



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Comparación de mediadores inflamatorios en lágrima de sujetos operados de cirugía refractiva con dos técnicas diferentes: Femto-LASIK versus SMILE”**

Que para optar por el grado de  
Maestría en Ciencias Médicas

PRESENTA

Christian Denisse Pinkus Herrera

TUTORA

Dra. María del Carmen Jiménez Martínez

Programa de Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Ciudad de México, Septiembre 2018.



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.

## Agradecimientos

### Agradecimientos Institucionales

Este trabajo fue dirigido por la Dra. María C. Jiménez Martínez y Dr. Luis Alberto Salazar del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM / Unidad Periférica “Conde de Valenciana”

La realización de esta tesis fue posible gracias a

- Programa de Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.
- Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). No. de CVU: **746489**.
- Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana.

### Agradecimientos personales

Agradezco a las personas que me apoyaron durante el tiempo del curso de maestría y para la realización de esta tesis para obtener el grado:

- A mi Comité Tutorial.
- A mis profesores del Departamento de Córnea y Cirugía Refractiva del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana.
- A mis profesores del programa de Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

### Dedicatoria

Dedico este trabajo de tesis a mi madre, por su amor y apoyo incondicional.

### Comité tutorial

María del Carmen Jiménez Martínez  
Enrique Graue Hernández  
Henry Velázquez Soto

## Contenido

<b>Introducción .....</b>	<b>6</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>6</b>
<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>14</b>
<b>Pregunta de investigación .....</b>	<b>14</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>14</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>15</b>
<b>Diseño del estudio .....</b>	<b>15</b>
<b>Material y métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>Tamaño de muestra .....</b>	<b>17</b>
<b>VARIABLES DE ESTUDIO .....</b>	<b>17</b>
<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>18</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>19</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>26</b>
<b>Conclusión .....</b>	<b>27</b>
<b>Financiamiento de la investigación .....</b>	<b>28</b>
<b>Declaración de conflicto de intereses de los investigadores .....</b>	<b>28</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>29</b>
<b>Apéndices .....</b>	<b>32</b>

## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1:</b> Función de células Th17.....	10
<b>Figura 2:</b> Concentraciones de citocinas lagrimales en ambos grupos de estudio y en los diferentes tiempos. ....	22
<b>Figura 3:</b> Concentraciones de IL-17 en ambos grupos en los diferentes tiempos. ....	23
<b>Figura 4:</b> Comparación del índice de concentración para IL-17 de ambos grupos. ....	23
<b>Figura 5:</b> Concentraciones de IL-6 en el grupo de SMILE.....	24
<b>Figura 6:</b> Concentraciones de IL-6 en el grupo de Femto-LASIK.....	24
<b>Figura 7:</b> Comparación de índices de concentraciones de IL-6 de ambos grupos. ....	25
<b>Tabla 1.</b> Características basales de los grupos estudiados.....	19
<b>Tabla 2.</b> Valores basales de los diferentes mediadores inflamatorios en lágrima.....	19
<b>Tabla 3.</b> Cambios en la concentración de las citocinas antes y después de cirugía refractiva en el grupo de SMILE. ....	20
<b>Tabla 4.</b> Cambios en la concentración de las citocinas antes y después de cirugía refractiva en el grupo de Femto-LASIK.....	20

## Índice de abreviaturas

<i>ADN:</i> ácido desoxirribonucleico.....	8
<i>FDA:</i> Food and Drug Administration.....	7
<i>Femto-LASIK:</i> LASIK asistido por femtosegundo.....	6, 8, 9
<i>FLEx:</i> Femtosecond lenticule extraction.....	9
<i>G-CSF:</i> factor estimulante de colonias de granulocitos.....	10
<i>GM-CSF:</i> factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.....	10
<i>ICAM-1:</i> Molécula de adhesión intercelular 1.....	8
<i>IFN <math>\gamma</math>:</i> interfección gamma.....	12
<i>IL-1:</i> Interleucina 1.....	7, 9, 11
<i>IL-10:</i> Interleucina 10.....	9, 12
<i>IL-12:</i> Interleucina 12.....	7
<i>IL-17A:</i> Interleucina 17A.....	9, 10, 12
<i>IL-2:</i> Interleucina 2.....	9, 12
<i>IL-4:</i> Interleucina 4.....	9, 13
<i>IL-6:</i> Interleucina 6.....	7, 9, 11, 12
<i>IL-8:</i> Interleucina 8.....	7
<i>LASIK:</i> laser-assisted in situ keratomileusis.....	6, 7
<i>MAPK:</i> proteína quinasas activadas por mitógenos.....	11
<i>MCP-1:</i> proteína quimioatrayente de monocitos 1.....	7
<i>MMP-9:</i> metaloproteínasa de la matriz 9.....	11

<i>NF- κB</i> : factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.....	11
<i>NGF</i> : Factor de crecimiento neural.....	8, 9
<i>NK</i> : células asesinas naturales.....	11, 12
<i>NKT</i> : Células asesinas naturales invariantes.....	10
<i>OSDI</i> : Ocular Surface Disease Index.....	8, 9
<i>RANTES</i> : regulated upon activation normal T cell expressed and secreted.....	7
<i>SMILE</i> : Small Incision Lenticule Extraction.....	6, 7, 8, 9
<i>TGF beta1</i> : Factor de crecimiento transformante beta.....	9
<i>Th1</i> : Linfocitos T helper 1.....	12
<i>Th17</i> : Linfocitos T helper 17.....	10, 11, 12
<i>Th2</i> : Linfocitos T helper 2.....	12, 13
<i>TNF-alfa</i> : Factor de necrosis tumoral alfa.....	8, 9, 11
<i>TUNEL</i> : marcado de final de corte de dUTP.....	8
<i>VEGF</i> : factor de crecimiento endotelial vascular.....	11

## Introducción

### Cirugía refractiva

El error refractivo es una causa importante de discapacidad visual corregible. La prevalencia de error refractivo en Estados Unidos en mayores de 20 años de edad se estima que es mayor del 50%. El error refractivo más común es astigmatismo, miopía e hipermetropía con un 36.2%, 33.1% y 3.6% respectivamente<sup>1</sup>.

La cirugía refractiva tiene el propósito de corregir el error refractivo y reducir la dependencia del uso de lentes de contacto o anteojos para las actividades rutinarias. En general se clasifica la cirugía en corneal o intraocular. La técnica de *LASIK* (laser-assisted in situ keratomileusis) y la técnica de *SMILE* (Small Incision Lenticule Extraction) son procedimientos corneales también llamados queratorrefractivos<sup>2</sup>. En el Reino Unido, se estima que aproximadamente en el 2.2% de la población se ha realizado cirugía refractiva con laser<sup>3</sup>.

## Antecedentes

### 1. LASIK

En las últimas 2 décadas, la cirugía refractiva LASIK se ha vuelto la más popular<sup>4</sup>. Fue introducida en el año 1990 por Pallikaris y cols.<sup>5</sup> Esta consiste en realizar un corte en la córnea para crear un flap o colgajo con un microqueratomo seguido de ablación con excimer laser del estroma con la refracción a tratar<sup>6</sup>, en general se han mostrado buenos resultados visuales y refractivos. En Estados Unidos de América se realizan aproximadamente un millón de procedimientos por año<sup>7</sup>. Existe una variante en la cual se puede realizar *LASIK* asistido por laser de femtosegundo, llamado *Femto-LASIK*, en donde se utiliza este laser para la realización del flap, así, no existe necesidad de utilizar una navaja, esto ha demostrado mejor predictibilidad en la profundidad del flap, lo que lleva a mayor seguridad y precisión<sup>8</sup>, sin embargo la utilización del laser de femtosegundo incrementa de manera importante el costo de la cirugía.

