



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ, I.A.P.

DEPARTAMENTO DE CórNEA Y CIRUGÍA REFRACTIVA

**DETERMINACIÓN DE INTERLEUCINA-17 EN MUESTRAS DE LÁGRIMA DE
PACIENTES CON CONJUNTIVITIS ALÉRGICA**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO OFTALMÓLOGO

Presenta:

Dr. Francisco Ventura Rodríguez

Asesores de tesis:

Dra. Cristina Pacheco Del Valle

M. en C. Atzin Robles Contreras

Ciudad de México, Agosto del 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÍNDICE

Resumen	3
Marco Teórico	4
Introducción	4
Planteamiento del problema	13
Justificación	13
Pregunta de investigación	14
Hipótesis	14
Objetivos	14
Material y métodos	15
Resultados	19
Discusión	24
Conclusiones	26
Bibliografía	27

Resumen

Introducción: La respuesta alérgica ocular es coordinada principalmente por el sistema inmune adaptativo. El conocimiento que se tiene sobre el rol de las células Th17 y sus citocinas en la alergia ocular es escaso. Diversos reportes refieren que niveles elevados de Interleucina-17 (IL-17) tienen un papel en la infiltración de neutrófilos en modelos alérgicos.

Objetivo: Comparar la concentración de IL-17 en muestras de lágrima en pacientes con conjuntivitis alérgica y pacientes sanos.

Métodos: Estudio prospectivo, transversal, observacional y analítico. Se recolectaron muestras de lágrima de pacientes con conjuntivitis alérgica y pacientes sanos para medir la concentración de IL-17.

Resultados: Al comparar las concentraciones de IL-17 se observó que existe una mayor concentración de IL-17 en el grupo control con respecto al grupo de estudio por grado de severidad clínica ($p < 0.01$). Sin embargo, al relacionar por tipo de conjuntivitis alérgica no se encontraron diferencias significativas con el grupo control ($p > 0.05$).

Conclusiones: No existe una diferencia en la concentración de IL-17 en lágrimas de pacientes con distintos tipos de conjuntivitis alérgica. No obstante, existe una posible relación inversa entre la concentración de IL-17 en lágrimas de pacientes con conjuntivitis alérgica y el grado de severidad clínica.

Palabras Clave: IL-17; conjuntivitis alérgica; muestra de lágrima; Severidad clínica; alergia ocular; Th17.

Marco Teórico

Introducción

La enfermedad ocular alérgica es un problema común observado en el ámbito oftalmológico. ⁽¹⁾ La conjuntivitis alérgica es una enfermedad inflamatoria que afecta directamente a la conjuntiva, que es una delgada membrana mucosa que reviste la superficie interna del párpado y cubre al ojo, de tal forma que lo provee de una barrera primaria contra aeroalergenos ambientales, químicos e infecciosos. ⁽²⁾

Las conjuntivitis alérgicas se clasifican en 5 tipos de presentación principales. La forma aguda es la conjuntivitis alérgica estacional normalmente causada por hiperreactividad a pólenes, mientras que la crónica es la perenne que se debe a ácaros y epitelios. La forma más severa por la afectación corneal es la queratoconjuntivitis vernal. Esta última se trata de una forma de reacción alérgica ocular específica de la infancia, que la mayor parte de las veces cede en la adolescencia, pero que cursa de forma crónica con reagudizaciones muy severas que pueden llegar a producir afectación corneal grave. ⁽³⁾ Otras formas de presentación son la queratoconjuntivitis atópica, que se presenta en sujetos con antecedentes familiares de atopia y que cursan con eccema o asma; y la conjuntivitis de papilas gigantes que se vincula con el contacto con un cuerpo extraño, como el uso de lentes de contacto blandos o rígidos, prótesis oculares, suturas expuestas en operaciones oculares y tumores dermoides límbicos. ⁽²⁾

Se estima que por el 6-30% de la población general puede presentar esta patología por sí sola, con o sin asociación a rinitis alérgica, siendo la conjuntivitis estacional la forma más común, aunque las variantes crónicas son las más frecuentes en la consulta oftalmológica. Por orden de frecuencia se presentan con una prevalencia que varía del 55-81% la conjuntivitis alérgica estacional, 10-81% la conjuntivitis alérgica perenne, 3.8-38.6% la queratoconjuntivitis vernal, 2.2-26.6% la queratoconjuntivitis atópica, 7% blefaroconjuntivitis de contacto y 2.9-4% la conjuntivitis papilar gigante. ⁽⁴⁾

En México, se desconoce su incidencia, pero 80% de los pacientes con conjuntivitis alérgica tiene también rinitis alérgica, asma y dermatitis atópica; en un porcentaje menor es concomitante con alergia a fármacos y a alimentos o urticaria. ⁽²⁾ Acorde a lo reportado por Morales-Marín se observó en una población pediátrica una incidencia de 3.15 casos por cada 1000 personas, siendo el tipo de

conjuntivitis alérgica más frecuente por clasificación la conjuntivitis alérgica perenne (75.3%), seguido por queratoconjuntivitis primaveral (14.6%).⁽⁵⁾

La queratoconjuntivitis vernal (QCV) es una patología inflamatoria que cursa con afectación bilateral y grave pudiendo producirse alteraciones visuales. Es la forma más rara, constituyendo entre el 0,5 y el 1 % de las enfermedades oculares en la mayoría de países. Los niños afectados suelen presentar antecedentes personales o familiares de atopia.⁽⁶⁾

