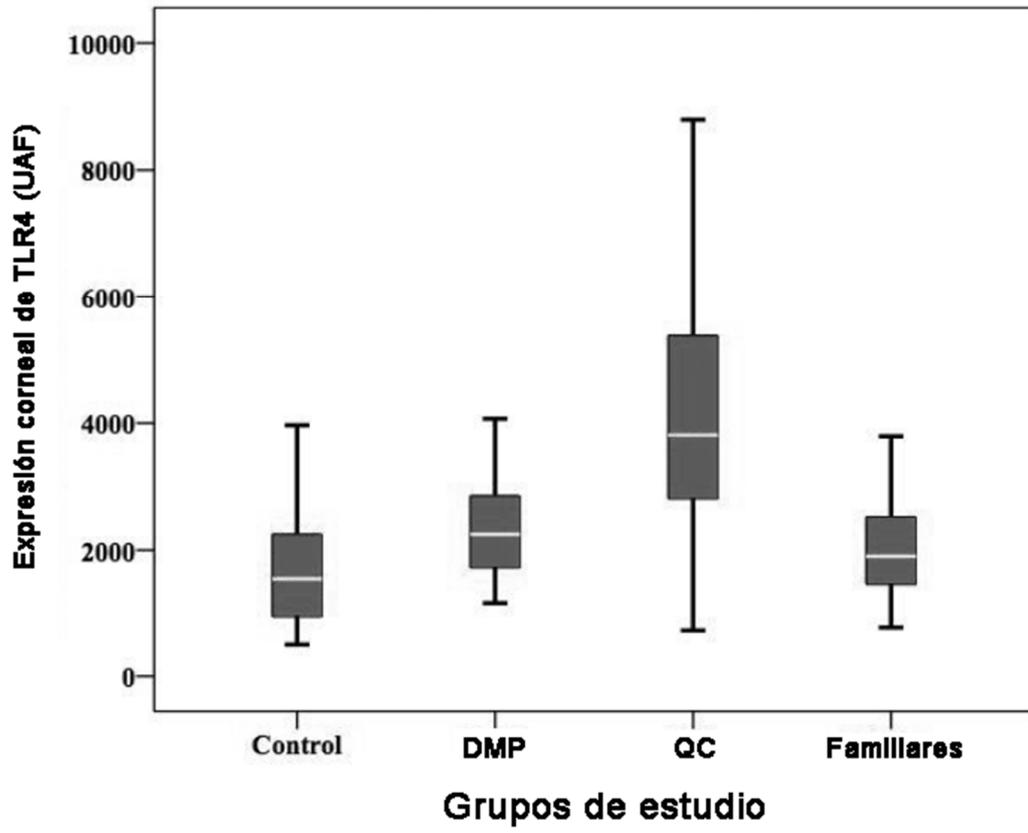


Figura 4

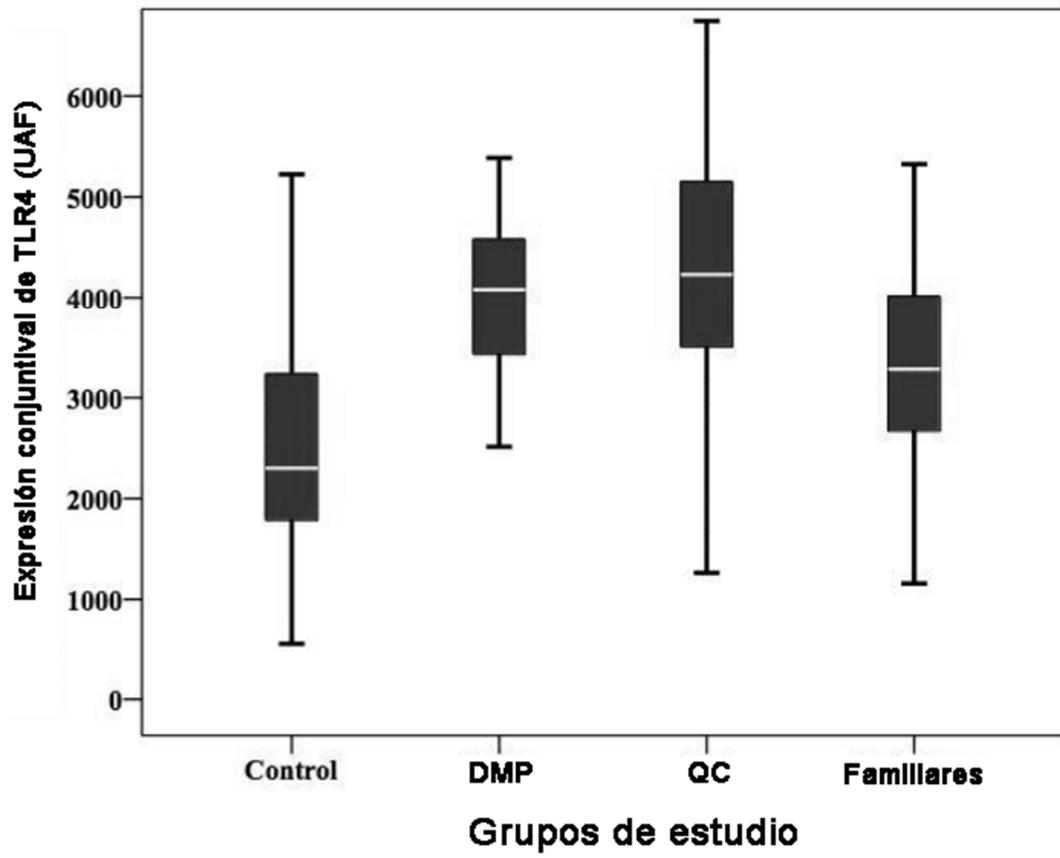


Figura 5