El efecto adverso más común de *LASIK* y de *Femto-LASIK* es el ojo seco<sup>7,9,10</sup>, se ha reportado en varios estudios diferentes incidencias, entre 20% y 60%<sup>11</sup>. El ojo seco puede afectar no solamente los resultados visuales, sino la calidad de vida en los sujetos sometidos a esta cirugía, los cuales, son en su mayoría jóvenes y laboralmente activos<sup>7</sup>. Este efecto adverso ha sido atribuido principalmente al daño que se produce en los nervios corneales por la creación del flap, lo cual afecta la sensibilidad corneal<sup>9,10,12,13</sup>, esto conlleva a la reducción en el reflejo de parpadeo y al aumento en la evaporación de la lágrima provocando inestabilidad en la película lagrimal<sup>14</sup>.

Además de lo mencionado, las fluctuaciones de los mediadores inflamatorios en el postoperatorio son clave para el daño en la superficie ocular. Se han descrito interacción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en la modulación de la reparación de herida corneal, así como migración celular y apoptosis después de cirugía refractiva<sup>12,14</sup>. Es probable que otras sustancias de señalización participen, como son los neuropéptidos y otros transmisores neuronales<sup>15,16,17</sup>, ya que la córnea es uno de los tejidos mayormente inervados, con fibras nerviosas derivadas del ganglio trigeminal<sup>16,18</sup>.

Los primeros estudios de citocinas en lágrima datan desde 1998, fueron realizados por Nakamura y colaboradores donde encontraron citocinas inflamatorias en lágrima de sujetos sanos, como *IL-1* alfa y beta, *IL-6* e *IL-8*.<sup>19</sup>

En un estudio donde se analizaron los cambios en niveles de citocinas y quimiocinas en lágrima antes y después de realizarse *LASIK*, observaron que la única citocina encontrada consistentemente en lágrima antes de *LASIK* fue *IL-8*. Los niveles en lágrima de *MCP-1*, *RANTES*, *IL-8* y eotaxina incrementaron 24 horas después de cirugía, siendo solamente significativa el aumento de eotaxina. La citocina inflamatoria *IL-12* aumentó una hora después de cirugía con significancia<sup>6</sup>. Los autores sugieren que estas citocinas son importantes para modular la reparación de herida corneal con el potencial de inducir inflamación.

Resan y colaboradores, midieron concentraciones de *IL-6* la cual es una citocina proinflamatoria, en lágrima antes, a la hora 1 y 24 después de *LASIK*, observando que aumenta el porcentaje de ojos con *IL-6* detectada respecto al porcentaje de ojos preoperatorio<sup>20</sup>. Estos autores sugieren que la *IL-6* tiene un papel en la reparación de herida corneal después de fotoablación estromal.

## **2. SMILE**

Actualmente está disponible el laser de femtosegundo el cual produce pulsos de luz ultra cortos a una tasa de repetición de 200kHz con un pulso de energía menor de 300nJ, es enfocado a una profundidad precisa en la córnea, al aplicarse el laser se forma un estado de plasma y posteriormente se convierte en una burbuja de gas por la evaporación del tejido<sup>21</sup>. Este laser puede pasar a través de las capas transparentes y así ser enfocado en cualquier área intraestromal en la córnea<sup>4</sup>.

La técnica de *SMILE* se volvió comercialmente disponible en el año 2012.<sup>4</sup> Es un procedimiento en el cual se utiliza laser de femtosegundo para crear una lentícula intraestromal con la refracción del paciente, la cual se remueve mediante una pequeña incisión corneal de 2 a 4 mm. No necesita de ablación con excimer laser ni hacer un flap, por lo que el daño a los nervios corneales es menor; ha mostrado excelente eficacia, seguridad y predictibilidad<sup>7,18</sup>. Recientemente esta técnica fue aprobada por la *FDA* (Food and Drug Administration) en 2016 en Estados Unidos.

En un meta análisis por Shen y colaboradores, se concluyó que las técnicas de *Femto-LASIK* y *SMILE* son seguras, efectivas y predecibles, sin embargo la sintomatología de ojo seco y la sensibilidad corneal son mejores con la técnica de *SMILE*<sup>8</sup>.

En otro meta análisis por Kobashi y colaboradores, encontraron que el tiempo de ruptura de película lagrimal, sintomatología medida por los resultados del cuestionario *OSDI* (Ocular Surface Disease Index), sensibilidad corneal y densidad de nervios sub basales corneales fueron mejores en la técnica de *SMILE* en comparación con la técnica de *femto-LASIK*<sup>11</sup>.

Existen pocos estudios sobre marcadores inflamatorios en la técnica de *SMILE*. En un estudio realizado por Dong y colaboradores<sup>22</sup>, en ojos de conejos se comparó la respuesta inflamatoria y reparación de la herida en ojos operados de *femto-LASIK* y ojos operados de *SMILE*, se demostró que la técnica *SMILE* puede inducir menor apoptosis, proliferación e inflamación en comparación con *femto-LASIK*, en este estudio midieron el marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa (*TUNEL*) el cual es un método para detectar fragmentación de *ADN* y detectar células apoptóticas a las 4 y 24 horas después de cirugía. También midieron la expresión del marcador celular Ki67, el cual es un marcador de la fase G1-M de mitosis para detectar la proliferación de queratocitos, se midió al día 3, semana 1 y mes 1. También midieron CD11b para detectar inflamación, CD11b es un marcador de monocitos, se midió al día 1 y 3, y semana 1. Encontraron menor cantidad de células estromales positivas para *TUNEL* en el grupo de *SMILE* en todas las mediciones con significancia estadística. Ambos grupos mostraron células positivas para Ki67 en todas las mediciones, sin embargo el grupo de *SMILE* mostró menor cantidad de células Ki67 positivas con significancia estadística. Las células CD11b positivas fueron significativamente menor en el grupo de *SMILE* en todas las mediciones.

Se sugiere que estas diferencias entre *SMILE* y *femto-LASIK* se debe al menor trauma epitelial y estromal inducido por la incisión pequeña y por el menor contacto con citocinas ya que no es necesario el levantamiento del cap<sup>22</sup>.

En otro estudio realizado por Gao y colaboradores<sup>12</sup> compararon *SMILE* contra *femto-LASIK*, evaluaron previo a cirugía, al día 1, semana 1, mes 1 y mes 3, parámetros de superficie ocular como tinción con fluoresceína, tiempo de ruptura de película lagrimal, Schirmer I, índice de enfermedad de superficie ocular *OSDI* y sensibilidad corneal central. En lágrima midieron antes de cirugía, al día 1, semana 1 y mes 1 postoperatorio las concentraciones de interleucina 6 (*IL-6*), factor de necrosis tumoral alfa (*TNF-alfa*), factor de crecimiento neural (*NGF*) y molécula de adhesión 1 (*ICAM-1*). Observaron niveles elevados en lágrima de *IL-6* en ambos grupos, sin embargo el grupo de *SMILE* recuperó niveles preoperatorios antes que el grupo de *femto-LASIK* y las concentraciones fueron menores; otro mediador elevado fue el factor de crecimiento neural (*NGF*) en lágrima después de *SMILE* y de *Femto-LASIK*, siendo mayor en el grupo de *Femto-LASIK*, por lo que estos marcadores pueden representar un rol importante en el proceso de reparación de daño de la superficie ocular. El *TNF-alfa* y el *ICAM-1* no presentaron diferencias en ninguna medición postoperatoria respecto a la medición basal. En cuanto a los parámetros de superficie ocular, se

encontró en general recuperación más rápida a valores preoperatorios en el grupo de *SMILE* que en el de *femto-LASIK*<sup>12</sup>.

