



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA
“FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA”

HALLAZGOS CLÍNICOS E INMUNOLÓGICOS
EN PACIENTES CON CONJUNTIVITIS
ALÉRGICA CRÓNICA

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el diplomado de especialidad en

OFTALMOLOGÍA

Presenta la

DRA. GRISELDA MARÍA AUXILIADORA IBÁÑEZ
VALDERRAMA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F.

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Enrique Graue Wiechers

Profesor Titular del Curso

Universidad Nacional Autónoma de México

Dra. Claudia E. Murillo Correa

Jefe del Departamento de Enseñanza

Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Ma. Carmen Jiménez Martínez

Unidad de Investigación

ASESOR

Dra. Concepción Santacruz Valdés

Médico Adscrito al Departamento de Córnea y Cirugía Refractiva
Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”, y estuvo dirigido por la Dra. Ma. Carmen Jiménez Martínez y la Dra. Concepción Santacruz Valdés.

El financiamiento de este trabajo fue por el proyecto CONACYT- SALUD 2005-14108.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo su apoyo en estos años

A mi directora de tesis por toda su ayuda incondicional

Dr. Gustavo Aguilar Velásquez.- Por el apoyo en la evaluación clínica inmunológica.

M en C. Marisela Linares Cañas.- Por el apoyo metodológico en el área de investigación.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
II. ANTECEDENTES	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
IV. TIPO DE ESTUDIO	26
V. OBJETIVOS	26
VI. CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSION, ELIMINACION.	26
VII. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS	27
VIII. RESULTADOS	30
IX. DISCUSIÓN	46
X. CONCLUSIONES	49
XI. BIBLIOGRAFÍA	50

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas del ojo son un conjunto de alteraciones inflamatorias que, en México, constituyen un problema de salud ya que generan una morbilidad significativa en todas sus formas clínicas. En Estados Unidos la prevalencia de las enfermedades alérgicas ha aumentado en los últimos años afectando entre el 15-25% de la población, reportándose que existen 22 millones de casos nuevos anuales de alergia y de estos el 32% manifiestan enfermedad ocular, especialmente niños y adultos jóvenes. En México no existen reportes claros sobre su incidencia o prevalencia pero López-López J reporta una frecuencia del 4% entre todas las enfermedades alérgicas,¹ mientras que Toribio E reporta que se encuentra asociada hasta en un 80% con otras enfermedades alérgicas². En nuestra institución, la conjuntivitis alérgica se encuentra dentro de las primeras 10 causas de consulta, impartándose casi 8000 consultas al año por esta entidad³. En su forma más leve, produce síntomas molestos pero que no amenazan a la visión, sus formas más graves, como son la queratoconjuntivitis vernal y atópica, pueden complicarse y provocar ceguera si afectan la córnea.

1.- Definición:

La conjuntiva se extiende desde el limbo al margen palpebral del ojo y se divide anatómicamente en tres porciones: la conjuntiva bulbar, que cubre la porción anterior de la esclerótica; la conjuntiva palpebral, que enmarca la superficie interna de los párpados; y el espacio unido por ambos, que se denomina fórnix o saco conjuntival. Histológicamente la conjuntiva se divide en dos áreas: epitelio plano estratificado no queratinizado, constituido por 2 a 5 capas celulares y la lámina propia, constituida de tejido conectivo laxo. (Figura 1)

La conjuntivitis alérgica es una es inflamación conjuntival bilateral, brusca e intensa, generalmente autolimitada, provocada por el contacto del alérgeno con la conjuntiva bulbar

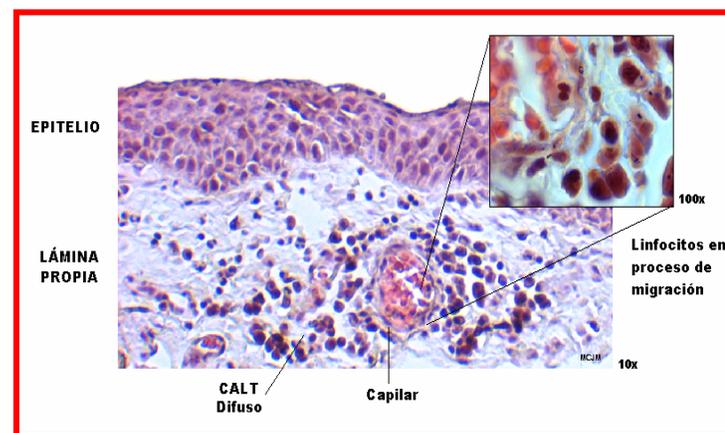


Figura 1. Conjuntiva bulbar humana. Corte histológico de conjuntiva bulbar humana (100x) en el que se observa el CALT difuso. Recuadro 1000x. Tinción con H y E .

y/o tarsal de un paciente sensibilizado, esta sensibilización se debe a una desregulación del sistema inmune y se manifiesta a través del CALT.⁴ (Figura 1)

Durante el proceso alérgico se liberan citocinas pro y anti-inflamatorias provenientes de células mononucleares que han migrado a la conjuntiva⁵. Lo que genera una gran cantidad de cambios en la superficie ocular. (Figura 2)

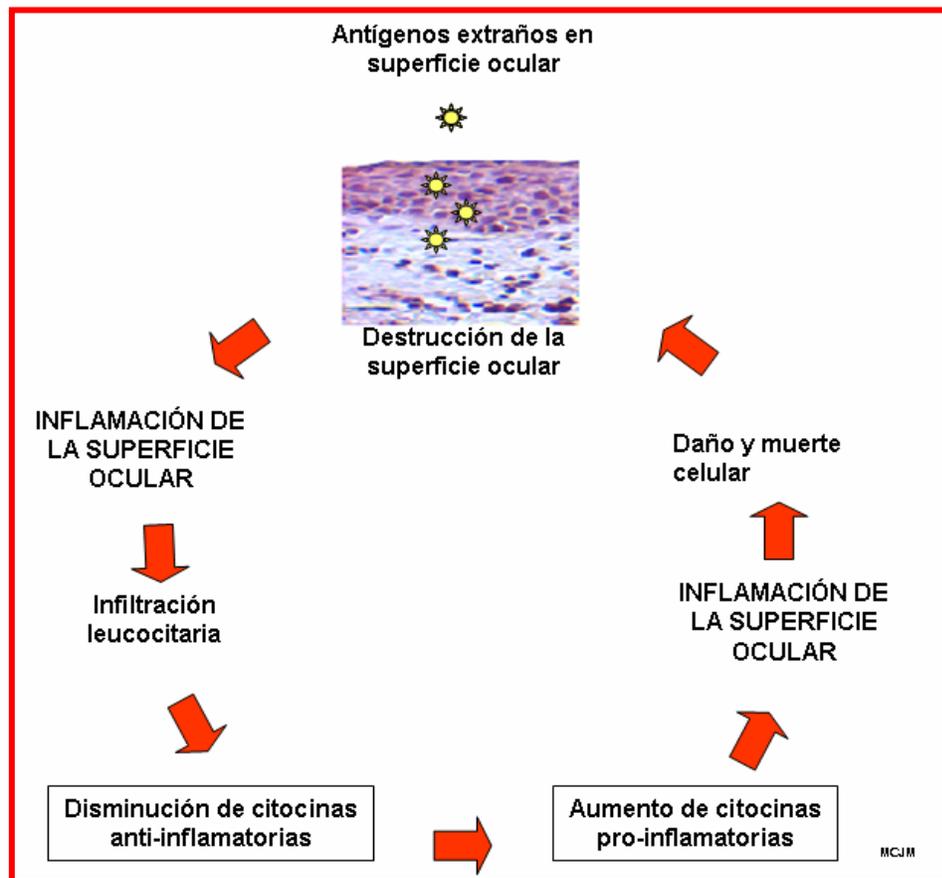


Figura 2. Fenómeno inflamatorio ocular. Se presentan los mecanismos involucrados en la perpetuación del daño en la superficie ocular.

2.- Manifestaciones Clínicas:

La inflamación de la superficie ocular genera una serie de signos y síntomas, de ellos el prurito se considera el más importante⁶, además, aparecen eritema conjuntival y ardor ocular, los cuales frecuentemente se acompañan de lagrimeo y fotofobia. En un principio estos síntomas tienden a ser ocasionales y reversibles pero a medida que se presentan cambios anatómicos en la superficie ocular por respuestas de reparación agresiva aparece fibrosis y vascularización⁷, con lo que los síntomas tienden a aumentar en frecuencia y aparición para finalmente hacerse irreversibles.

El eritema, el edema palpebral y/o conjuntival, el enrojecimiento y la fotofobia son más frecuentes en la fase aguda; mientras que en la fase tardía se observa que la hiperemia conjuntival se torna más aparente y aparece pseudoptosis; en algunos casos acúmulos celulares en la región límbica y en casos extremos ulceraciones corneales. En nuestra población se ha reportado que los síntomas más característicos son el prurito (97%), el lagrimeo (86.4%) y la fotofobia (54.2%); mientras que los signos más frecuentes son las papilas tarsales (100%) y la hiperemia conjuntival (82%)⁸. En la conjuntivitis se puede afectar también la piel y el tejido subcutáneo de los párpados pero es la conjuntiva la que se encuentra más afectada.

3.- Clasificación:

Las conjuntivitis alérgicas pueden ser clasificadas de acuerdo a su tiempo de evolución en agudas y crónicas. Son dos las formas agudas: la estacional, que se presenta durante algunas épocas del año y están relacionadas a eventos como polinización en primavera o verano; y la perenne, que se presenta durante todo el año. Dentro de las formas crónicas se describen la queratoconjuntivitis primaveral, la queratoconjuntivitis atópica y la conjuntivitis papilar gigante, a esta última no se le considera una auténtica reacción alérgica ocular ya que se ha asociado a daño mecánico, como en los usuarios de lentes de contacto, pero no se descarta que la presentación clínica pueda agravarse por una alergia concomitante⁹.

A) Conjuntivitis Alérgicas Agudas

Se clasifica dentro de éstas a la conjuntivitis alérgica estacional (SAC, por sus siglas en inglés, Seasonal Allergic Conjunctivitis) y la perenne (PAC, por sus siglas en inglés, Perennial Allergic Conjunctivitis), en ambas se identifica clínicamente una historia familiar de atopia, así como reacciones alérgicas desencadenadas por pólenes, pasto, ácaros o pelo de animales; estos pacientes pueden presentar además rinitis (rinoconjuntivitis), asma o ambos. La SAC representa el 90 % de todos los tipos de conjuntivitis alérgicas, mientras que la PAC representa el 5 % de los casos; afectan a ambos sexos y a todas las edades, clínicamente presentan hiperemia conjuntival, quemosis, prurito, moco, edema palpebral y papilas de menor tamaño.

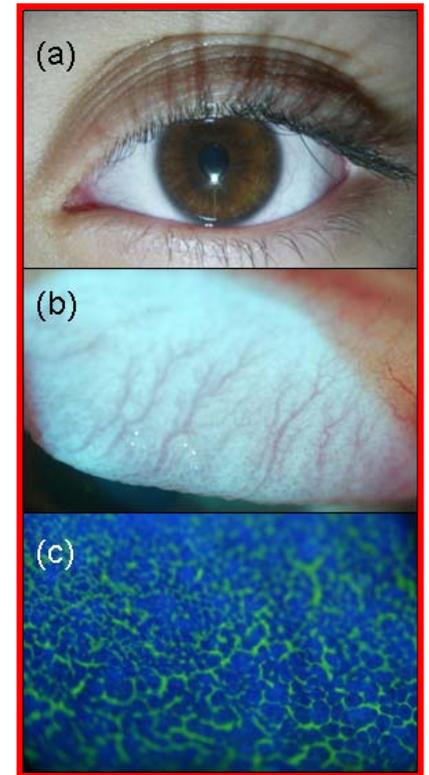


Figura 3. Conjuntivitis alérgica perenne. Paciente con reacción papilar leve. a) Vista de frente, ligera hiperemia conjuntival; b) Reacción palpebral; c) Tinción con fluoresceína y luz azul de cobalto que evidencia las papilas tarsales.

Los signos y síntomas son estacionales en la SAC y durante todo el año en la PAC. El mecanismo de daño inmunológico en la SAC se encuentra mediado exclusivamente por células cebadas residentes, mientras que en la PAC intervienen además los eosinófilos sensibilizados⁹.

B) Conjuntivitis Alérgicas Crónicas

Clínicamente se dividen en:

- a) Queratoconjuntivitis primaveral (VKC, por sus siglas en inglés, Vernal Keratoconjunctivitis).
- b) Queratoconjuntivitis atópica (AKC, por sus siglas en inglés, Atopic Keratoconjunctivitis).
- c) Conjuntivitis papilar gigante (GPC, por sus siglas en inglés, Giant Papillary Conjunctivitis).

El mecanismo de daño inmunológico en el caso de la VKC y la AKC es por medio de una reacción de hipersensibilidad tipo I (ver inmunofisiopatología). En el caso de la GPC, el mecanismo de daño es primordialmente mecánico, favorecido por una inflamación persistente mantenida por una hipersensibilidad de tipo IV, mediada por linfocitos Th1, por eso algunos autores no la consideran como una conjuntivitis alérgica clásica.¹⁰

- a) La queratoconjuntivitis primaveral (VKC) representa aproximadamente el 3% de todas las conjuntivitis, se presenta con mayor frecuencia entre la infancia y la pubertad, afectando más a los hombres en climas cálidos y se manifiesta durante todo el año con exacerbaciones estacionales. Se puede clasificar de acuerdo a la localización de la lesión ocular en palpebral, límbica y mixta. (Figura 4).