La etiopatogenia de la queratoconjuntivitis vernal es desconocida. Se sugiere un mecanismo IgE mediado porque en el estudio histológico de esta afección se objetiva un aumento de mastocitos.⁽⁶⁾ La histología de se caracteriza por un infiltrado de eosinófilos, mastocitos degranulados, basófilos, células plasmáticas, linfocitos y macrófagos. Sin embargo la clínica y los cambios histopatológicos asociados no se explican sólo por un proceso mediado por mastocitos e IgE. La QCV sería la combinación de varias interacciones celulares que incluyen mastocitos, eosinófilos y linfocitos activados. Se ha demostrado un aumento de la expresión de RNAm para IL-3, IL-4 e IL-5 cuando se compara con tejido normal. En especial la expresión de RNAm para IL-5 es significativamente más alta en pacientes con QCV, QCA y en CPG que en controles sanos. También se ha observado aumento de la producción de IL-4 y descenso de IFN- γ , comparado con sujetos normales, mientras que la producción de IL-2 no cambia. Esto sugiere que la QCV tiene un perfil de células T tipo Th2. La detección de VCAM-1 en suero de pacientes con QCV la diferencia de las formas no proliferativas de conjuntivitis alérgica. El fluido lacrimal en la QCV contiene grandes cantidades de histamina. Los pacientes con QCV demuestran tener una mayor sensibilidad a la aplicación tópica de histamina que los controles sanos. Esto puede ser debido a la disminución de histaminasas en lágrima. El fluido lacrimal de la QCV contiene también MBP, ECP, cristales de Charcot-Leyden, basófilos, IgE e IgG específicas para aeroalérgenos (p. ej. polen de ambrosía) y eosinófilos (en el 90 % de los casos), LTB4 y LTC4. Se ha hallado factor de crecimiento nervioso en el estroma conjuntival de pacientes con QCV. Se ha encontrado eosinófilos degranulados y sus enzimas tóxicos como ECP y MBP en lágrimas y conjuntiva, así como en la periferia de úlceras corneales, sugiriendo su papel etiopatogénico en muchos problemas asociados a la QCV. Los queratocitos epiteliales promueven la producción de eotaxina por parte de IL-4. Los niveles de ECP están directamente relacionados con los síntomas clínicos y se reducen cuando se inicia tratamiento con antiinflamatorios (ciclosporina o dexametasona).⁽⁶⁾

El diagnóstico de esta entidad es clínico. No existe ningún estudio o prueba de laboratorio que sea sensible o específica para esta patología. Sin embargo, en estudios recientes se sugiere el estudio de los mediadores para el control evolutivo de la queratoconjuntivitis alérgica. La histología de esta conjuntivitis se caracteriza por el aumento de eosinófilos, mastocitos y células plasmáticas, así como alteraciones microvasculares y depósitos de fibrina. Esto conlleva a que en las lágrimas de estos pacientes se objetive aumento de histamina, triptasa, proteína catiónica y mayor básica del eosinófilo, y aumento de las moléculas de adhesión y leucotrienos. ⁽⁶⁾

La QCV es una enfermedad que se favorece por climas cálidos, siendo más común en lugares cercanos a los trópicos. Sin embargo, no es inusual ver este tipo de pacientes en Norteamérica. La prevalencia de queratoconjuntivitis vernal en Europa tiene un rango entre 1.2 y 10.6 casos por 10,000 personas, aunque la prevalencia de complicaciones corneales asociadas es mucho menor siendo cercana a los 0.3-2.3 casos por cada 10,000 personas. Típicamente se afecta la población joven. Se produce una hiperreactividad inespecífica que no se asocia a los niveles de alérgenos en el ambiente, por lo que es frecuente que las pruebas cutáneas y/o la medición de inmunoglobulina E sérica sean negativos. ⁽⁷⁾

La queratoconjuntivitis vernal se caracteriza por ser una forma crónica alérgica inflamatoria de la superficie ocular cuya patogénesis es mediada principalmente por linfocitos Th2 y en la cual también presentan un rol la sobreexpresión de mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, citocinas derivadas de Th2, quimiocinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, fibroblastos y linfocitos. Se han involucrado también la IL-4 e IL-13 en la formación de papilas gigantes por inducción de la producción de matriz extracelular y la proliferación de los fibroblastos conjuntivales. ⁽⁷⁾

Los síntomas oculares que produce son prurito muy severo que puede llegar a ser incapacitante, eritema, hinchazón y presencia de secreción. Frecuentemente pueden presentar fotofobia. El signo característico es la presencia de aproximadamente 10 a 20 papilas gigantes en la conjuntiva tarsal superior, que miden varios milímetros de diámetro formando un patrón de “empedrado”, entre las que puede encontrarse secreción mucosa. Estas papilas gigantes se encuentran llenas de células inflamatorias, edema y mastocitos, siendo estos últimos infrecuentes en la conjuntiva. Se pueden encontrar en abundancia neutrófilos, células plasmáticas, células mononucleares y eosinófilos. Se ha detectado la presencia de niveles altos de IgE y mediadores de mastocitos como la histamina,

leucotrienos, prostaglandinas y cinasas en muestras de lágrima de pacientes con queratoconjuntivitis vernal. La infiltración y activación masiva de eosinófilos es la responsable de las complicaciones corneales, por producción de factores epiteliotóxicos. (7)

Como manifestaciones corneales se puede observar una queratitis punteada en la córnea central, cuyos puntos pueden coalescer y formar una opacidad sincitial que comúnmente genera una placa blanquecina o grisácea por debajo del epitelio. Estas placas vernaes están formadas histológicamente por mucina y células epiteliales; y pueden interferir con la visión y generar cicatrices corneales centrales. Las placas pueden ser removidas con queratectomía superficial. Otra manifestación son los puntos de Tantra, signo de actividad de la enfermedad que desaparece cuando los síntomas remiten. Consisten de aglomerados de eosinófilos que se colectan en las criptas formadas de la unión entre la conjuntiva y la córnea. También llegan a incluir neutrófilos y células epiteliales. Se pueden presentar úlceras en escudo de forma oval, bien delimitadas, con opacificación estromal subyacente en los sectores superiores del epitelio corneal. Después de que sanan, puede quedar una opacidad en el estroma anterior. (7)

El grado de severidad de las enfermedades alérgicas oculares se basa principalmente en los cambios inflamatorios a nivel conjuntival, palpebral y corneal. Robles-Contreras y colaboradores proponen una clasificación que abarca estas características clínicas para evaluar la evolución de las conjuntivitis alérgicas. Proponen un sistema de grados con una escala del 0-4 para signos y síntomas, donde el grado 0=ausencia de la enfermedad, 2=leve, 3=moderado, 4=severo. Dentro de los síntomas evaluados se encuentran la presencia de prurito, lagrimeo, fotosensibilidad, sensación de cuerpo extraño y ardor ocular (figura 1). Entre los signos evaluados se toman aquellos implicados con inflamación de la superficie ocular como la posición de los párpados, el aspecto de la piel, el estado de la unión mucocutánea en el párpado buscando la presencia de disfunción de glandulas de meibomio, el aspecto de la secreción, involucro limbal y el estado corneal (figura 2 y tabla 2). Del total acumulado de puntos resultante de graduar los signos y síntomas (total de 48 puntos), se puede dividir en 0 puntos=sin actividad/ausencia de la enfermedad, 1-12 puntos=leve, 13-24 puntos=moderada, 25-36 puntos moderadamente severa y 36-48 puntos=severa. Se puede usar el puntaje del lado más afectado para el seguimiento en los casos bilaterales. Los signos característicos de la queratoconjuntivitis vernal tienden a estar en grado 2 y generalmente en grado 3 de la escala de signos.