En un estudio por Zhang y colaboradores<sup>14</sup>, se comparó mediadores inflamatorios y parámetros de la superficie ocular entre dos técnicas realizadas con laser de femtosegundo, *FLEX* y *SMILE*, donde *FLEX* requiere de realizar un flap similar al *LASIK* y posteriormente extraer una lentícula estromal. Los parámetros que midieron fueron test de Schirmer I, tinción con fluoresceína, tiempo de ruptura de película lagrimal, altura del menisco lagrimal, índice de enfermedad de la superficie ocular medida por el cuestionario *OSDI*, y la sensibilidad corneal central. Los mediadores inflamatorios medidos fueron Interleucina 1 alfa, factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento neural, interferón gamma, factor de crecimiento transformador beta, y metaloproteinasa 9 en lágrima. Las mediciones se realizaron antes de la cirugía, y después de la cirugía al día 1, semana 1, y mes 1. Encontraron que la sensibilidad corneal disminuyó en ambos grupos en la semana 1 y mes 1, con mayor disminución en el grupo de *FLEX*. El tiempo de ruptura de película lagrimal disminuyó respecto a valores basales en ambos grupos, sin diferencia al mes de la cirugía entre ambos grupos. La tinción con fluoresceína fue más severa en el grupo de *FLEX* en la primer semana. El *OSDI* disminuyó en ambos grupos después de cirugía pero no se encontró diferencias significativas entre ambos grupos, aunque fue menos severo en el grupo de *SMILE*.

Sobre los mediadores encontraron que el *NGF* aumentó después de cirugía en ambos grupos, con mayor aumento en el grupo de *FLEX*, el *TGF beta1* se encontró elevado en ambos grupos el primer día, y en el grupo de *FLEX* se mantuvo elevado al mes. *IL-1* aumentó en el grupo de *FLEX* en el primer día postoperatorio. Encontraron correlación entre *NGF*, *TGF*, *IL1* con *OSDI*, tiempo de ruptura de película lagrimal y con tinción con fluoresceína.

Este estudio apoya la hipótesis de que *SMILE* induce menos daño a la superficie ocular y menor aumento en *NGF*, *TGF*, *IL1* en comparación con *FLEX*, lo que puede contribuir al proceso de recuperación más temprano<sup>14</sup>.

### **3. Citocinas y su relación con inflamación ocular**

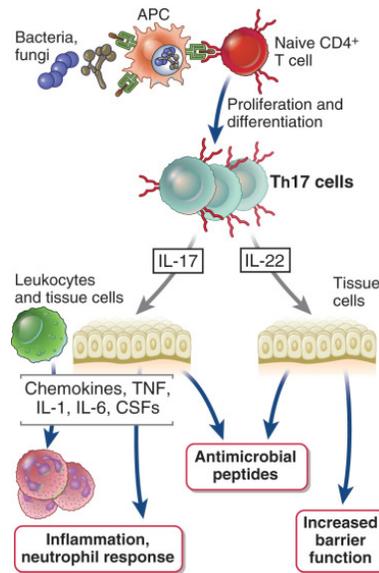
Debido a que la cirugía refractiva requiere de realizar una herida corneal, es necesaria su reparación y en ésta actúan diferentes mediadores inflamatorios que han sido relacionados con ojo seco, siendo éste el efecto adverso más frecuente de este tipo de cirugía. El mediador inflamatorio más estudiado ha sido *IL-6*, por lo que es importante ahondar en el estudio de este y otros posibles mediadores relacionados con inflamación y ojo seco como *IL-17A*, *TNF $\alpha$* , *IFN $\gamma$* , *IL-10*, *IL-2* e *IL-4*.

Las citocinas mencionadas previamente son moléculas de señalización que median la comunicación intercelular y favorecen procesos inflamatorios más complejos en los que se involucra la participación tanto de células de la respuesta innata, como células de la respuesta adquirida. El término interleucina alude a la comunicación intercelular

entre los leucocitos, sin embargo diferentes tipos celulares son capaces de producir y responder a las citocinas<sup>23</sup>.

## IL-17A

La interleucina 17A (*IL-17A*) se descubrió en 1993, y es el miembro prototipo de la subclase más nueva de citocinas. Es secretada por células *Th17*. Muchos experimentos sugieren que la *IL-17* induce inflamación del tejido, principalmente al estimular la expresión de varias citocinas pro-inflamatorias tales como la *IL-6*, *TNF-alfa*, *G-CSF* (factor estimulante de colonias de granulocitos), *GM-CSF* (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), entre otras. La *IL-6* también es esencial para la diferenciación de novo de las células *Th17* lo cual sugiere un circuito de retroalimentación positiva inducida por la *IL-17*. Además de las células *Th17*, existen otras fuentes de *IL-17*, tales como las células  $T\gamma\delta$ , las células *NKT* y las células  $T\text{ CD8}^+$ , entre otras<sup>24,25</sup>. Ver **figura 1**.



**Figura 1: Función de células Th17.**

Las citocinas producidas por las células Th17 estimulan la producción local de quimiocinas que reclutan neutrófilos y otros leucocitos, aumenta la producción de péptidos antimicrobianos (defensinas), y promueve la función de la barrera epitelial.

Figura tomada de Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2018. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier.<sup>30</sup>

En humanos, se han identificado niveles elevados de *IL-17* en ojos con coriorretinopatía en perdigonada o "birdshot", enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada, así como en uveítis HLA-B27 y en uveítis de Behcet<sup>25</sup>. También se han observado niveles elevados de *IL-17* en lágrima de sujetos con ojo seco y disfunción de glándulas de Meibomio los cuales disminuyen después de tratamiento<sup>26</sup>. En una revisión sistémica se encontró que los niveles de *IL-17* en lágrima, suero y saliva de pacientes con síndrome de Sjögren primario estaban significativamente aumentados en comparación a los controles, y aún más elevados en pacientes que no estaban en tratamiento inmunosupresor, así mismo, encontraron correlación positiva de los

niveles de *IL-17* con la severidad de la enfermedad<sup>27</sup>.

## **IL-6**

La interleucina 6 dirige múltiples procesos biológicos y juega un papel pivote en la estimulación de diferentes respuestas inmunológicas como la erradicación de la infección y reparación de herida.

Puede ser producida y secretada por diferentes células incluyendo células dendríticas, células endoteliales, células T y macrófagos. La *IL-6* es producida por los queratocitos posterior a la estimulación con *IL-1*.<sup>28</sup> Funciona uniéndose a la superficie celular o a un receptor soluble. La unión de *IL-6* a su receptor resulta en la activación de la vía de JAK-STAT (JAK1, JAK2, STAT3) y la vía *MAPK* (de las siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases, o proteína quinasas activadas por mitógenos) las cuales llevan a la expresión de citocinas inflamatorias, factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*) y diferenciación de células T CD4+ en células *Th17*.

En humanos se han observado niveles elevados en humor acuoso de ojos con distintas enfermedades inflamatorias como enfermedad de Behcet, enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada, sarcoidosis, uveítis idiopática, necrosis retiniana aguda, uveítis HLA-B27, entre otras<sup>25</sup>. También se han observado niveles elevados de *IL-6* en lágrima de sujetos con ojo seco y disfunción de glándulas de Meibomio los cuales disminuyen con tratamiento<sup>26</sup>.