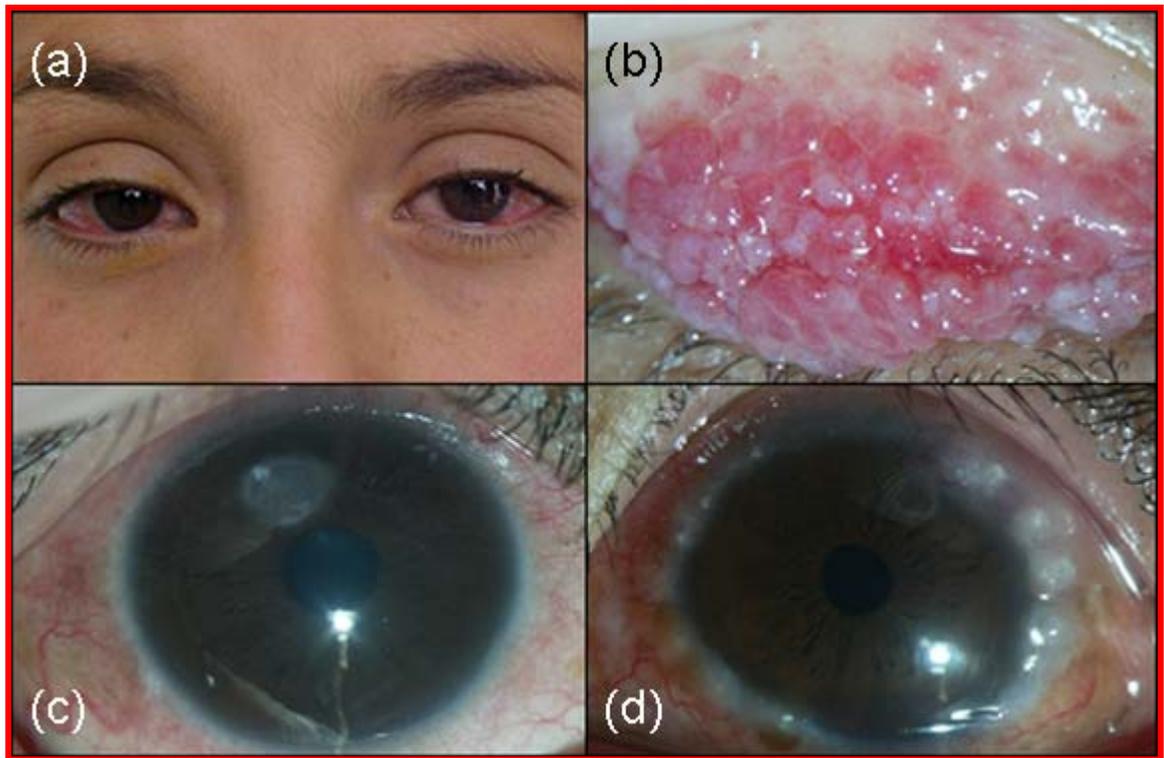


Figura 4. Queratoconjuntivitis primaveral. a) Pseudoptosis e hiperemia conjuntival importante; b) Forma palpebral; c) Úlcera corneal en escudo; d) Puntos de Horner-Trantas en la forma limbal.

- La conjuntivitis palpebral se distingue por quemosis, hiperemia conjuntival e hipertrofia papilar difusa, predominantemente localizada en el tarso superior. Las papilas pueden tener un tamaño mayor de 0.3 mm y considerarse papilas gigantes, son de forma poliédrica y en algunos casos se encuentran sobreelevadas del plano conjuntival erosionando la córnea. Además, puede haber un acumulo de moco denso con fibrina entre las papilas, lo que se conoce como signo de Maxwell-Lyons y es común observar un aspecto empedrado de las mismas lo que puede ocasionar blefaroespasma o pseudoptosis por tallado intenso. (Figura 4).

- La conjuntivitis límbica se caracteriza por afectar el limbo con lesiones nodulares, pequeñas y sobreelevadas que pueden coalescer, su aspecto es gelatinoso y brillante, rodeando los 360° del limbo o bien, pueden ser nódulos aislados de aspecto amarillento. Histológicamente se observa un infiltrado inflamatorio con predominio de eosinófilos, en el ápice de la papila se pueden observar unos puntos blanquecinos conocidos como puntos de “Horner-Trantas” que son resultado del acumulo eosinofílico. (Figura 4).

- La conjuntivitis mixta es considerada una combinación de las entidades mencionadas previamente, por lo que se puede afectar tanto la porción palpebral de la conjuntiva, como la porción límbica y tener repercusiones visuales por daño en la superficie corneal.

Existen dos complicaciones frecuentes en la VKC que pueden comprometer la visión al afectar la córnea: a) las úlceras en escudo y b) el queratocono. En el caso de las úlceras, éstas se presentan con mayor frecuencia en el cuadrante temporal superior, son ovales y tienen un nicho de aspecto blanquecino por acumulo de neutrófilos y eosinófilos. El queratocono es una ectasia corneal que se acompaña de un adelgazamiento importante de la córnea, su origen también puede ser genético, pero se le ha relacionado con cifras de IgE elevadas en lágrima de pacientes con conjuntivitis alérgica, el rascado es un factor importante en el desarrollo del queratocono, detectándose entre el 66%-73% de los pacientes con conjuntivitis alérgica y en un 54% de pacientes con antecedentes de alergia.¹¹ (Figura 5).



Figura 5. Paciente con queratocono. Vista lateral que muestra la protrusión corneal.

b) Queratoconjuntivitis atópica. La AKC se presenta con mayor frecuencia en hombres entre los 30 a los 50 años de edad, con historia familiar de asma, urticaria y/o fiebre del heno, puede observarse durante todo el año y representa casi el 2% de las conjuntivitis alérgicas. Típicamente los pacientes tienen dermatitis atópica o eczema desde la infancia y el desarrollo de los síntomas oculares aparece en la cuarta década de la vida. El síntoma primario es comezón intensa y bilateral de la piel de los párpados, área periorbitaria y conjuntiva; se pueden observar fisuras en el canto lateral debido a tallado importante, acompañado de un aspecto indurado de la piel; puede existir blefaritis atópica con tilosis y edema de párpados, que conduce a disfunción de las glándulas de Meibomio con ojo seco concomitante. En las formas severas se observan úlceras con “derretimiento” corneal, queratitis, cataratas polares anteriores y glaucoma. A nivel del tarso puede observarse una cicatriz severa con vascularización y tejido fibroso en la lámina propia, signo conocido como “Línea de Dennie”, en estos pacientes puede haber desarrollo queratocono. (Figura 6)

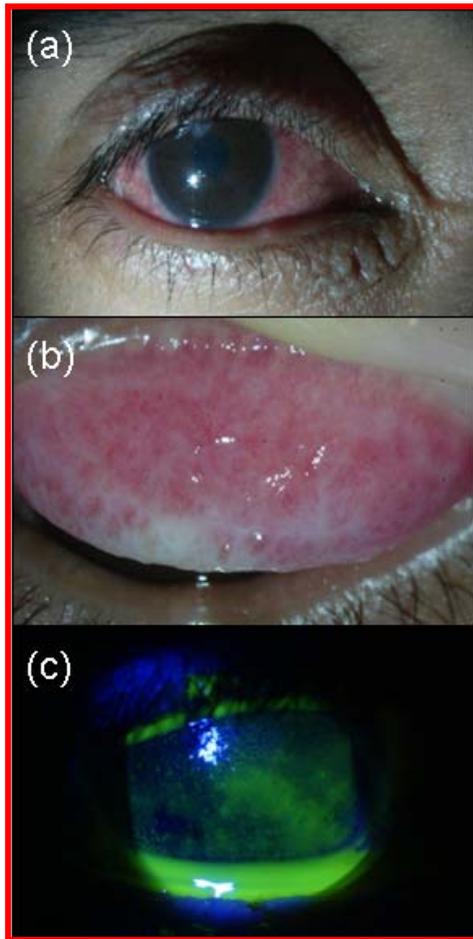


Figura 6. Queratoconjuntivitis atópica. a) Aspecto indurado de la piel e hiperemia conjuntival; b) Línea de Dennie en conjuntiva del tarso superior; c) Alteraciones de la película lagrimal en el área interpalpebral por acúmulo de moco y erosión epitelial.

c) Conjuntivitis Papilar Gigante (GPC), esta tiene una etiología compleja, se le relaciona con la presencia de cuerpos extraños como lentes de contacto, prótesis o suturas, el daño puede verse favorecido por la fricción del parpadeo, el cual se realiza de manera normal aproximadamente entre 16,000-19,000 veces al día, si a esto le sumamos alguna alergia concomitante, el cuadro se puede agravar notoriamente. Clínicamente hay síntomas variables de intolerancia al lente con sensación de cuerpo extraño, se observa inyección conjuntival, secreción mucoide y el tamaño de las papilas esta aumentado y puede variar de 0.3 a 0.75 mm. (Figura 7) Este tipo de conjuntivitis se puede desarrollar después de 10 meses del uso de lente de contacto, estimándose que entre el 1 y 3% de los usuarios de lentes de contacto van a desarrollar esta patología, la GPC representa casi el 1% de todas las conjuntivitis alérgicas.



Figura 7. Conjuntivitis papilar gigante. Se observa el aspecto de las papilas con coloración blanquecina

4.- Inmunofisiopatología.

En la actualidad existe un debate abierto sobre la fisiopatología de las conjuntivitis alérgicas, a pesar de esto, es reconocido que las enfermedades alérgicas oculares se encuentran caracterizadas por un patrón de inflamación mediado por IgE,¹² pero al parecer las diferentes formas de presentación clínica parecen depender de varios factores, entre los que intervienen: la cantidad de Ag, la estructura antigénica, la cronicidad del estímulo, las características particulares de cada individuo al montar la respuesta inmunitaria (inmunogenética) y probablemente de otras situaciones que aún no se han logrado esclarecer. No obstante, en la inmunofisiopatología de las conjuntivitis alérgicas se reconocen claramente dos fases: sensibilización y efectora⁶.

A) FASE DE SENSIBILIZACION

Es la fase menos comprendida y estudiada de las conjuntivitis alérgicas, el modelo actual plantea un primer contacto del antígeno con el CALT, el cual por sus características estructurales, tiene la capacidad de inducir una respuesta Th2. El alérgeno atraviesa el epitelio conjuntival, donde es capturado por una célula presentadora de antígeno (CPA) residente. La CPA puede presentar el antígeno a linfocitos T CD4+ del CALT, en el ojo o migrar a ganglios linfáticos de relevo, en donde lo presentará a un linfocito TCD4+ el cual se diferenciará dependiendo del tipo de células presentadoras de antígeno y de la afinidad por el receptor de T.

Las células dendríticas que no expresan CD8 α preferentemente generan respuestas Th2 cuando el paciente está predispuesto genéticamente, si el antígeno se encuentra en bajas concentraciones o si tiene baja afinidad para el receptor T entonces se genera la diferenciación a células Th2 las cuales producen IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. El planteamiento clásico propone que la IL-4 inhibe la respuesta Th1 y junto con la IL-13 desvía la producción de las células plasmáticas hacia la producción de IgE¹³; la IL-5 promueve la generación de eosinófilos a partir de médula ósea y mientras que la IL-9 induce la generación de células cebadas o mastocitos, ambas citocinas inducen también la activación de estas células, observándose un incremento de receptores para IgE en su superficie y mayor actividad celular¹⁴. Cuando una de estas células tiene sus receptores de IgE ocupados por estos anticuerpos se les conoce como “células sensibilizadas”, es necesario contar con un gran número de células sensibilizadas cerca de la barrera epitelial, para que un segundo encuentro con el alérgeno, genere la degranulación de éstas y liberen su contenido; por otra parte, para el mantenimiento de la respuesta alérgica a nivel local es necesario la infiltración constante de linfocitos T CD4 alérgeno-específicos (Figura 8) lo que dará pie a la fase efectora¹⁵.