Evaluation of Grade of Symptoms Severity for Allergic Ocular Diseases					
	0 None of the time	1 Some of the time	2 Half of the time	3 Most of the time	4 All of the time
Itching	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tearing	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Light Sensitivity	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gritty Sensation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Burning Sensation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Tabla 1. Evaluación clínica del grado de severidad de las enfermedades alérgicas oculares por sus síntomas. Reproducido con permiso de M. en C. Robles Contreras.

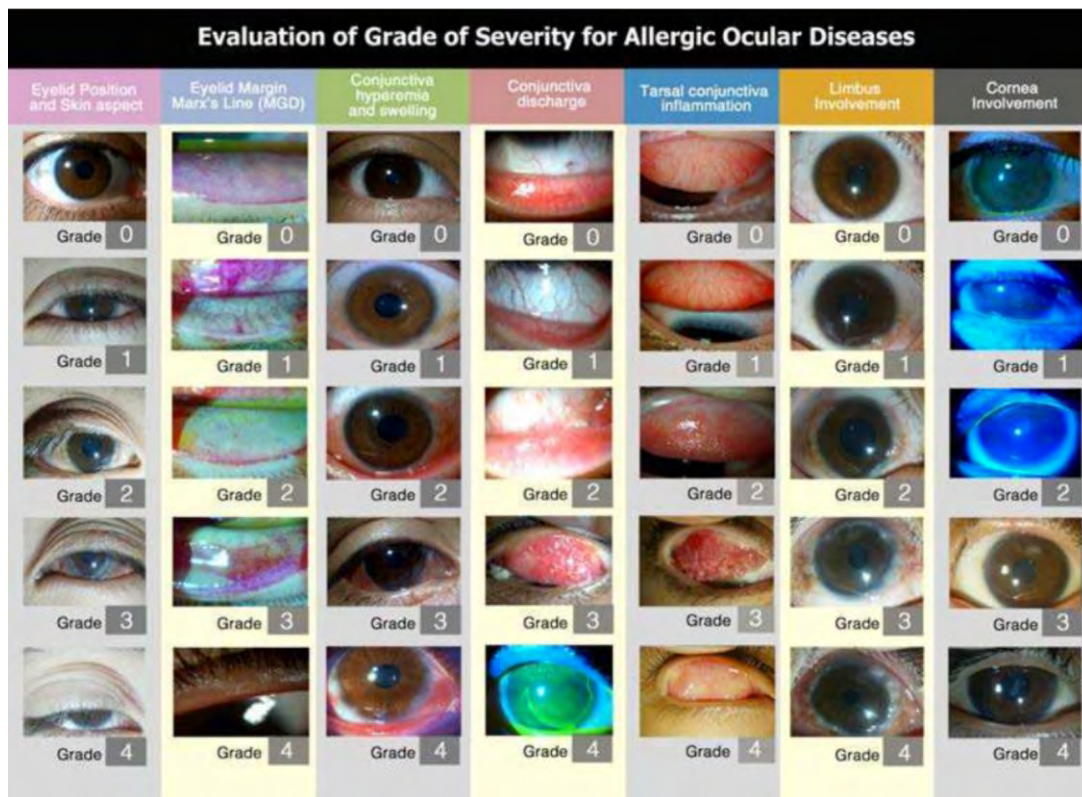


Figura 1. Evaluación clínica del grado de severidad de las enfermedades alérgicas oculares por sus signos clínicos. Reproducido con permiso de M. en C. Robles Contreras

Signos / Grados	Posición del párpado y aspecto de la piel	Margen del párpado (Línea de Marx)	Hiperemia conjuntival y quemosis	Descarga conjuntival	Respuesta inflamatoria de la conjuntiva tarsal	Involucro limbal	Involucro corneal
0	No hay edema palpebral	No hay desplazamiento de la unión mucocutánea	No hiperemia o edema	No descarga	No hiperplasia papilar o folículos visibles	No nódulos limbales o puntos visibles	No QPS
1	Edema del borde palpebral superior o inferior localizado sin línea de Dennie	1/3 desplazamiento de unión mucocutánea	Hiperemia 1 o 2 + con 1/3 edema rosado en conjuntiva, formación SIN pliegues en fondo de saco	Descarga acuosa clara y/o restos escasos	Menos 1/3 papilas con tamaño 0.3 con vasos uniformes visibles en conjuntiva tarsal	Menos 1 cuadrante con nódulos Trantas	Escasa QPS sin involucro central
2	Edema del borde palpebral con pseudoptosis y línea de Dennie	2/3 desplazamiento de unión mucocutánea	Hiperemia 2 o 3 + con 2/3 edema rojizo en conjuntiva, CON escasos pliegues en fondo de saco	Descarga mucosa grisáceo-blanquecina en fondo de saco o adherida a 1/3 del limbo o conjuntiva tarsal	1/3 - 2/3 de papilas moderadas (0.3-0.5 tamaño) con vasos delgados visibles en conjuntiva tarsal	1/4 - 1/2 de puntos de Trantas en limbo con escaso pigmento	1/4 - 1/2 de QPS sin compromiso del eje visual
3	Pseudoptosis unilateral o bilateral moderada y múltiples líneas de Dennie	Desplazamiento generalizado unión mucocutánea	Hiperemia >3+ con más 2/3 de edema con ingurgitación localizada en vasos ciliares, con moderada presencia de pliegues en fondo de saco	Hilos en fondo de saco de descarga mucosida copiosa y espesa (blanca, grisácea o amarillenta) o adherida a 2/3 del limbo o conjuntiva tarsal	Papilas en "empedrado" más 2/3 0.75 tamaño, con o sin fibrosis, vasos irregulares en conjuntiva tarsal	Más de 1/2 de nódulos Trantas en limbo con escaso-moderado pigmento o 1/4 - 1/2 de deficiencia de células limbales	QPS generalizada con compromiso del eje visual o defectos epiteliales, Úlcera corneal indolente en cuadrante superior
4	Pseudoptosis severa uni o bilateral con cambios en la textura y pigmentación de la piel. Signo de Hertoghe (+)	Cicatrización o queratinización	Hiperemia 3+ con ingurgitación generalizada de vasos ciliares. Pliegues conjuntivales severos en fondo de saco	Hilos de descarga mucosida adheridos a la superficie corneal	Escasas papilas >0.75 con fibrosis o macropapilas que se extruyen con posible acortamiento del fondo de saco (simblétron) conjuntiva con palidez generalizada sin vasos normales visibles	Nódulos de Trantas generalizados en limbo con fibrosis y pigmento o más de la mitad con deficiencia de células limbales	Queratocono con o sin leucoma central

Tabla 2. Evaluación clínica del grado de severidad de las enfermedades alérgicas oculares por sus signos clínicos. Reproducido con permiso de M. en C. Robles Contreras.