## **TNF $\alpha$**

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*TNF* por sus siglas en inglés, “*Tumor Necrosis Factor*”) es una citocina proinflamatoria. Tiene una forma soluble y otra forma unida a membrana, el receptor de TNF 1 (TNFR-1) es el principal para ambas formas, y se expresa en todas las células. El receptor de TNF 2 (TNFR-2) solamente está expresado en células del sistema inmune y solamente responde al *TNF* unido a membranas.

La unión a su receptor provoca una cascada de señalización compleja que es mediada por proteínas asociadas al receptor de *TNF* (TRAF), esto provoca translocación de *NF- $\kappa$ B* al núcleo para producción de citocinas proinflamatorias y activación de la cascada de *MAPK*.

*TNF alfa* es producido por todas las células del sistema inmune, sin embargo, cuando hay un estímulo inflamatorio es producido principalmente por células *NK*, macrófagos activados, células T activadas, mastocitos y células endoteliales.

En humanos se han observado niveles elevados de *TNF $\alpha$*  en humor acuoso en enfermedades como uveítis idiopática, uveítis asociada a HLA-B27, Vogt-Koyanagi-Harada y enfermedad de Behcet<sup>25</sup>.

A nivel corneal contribuye a la producción de *IL-6* por los queratocitos e induce la expresión de *MMP-9*. Puede ser producido por diferentes células, incluyendo epitelio corneal, queratocitos y células endoteliales<sup>28</sup>.

## **IFN $\gamma$**

El *IFN  $\gamma$*  es un tipo de citocina producido por las células *NK* y los linfocitos T CD4+ y CD8+, actúa principalmente sobre los monocitos, macrófagos y neutrófilos. Participa en la regulación de la actividad fagocítica mediada por macrófagos y la formación de granulomas como respuesta a patógenos intracelulares<sup>29</sup>. También promueve la diferenciación de células T CD4+ a *Th1* e inhibe el desarrollo de células *Th2* y *Th17*, para amplificar la respuesta *Th1*.<sup>30</sup> En un modelo animal de ojo seco observaron que *IFN $\gamma$*  junto a *IL-17* aumenta la respuesta autoinmune y la severidad de ojo seco.<sup>31</sup> En humanos se han observado altas concentraciones en infecciones oculares<sup>32</sup>, así como en ojo seco evaporativo.<sup>33</sup>

## **IL-10**

La interleucina 10 (*IL-10*) es una citocina con propiedades antiinflamatorias, también es conocida como factor de inhibición de la síntesis de citocinas. Fue identificada por su habilidad para inhibir *IFN $\gamma$*  de las células *Th1*, es una de las citocinas inmunoreguladoras más importantes. Es secretada por células T activadas, macrófagos, célula dendríticas, células *NK* y células B. La unión de la *IL-10* a su receptor lleva a la supresión de la transcripción génica de citocinas inflamatorias, inhibición de la activación de macrófagos, regulación a la baja de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II en células presentadoras de antígeno y actividad antiapoptótica<sup>25</sup>. Se han encontrado niveles elevados de *IL-10* además de *IL-6* e *IL-17 A* en lágrima en ojos con pterigión.<sup>34</sup>

## **IL-2**

La interleucina 2 es un factor de crecimiento, de sobrevivencia y diferenciación para los linfocitos T que juega un papel en la proliferación de células T activadas por antígenos y en el mantenimiento de las células T reguladoras (las cuales suprimen la respuesta inmune). Es producida principalmente por linfocitos T CD4+ después del reconocimiento de antígenos y moléculas coestimuladoras. Su producción inicia dentro de las primeras 2 horas del reconocimiento del antígeno con un pico a las 8-12 horas y disminuye para las 24 horas.<sup>35</sup> En un estudio por Pinto-Fraga y colaboradores encontraron niveles elevados de IL-2 en pacientes con ojo seco tratados con fluorometolona que presentaron disminución de signos y síntomas de ojo seco en comparación con pacientes tratados solamente con lubricante donde los niveles de *IL-2* disminuyeron y los síntomas aumentaron, por lo que ellos sugieren que la *IL-2* actúa como moderador de inflamación en ojo seco.<sup>36</sup>

## **IL-4**

La interleucina 4 es un inductor y efector de las células *Th2*, es producida principalmente por los linfocitos T CD4+ y mastocitos activados. La *IL-4* estimula las células B para el cambio de la cadena pesada de inmunoglobulina al isotipo IgE, también estimula el reclutamiento de leucocitos, principalmente eosinófilos<sup>30</sup>. Se ha encontrado aumentada en lágrima de pacientes con queratocono.<sup>37</sup>

## Planteamiento del problema

Cada vez es más frecuente la realización de cirugía refractiva siendo LASIK la técnica más utilizada, sin embargo la realización de la técnica de SMILE ha ido en aumento en los últimos años. En ambas se realiza una herida corneal lo que conlleva a mecanismos moleculares para su reparación como son la liberación de mediadores inflamatorios. Estos mecanismos no son del todo conocidos, por lo que hace falta su estudio.

## Pregunta de investigación

¿Existen diferencias entre las concentraciones de mediadores inflamatorios en lágrima de sujetos a los que se les realiza cirugía refractiva con técnica de SMILE y con técnica de Femto-LASIK?

## Justificación

El microambiente tiene un papel relevante en los procesos de reparación corneal posteriores a diferentes técnicas de cirugía refractiva. En este sentido, es relevante estudiar los mediadores inflamatorios en lágrima con la finalidad de determinar cual técnica quirúrgica podría estar generando un mayor proceso inflamatorio y a largo plazo efectos adversos como ojo seco. Así mismo, esto nos puede ayudar a entender mejor la fisiopatogenia de la reparación de herida corneal.

## Hipótesis

Los mediadores inflamatorios se encontrarán en mayor concentración en lágrima en los pacientes operados con técnica de Femto-LASIK que con los de técnica SMILE.

## Objetivo general

Comparar los niveles de mediadores inflamatorios en lágrima en sujetos sometidos a cirugía refractiva con técnica de Femto-LASIK y técnica de SMILE.

## Objetivos específicos

Comparar las concentraciones de los mediadores inflamatorios en lágrima, entre los grupos, con mediciones prequirúrgicas, y en el postoperatorio a la 1er hora y 24 horas.

## Diseño del estudio

Estudio longitudinal prospectivo analítico.

## Material y métodos

### Consideraciones éticas

Este protocolo fue evaluado y autorizado por el comité de ética en investigación del Instituto (CEI-2016/12/02), así como por el comité de bioseguridad (CB-051-2016) y el comité de investigación (CI-051-2016). (Ver **apéndices**).

Todos los sujetos que participaron en el estudio otorgaron previamente su consentimiento informado (ver **apéndices**).

### Selección de pacientes

#### *Criterios de inclusión*

- Sujetos de 18 años de edad o más que fueron sometidos a cirugía refractiva con técnica de Femto-LASIK o de SMILE en el periodo de julio 2017 a diciembre 2017 en el departamento de Córnea y Cirugía Refractiva del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, en la Ciudad de México.
- Aceptar mediante consentimiento informado participar en el estudio.

#### *Criterios de no inclusión*

- Enfermedad ocular agregada.
- Cirugía ocular previa.
- Enfermedad sistémica asociada (diabetes mellitus, obesidad, enfermedades autoinmunes, enfermedades neoplásicas, enfermedades alérgicas).