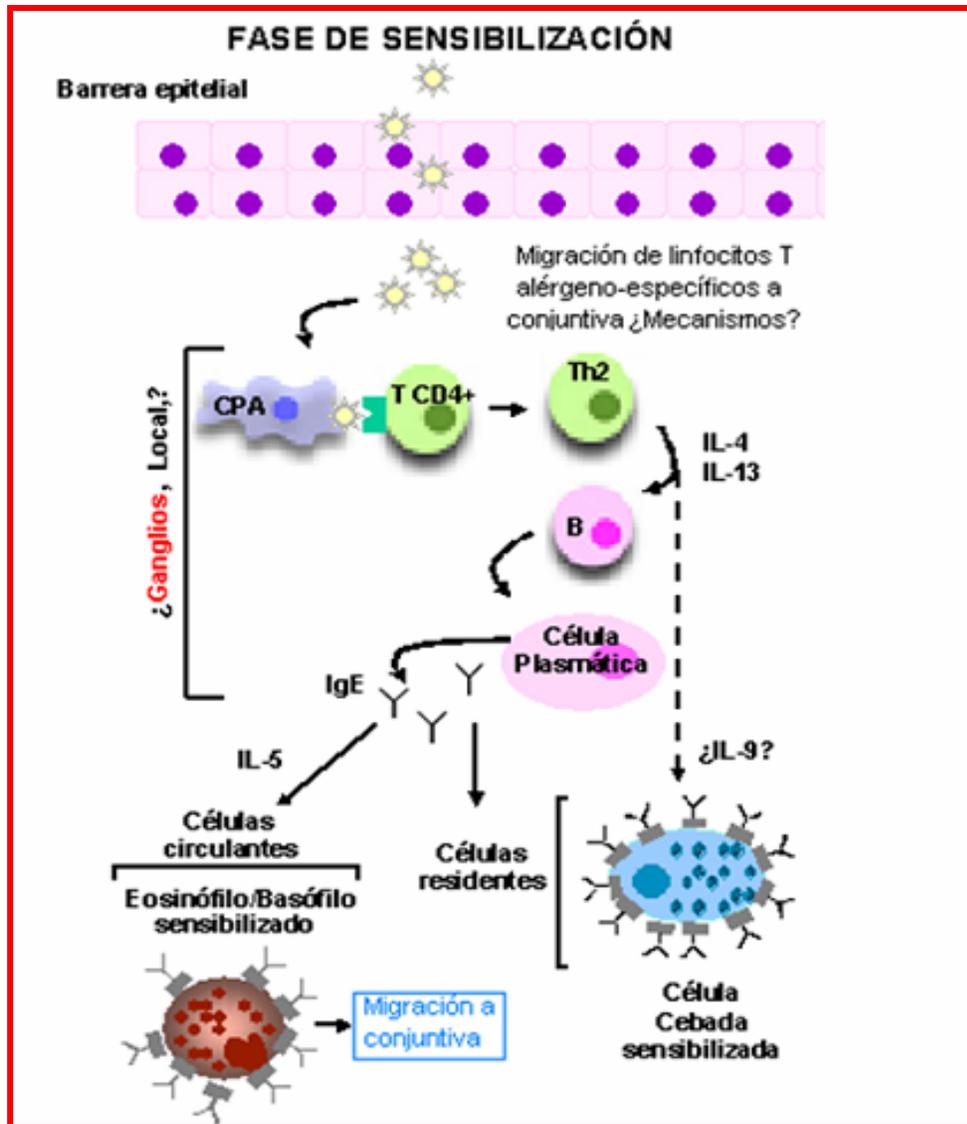


Figura 8. Inmunofisiopatología de las conjuntivitis alérgicas. Secuencia hipotética de eventos durante la fase de sensibilización.

B) FASE EFECTORA

Se presenta cuando aparece un segundo contacto con el antígeno ofensor, generando una serie de eventos que despiertan una respuesta inflamatoria. Ésta a su vez la podemos dividir en una etapa aguda y una crónica. En la primera, las células efectoras son aquellas que fueron sensibilizadas directamente por el alérgeno, es decir, células residentes como mastocitos o células que han migrado desde la periferia, como eosinófilos y/o basófilos, en las cuales el reconocimiento del alérgeno, dado por la IgE genera la degranulación de éstos con la liberación de mediadores pro inflamatorios. Si esta condición persiste, el microambiente conduce a la fase crónica, en la cual se activan más células inflamatorias y células residentes como las del epitelio, que contribuyen con mayor producción de quimiocinas (RANTES, EOTAXINA, MCP, MIP-1 e IL-8), aumentando el reclutamiento leucocitario, sobre todo de eosinófilos, fibroblastos y macrófagos conjuntivales, lo que desemboca en un daño estructural de la conjuntiva¹⁶ (Figura 9).

En la fase aguda se observa:

- a) Reorganización del citoesqueleto de la célula cebada, permitiendo que las vacuolas donde se encontraban almacenados los mediadores preformados se fusionen a la membrana plasmática y liberen su contenido al tejido circundante¹⁵.
- b) Activación de las vías relacionadas con la generación de mediadores lipídicos por activación de la lipooxigenasa con la producción de leucotrienos y sus consecuentes efectos biológicos.
- c) Liberación de citocinas, que favorecen un microambiente pro-inflamatorio. Manteniendo la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas productoras de IgE¹⁶.

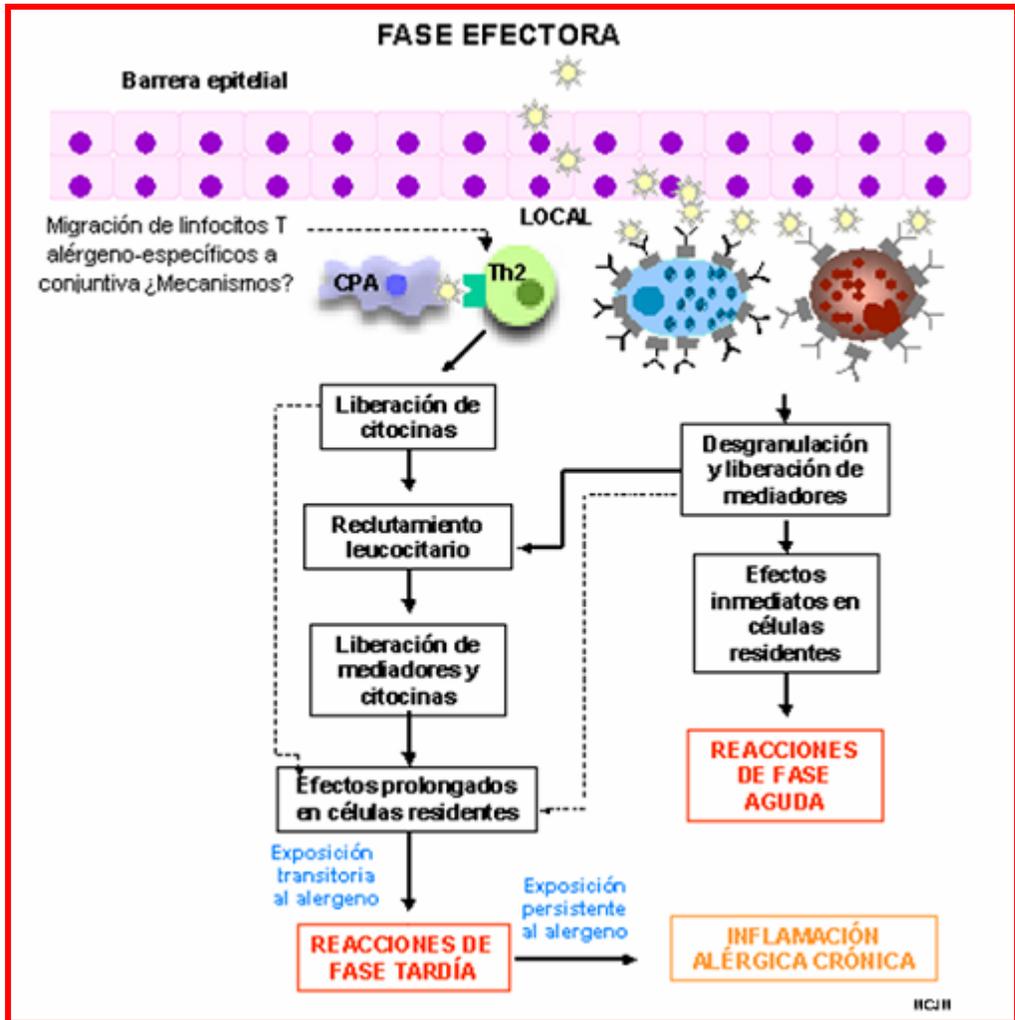


Figura 9. Immunofisiopatología de las conjuntivitis alérgicas. Secuencia hipotética de eventos durante la fase efectora.

La activación de los eosinófilos es relevante en la inmunofisiopatología de la conjuntivitis alérgica, ya que además de inducir la liberación de muchos de los mediadores preformados y de novo iniciales, liberan otras proteínas que resultan tóxicas para el epitelio conjuntival y corneal, como la proteína básica mayor, la proteína catiónica eosinofílica, la peroxidasa eosinofílica, entre otras; además de que en sus gránulos se han detectado citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y TGF- β , que serán responsables de sintetizar colágeno y activar a los fibroblastos que serán responsables de las manifestaciones tardías de la enfermedad favoreciendo el proceso de neo-vascularización (Figura 10). Todos estos factores solubles liberados explican porqué los eosinófilos predominan en las enfermedades alérgicas conjuntivales crónicas y están ausentes en otros procesos inflamatorios oculares.

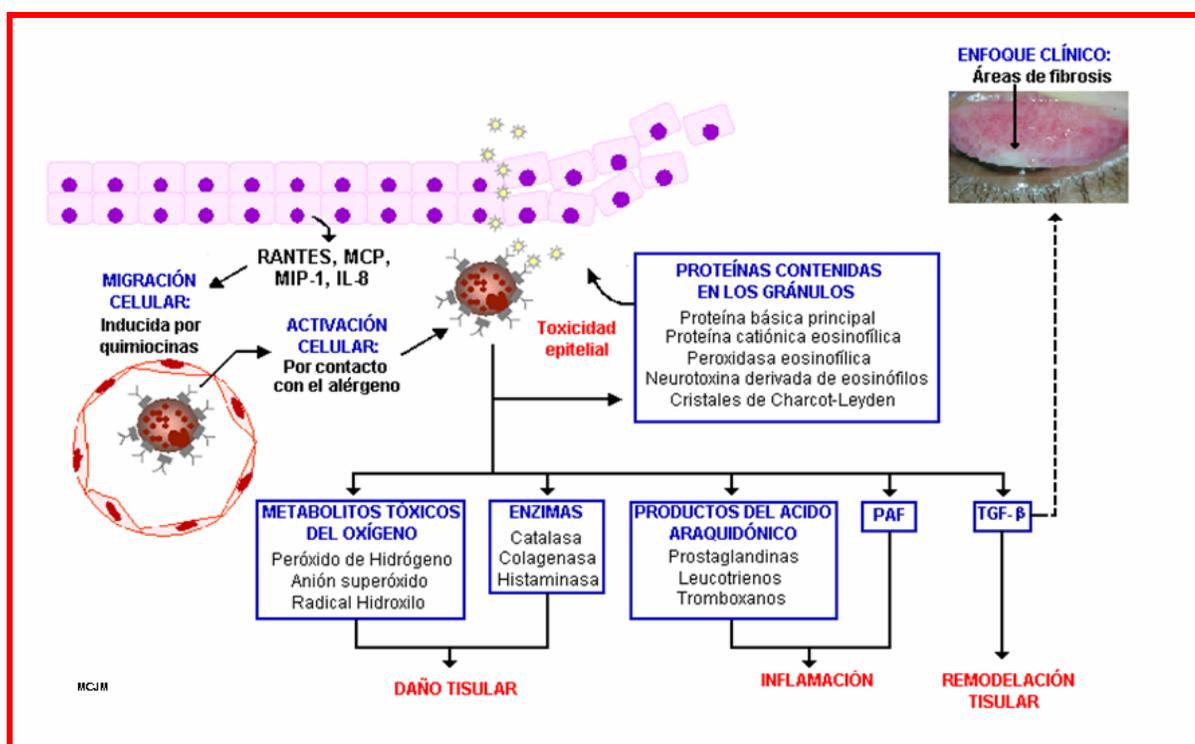


Figura 10. Papel biológico del eosinófilo en las conjuntivitis alérgicas y su repercusión clínica. Secuencia hipotética de eventos durante la activación del eosinófilo en conjuntiva.

Así, el reclutamiento celular mantenido por linfocitos T CD4 Th2, va amplificando el proceso inflamatorio, de tal suerte que si continúa la persistencia del alérgeno o existen exposiciones repetidas al mismo, el fenómeno va generando más daño tisular y favorece procesos continuos de reparación y remodelación tisular que inducen fibrosis y vascularización del tejido. Todos estos factores solubles liberados explican el papel tan importante que juegan estas células en las enfermedades alérgicas conjuntivales. En la tabla 1 se resumen las características clínicas y los mecanismos de daño propuestos para los diferentes tipos de conjuntivitis alérgicas.

Sin embargo es importante señalar que:

- a) No se han determinado las características fenotípicas y funcionales de las poblaciones de células T involucradas en conjuntivitis alérgica.

- b) No se conocen las manifestaciones clínicas asociadas a los cambios inmunológicos en los que participa CD30.