La queratoconjuntivitis vernal es una condición inflamatoria de la superficie ocular que se observa más comúnmente en hombres jóvenes, antes de la pubertad, que viven en sitios con climas cálidos y áridos. Es bilateral y recurrente, se caracteriza por presentar síntomas estacionales o perennes que se exacerbaban cuando ocurre durante la primavera, a principios de otoño e invierno. La inflamación prolongada por más de 3 años, aumenta la posibilidad de desarrollar síntomas perennes. El prurito intenso es el síntoma predominante durante las exacerbaciones, seguido de fotofobia, lagrimeo y descarga mucosa pegajosa. Su curso clínico es variable, tendiendo a involucrar al inicio el tarso y la conjuntiva limbal, lo cual lleva a 3 formas diferentes: una forma tarsal, una forma limbal y una mixta. En la primera, se puede notar hiperemia conjuntival, quemosis e hipertrofia de papilas de 0.5-0.75 mm de diámetro en aspecto de "empedrado", que representa el hallazgo principal de la enfermedad. El signo clásico de Maxwell- Lyons es la presencia de filamentos gruesos de moco sobre las papilas. En la forma limbal, se forman infiltrados gelatinosos amarillento-grisáceos en el limbo con bordes engrosados y con vascularización superficial periférica. Los puntos de Horner.-Trantas son puntos blancos, calcáreos resultado de la reacción eosinofílica en el borde de la conjuntiva limbal así como en la punta de los nódulos. También se

asocia con queratocono, el cual produce disminución permanente de la visión en 6% de los pacientes. El compromiso persistente de la córnea se produce en parte por la inflamación crónica limbal que lleva a desarrollar pérdida de la función de la células madre del limbo y fibrosis conjuntival por un apoyo estromal insuficiente. La meta terapéutica principal de las conjuntivitis alérgicas es mejorar la calidad de vida del paciente. Para ello, están disponibles diversos agentes en presentación tópica como vasoconstrictores, antihistamínicos, estabilizadores de mastocitos y antiinflamatorios entre otros. Algunos factores que pueden afectar la eficacia del tratamiento son el costo del medicamento y el uso de lentes de contacto. Las opciones de tratamiento para las diferentes formas de alergia ocular se dividen en tres acciones: primaria, secundaria y terciaria, además de los nuevos agentes tópicos en desarrollo.⁽⁸⁾

Relación entre IL-17 y la fisiopatogenia de la conjuntivitis alérgica

La respuesta inmune alérgica ocular es una enfermedad mediada por IgE que conlleva a inflamación. Resulta de la activación de 2 fases: una fase temprana en la cual se produce una respuesta en minutos después de la exposición a un alérgeno y que inicia cuando este se acopla a la IgE; y una fase tardía que empieza 6-12 horas después de la exposición y en la que se produce infiltración de células inflamatorias, principalmente neutrófilos, en la conjuntiva. Estas respuestas son coordinadas principalmente por el sistema inmune adaptativo, el cual se desencadena por activación de células T, las cuales se diferencian en diferentes subtipos celulares, siendo los 4 principales: Th2, Th1, Th17 y T reguladora. La principal célula involucrada es la Th2, que se presenta en respuestas de inmunidad humoral ante patógenos extracelulares, y que produce principalmente IL 4 e IL-5 para activar células B y producción de IgE. Sin embargo, existen otros subtipos que intervienen en este mecanismo. El conocimiento que se tiene sobre el rol de las células Th17 en la alergia ocular es escaso y mal entendido. Se ha reportado que no ejerce un papel en la infiltración de eosinófilos en la conjuntiva en algunos modelos de ratón en los que se suprime su producción silenciando los genes encargados de su producción, por lo que no tiene un rol en la alergia ocular estacional. Sin embargo, esto contrasta en formas de alergia ocular severa como la queratoconjuntivitis vernal en donde se ha demostrado un aumento en los niveles séricos de IL-17 comparados con controles sanos. No obstante, aun no se ha relacionado directamente la participación de células Th17 debido a que otras células también producen la interleucina, como la célula T gamma-delta. Se ha estudiado mejor el papel que presenta en el asma, donde se observa que recluta neutrófilos directamente a través de IL-8 o indirectamente a través de CXCL8 y factores estimulantes de colonias. Esto da lugar a formas de presentación más severas de asma por

infiltrado de neutrófilos en la mucosa, similar a los cambios típicamente observados en la conjuntiva en alergia ocular. Otros reportes refieren que algunos pacientes que presentan niveles elevados de IL-17 tienen un predominio de infiltración de neutrófilos y se asocian a formas de asma resistentes a esteroides. ⁽⁹⁾

Recientemente se ha relacionado la concentración de IL-17 con enfermedades inflamatorias oculares como con enfermedad inflamatoria sistémica y el grado de severidad clínica. Entre estas destacan principalmente la enfermedad injerto contra huésped, queratitis autoinmune, el síndrome de Sjögren y el síndrome de Stevens-Johnson. ⁽¹⁰⁾

En el tema de queratoconjuntivitis vernal, se han realizado múltiples estudios recientes para identificar proteínas solubles en lágrima asociadas a su patogenia, entre las cuales se ha encontrado IL-6sR.