#### *Criterios de eliminación*

- Presentar durante la cirugía alguna complicación que no permitiera realizar la ablación completa o presentar defecto epitelial.
- Presentar infección ocular durante el seguimiento.
- Que el paciente retirara el consentimiento.

## **Técnicas quirúrgicas**

Se realizó cirugía refractiva mediante técnica de Femto-LASIK y mediante técnica de SMILE por 3 cirujanos oftalmólogos con la misma experiencia en estas cirugías.

### *Técnica de Femto-LASIK*

La técnica de femto-LASIK fue realizada con el femtosegundo VisuMax (VisuMax, Carl Zeiss Meditec, Jena, Alemania) para realizar el flap corneal, con bisagra superior, grosor de 110 micras y diámetro de 8.5 mm. La densidad de energía fue de aproximadamente 180nJ. La ablación estromal fue realizada con el laser excimer Mel-90 (Carl Zeiss Meditec). Fluencia de 180mJ/cm<sup>2</sup> a una frecuencia de 250 Hz. El diámetro de la zona óptica fue de 6.5 mm.

### *Técnica de SMILE*

La técnica de SMILE se realizó mediante laser de femtosegundo de 500kHz (VisuMax, Carl Zeiss Meditec, Jena, Alemania) la densidad de energía fue de aproximadamente 150nJ. Las incisiones se realizaron en el siguiente orden: superficie posterior de la lentícula, el borde de la lentícula, la superficie anterior de la lentícula y la incisión para la extracción de la lentícula. El diámetro de la lentícula fue de 6.5 mm, el diámetro del cap de 7.5 mm, profundidad del cap de 140 micras y la incisión lateral para la extracción de la lentícula de 3 mm.

## **Aspectos de bioseguridad**

Para el cumplimiento de esta parte del protocolo se cuenta con la infraestructura del área de Inmunología de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. El área de laboratorio clínico cuenta con área de toma de muestra, la cual cumple con los requisitos especificados en la Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. El área de procesamiento de las muestras está organizada bajo la misma norma. Los desechos biológicos generados se colectaron, transportaron y desecharon conforme al protocolo interno vigente de manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI) de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana basado en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 sobre el manejo de RPBI. Los RPBI se recaudaron en las bolsas indicadas con color azul, rojo y amarillo y teniendo recipientes rígidos

especiales para punzocortantes, presentes tanto en el área de toma de muestra como en el área de laboratorio. Posteriormente estos contenedores fueron transportados por el personal calificado al área de concentración de RPBI para su posterior destrucción de acuerdo al procedimiento institucional. La toma de muestra se realizó por el médico investigador actualizado mediante curso interno de manejo de RPBI.

### **Obtención de las muestras oculares**

El lugar de toma de muestra fue en sala de Excimer Laser y en el laboratorio de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana, realizada por la Dra. Christian Denisse Pinkus Herrera.

Las muestras lagrimales fueron obtenidas a partir de la superficie ocular, en el menisco lagrimal inferior, añadiendo 20 $\mu$ L de solución salina balanceada estéril y recuperándola inmediatamente mediante un capilar estéril. Las muestras se congelaron a -60°C hasta su procesamiento.

### **Procesamiento de las muestras oculares**

Las muestras fueron procesadas para la determinación de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17A) utilizando el BD CBA Human Th1, Th2, Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences, San Jose, CA,USA), por rearrreglos de citometría de flujo y fueron analizadas con el programa FCAP Array software.

Las muestras fueron desechadas conforme al protocolo interno vigente de manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. Los capilares con los que se tomó la muestra de lágrima fueron desechados en el recipiente rígido para punzocortantes. La muestra de lágrima y el kit para el procesamiento fueron desechados en la bolsa roja.

## **Tamaño de muestra**

Muestra por conveniencia.  
Ojo derecho de cada sujeto que se le realizó cirugía refractiva en el periodo comprendido entre julio 2017 a diciembre 2017.

## **Variables de estudio**

Independiente

- Técnica quirúrgica

- Equivalente esférico (continua, medida en dioptrías).

Dependientes

- Citocinas en lágrima (continua, medida en pg/ml)

## **Análisis estadístico**

Para las concentraciones de los diferentes mediadores se obtuvo media o mediana y desviación estándar o percentiles dependiendo de la distribución. Para las diferencias de las concentraciones se utilizó prueba de ANOVA considerando una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa. El análisis fue realizado utilizando el programa GraphPad Prism 7.

## Resultados

### Datos demográficos

Se analizaron muestras de lágrima de 15 ojos (de 15 sujetos) para el grupo de SMILE y de 14 ojos (14 sujetos) para el grupo de Femto-LASIK. En la **tabla 1** se muestran las características basales de ambos grupos.

**Tabla 1. Características basales de los grupos estudiados.**

Características basales	SMILE	F-LASIK	Valor de <i>p</i>
<b>Número de ojos</b>	15	14	----
<b>Sexo</b>			----
Masculino	5	6	
Femenino	10	8	
<b>Edad (años), media ± DE *</b>	29.13 ± 1.96	26.43 ± 1.05	<i>p</i> =0.2389
<b>Equivalente esférico (Dioptrías), mediana ± percentiles **</b>	-6.00 (-6.75 a -5.5)	-3.18 (-3.77 a -1.68)	<i>p</i> <0.0001

\*DE: Desviación estándar. Se utilizó prueba de Welch.

\*\* Se utilizó prueba de Mann-Whitney.

### Determinación de mediadores inflamatorios en lágrima basal, a la 1er hora del postoperatorio y a las 24 horas del postoperatorio

Los mediadores inflamatorios que se midieron en lágrima fueron IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de SMILE y el grupo de Femto-LASIK para los valores basales en ningún marcador como se muestra en la **tabla 2**.

**Tabla 2. Valores basales de los diferentes mediadores inflamatorios en lágrima.**

Mediador inflamatorio	SMILE (pg/ml)	F-LASIK (pg/ml)	Valor de <i>p</i>
	Mediana (Percentiles 25% y 75%)	Mediana (Percentiles 25% y 75%)	
<b>IL-17</b>	33.6 (12.57-57.06)	54.49 (44.87-93.98)	0.12
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	11.89 (1.5-23.58)	18.44 (15.47-36.9)	1.10
<b>TNF</b>	7.31 (1.23-16.14)	14.21 (11.12-28.74)	0.13
<b>IL-10</b>	4.73 (0.53-9.72)	11.62 (7.59-18.86)	0.06
<b>IL-6</b>	10.37 (1.86-14.43)	16.42 (11.38-27.88)	0.12
<b>IL-4</b>	4.58 (0.53-11.47)	11.31 (8.36-23.55)	0.12
<b>IL-2</b>	9.95 (0-25.17)	17.15 (12.52-34.43)	0.11

Se utilizó prueba de Mann-Whitney.

Para las concentraciones de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-4 e IL-2 en lágrima, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales, a la hora y a las 24 horas en ningún grupo ni tampoco al comparar ambos grupos entre sí. Ver *tabla 3, tabla 4 y figura 2*.