Tabla 1. Clasificación clínica e inmunofisiopatológica de las conjuntivitis alérgicas

TIPO	EPIDEMIOLOGÍA	CUADRO CLÍNICO	DATOS HISTOLÓGICOS	MECANISMO DE DAÑO INMUNOLÓGICO
AGUDAS				
Estacional (SAC)	Corresponde al 90 % de todas las conjuntivitis. Afecta hombres y mujeres de todas las edades y aparece con los cambios estacionales.	Hiperemia, quemosis, comezón, descarga de moco y edema palpebral. Hay reacción papilar < 0.4mm	No hay cambios celulares	Hipersensibilidad de Tipo I, mediada por IgE y células cebadas sensibilizadas
Perenne o panestacional (PAC)	Se presenta durante todo el año pero puede tener exacerbaciones, representa el 5 % de los casos con conjuntivitis alérgica	Hiperemia, quemosis, comezón y edema palpebral.	Infiltración de eosinófilos en lámina propia	Hipersensibilidad de Tipo I, mediada por IgE, células cebadas y eosinófilos sensibilizados
CRÓNICAS				
Primaveral (VKC)	Puede ocurrir durante todo el año con exacerbaciones estacionales, preferentemente afecta a hombres previo a la pubertad. Representa casi el 3% de las conjuntivitis alérgicas	Hiperemia conjuntival, se pueden presentar queratitis y úlceras corneales en escudo, puntos de Horner – Trantas (limbal), S. de Maxwell-Lyons (palpebral), papilas grandes > 0.4 mm, pseudoptosis y blefaroespasmio. Pueden desarrollar queratocono.	Céls. cebadas y eosinófilos en epitelio. Eosinófilos y basófilos en lámina propia de la conjuntiva, incluso linfocitos.	Hipersensibilidad de Tipo I, mediada por IgE, células cebadas y eosinófilos sensibilizados Infiltración de linfocitos T CD4 Th2 en lámina propia
Atópica (AKC)	Frecuentemente asociada con dermatitis atópica y eczema. Se presenta predominantemente en hombres de 30 años. Se puede presentar en todo el año. Representa casi el 2% de las conjuntivitis alérgicas	Hiperemia conjuntival, comezón, edema y lagrimeo. Fisuras en el canto lateral debido a tallado extremo. De manera severa puede presentar úlceras, lisis, queratitis y cataratas polares anteriores. Puede producir cicatriz severa, vascularización, Línea de Dennie (palpebral), queratocono, existe hipertrofia papilar.	Infiltración linfocitaria y eosinófilos en lámina propia, cambios en las células calciformes	Hipersensibilidad de Tipo I, mediada por IgE, células cebadas y eosinófilos sensibilizados Infiltración de linfocitos T CD4 Th2 en lámina propia
Conjuntivitis Papilar Gigante (GPC)	Puede afectar a pacientes con historia o no de atopia, desarrollándose después de 10 meses del uso de lente de contacto. Se estima que hay entre 1-3% de pacientes usuarios de lentes de contacto (blando o permeables al gas) que son afectados.	Presencia de moco e intolerancia a lente de contacto, en las formas moderadas a severas puede existir inyección conjuntival presente con cicatrización a nivel del tarso. Las papilas pueden ser de 0.3 a 0.75 mm o de mayor tamaño.	Presencia de linfocitos y células cebadas	Hipersensibilidad de Tipo IV, mediada por linfocitos Th1 IgG e IgM y activación de complemento En casos de alergia concomitante, daño por IgE y activación de células sensibilizadas

II. ANTECEDENTES.

En este momento el modelo fisiopatológico de la alergia ocular no responde totalmente a la evolución clínica de la misma, por lo que la búsqueda de los mecanismos que expliquen el daño observado clínicamente continúa, específicamente la mayoría de los estudios se han enfocado a las vías de activación celular y a las consecuencias biológicas que generan. Sin embargo en los últimos años ha cobrado relevancia la asociación entre CD30 y alergia¹⁷.

El CD30 fue originalmente descrito en las células de Reed-Sternberg de la enfermedad de Hodgkin y fue relacionado a la actividad de la enfermedad, es conocido también como Ki-1 y es una proteína que pertenece a la familia de los receptores de TNF como CD40, Fas y CD27; posteriormente se le identificó en linfocitos B y T activados, y por último, se describió su expresión en linfocitos NK y monocitos¹⁸. Se le ha relacionado con la respuesta Th2,¹⁹ y se le considera una molécula de activación bimodal ya que puede generar efectos de proliferación o inducir apoptosis, dependiendo del microambiente celular en el que se exprese, de tal manera que cuando CD30 se expresa en células madre embrionarias transformadas anormales o durante la rinitis alérgica, las células CD30+ están en proliferación activa^{20,17}. Por otra parte, se ha observado que los linfocitos TCD4+ de sangre periférica de pacientes asmáticos, expresan CD30 después de una estimulación antigénica²¹. Aunque se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales se expresa CD30, algunos autores sugieren que la IL-4, además de aumentar los niveles de IgE en pacientes alérgicos de vías respiratorias y dermatitis atópica, también promueve su expresión²². Este concepto se refuerza por el hecho de que la exacerbación del cuadro alérgico en los pacientes asmáticos que se desarrolla después de una infección por virus sincicial respiratorio es producto del aumento en la producción de IL-4 liberada por linfocitos TCD8+ CD30+²³ por lo que se ha sugerido que el CD30 podría ser una señal coestimuladora expresada en linfocitos con función Th2.^{24, 25}

Garfias et.al. demuestran que las subpoblaciones CD4+ CD30+ son grandes productoras de IL-5²⁶, citocina involucrada en el mantenimiento del status alérgico; no obstante, en modelos murinos de conjuntivitis alérgica, se ha demostrado que la cronicidad es mantenida por linfocitos T productores de INF- γ que han migrado al sitio de lesión²⁷.

En los últimos años, se ha sostenido que los linfocitos en migración son células efectoras diferenciadas que tienen la capacidad de producir citocinas, en este sentido los linfocitos T que

expresan marcadores de células NK como CD57 han sido propuestos como células terminalmente diferenciadas ya que no expresan en su superficie CCR7 y se encuentran expandidas en estados de inflamación crónica.

El CD57 es un polisacárido sulfatado que actúa como una molécula de adhesión en algunas poblaciones celulares, es uno de los ligandos propuestos para la P y L selectina, para IL-6 y para proteoglicanos del sistema nervioso. Jiménez et al. Sugieren que la interacción de CD57 como P-selectina expresada en células endoteliales activadas, conjuntamente con IL-6, como resultado de la inflamación crónica, favorece la adhesión selectiva de ciertas poblaciones especializadas de linfocitos T, llevando la respuesta inmune al área de lesión tisular, ya que estas células tienen la capacidad de producir IL-4 e IFN-gamma.

En relación con lo anterior, se han reportado gran cantidad de linfocitos T CD57+, en entidades de origen alérgico inflamatorio, como la alveolitis alérgica y se han demostrado que las células CD57+ disminuyen después del tratamiento con corticoides en pacientes en actividad asmática, todo lo anterior nos hace pensar que las subpoblaciones CD57+ tiene una participación en el mantenimiento de la actividad inflamatoria. Apoyando esta propuesta, Brinkmann et al, sugieren que la expresión de Cd57 en linfocitos T CD4+ humanos, podría asociarse a estadios de diferenciación de células Th2, ya que los linfocitos CD4+CD57+ son grandes productores de IL-4, proponiendo que podrían ser críticas para el desarrollo de las respuestas Th2/IgE *in vivo*.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No se han determinado las características fenotípicas y funcionales de las poblaciones de células T involucradas en conjuntivitis alérgica, ni tampoco se conocen las manifestaciones clínicas asociadas a los cambios inmunológicos en los que participa CD30.

IV. TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo y observacional.

V. OBJETIVO

General

Describir las características fenotípicas y funcionales de los linfocitos T CD30; así como las características clínicas de pacientes con conjuntivitis alérgica crónica.

Particulares

1. Determinar la frecuencia de los linfocitos T CD30+ en pacientes con conjuntivitis alérgica crónica en condiciones basales, posterior al estímulo alérgico o al estímulo policlonal.
2. Determinar las características clínicas de los pacientes con conjuntivitis alérgica.

VI. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

INCLUSION

1. Aquellos pacientes con diagnóstico de conjuntivitis alérgica crónica activa, sin enfermedad alérgica activa asociada en el momento de la toma de muestra y sin tratamiento inmunológico u oftalmológico convencional al inicio del estudio.

EXCLUSION

1. Pacientes con diagnóstico de conjuntivitis alérgica crónica y otras enfermedades de origen inmunológico asociadas.

ELIMINACIÓN.

1. Pacientes que no tuvieron el expediente completo, que no acudieron a la documentación fotográfica ni a la toma de muestra sanguínea.

VII. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS.

a) Pacientes.

Se incluyeron en este trabajo 12 pacientes con diagnóstico clínico de queratoconjuntivitis primaveral. A todos los pacientes que participaron en este estudio se les realizaron pruebas rutinarias para determinación de hipersensibilidad tipo I que incluyeron, biometría hemática, citología de moco nasal, radiografía de senos paranasales, determinación de IgE total, coproparasitoscópico (CPS) en serie de tres y pruebas cutáneas positivas. Los pacientes con CPS positivo fueron eliminados de este estudio asignándoles tratamiento correspondiente.

Este trabajo siguió los estatutos de la Declaración de Helsinki, siendo aprobado por los Comités de Investigación y Ética del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” (CC-011-2005). Todos los pacientes que participaron en este estudio dieron su consentimiento informado para la realización de las pruebas inmunológicas.

b) Material.

El medio de cultivo RPMI-1640, saponina, las sales utilizadas en la preparación de los amortiguadores y la Concanavalin- α (Con- α) fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA) Los anticuerpos monoclonales contra los marcadores de superficie CD30 – FITC, -PE, fueron obtenidos de BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Los anticuerpos monoclonales conjugados a FITC contra el antígeno nuclear Ki-67 fueron obtenidos de DAKO (Copenhagen, Denmark). El Lymphoprep (Ficoll con densidad de 1.077) fue obtenido de Nycomed Pharma As. (Nyegaard, Oslo, Norway). El suero fetal bovino fue obtenido de HyClone Labs. (Logan, TU, USA).. Los anticuerpos anti- CD4 y CD8 conjugados a PerCy5 fueron obtenidos de e-biosciences (San Diego, CA, USA). El piruvato de sodio, L-glutamina, 2-mercaptoetanol fueron de Gibco BRL. (Rockville, MD, USA). Las placas para cultivo de 24 pozos fueron obtenidas de Nalgene Nunc International, (Denmark).

c) Métodos.

A todos los pacientes se les realizó una exploración oftalmológica completa, se seleccionó a los pacientes con diagnóstico clínico de conjuntivitis alérgica y se realizó documentación fotográfica, iniciándose tratamiento oftalmológico convencional.

Con formato: Numeración y viñetas

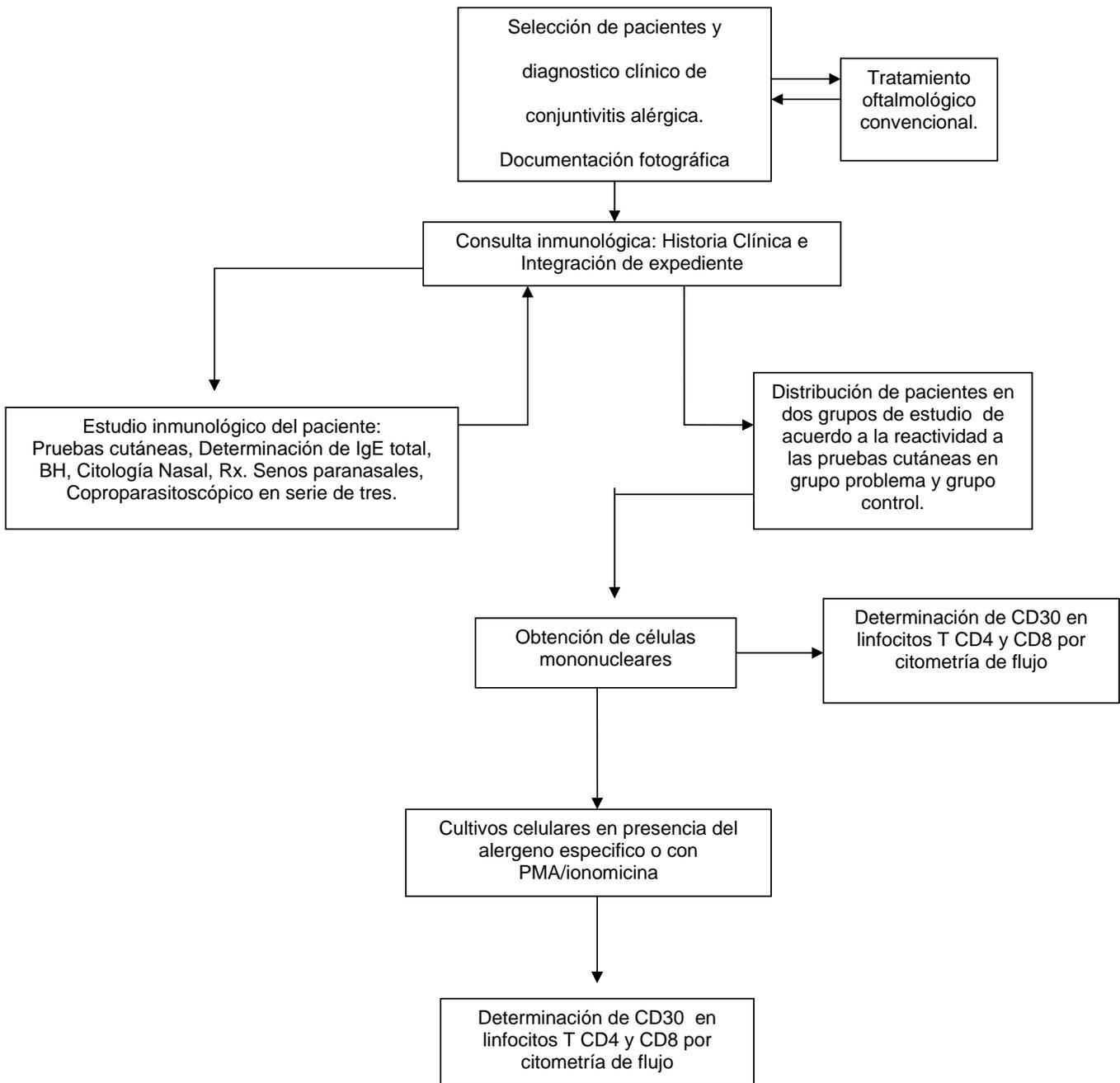
Los signos fueron evaluados en base a una escala análoga-visual (arbitraria) de cuatro puntos, la cual fue desarrollada para este trabajo, por lo que se encuentra en la sección de resultados.