A nuestro conocimiento, existen pocos estudios para detección de IL-17 en lágrima. El más reciente y representativo es el realizado por Micera y colaboradores, quienes llevaron una cohorte de 16 pacientes con queratoconjuntivitis vernal en la que estudiaron un esquema de 60 proteínas como potenciales candidatas para formar un perfil de detección entre una fase quiescente y activa de la enfermedad. Encontraron al menos 16 proteínas que determinaron como marcadores viables incluyendo a la IL-17, pero destacando principalmente la NT4, \square FGF, and MMP1 por ser marcadores presentes de forma importante únicamente en enfermedad activa. Sin embargo, se asocio IL-17 a la forma activa con valor significativo, encontrando un incremento de esta última ≥ 3.00 veces con respecto a los controles con $\square < 0.01$. ⁽¹¹⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad ocular alérgica es un problema común observado en el ámbito oftalmológico. **(1)** Se estima que por el 6-30% de la población general puede presentar esta patología por si sola, con o sin asociación a rinitis alérgica, siendo la conjuntivitis estacional la forma más común, aunque las variantes crónicas son las más frecuentes en la consulta oftalmológica. La queratoconjuntivitis vernal tiene una prevalencia del 2.2-26.6%. **(3)** La queratoconjuntivitis vernal es una patología inflamatoria que cursa con afectación bilateral y grave pudiendo producirse alteraciones visuales. Es la forma más rara, constituyendo entre el 0,5 y el 1 % de las enfermedades oculares en la mayoría de países. **(6)** El diagnóstico de esta entidad es clínico. No existe ningún estudio o prueba de laboratorio que sea sensible o específica para esta patología. Sin embargo, en estudios recientes se sugiere el estudio de los mediadores para el control evolutivo de la queratoconjuntivitis alérgica. **(6).**

Por esta razón, se desea estudiar con más detalle la presencia de esta patología en el hospital, así como ahondar en los mediadores inflamatorios que presenta la patología.

JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento existen solo 2 estudios que han relacionado la presencia de IL-17 en queratoconjuntivitis vernal, pero no existe un estudio que relacione la cantidad de IL-17 con los distintos tipos de conjuntivitis alérgica ni con el grado de severidad de la enfermedad. Esto adquiere relevancia debido a que puede desarrollarse como un marcador de severidad o de respuesta terapéutica.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una diferencia entre la concentración de IL-17 presente en muestras de lágrima de pacientes con conjuntivitis alérgica y pacientes sanos?

HIPÓTESIS

Existe una mayor concentración de IL-17 en muestras de lágrima de pacientes con conjuntivitis alérgica que en la muestra de pacientes sanos.

HIPÓTESIS ALTERNA

Existe una mayor concentración de IL-17 en muestras de lágrima de pacientes sanos que en la muestra de pacientes con conjuntivitis alérgica.

HIPÓTESIS NULA

No existe una diferencia entre la concentración de IL-17 presente en muestras de lágrima de pacientes con conjuntivitis alérgica y pacientes sanos.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Comparar la concentración de IL-17 en muestras de lágrima en pacientes con conjuntivitis alérgica y pacientes sanos.

Objetivo secundario:

Relacionar la concentración de IL-17 en muestras de lágrima en pacientes con distintos tipos de conjuntivitis alérgica y el grado de severidad clínica que presentan.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó un estudio prospectivo, transversal, observacional y analítico, previa aprobación del Comité de Ética interno de la institución, durante el periodo de Mayo del 2016 a Octubre de 2016.

Pacientes. Se incluyeron en el estudio pacientes que acudieron a consulta en los cuales se realizó el diagnóstico clínico de conjuntivitis alérgica, de cualquier edad y sexo. Como grupo control se incluyeron pacientes sin conjuntivitis alérgica de sexo y edad similar. Se excluyeron a los pacientes que presentaron condiciones inflamatorias con afección de la superficie ocular ajenas al padecimiento en estudio (ej, uveítis, trauma ocular), pacientes con antecedente de procedimiento quirúrgico ocular, pacientes con antecedente de uso de esteroides y/o algún otro medicamento antialérgico un mes previo a la toma de la muestra; y aquellos que no contaron con el consentimiento informado. Se eliminaron del estudio pacientes que tuvieron un seguimiento inadecuado, una muestra insuficiente para análisis y/o un expediente con datos incompletos.

Para distinción del tipo de conjuntivitis alérgica como conjuntivitis alérgica estacional, conjuntivitis alérgica perenne, queratoconjuntivitis vernal o queratoconjuntivitis atópica se registraron la edad, sexo, tiempo de evolución de la patología, época de mayor afectación, terapia médica usada previamente, patología alérgica asociada (Rinitis alérgica, dermatitis atópica y asma).

Evaluación de la severidad clínica. Debido a que no encontramos existencia de un parámetro estandarizado internacional para medición del grado de severidad clínica, se utilizó la escala de severidad clínica para enfermedades alérgicas oculares reportada por Robles y Santacruz ⁽⁷⁾ que se basa principalmente en los cambios inflamatorios a nivel conjuntival, palpebral y corneal. Se establece un sistema de grados con una escala del 0-4 para signos y síntomas, donde el grado 0=ausencia de la enfermedad, 2=leve, 3=moderado, 4=severo. Dentro de los síntomas evaluados se encuentran la presencia de prurito, lagrimeo, fotosensibilidad, sensación de cuerpo extraño y ardor ocular. Entre los signos evaluados se

toman aquellos implicados con inflamación de la superficie ocular como la posición de los párpados, el aspecto de la piel, el estado de la unión mucocutánea en el párpado buscando la presencia de disfunción de glándulas de meibomio, el aspecto de la secreción, involucro limbal y el estado corneal. Del total acumulado de puntos resultante (total de 48 puntos), se puede dividir en 0 puntos = sin actividad/ausencia de la enfermedad, 1-12 puntos = leve, 13-24 puntos = moderada, 25-36 puntos = moderadamente severa y 36-48 puntos = severa. Se utilizó el puntaje del lado más afectado en los casos bilaterales. La medición la realizó el mismo explorador.

Toma de muestra lagrimal. Las muestras de lágrima se recolectaron, previa firma del consentimiento informado. Se recolectaron las muestras en el mismo cuarto de examinación para minimizar el efecto de la humedad ambiental. No se utilizó anestésico tópico para evitar diluir la lágrima. Se instilaron dos gotas de solución salina estéril de manera tópica en ambos ojos del paciente, y se recuperó lo instilado mediante la colocación de un tubo capilar estéril sobre el canto externo evitando el contacto con la piel. Se repite la operación hasta 3 veces con intervalos de 30 minutos para recolectar el volumen necesario para análisis (mayor a 0.2 ml). Posteriormente la muestra se depositó en un frasco estéril y se almacenó a temperaturas de -80 grados centígrados hasta su posterior procesamiento.

Niveles de IL-17 lagrimal. Se midieron las concentraciones de IL-17 utilizando un equipo comercialmente adquirible para ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) siguiendo las instrucciones del proveedor (Quantikine D1700 Human IL-17 Immunoassay; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Se estableció una curva estandarizada a partir de los reactivos control del equipo, y se determinó la cantidad de IL-17 presente en las muestras de lágrima en pg/ml para cada ojo.