**Tabla 3. Cambios en la concentración de las citocinas antes y después de cirugía refractiva en el grupo de SMILE.**

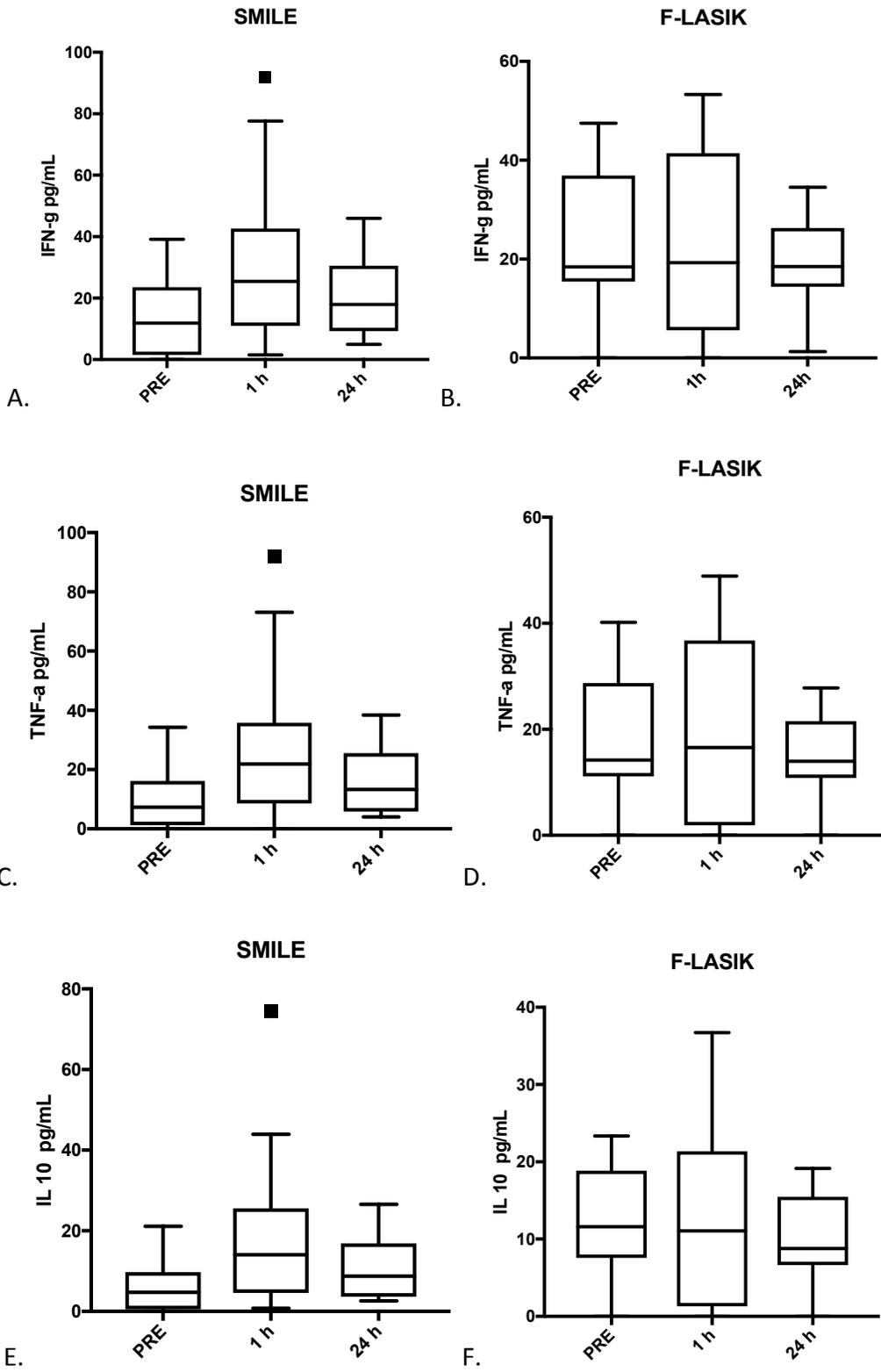
Mediador inflamatorio SMILE	Basal	1 hora	24 horas	Valor de p
<b>IL-17</b>	33.6 (12.57-57.06)	76.18 (42.83-132.6)	52.36 (32-89.12)	p=0.02
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	11.89 (1.5-23.58)	25.43 (11.02-42.63)	17.95 (9.27-30.57)	p=0.11
<b>TNF</b>	7.31 (1.23-16.14)	21.87 (8.55-35.84)	13.31 (5.86-25.57)	p=0.07
<b>IL-10</b>	4.73 (0.53-9.72)	14.02(4.56-25.56)	8.75(3.62-16.87)	p=0.07
<b>IL-6</b>	10.37 (1.86-14.43)	51.38 (32.59-67.01)	32.98 (20.46-47.65)	p<0.0001
<b>IL-4</b>	4.58 (0.53-11.47)	13.44 (3.97-24.71)	9.69 (2.81-16.68)	p=0.19
<b>IL-2</b>	9.95 (0-25.17)	28.72 (7.48-45.44)	18.62 (8.8-31.47)	p=0.07

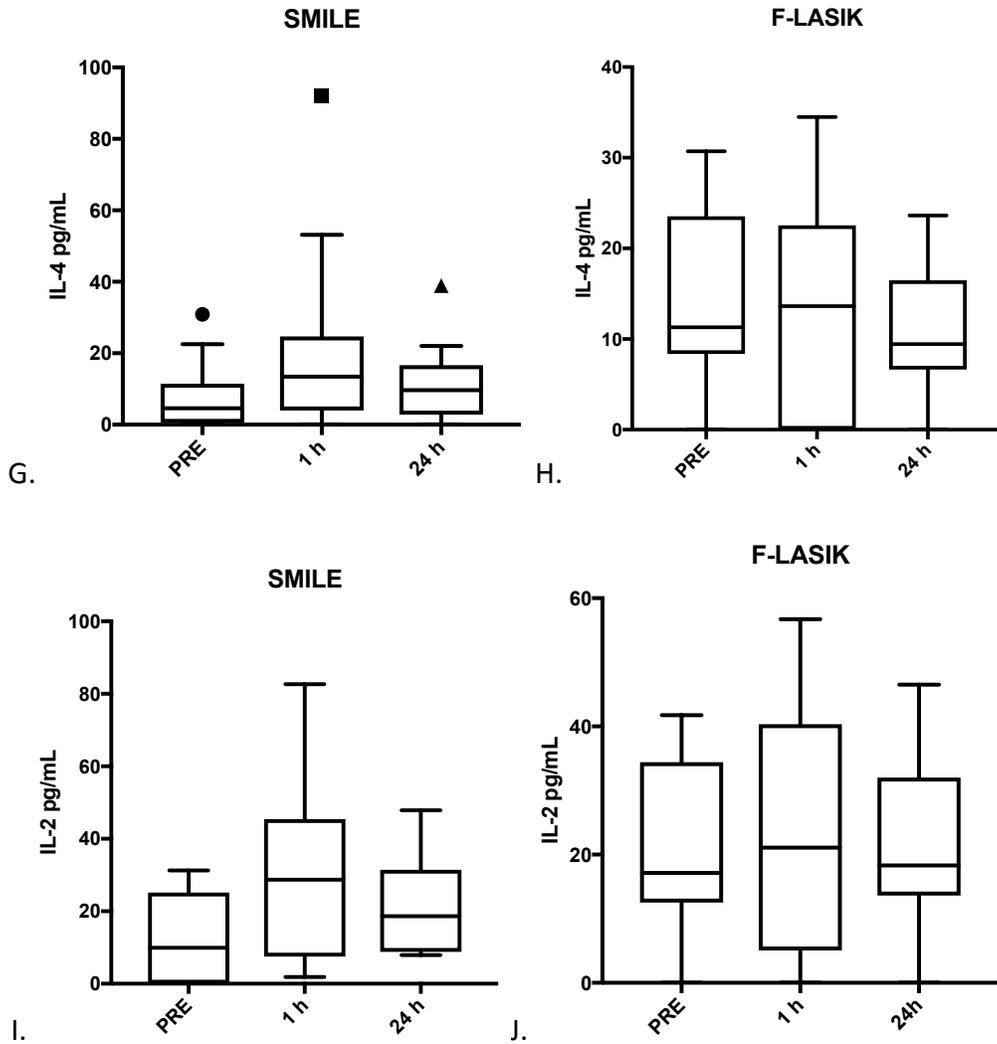
Se utilizó prueba de Kruskal-Wallis.