Separación de Células Mononucleadas (CMN). Las CMN se separaron del paquete eritrocitario por centrifugación a 1,750 rpm en Ficoll-hypaque (1.077 de densidad), durante 30 minutos a 4°C. Las CMN obtenidas fueron lavadas y su viabilidad fue valorada por exclusión del colorante azul tripano, cuantificándose en un hemocitómetro.

Cultivos celulares. Se utilizaron CMN y se cultivaron en placas de 24 pozos, colocando por pozo 1×10^6 células en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% en presencia o ausencia de *Der p* a concentración óptima. Cuatro horas antes de cosechar las células fue añadida PMA (5 ng/ml) / Ionomicina (0.2 µg /ml).

Análisis estadístico. Se utilizó T de student y/o U-Mann Whitney dependiendo de la distribución de las muestras, considerándose una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat y las gráficas con SigmaPlot.

FLUJOGRAMA DE TRABAJO



VIII. RESULTADOS

A. Hallazgos clínicos de los pacientes con conjuntivitis alérgica.

Se analizaron clínicamente un total de 12 pacientes. Los signos estudiados en los pacientes que ingresaron a nuestro estudio, fueron aquellos más frecuentes y que se encuentran reportados en la literatura: (2, 3, 4, 5, 6, 7,)

- a) Hiperemia conjuntival
- b) Papilas
- c) Puntos de Trantas
- d) Queratitis punteada superficial
- e) Melanosis conjuntival
- f) Vascularización del limbo esclerocorneal.

Con lo anterior, se propuso la siguiente escala análogo-visual (Tabla 2); la cual utilizó una definición arbitraria de los signos encontrados en los pacientes que participaron en nuestro estudio.

Tabla 2. Escala análogo-visual para la conjuntivitis alérgica crónica.

	ESCALA ANÁLOGO-VISUAL			
SIGNO	0	1	2	3
Hiperemia conjuntival	Ausente	Área menor del 25% de la superficie conjuntival	Área mayor al 25% pero sin llegar a afectar la totalidad de la conjuntiva	Hiperemia en toda la superficie conjuntival.
Presencia de papilas	Ausente	Papilas cubriendo un 25% de la superficie de la conjuntiva tarsal superior	Papilas cubriendo más del 25% de la superficie de la conjuntiva tarsal superior, sin llegar a	Papilas afectando la totalidad de la conjuntiva tarsal superior

			afectar la totalidad de la conjuntiva tarsal superior.	
Puntos de Trantas	Ausente	Presentes en el limbo esclero-corneal		
Superficie corneal	Íntegra	Queratitis punteada superficial difusa	Queratitis punteada superficial que coalesce formando áreas de desepitelización	Úlcera corneal (Área de desepitelización que involucra al estroma)
Melanosis conjuntival	Ausente	Presente en la conjuntiva bulbar		
Vascularización del limbo esclero-corneal	Ausente	Presente en el limbo esclero-corneal.		

Con la escala análogo-visual propuesta presentamos en la tabla 3, los resultados encontrados en nuestros pacientes:

Tabla 3. Comparación de los hallazgos clínicos observados en ambos grupos de pacientes

NUMERO DE PACIENTE	PACIENTES CON PRUEBAS CUTÁNEAS POSITIVAS		PACIENTES CON PRUEBAS CUTÁNEAS NEGATIVAS.	
	OD Puntuación por escala)	OI (Puntuación por escala)	OD (Puntuación por escala)	OI (Puntuación por escala)
1	14	14	15	15
2	16	16	15	15
3	15	15	9	9
4	8	8	13	13
5	12	12	7	7
6	15	15	12	12
Promedio ± DE	13.33 ± 2.8	13.33 ± 2.8	11.83 ± 3.2	11.83 ± 3.2
Valor de p ambos ojos	0.113			

Interesantemente, se encontraron dos pacientes dentro del grupo de pruebas cutáneas negativas con queratocono en ambos ojos. Figura 13.



Figura 11. Paciente con pruebas cutáneas positivas.



Figura 12. paciente con pruebas cutáneas negativas.



Figura 13. Pacientes con leucoma central secundario a hydrops.

B. Hallazgos clínicos inmunológicos de los pacientes con conjuntivitis alérgica.

Como parte del proceso de reclutamiento de los pacientes a este estudio se realizaron una serie de pruebas para determinar la presencia o ausencia de reactividad cutánea a *Dermatophagoides pteronyssinus*, (alergeno elegido para la estimulación *in vitro* por ser el de mayor frecuencia en inducir reactividad alérgica). Se observó que había pacientes con IgE elevada y eosinofilia en moco nasal y que había otros pacientes con IgE en valores normales, sin eosinofilia, en ambos casos estas observaciones se correspondieron con la reactividad a las pruebas cutáneas hechas para los alergenos más comunes de nuestra población. Con estos hallazgos se decidió dividir a los pacientes en dos grupos:

- Grupo A.- Pacientes con pruebas cutáneas positivas (PCP) al menos para *Dermatophagoides pteronyssinus* (n=6). Figura 11
- Grupo B.- Pacientes con pruebas cutáneas negativas (PCN) para cualquier alergeno (n=6). Figura 12

En la tabla 4 se resumen los hallazgos de inmunológicos del laboratorio clínico entre ambos grupos de pacientes. No existieron diferencias estadísticamente significativas en el número de leucocitos totales, en el porcentaje de eosinófilos en sangre, en el porcentaje de linfocitos T CD4, ni en el porcentaje de linfocitos T CD8 entre ambos grupos. Sin embargo los eosinófilos en moco nasal fueron 4.3 veces más frecuentes en el grupo A que en el grupo B ($p=0.01$); así como la IgE total, que se encontraba incrementada 9.3 veces más en el grupo A que en el grupo B ($p=0.04$). (Figura 14).

	PACIENTES CON	PACIENTES CON	Valor de p
--	---------------	---------------	------------

Tabla 4. Características de los pacientes con conjuntivitis alérgica incluidos en este estudio.

	POSITIVAS	NEGATIVAS	
Leucocitos totales	7615 ± 374	7269 ± 361	0.513
Eosinófilos en sangre	6.9 ± 1.67	3.6 ± 0.7	0.09
Eosinófilos en moco nasal	26.18 ± 5.85	6 ± 4.42	0.01
IgE total	668.5 ± 255.8	71.7 ± 14.9	0.04
Linfocitos T CD4+	38.8 ± 2.3	32.2 ± 2.3	0.06
Linfocitos T CD8+	29.2 ± 2.6	26.7 ± 2.3	0.41

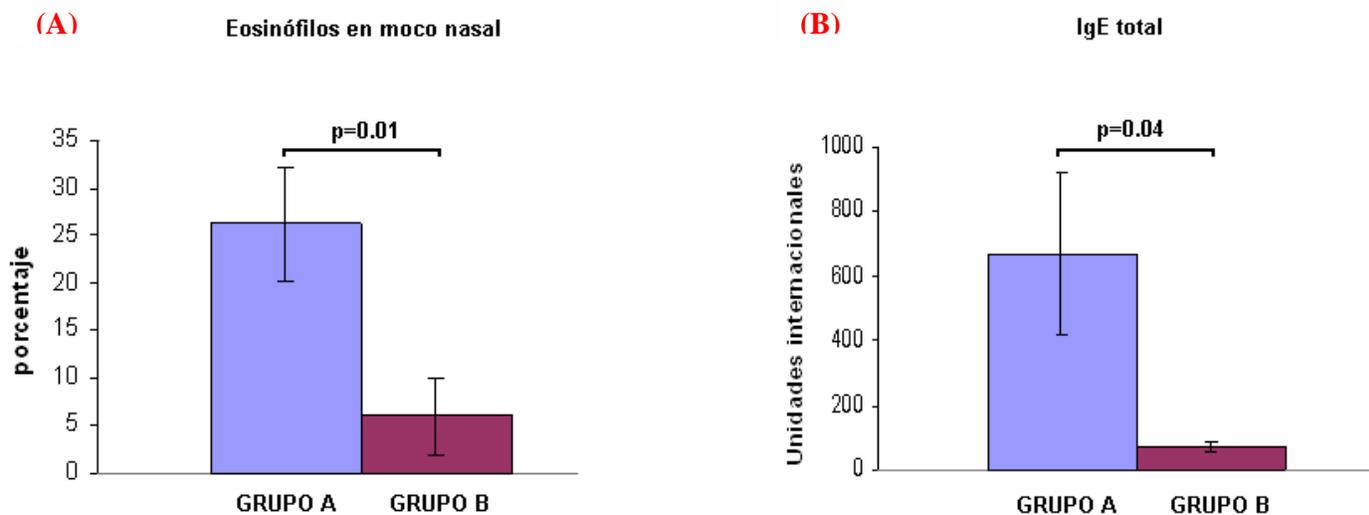


Figura 14. Características de los pacientes con conjuntivitis alérgica. En (A) se observa el porcentaje de eosinófilos en moco nasal; en (B) Unidades internacionales de IgE total. En ambos casos se trata de pacientes con pruebas cutáneas positivas (Grupo A) y pacientes con pruebas cutáneas negativas (Grupo B).

B. Titulación de la concentración de Ag (*Dermatophagoides pteronyssinus*) óptima para la estimulación *in vitro*.

Se realizaron estudios “dosis-respuesta” para conocer la concentración óptima de alérgeno necesaria en la estimulación *in vitro*. Células mononucleadas de pacientes positivos a pruebas cutáneas (n=3) fueron estimuladas a diferentes concentraciones de Ag durante 7 días, como ha sido reportado previamente por Garfías Y, et al¹⁷ (en la figura 15, se observa un incremento significativo en el número de células Ki-67+ desde la concentración de 5µg, alcanzando una proliferación de 3.6 veces superior con 10 µg (p<0.00001). Sin embargo al incrementar la concentración de antígeno se observó una disminución en el número de células KI-67+, esto puede ser explicado debido a que el Der p, tiene actividad proteolítica. En su genoma se han identificado secuencias similares a cisteín-proteasas, tripsinas y proteasas colagenolíticas, siendo todas ellas funcionalmente activas³⁶⁻³⁸.

Proliferación celular

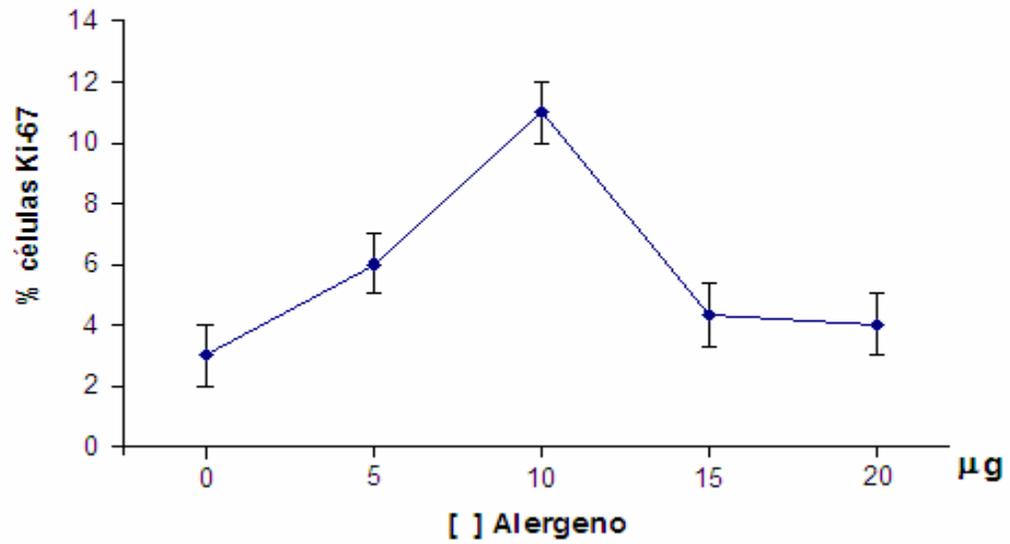


Figura 15. Células mononucleadas estimuladas con alergeno. Las células fueron estimuladas con distintas concentraciones de alergeno durante 7 días, concluido el tiempo de cultivo las células fueron recuperadas, fijadas, permeabilizadas y marcadas con un anticuerpo anti-Ki67. Los resultados se analizaron por citometría de flujo.

C. Cambios en la expresión de CD30 y CD57 en linfocitos T CD4+ y CD8+ de los diferentes grupos de estudio

Una vez identificadas las condiciones óptimas de estimulación con *Der p* se evaluó exclusivamente la expresión tanto de CD30 como de CD57 en linfocitos CD4 y CD8 antes y después del estímulo con *Der p* o con PMA/Ionomicina.