Análisis estadístico. Se integraron los datos en una base en Excel, y se realizó el análisis estadístico por medio del Software Graphpad prism Versión 6.0. Se utilizaron pruebas no paramétricas univariadas (U de Mann-Whitney) y multivariadas (ANOVA de una vía) para los comparar los promedios de concentración de IL-17 entre los distintos grupos. Para valorar la relación entre la el grado de severidad clínico y la concentración de IL-17 se utilizó

el análisis de correlación de Pearson. Para todas las pruebas se fijó un valor de $p < 0.05$ para considerarlas significativas.

Criterios de Inclusión:

Pacientes de cualquier edad y sexo

Diagnóstico de Conjuntivitis alérgica confirmado por el Servicio de Córnea y Cirugía Refractiva. de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P.

Criterios de Exclusión:

Pacientes que presenten condiciones inflamatorias que afecten la superficie ocular ajenas al padecimiento en estudio (ej, uveítis, trauma ocular)

Pacientes a los que se les haya realizado un procedimiento quirúrgico ocular

No contar con consentimiento informado firmado

Criterios de Eliminación

Pacientes que no cuenten con un seguimiento adecuado

Pacientes que no tengan una muestra suficiente para análisis de IL-17 por kit de ELISA

Pacientes que rechazan participar en el estudio

ASPECTOS ÉTICOS

A todos los participantes se les otorgó una Hoja de consentimiento informado a firmar para corroborar su participación, y fueron sometidos a una toma de muestra de la lesión para la realización de la prueba con kit de ELISA para IL-17. Los efectos adversos reportados por la literatura para la técnica de procuración de muestra fueron reportados previamente.

ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD

El estudio se apegó a las pautas establecidas por la Declaración de Helsinki y a los aspectos bioéticos inherentes y actuales de la investigación básica. Para la realización de este estudio se tomó una muestra de la lágrima con las debidas medidas de seguridad. El material de desecho generado, fue tratado y clasificado de acuerdo a la norma oficial. Esta muestra no genera riesgos por exposición a la misma.

RECURSOS FINANCIEROS

Los recursos necesarios y los estudios correspondientes para la realización de esta investigación, se solicitaron por los medios apropiados a la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz. Se entregaron en tiempo y forma debidos presupuesto de cotización de (1) kit ELISA Quantikine Modelo D17000 - costo a la última cotización 776 dólares americanos. Investigador principal, asesor metodológico. Material ocupado para recolección de muestra de lágrima en centro de investigación biomédica.

RESULTADOS

Se recolectaron y procesaron 42 muestras de lágrima de 21 pacientes con conjuntivitis alérgica de diferentes tipos y grados de severidad, así como 4 muestras de lágrima de 2 pacientes sanos. La edad promedio del grupo de pacientes con conjuntivitis alérgica fue de 14.66 años \pm 12.18 años con un rango de 4-64 años. Las características clínicas se presentan a continuación en la tabla 3, no se presentaron diferencias estadísticamente significativa para estas características entre grupos ($p > 0.05$).

Grupos	Número de ojos n (%)	Promedio de edad (años)	Promedio de puntaje de severidad clínica
Control	4 (100)	13.5 \pm 4.5	-
Estacional	32 (76)	14.75 \pm 13.71	14 \pm 4
Perenne	6 (14)	15.33 \pm 7.4	12 \pm 12.30
QCV	4 (9)	23 \pm 5.66	21.5 \pm 0.71
Leve	18 (43)	12.44 \pm 4.67	9 \pm 2.74
Moderado	24 (57)	16.33 \pm 15.72	18.50 \pm 3.55

Tabla 3. Características clínicas del grupo control y grupo de estudio. Se subdividieron en grado de severidad clínica y tipos de conjuntivitis. Abreviaturas: QCV= Queratoconjuntivitis vernal. Los datos de edad y puntaje clínico se presentan en valor promedio \pm desviación estándar. No se presentan diferencias significativas entre grupos ($p > 0.05$)

Los valores promedio de IL-17 obtenidos de las muestras de lágrima se presentan a continuación en

la tabla 4. Al comparar las concentraciones de IL-17 como se muestra en la figura 2, se observó que existe una mayor concentración de IL-17 en el grupo control con respecto al grupo muestra tanto en conjunto como divididos por grados de severidad clínica tanto con los pacientes con severidad leve como moderada de forma significativa ($p < 0.01$). Sin embargo, al relacionar por tipo de conjuntivitis alérgica no se encontraron diferencias significativas con el grupo control ($p > 0.05$). Al analizar la concentración de IL-17 comparando entre los distintos tipos de conjuntivitis alérgica no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), como se observa en la figura 3.

	Valor Interleucina-17 (pg/ml) promedio
Control	68.6 ± 22.76
Leve	13.56 ± 21.81
Moderado	6.71 ± 10.33
Estacional	9.42 ± 15.93
Perenne	11.72 ± 24
QCV	4.98 ± 7.57

Tabla 2. Valores de Interleucina-17 del grupo control y grupo de estudio. Concentración promedio de Interleucina-17 con desviación estándar en muestras de lágrima del grupo control y grupos divididos por grado de severidad clínica y tipo de conjuntivitis alérgica. Abreviaturas: QCV= Queratoconjuntivitis vernal.

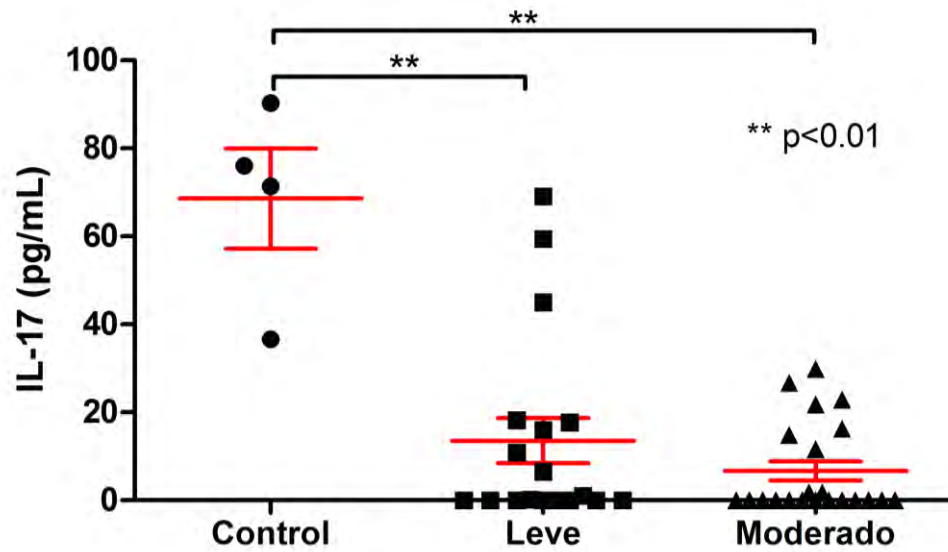


Figura 2. Comparación de la concentración de IL-17 en muestras de lágrima de pacientes del grupo control y su relación con grupos de severidad clínica leve y moderado de los pacientes con conjuntivitis alérgica. Para la comparación de todos los grupos se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente se realizó una prueba de U de Mann Whitney donde una $p < 0.05$ es considerada una diferencia estadísticamente significativa. ** $P < 0.01$