**Tabla 4. Cambios en la concentración de las citocinas antes y después de cirugía refractiva en el grupo de Femto-LASIK.**

Mediador inflamatorio F-LASIK	Basal	1 hora	24 horas	Valor de p
<b>IL-17</b>	54.49 (44.87-93.98)	75.01 (15.2-110.5)	53.8 (42.99-84.73)	p=0.99
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	18.44 (15.47-36.9)	19.28 (5.62-41.41)	18.51 (14.4-26.29)	p=0.96
<b>TNF</b>	14.21 (11.12-28.74)	16.57 (1.9-36.76)	14 (10.83-21.54)	p=0.92
<b>IL-10</b>	11.62 (7.59-18.86)	11.09 (1.30-21.39)	8.78 (6.64-15.5)	p=0.76
<b>IL-6</b>	16.42 (11.38-27.88)	45.09 (23.88-69.84)	54.88 (17.48-73.77)	p=0.01
<b>IL-4</b>	11.31 (8.36-23.55)	13.64 (0-22.54)	9.44 (6.64-16.49)	p=0.76
<b>IL-2</b>	17.15 (12.52-34.43)	21.09 (5.06-40.35)	18.33 (13.61-32.03)	p=0.97

Se utilizó prueba de Kruskal-Wallis.





**Figura 2: Concentraciones de citocinas lagrimales en ambos grupos de estudio y en los diferentes tiempos.**

En A-B concentraciones de IFN- $\gamma$  en grupo SMILE y F-LASIK respectivamente. C-D concentraciones de TNF en grupo SMILE y F-LASIK respectivamente. E-F concentraciones de IL-10 en grupo SMILE y F-LASIK respectivamente. G-H concentraciones de IL-4 en grupo SMILE y F-LASIK respectivamente. I-J concentraciones de IL-2 en grupo SMILE y F-LASIK respectivamente.

### Elevación de IL-17 posterior a cirugía refractiva

Respecto a la IL-17 se encontró diferencia estadísticamente significativa en el grupo de SMILE comparando el valor basal con el posoperatorio de 1h ( $p=0.01$ ), (Ver **tabla 3** y **figura 3**). No hubo cambios en el grupo Femto-LASIK.

Se puede observar en el grupo de SMILE, que a la 1 hora postoperatoria aumenta 2.26 veces respecto a la basal, y a las 24 horas disminuye a 1.55 veces respecto a la basal como se observa en la **Figura 4**.

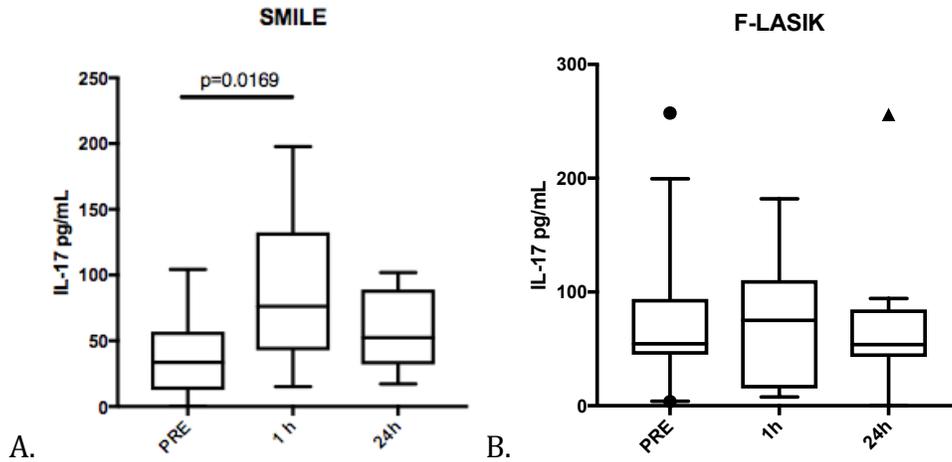


Figura 3: Concentraciones de IL-17 en ambos grupos en los diferentes tiempos.

A. Concentraciones de IL-17 en grupo de SMILE. B. Concentraciones de IL-17 en grupo de Femto-LASIK.

Al analizar los índices de las concentraciones lagrimales para IL-17 en el grupo de Femto-LASIK, se observó un incremento 1.37 veces a la hora y regresa a su valor basal a las 24 horas. Comparando los índices entre ambos grupos se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0491$ ) a la 1 hora postoperatoria siendo mayor el aumento en el grupo de SMILE, aunque en ambos grupos la concentración para IL-17 tiende a disminuir acercándose a sus valores basales a las 24 horas como se observa en la *figura 4*.

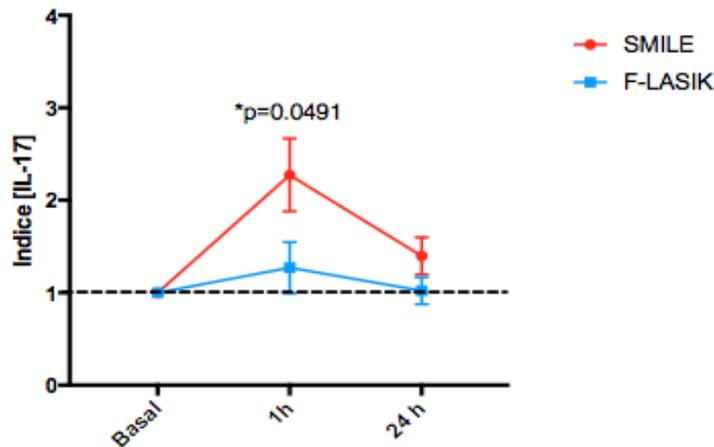


Figura 4: Comparación del índice de concentración para IL-17 de ambos grupos.

En esta gráfica se muestra la cinética de concentración (índice) para la IL-17 lagrimal entre ambos grupos de estudio. El índice fue obtenido al dividir las medianas de la concentración de los diferentes tiempos postoperatorias entre la mediana del valor basal.

## Elevación de IL-6 a la hora y 24 horas después de cirugía refractiva en ambos grupos

En el grupo de SMILE se encontró mayor concentración de IL-6 en el valor de 1 hora y de 24 horas postoperatorias en comparación con el valor basal con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$  y  $p = 0.0031$  respectivamente), ver **figura 5**.

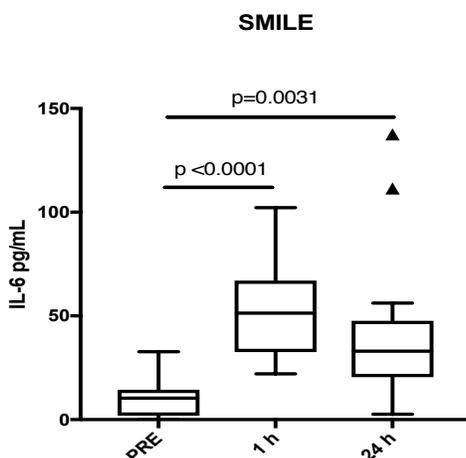


Figura 5: Concentraciones de IL-6 en el grupo de SMILE.