Frecuencia de linfocitos T CD30+. El porcentaje de linfocitos T CD4+CD30+ en células no estimuladas fue similar en ambos grupos, siendo de 2 ± 0.8 en el grupo A y 1 ± 0.3 en el grupo B. En células estimuladas con PMA/ionomicina el porcentaje de linfocitos T CD4+CD30+ se incrementó 4.3 veces con respecto a las células no estimuladas en el grupo A ($p < 0.0001$), mientras que en el grupo B se incrementaron 8.4 con respecto a su basal ($p < 0.0001$) (Tabla 5, Figuras 16A y 17). Al estimular las células con el alérgeno el porcentaje de linfocitos T CD4+ CD30+ se incrementó 16.2 veces con respecto a las células no estimuladas en el grupo A ($p < 0.0001$), mientras que en el grupo B se incrementaron 41.1 veces con respecto a su basal ($p < 0.0001$). Por otra parte, el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD30+ en células no estimuladas fue similar en ambos grupos, siendo de 1 ± 0.2 en el grupo A y 1 ± 0.3 en el grupo B. En células estimuladas con PMA/ionomicina el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD30+ se incrementó 4.9 veces con respecto a las células no estimuladas en el grupo A ($p = 0.002$), mientras que en el grupo B se incrementaron 8.4 con respecto a su basal ($p = 0.01$) (Tabla 5 Figuras 16B y 17). Al estimular las células con el alérgeno el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD30+ se incrementó 16.2 veces con respecto a las células no estimuladas en el grupo A ($p < 0.0001$), mientras que en el grupo B se incrementaron 41.1 veces con respecto a su basal ($p = 0.0003$). (Tabla 6, Figuras 16B y 17).

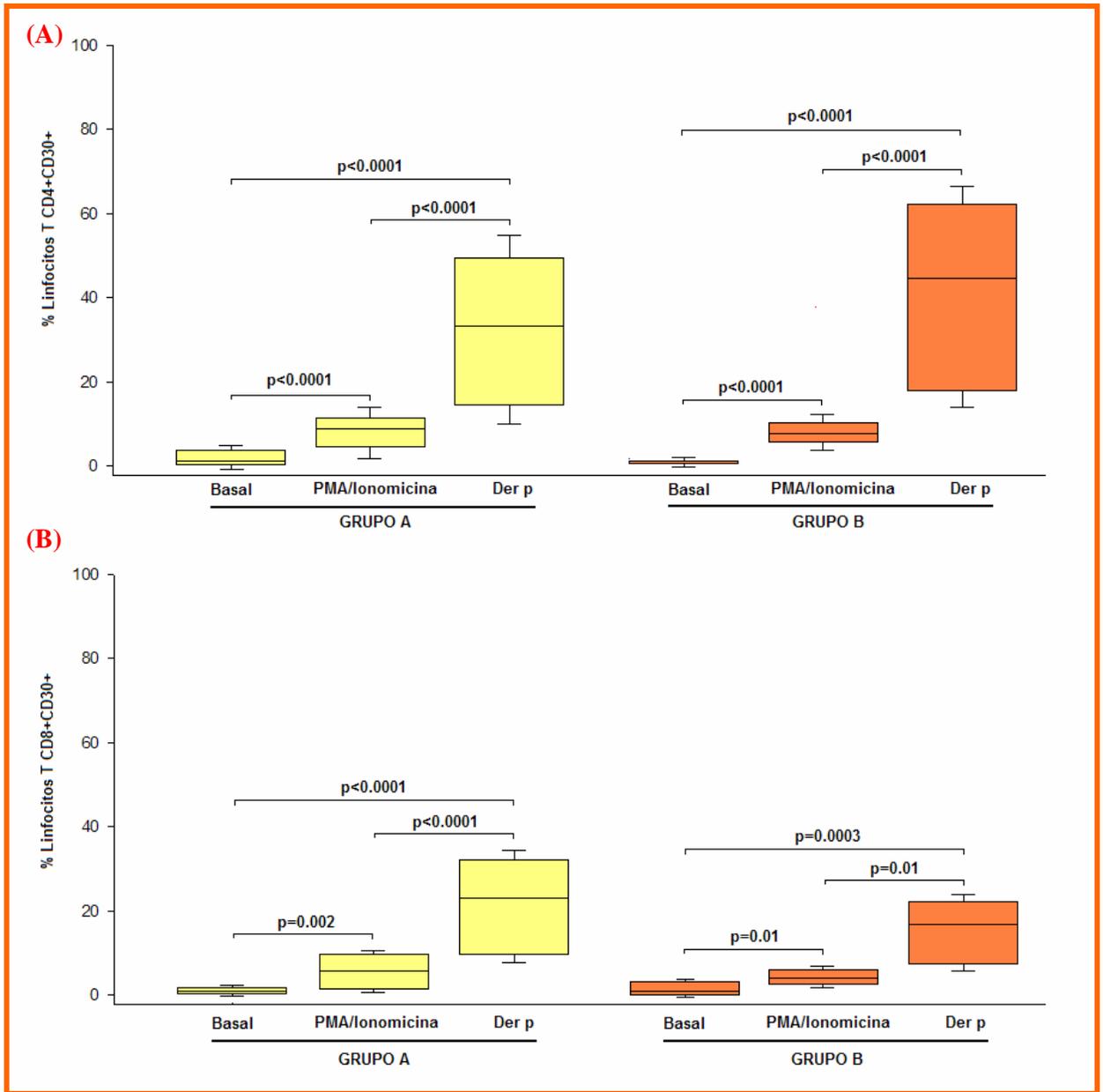


Figura 16. Cambios en la frecuencia de linfocitos T CD30+ con diferentes estímulos. Linfocitos T CD4+CD30+ (A), linfocitos T CD8+CD30+ (B).

Por último, aún cuando el porcentaje de incremento en la frecuencia de células CD30+ fue significativo para ambas poblaciones celulares, siempre predominaron los linfocitos T cooperadores CD30+ sobre los citotóxicos CD30+, tanto para el grupo A ($p=0.03$), como para el grupo B ($p=0.0003$). (Tabla 5, Figura 15).

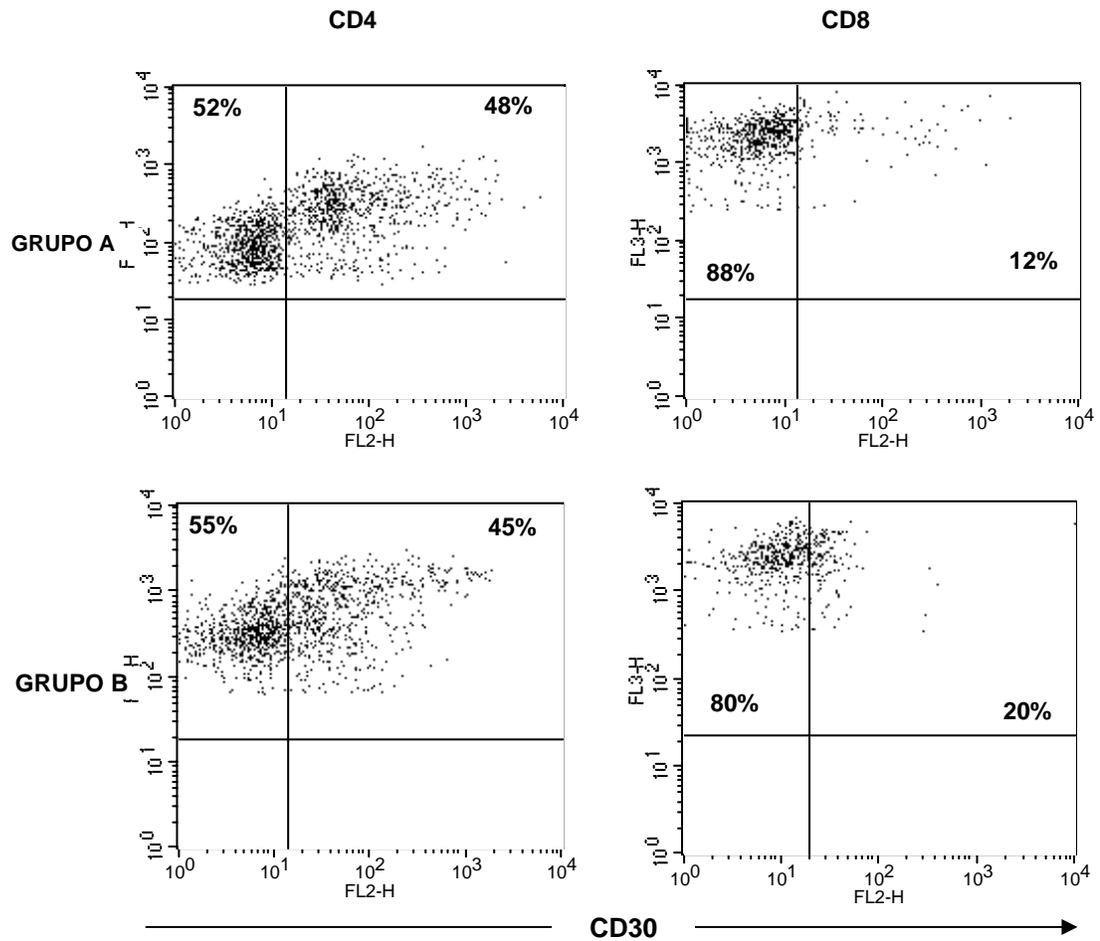


Figura 17. Expresión de CD30 en linfocitos T. Imagen de citometría de flujo (dot plot) que muestra en el eje de las “y” tamaño vs la marca con un anticuerpo anti-CD30 conjugado a un fluorocromo en el eje de las “x”. En ambos grupos de estudio, posterior al cultivo, en la ventana para linfocitos T CD4 o linfocitos T CD8.

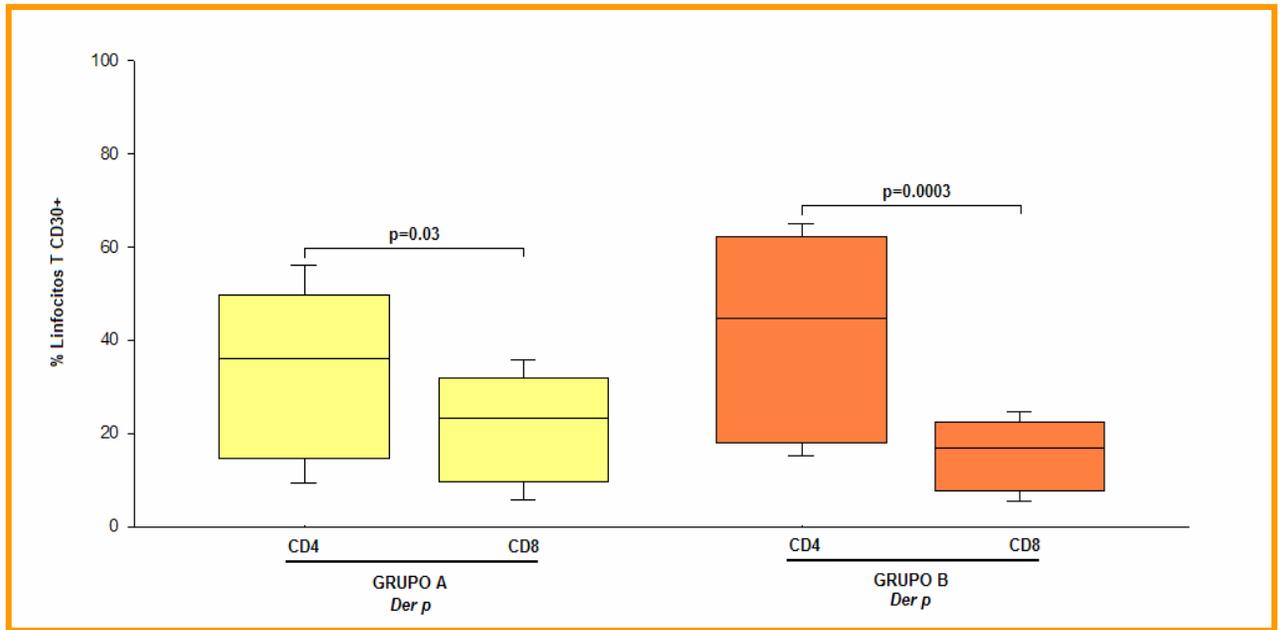


Figura 18. Cambios en la frecuencia de linfocitos T CD4+CD30+ vs cambios en la frecuencia de linfocitos T CD8+CD30+. Se muestra el porcentaje de células CD30+, en ambos grupos de estudio a siete días de cultivo con *Der p*.

Tabla 5. Expresión de CD30 y CD57 en linfocitos T CD4+ y CD8+ en ambos grupos de estudio y con diferentes estímulos.

	BASAL			PMA / IONOMICINA			DER P		
	Grupo A	Grupo B	Valor de p: A vs B	Grupo A	Grupo B	Valor de p: A vs B	Grupo A	Grupo B	Valor de p: A vs B
CD4+CD30+	2.2 ± 0.8	1.03 ± 0.3	0.407	9.5 ± 1.3 *]	8.7 ± 0.9 £]	0.637	35.9 ± 5.3]	42.3 ± 5.4]	0.405
CD8+CD30+	1.08 ± 0.3	1.76 ± 0.7	0.211	5.3 ± 1.2]	4.2 ± 0.4]	0.407	22.8 ± 3.1 *]	16.8 ± 3.5 f]	0.218
CD4+CD57+	5.2 ± 2.4 §]	6.7 ± 1.3 ¥]	0.637	17.8 ± 2.1	15.8 ± 1.5	0.670	23.9 ± 2	29.2 ± 2.3]	0.017
CD8+CD57+	23.4 ± 4.5]	26.9 ± 4.7]	0.613	18.3 ± 1.9	19.6 ± 2.1	0.425	22.7 ± 2	21.3 ± 2 ¥]	0.905

§ p=0.008, ¥ p=0.007, * p=0.03; £ p=0.0002; f p=0.0003.