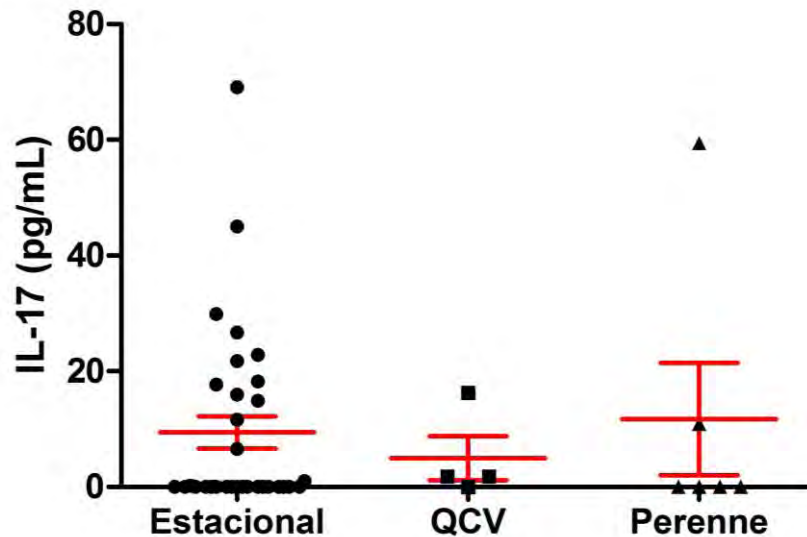


Figura 3. Comparación de la concentración de IL-17 en muestras de lágrima de pacientes con distintos tipos de conjuntivitis alérgica. Para la comparación de todos los grupos se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente se realizó una prueba de U de Mann Whitney donde una $p < 0.05$ es considerada una diferencia estadísticamente significativa. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos tipos de conjuntivitis alérgica ($p > 0.05$). Abreviaturas: QCV= Queratoconjuntivitis vernal.

El análisis de correlación entre los niveles de IL-17 y el grado de puntaje clínico tomando en cuenta únicamente el puntaje de los signos clínicos se observó una correlación con tendencia negativa significativa ($p < 0.05$) como se muestra en la figura 4.

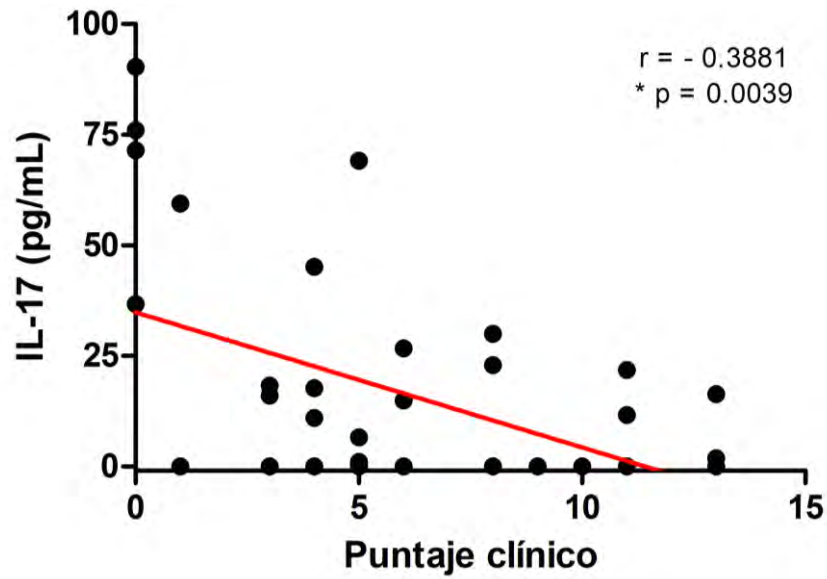


Figura 4. Correlación entre el puntaje clínico y la concentración de IL-17 en muestras de lágrima de pacientes del grupo control y pacientes con conjuntivitis alérgica. Se realizó una correlación de Pearson encontrando una correlación negativa con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Discusión

Recientemente se ha relacionado la concentración de IL-17 con enfermedades inflamatorias oculares y su grado de severidad clínica. Entre estas destacan principalmente la enfermedad injerto contra huésped, queratitis autoinmune, el síndrome de Sjögren y el síndrome de Stevens-Johnson. Kang y colaboradores correlacionaron positivamente la concentración de IL-17 con el grado de severidad clínica corneal en estas enfermedades, sugiriendo un mecanismo patogénico de esta citocina y por lo tanto un marcador factible de cuantificación de la actividad.⁸

Similarmente, Tan y colaboradores correlacionaron niveles aumentados de IL-17 en lágrima y la severidad clínica de pacientes con síndrome ojo seco asociado y no asociado a Síndrome de Sjögren.⁹

Sin embargo, a nuestro conocimiento, existen pocos estudios sobre detección de IL-17 y su relación con el mecanismo alérgico ocular. Calder y colaboradores encontraron la presencia del receptor para IL-17 a nivel conjuntival así como secreción de IL-8 y CD44, ambas moléculas proinflamatorias, en respuesta a la aplicación de IL-17A externa.¹⁰

El estudio más reciente y representativo de IL-17 en lágrima es el realizado por Micera y colaboradores, quienes llevaron una cohorte de 16 pacientes con queratoconjuntivitis vernal en la que estudiaron un esquema de 60 proteínas como potenciales candidatas para formar un perfil de detección entre las fases quiescente y activa de la enfermedad. Encontraron al menos 16 proteínas que determinaron como marcadores viables incluyendo a la IL-17, pero destacando principalmente la NT4, FGF, and MMP1 por ser marcadores presentes de forma importante únicamente en enfermedad activa. Sin embargo, se asoció IL-17 a la forma activa con valor significativo, encontrando un incremento de esta última ≥ 3.00 veces con respecto a los controles con $p < 0.01$, aunque no se reporta la concentración de la citocina. ⁽¹¹⁾