D. Determinación de citocinas proinflamatorias en ambos grupos de estudio.

Se sabe que las citocinas proinflamatorias perpetúan la agresión inmunológica prolongando el estado inflamatorio del microambiente. De tal forma que se determinó la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α) en el SN de cultivo de CMN estimuladas y no estimuladas con *Der p*, observando que la concentración de IL-1 β en SN del Grupo A se incrementó 2.1 veces en las células estimuladas con el alérgeno ($p=0.002$); mientras que la concentración de IL-1 β en SN del grupo B se incrementó 1.6 veces en las células estimuladas con *Der p* ($p=0.0008$). No habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio, en la concentración de IL-1b en el SN de células no estimuladas o estimuladas. (Figura 19A y Tabla 6)

Con respecto a la concentración de IL-6 en SN, en el grupo A se incrementó 1.5 veces ($p=0.005$) en las células estimuladas con el alérgeno; mientras que en el grupo B la concentración de IL-6 en SN se incrementó 1.3 veces más ($p < 0.0001$) en las células estimuladas. (Figura 19B y Tabla 6) No habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio, en la concentración de IL-6 en el SN de células no estimuladas o estimuladas.

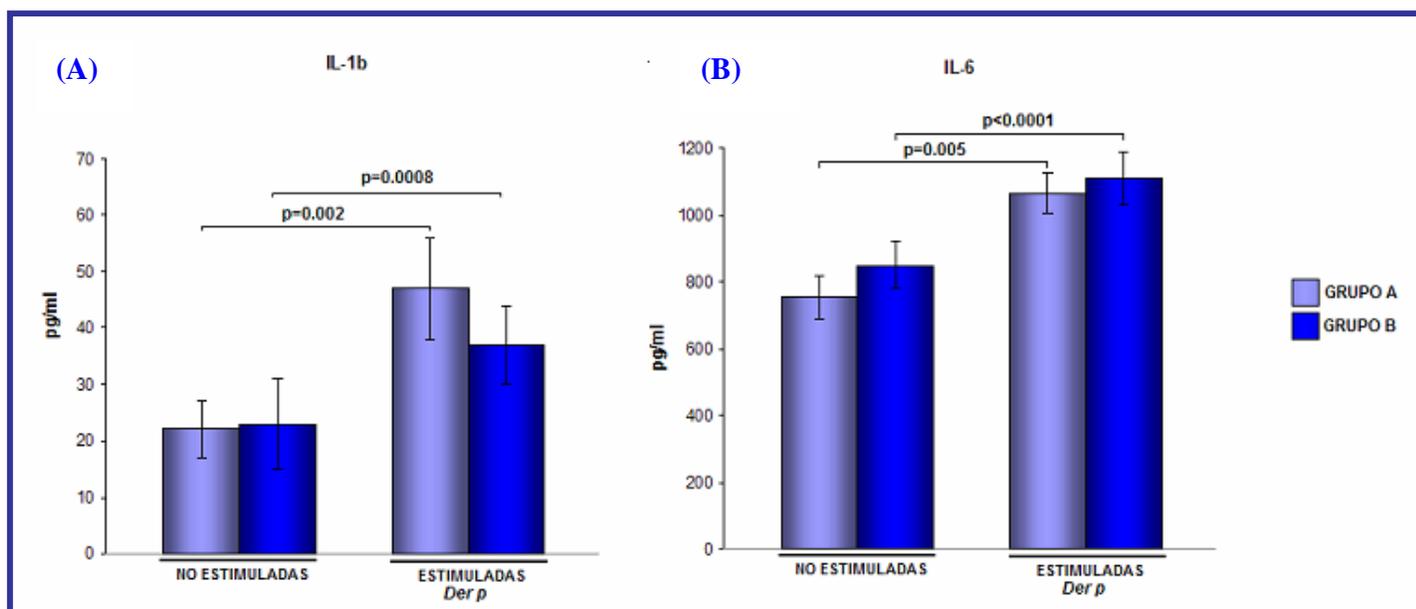


Figura 19. Citocinas proinflamatorias en sobrenadante de cultivo. Gráficas de barras que muestran las concentraciones de citocinas en sobrenadante de células estimuladas y no estimuladas con *Der p* durante 7 d en ambos grupos de pacientes. (A) IL-1b, (B) IL-6.

Por último, al determinar la concentración de TNF- α en el SN, se observó que en el grupo A aumentó tres veces más ($p = 0.0009$) la concentración de esta citocina en células estimuladas con *Der p*; en comparación en el grupo B la concentración de TNF- α 1.8 veces más ($p < 0.0001$) en las células estimuladas, que en las no estimuladas. Resultó interesante que al comparar la producción basal, es decir, la concentración de TNF- α en células no estimuladas entre el grupo A y el grupo B, se haya observado una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0001$) (Tabla 6 y Figura 20)

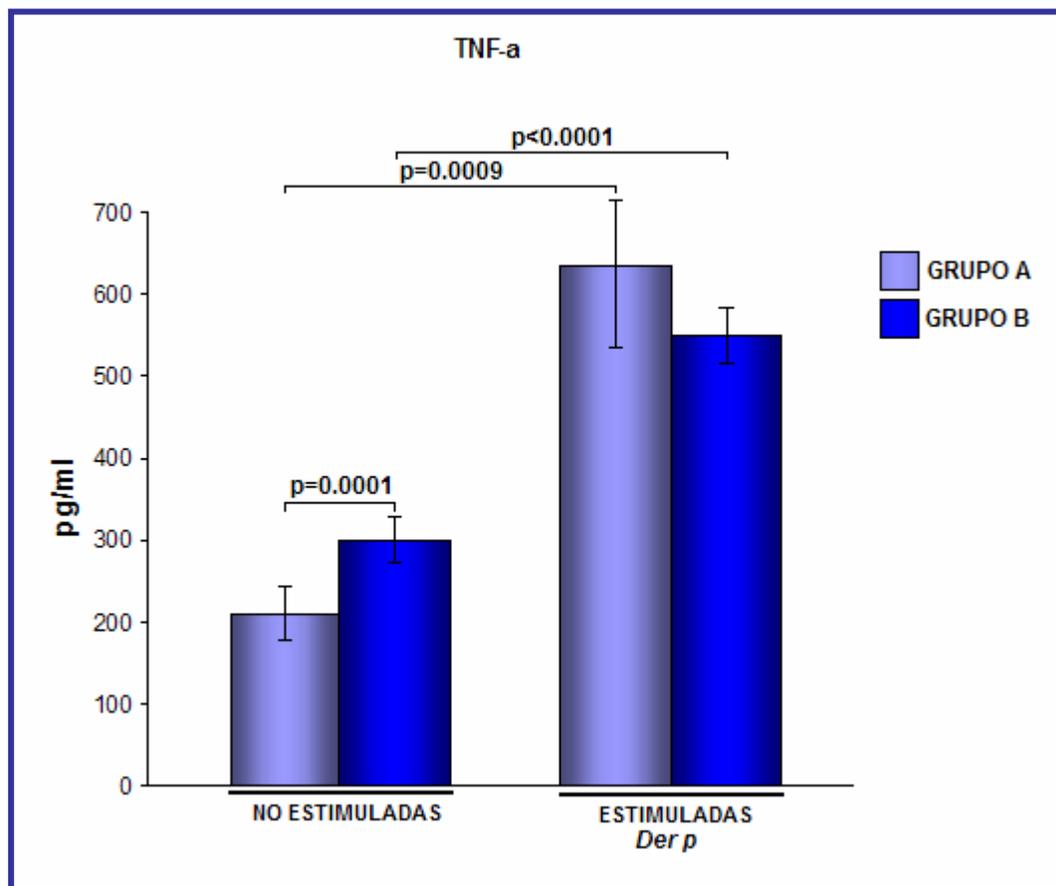


Figura 20. TNF- α en sobrenadante de cultivo. Gráfica de barras que muestra la concentración de TNF- α en SN de células estimuladas y no estimuladas con *Der p* durante 7 d de cultivo entre ambos grupos de pacientes.

Tabla 6. Citocinas proinflamatorias en SN de cultivo de CMN entre ambos grupos de pacientes.

	GRUPO A			GRUPO B		
	No estimuladas	Estimuladas con Der p	p	No estimuladas	Estimuladas con Der p	p
IL-1b	22 ± 13	47 ± 21	0.002	23 ± 18	37 ± 16	0.0008
IL-6	697 ± 115	1065 ± 145	0.005	850 ± 181	1108 ± 192	<0.0001
TNF-α	210 ± 82*	635 ± 252	0.0009	300 ± 68*	550 ± 86	<0.0001

± Desviación estándar

*p=0.0001

IX. DISCUSIÓN

La caracterización de los componentes celulares que participan en un proceso inflamatorio proporciona claves para determinar los procesos moleculares involucrados en la enfermedad estudiada. Las interacciones de las moléculas de adhesión con otras células o con proteínas de la matriz extracelular, culminan en tres importantes funciones celulares: el llamado “homming” (que consiste en la migración de linfocitos a sitios linfáticos especializados o a sitios de inflamación crónica), la apoptosis y la activación celular^{39, 40}. En el caso de las conjuntivitis alérgicas crónicas, es conocido, por modelos animales, que el proceso inflamatorio local se mantiene por linfocitos Th2 que han hecho homming en la conjuntiva^{39, 41}. Se sabe que el CD30 es una molécula coestimuladora que favorece la activación celular^{18, 40} tanto de linfocitos Th1 como de linfocitos Th2; sin embargo, los linfocitos T CD4+ Th2 de sujetos alérgicos y que expresan CD30 en su superficie, son células que responden a la proliferación in Vitro con el alérgeno¹⁷. Recientemente, se ha propuesto que los linfocitos Th1 pueden favorecer las actividades efectoras de los linfocitos Th2, lo que se ha corroborado en modelos experimentales murinos de alergia respiratoria⁴². No obstante, el compromiso de estas poblaciones celulares CD30+ y aquellas asociadas a estímulos crónicos como las que expresan CD57, no han sido estudiadas en procesos alérgicos oculares, es por eso que en este trabajo se evaluaron las citocinas relacionadas a Th1 y Th2 en los linfocitos CD30+, CD30-, CD57+ y CD57-, así como la producción de citocinas proinflamatorias en individuos con queratoconjuntivitis primaveral.

La clasificación de los pacientes en este estudio se realizó con la finalidad de tener un grupo problema y un grupo control, por lo que se incluyeron pacientes con diagnóstico clínico de conjuntivitis alérgica crónica (en su variante primaveral) a los que se les realizó un estudio alergológico completo que incluyó: pruebas cutáneas por técnica de Prick; determinación de IgE total, cuantificación de eosinófilos en sangre periférica así como en moco nasal, estudio radiológico de senos paranasales y coproparasitoscópico en serie de tres muestras. Se ideó una escala análoga-visual con puntaje arbitrario tomando en cuenta las características clínicas más frecuentemente encontradas en los pacientes con esta patología y se le dio un puntaje total a cada uno de los pacientes estudiados.

Es importante resaltar que para realizar el diagnóstico de conjuntivitis alérgica, el oftalmólogo nunca recurre a este tipo de valoración alergológica, por lo que fue una sorpresa encontrar diferencias significativas entre los niveles de IgE total y el porcentaje de eosinófilos en moco nasal entre ambos grupos de pacientes, este hallazgo clínico representó para este trabajo una

aportación importante al área oftalmológica, ya que desde un principio el encontrar diferencias biológicas entre los dos grupos aparentemente “iguales” hablaba de mecanismos de regulación inmunológica diferentes en los que seguramente estarían involucrados la IL-4 y la IL-5.

Al analizar la frecuencia de las poblaciones CD30+, notamos que la expresión de CD30 en las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 se incrementó en ambos grupos de pacientes después de ser estimuladas *in vitro* con un alérgeno, como ya ha sido ampliamente demostrado en rinitis, asma y atopia cutánea⁴³⁻⁴⁶. Esto indica que la expresión de CD30 en los linfocitos T CD4 y CD8 es un mecanismo universal presente en las enfermedades atópicas incluyendo a las alergias oculares. Por otra parte, previo a este estudio, solo se había asociado a las subpoblaciones CD8+ CD30+ con asma e infección viral, los autores de ese estudio sugieren que las células CD8 que expresan CD30 contribuyen importantemente con el daño bronquial a través de un microambiente Th2²³

Por otro lado hay un aumento significativo en las subpoblaciones CD4+ CD57+ después de un estímulo alérgeno-específico, lo que resulta interesante, ya que la expresión de CD57 en linfocitos T cooperadores se ha asociado a estimulación antigénica crónica y activación de clonas de memoria,^{47, 48, 32} por lo que es probable que el incremento observado en la frecuencia de linfocitos T CD4+ CD57+ post-cultivo de nuestros pacientes alérgicos haya sido consecuencia de la activación y expansión de clonas constantemente estimuladas y que probablemente tengan un fenotipo de memoria.

Desde un punto de vista clínico, tanto el incremento en la frecuencia en los linfocitos T CD30+, como en los linfocitos T CD4+CD57+ resultó interesante, ya que lo esperado era que el grupo negativo a pruebas cutáneas no se activara *in vitro* en presencia del antígeno, o lo hiciera en menor proporción. Estos datos apoyaron aún más la propuesta de que en ambos grupos hay condiciones en el microambiente distintas entre ellos, y que la diferencia no radica fundamentalmente en que si unas reconocían al antígeno o no; en este sentido el incremento en la frecuencia de linfocitos T CD4+CD57+ en ambos grupos de estudio, con predominio en el grupo B, nos sugiere la activación de células con fenotipo de memoria^{32,48} o que fueron inducidas *in vitro* hacia su diferenciación terminal²⁸.