Hasta el momento no encontramos estudios que reporten la relación la concentración de IL-17 en individuos sanos y con conjuntivitis alérgicas, así como su relación con el grado de severidad. La población de nuestro estudio es una población joven predominantemente masculina, sin diferencias importantes entre los grupos lo cual permite una comparación adecuada en condiciones similares. La forma más frecuente encontrada fue estacional, lo cual se puede deber a la captura de pacientes en el sistema de atención del hospital. La relación entre la concentración de IL-17 entre el grupo control se relacionó negativamente en el análisis contra los grupos con severidad leve y moderada. Se encontró una tendencia negativa significativa al correlacionar el puntaje clínico de los signos con los niveles de IL-17 que establece la posibilidad de que a mayor puntaje clínico se encuentra un menor grado de afección clínica. Es de notar esta relación debido a que otros modelos de enfermedades inflamatorias de la superficie ocular presentan una relación contraria, lo que implica un rol patogénico de la IL-17 en la cronicidad y severidad del la inflamación. La respuesta observada en nuestro estudio pudiera explicarse parcialmente por la respuesta que se ha hallado en modelos de asma murinos y su relación con IL-17. En estos se observó una posible función reguladora negativa durante la fase efectora en el asma ya que disminuye la función de las células presentadoras de antígenos, reduciendo así la expresión de citocinas de los linfocitos Th2 a distintos niveles como pulmón y nódulos linfáticos y por lo tanto disminuyendo la sensibilización a antígenos. Se cree que ese resultado variable en el efecto puede tener relación con el órgano donde actúa la IL-17. ¹²

Asimismo, no se encontró relación entre los niveles de IL-17 entre los distintos tipos de conjuntivitis alérgica. Existen dos factores que pueden generar este comportamiento, incluyendo la distribución de pacientes dentro de los grupos. El segundo factor se asocia al comportamiento de la patología. La queratoconjuntivitis vernal suele ser una patología inflamatoria marcada que se podría esperar aumentara más la concentración de IL-17 que el resto de los tipos. Sin embargo, esta diferencia encontrada puede deberse a que los pacientes analizados presentaron un grado moderado de

sintomatología, que puede corresponder con la fase quiescente de la enfermedad y por lo tanto una menor concentración de IL-17. (11)

La principal limitación del presente estudio es la cantidad de pacientes para el grupo control debido a que esta reducida mientras que los pacientes con conjuntivitis alérgica en la muestra asemejan en forma similar la proporción de frecuencia en la población. Esta falta de personas sanas adecuada reduce la posibilidad de un análisis estadístico contundente. Además, la escala de severidad clínica presenta rangos arbitrariamente dispuestos para clasificación y asigna valores similares para los síntomas que para los signos. Esto cobra importancia ya que hay variaciones importantes entre signos clínicos, como pudiera ser la presencia de queratopatía punteada superficial y el siguiente escalón que incluye una úlcera en escudo, que tienen un puntaje muy reducido y por lo tanto disminuyen la variación en el puntaje. También se debe considerar que estos signos no se presentan estrictamente en forma progresiva sino que son variantes del espectro clínico variado de la enfermedad alérgica ocular e inclusive algunos de estos son alteraciones asociadas pero no estrictamente un estadio final de la patología, como pudiera ser la presencia del queratocono.

Conclusiones

Las concentraciones de IL-17 en las muestras de lágrima en la población sana fue mayor que la encontrada en los pacientes con conjuntivitis alérgica. No existe una diferencia en la concentración de IL-17 en lágrimas de pacientes con distintos tipos de conjuntivitis alérgica. No obstante, existe una relación entre la concentración de IL-17 en lágrimas de pacientes con conjuntivitis alérgica y el grado de severidad clínica. que propone una tendencia de que a mayor cantidad de IL-17 se encuentra puede haber menor severidad clínica. Para confirmar esta posibilidad se debe ampliar la muestra del grupo control.

Bibliografía

1. Garg A, Sheppard J, E D, Meyer D, Mehta C. Ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular. 1st ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2008.
2. Leonardi A, Castegnaro A, Valerio A, Lazzarini D. Epidemiology of allergic conjunctivitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2015;15(5):482-488.
3. Zepeda Ortega B, Rosas Vargas M, Ito tsuchiya F, del Río Navarro B, Sienna Monge J. Conjuntivitis alérgica en la Infancia. *Rev Alerg Mex*. 2016;54(2):41-53.
4. Morales Marin D, Zepeda Ortega B, Mendieta Alcántara G. Epidemiología y tratamiento de conjuntivitis alérgica en un hospital pediátrico. *Arch Inv Mat Inf*. 2010;2(3):108-112.
5. Reyes N, Saban D. T helper subsets in allergic eye disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2014;14(5):477-484
6. La Rosa M, Lionetti E, Reibaldi M, Russo A, Longo A, Leonardi S et al. Allergic conjunctivitis: a comprehensive review of the literature. *Ital J Pediatr*. 2013;39(1):18.
7. Robles-Contreras A, Santacruz C, Ayala J, Bracamontes E, Godinez V, Estrada-García I, et al. Allergic Conjunctivitis: An Immunological Point of View. En Zdenek Pelikan. *Conjunctivitis - A Complex and Multifaceted Disorder*. InTech, 2011.
8. Kang M, Kim M, Lee H, Lee H, Wee W, Lee J. Interleukin-17 in Various Ocular Surface Inflammatory Diseases. *Journal of Korean Medical Science*. 2011;26(7):938-944.
9. Tan X, Sun S, Liu Y, Zhu T, Wang K, Ren T et al. Analysis of Th17-associated cytokines in tears of patients with dry eye syndrome. *Eye*. 2014;28(5):608-613.
10. Calder V, Offiah I, Galatowicz G, Mellors R, Calonge M, Stern ME. Conjunctival Expression of Interleukin-17 Receptors in Chronic Allergic Eye Disease: An Immunoregulatory Role for Interleukin-17 on Conjunctival Epithelial Cells. *Invest. Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(14):6631.
11. Micera A, Di Zazzo A, Esposito G, Sgrulletta R, Calder V, Bonini S. Quiescent and Active Tear Protein Profiles to Predict Vernal Keratoconjunctivitis Reactivation. *BioMed Research International*. 2016;2016:1-10

12. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(12):2715-2725.