Datos no incluidos en este estudio y provenientes de la línea de investigación desarrollada en la Unidad de Investigación de este Instituto, demostraron que las células CD30+ y CD57+ son la

principal fuente de citocinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-4 e IL-5) (Tesis de Maestría. Gustavo Aguilar Velásquez. 2007). El INF- γ induce además la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α ⁵¹ a partir de macrófagos activados, y se sabe que estas citocinas perpetúan el estado inflamatorio en las conjuntivitis alérgicas crónicas²⁷, por esta razón en este trabajo también se evaluó la producción de IL-1, IL-6 y TNF- α en el SN de cultivo, observando tal como esperábamos un incremento posterior al estímulo alérgico, llamando la atención sin embargo, que a nivel basal la producción de TNF- α se encontraba incrementada únicamente en el grupo B. Este dato asemeja un estado inflamatorio de bajo grado como ocurre en otras enfermedades inmunológicamente mediadas en donde existe un proceso de migración celular selectiva, tal como ocurre en la dermatitis atópica.⁵² o en aterosclerosis relacionada a obesidad y diabetes mellitus⁵³, lo que podría explicar la negatividad a las pruebas cutáneas, pues es posible que los linfocitos T alérgico-específicos (CD57+) se encuentren siendo reclutados con mayor frecuencia a ojo que a otros sitios, sin embargo se necesitarán estudios posteriores sobre migración celular para poder resolver esta cuestión.

En conclusión, los datos obtenidos en este estudio sugieren que los linfocitos CD30+ y los linfocitos T CD57+ participan en los fenómenos alérgicos oculares crónicos a través de la producción de citocinas Th1 y Th2, en particular las funciones efectoras inducidas por las citocinas Th1 favorecen un estado proinflamatorio mediante el incremento en la producción de citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α .

X. CONCLUSIONES

1. Con este trabajo se propuso una escala análogo-visual para distinguir el grado de actividad de la conjuntivitis alérgica crónica, y comparar clínicamente los pacientes que tenían pruebas cutáneas positivas de los que tenían pruebas cutáneas negativas.
2. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los hallazgos clínicos de los pacientes con pruebas cutáneas positivas y los pacientes con pruebas cutáneas negativas.
3. La frecuencia de linfocitos T CD30+ (CD4+, CD8+) se incrementa posterior al estímulo alérgico.
4. Las células mononucleares producen significativamente mayor TNF- α en condiciones basales en el grupo B lo que pudiera explicar mayor migración ocular, negatividad a las pruebas cutáneas y las consecuencias de la inflamación crónica ocular como el queratocono, hallazgo clínico oftalmológico en los pacientes de este grupo.

XI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- López-López J. 1999 Epidemiología de alergia pediátrica en el Hospital General de México O.D. Análisis orientado por problemas en evidencias de 1000 pacientes. *Alergia e Inmunol Pediatr*; 8 (1):17-20
- 2 Toribio E 2001 Conjuntivitis alérgica *Alergia e Inmunol Pediatr*;10 (1):15-19
- 3.-Pantoja-Melendez C. 2006.Reporte principales causas de consulta Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana
- 4.- Tissu. Butrus S,Portela R 2005 Conjunctiva-associated Lymphoid *Ophthalmol Clin North am.*,18(4):485-492.
- 5.-Leonardi A. 2005 *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 5 (5):464-472.
- 6.- Ono SJ, Abelson MB. 2005 Allergic conjunctivitis :Update pathophysiology and prospects for future treatment *J Allergy Clin Immunol*;115:118-22
- 7.- . [Bremond-Gignac D](#). 2002 The clinical spectrum of ocular allergy. [Curr Allergy Asthma Rep.](#); 2(4): 321-324)
- 8.-Campuzano M, Juarez JC Lopez G. 2002 Alergenos y factores de riesgo en pacientes pediatricos con conjuntivitis alergica etacional *Revista Alergia México*; 49(4): 105.11
9. Gonzàlez, Jaime et al; Estudio clínico comparativo del diclofenaco versus ketorolaco en el manejo sintomático de las conjuntivitis alérgicas en niños. *Rev Mex oftalmol*; Enero-febrero 2006; 80(1) : 16-20.
- 10.- [Bielory L](#). 2000 Allergic and immunologic disorders of the eye. Part I: immunology of the eye. [J Allergy Clin Immunol.](#); 106(5): 805-816.
- 11.- [Bonini S](#), [Coassin M](#), [Aronni S](#), [Lambiase A](#). 2004 Vernal keratoconjunctivitis. [Eye.](#); 18(4): 345-351.
- 12.- Spraul CW, [Lang GK](#). 1995 Allergic and atopic diseases of the lid, conjunctiva, and cornea. [Curr Opin Ophthalmol.](#); 6 (4): 21-26
- 13.- [Jelinek DF](#). 2000 Regulation of B lymphocyte differentiation. [Ann Allergy Asthma Immunol.](#); 84(4): 375-385.
14. MoserM, MurphyKM. 2000 Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. *Nat Immunol*; 1:199-205.
- 15.- AbelstonMB, AllansmithMR. 1979 Histamine in the eye. In: Silverstein A, O'ConnorG, editosrs *.Immunology and immunopathology of the eye: Masson Publishing*.p362-4.
- 16.- Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Obayashi M, Toda M. 2003 Chemokines: roles in leukocyte developmment, trafficking, and effector function . *J Allergy Clin Immunol*;111:1185-99.

- 17.- Garfias Y, Ortiz B, Hernandez J, Magaña D, Becerril-angeles M, Zenteno E, Lascurain R. 2006 *Allergy*; 61:27-34.
- 18.- Watts TH. 2005 TNF/TNFR Family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol*; 23:23-68.
- 19.- Kroczek R, et al. 2005 *J Allergy Clin Immunol.*; 116:906-909
- 20.- Tarkowski M. 2003 Expression and role of CD30 in regulation of T cell activity. *Curr Opin Hematol*;10:267-271.
- 21.-LeonardC,Torme V, Faul, Burke CM, Poulren LW. 1997 Allergen-induced CD30 expresión on T cells of atopic asmatics *Clin Exp Allergy*;27:780_86.
- 22.- Foster PS, Martinez-Moczygemba M, Huston DP, Corry DB. 2002 Interleukins-4,-5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. *Pharmacol Ther*;94:253–264.
- 23.- Stanciu LA, et al. 2005 *Respir Res.*; 6:67.
- 24.- Caproni M Bianchi B, D’Elios MM, De Carli M, Amedei A, Fabbri P 1997. In vivo relevance of CD30 in atopic dermatitis *Allergy*;52:1063-1070.
- 25.- Toennies HM, Green JM, Arch RH. Expresión of CD30 and Ox40 on Tlymphocyte subsets is controlled by distinct regulatory mechanisms *J Leukoc Biol.* 2004;75:350-357.
- 26.- Del Prete G, de Carli M, Almerigogna F,Daniel CK, D’Elios MM, Zancuoghi G et al. 1995 Preferential expression of CD30 by human CD4+ T cells producing Th2-type cytokines. *FASEB J*;9:81–86.
- 27.- Calonge M, Siemasko KF, Stern ME. 2003 Animal models of ocular allergy and their clinical correlations. *Curr Allergy Asthma Rep*; 3:345-351.
- 28.- [Palmer BE](#), [Blyveis N](#), [Fontenot AP](#), [Wilson CC](#). 2005 Functional and phenotypic characterization of CD57+CD4+ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction.*J Immunol.* Dec 15; 175(12):8415-23.
- 29.- [Needham LK](#), [Schnaar RL](#). The HNK-1 1993 reactive sulfoglucuronyl glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin but not E-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 15;90(4):1359-63.
- 30.- Cebo C, Danbrouck T, Maes E, Laden C, Strecker G, Michalski JC, Zanetta JP. 2001Recombinant human interleukins IL-1a, IL-1b, IL-4, IL-6 and IL-7 show different and specific calcium-independent carbohydrate-binding properties. *J Biol Chem*; 276: 5685-91
- 31.- Miura R, Aspberg A, Ethell IM, Hagihara K, Schnaar R, Ruoslahti E, Yamaguchi Y. 1999 The proteoglycan lectin domain binds sulfated cell surface glycolipids and promotes cell adhesion. *J Biol Chem*; 274: 11431-8.
- 32.- Jiménez-Martínez MC, Linares M, Baez R, Montaña LF, Martínez-Cairo S, Gorocica P, Chávez R, Zenteno E, Lascurain R. 2004 Intracellular expression of interleukin-4 and interferon- by a

Mycobacterium tuberculosis antigen-stimulated CD4⁺ CD57⁺ T cell subpopulation with memory phenotype in tuberculosis patients. *Immunology*; 111:100-106

33.- Costabel U, Teschler H, Guzman J. 1992 Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP): the cytological and immunocytological profile of bronchoalveolar lavage. 1: *Eur Respir J*. Jul;5(7):791-7

34.- Nakajima H, Fukuda T, Ando N, Makino S. 1993 Inhibitory effects of oral glucocorticoid therapy on T-lymphocyte infiltration in the bronchial mucosa of asthmatic subjects] *Arerugi*. Apr;42(4):505-13.

35.- Brinkmann V, Kristofic C. 1997 Massive production of Th2 cytokines by human CD4⁺ effector T cells transiently expressing the natural killer cell marker CD57/HNK1. 1: *Immunology*. Aug;91(4):541-7.

36.- Chua KY, Stewart GA, Thomas R, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM, Turner KJ. 1988 Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1: homology with cysteine proteases. *J Exp Med*; 167:175.

37.- Stewart GA, Ward LD, Simpson RJ, Thomson PJ. 1992 The group III allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is a trypsin-like enzyme. *Immunology*; 75:29.

38.- King C, Simpson RJ, Moritz RL, Reed GE, Thomson PJ, Stewart GA. 1996 The isolation and characterization of a novel collagenolytic serine protease allergen (Der p 9) from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol*; 98:739.

39.- [Haynes RJ](#), [Tighe PJ](#), [Scott RA](#), [Singh Dua H](#). 1999 Human conjunctiva contains high endothelial venules that express lymphocyte homing receptors. [Exp Eye Res](#).; 69(4): 397-403.

40.- [So T](#), [Lee SW](#), [Croft M](#). 2006 Tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor family members that positively regulate immunity. [Int J Hematol](#).; 83(1): 1-11

41.- [Bielory L](#). 2000 Allergic and immunologic disorders of the eye. Part I: immunology of the eye. [J Allergy Clin Immunol](#).; 106(5): 805-816.

42.- [Broide DH](#). 2001 Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. [J Allergy Clin Immunol](#).; 108: S65-71.

43.- [Lipozencic J](#), [Bobek D](#), [Jakic-Razumovic J](#). 2003 The presence of surface CD30 on T cells in atopic dermatitis. [Acta Dermatovenerol Croat](#).; 11(3): 145-152

44.- [Garfias Y](#), [Rojas-Ramos E](#), [Jimenez Mdel C](#), [Martinez-Cairo S](#), [Chavez R](#), [Gorocica P](#), [Zenteno E](#), [Lascurain R](#). 2003 Comparative analysis of mononuclear cell surface markers in atopic processes- α preliminary study. [Immunol Invest](#).; 32(1-2): 95-104

- 45.- [Yamamoto J](#), [Adachi Y](#), [Onoue Y](#), [Kanegane H](#), [Miyawaki T](#), [Toyoda M](#), [Seki T](#), [Morohashi M](#). 2000 CD30 expression on circulating memory CD4+ T cells as a Th2-dominated situation in patients with atopic dermatitis. [Allergy](#); 55(11): 1011-1018
- 46.- . [Dummer W](#), [Rose C](#), [Brocker EB](#). 1998 Expression of CD30 on T helper cells in the inflammatory infiltrate of acute atopic dermatitis but not of allergic contact dermatitis. [Arch Dermatol Res](#); 290(11): 598-602.
- 47.- Legac E, Autran B, Merle-Beral H, Katlama C, Debre PA. 1992 CD4+CD7-CD57+ T cells: a new T lymphocyte subset expanded during human immunodeficiency virus infection. *Blood*; 79: 1746-53
- 48.- Bell EB, Sparshott SM, Bunce C. 1998 CD4+ T cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen- α unifying concept. *Immunol Today*; 19: 60-4
- 49.- [Heshmat NM](#), [El-Hadidi ES](#). 2006 Soluble CD30 serum levels in atopic dermatitis and bronchial asthma and its relationship with disease severity in pediatric age. *Pediatr Allergy Immunol*; 17(4): 297-303
- 50.- [Pellegrini P](#), [Berghella AM](#), [Contasta I](#), [Adorno D](#). 2003 CD30 antigen: not a physiological marker for TH2 cells but an important costimulator molecule in the regulation of the balance between TH1/TH2 response. [Transpl Immunol](#); 12(1): 49-61.
- 51.- [Fong TA](#), [Mosmann TR](#). 1989 The role of INF-gamma in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. [J Immunol](#); 143(9): 2887-2893.
- 52.- [Viljanen M](#), [Pohjavuori E](#), [Haahtela T](#), [Korpela R](#), [Kuitunen M](#), [Sarnesto A](#), [Vaarala O](#), [Savilahti E](#). 2005 Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema-dermatitis syndrome. [J Allergy Clin Immunol](#); 115(6): 1254-1259.
- 53.- [Murdolo G](#), [Smith U](#). 2006 The dysregulated adipose tissue: a connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. [Nutr Metab Cardiovasc Dis](#); 16: S35-38