En el grupo de Femto-LASIK también se encontró mayor concentración de IL-6 en el valor de 1 hora y de 24 horas postoperatorias en comparación con el valor basal con una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.05$  y  $p = 0.03$  respectivamente), ver **figura 6**.

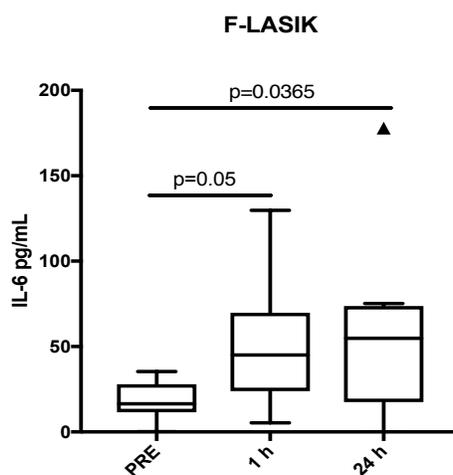
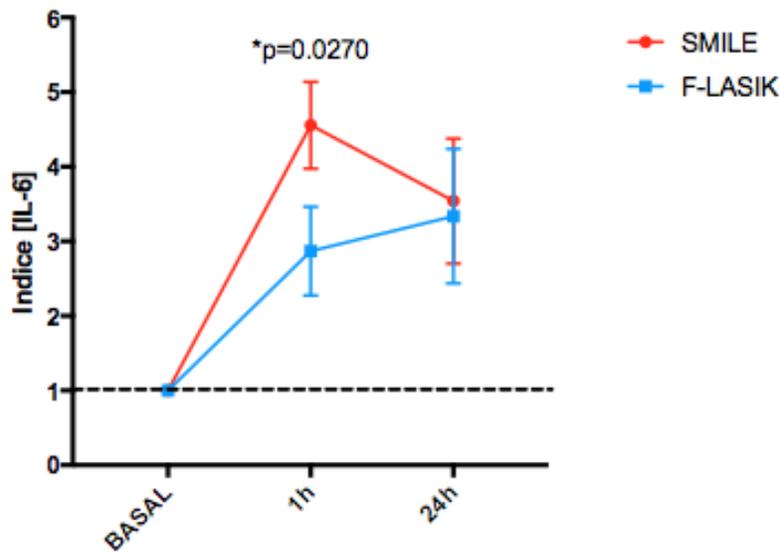


Figura 6: Concentraciones de IL-6 en el grupo de Femto-LASIK.

Al comparar ambos grupos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores absolutos, sin embargo, en los índices de concentración se puede observar que el grupo de SMILE aumenta la concentración 4.9 veces a la hora respecto a la basal, y, a las 24 horas 3.18 veces respecto a la basal, lo que indica que el proceso inflamatorio va disminuyendo con el tiempo.

Al hacer esta misma comparación en el grupo de Femto-LASIK, se observa 2.74 veces mayor la concentración de IL-6 y a las 24 horas aumenta 3.34 veces más respecto al valor basal, lo que indica que el proceso inflamatorio persiste a las 24 horas en el grupo de Femto-LASIK.

Al comparar ambos grupos, se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los índices de concentraciones a la 1 hora postoperatoria, siendo mayor en el grupo de SMILE, ver **figura 7**.



**Figura 7: Comparación de índices de concentraciones de IL-6 de ambos grupos.**

En esta gráfica se muestra la cinética de concentración (índice) para la IL-6 lagrimal entre ambos grupos de estudio. El índice fue obtenido al dividir las medianas de la concentración de los diferentes tiempos postoperatorias entre la mediana del valor basal.

## Discusión

El error refractivo es una causa importante de discapacidad visual que se corrige con ayudas ópticas como los anteojos o con cirugía refractiva como el *Femto-LASIK* y *SMILE*, estas cirugías se realizan con mayor frecuencia conforme pasan los años. Para su realización es necesaria hacer una herida corneal y esto lleva a procesos inmunológicos para su reparación. Entre estas dos técnicas se han visto buenos resultados respecto a su eficacia, seguridad y predictibilidad.<sup>7,8,18</sup> El efecto adverso más frecuente después de cirugía refractiva corneal es el ojo seco, patología en la cual la inflamación tiene un papel muy importante y se han visto distintos mediadores inflamatorios involucrados.

En este trabajo investigamos sobre algunos mediadores inflamatorios en lágrima posterior a cirugía refractiva comparando dos técnicas diferentes: *Femto-LASIK* y *SMILE*, para ahondar en el conocimiento de lo que sucede posterior a estas cirugías y si una técnica desencadena mayor inflamación que la otra.

Entre ambos grupos analizados se encontró diferencia estadísticamente significativa en el equivalente esférico tratado como se observa en la **tabla 1**, estas diferencias las atribuimos a que en el Departamento de Córnea y Cirugía Refractiva del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana los sujetos con mayor equivalente esférico se les ofrece la técnica de *SMILE* y a los de menor equivalente esférico se les ofrece alguna otra técnica como *Femto-LASIK*, ya que la técnica de *SMILE* en teoría conserva mejor la biomecánica corneal.

En el presente estudio las concentraciones basales fueron determinadas como se observa en la **tabla 2**, estas mediciones pueden contribuir a establecer un valor de referencia normal de los distintos mediadores inflamatorios en lágrima.

Para las concentraciones de *IFN- $\gamma$* , *TNF*, *IL-10*, *IL-4* e *IL-2* en lágrima no hubo cambios significativos que hagan pensar que estos mediadores tengan un rol importante posterior a estas cirugías. Nuestros resultados respecto a *TNF* concuerdan con lo encontrado en otros estudios<sup>12,14</sup>, así como los resultados de *INF- $\gamma$* .<sup>14</sup> Respecto a *IL-10*, *IL-4* e *IL-2* en lágrima posterior a cirugía refractiva no existen reportes en la literatura que sea de nuestro conocimiento.

El no haber encontrado incremento en *IL-4* asegura que los pacientes no contaban con proceso inflamatorio alérgico, y que los resultados obtenidos fueron por reacción inflamatoria propia de la cirugía refractiva y no por algún proceso mediado por células *Th2*.

De forma interesante, observamos que las concentraciones de *IL-6* aumentaron en ambos grupos a la hora y a las 24 horas postoperatorias con significancia estadística. Estos resultados concuerdan con los que obtuvieron Gao y colaboradores respecto a que aumentan las concentraciones a las 24 horas, pero ellos reportan mayor concentración en el grupo de *Femto-LASIK*<sup>12</sup> a diferencia de lo encontrado en nuestro estudio, esto podría ser explicado por la diferencia en los grupos del equivalente esférico ya que la refracción tratada fue mayor en el grupo de *SMILE*.

La *IL-6* juega un papel muy importante en la estimulación de diferentes respuestas inmunológicas, entre ellas la reparación de herida. Cuando se une a su receptor activa diferentes vías que llevan a la expresión de citocinas inflamatorias, *VEGF* y diferenciación de células T CD4+ en células *Th17* las cuales secretan a su vez *IL-17A*, otra citocina proinflamatoria que estimula la expresión de *IL-6*, *TNF-alfa*, *G-CSF*, *GM-CSF*, entre otras.

En el presente estudio encontramos aumento en las citocinas proinflamatorias *IL-17* e *IL-6* en ambos grupos, estas mismas citocinas se han visto relacionadas con ojo seco y disfunción de glándulas de Meibomio como se reporta en el estudio de Liu y colaboradores<sup>26</sup>, la *IL-17* también juega un papel importante en Síndrome de Sjögren primario.<sup>27</sup> Estos resultados podrían estar relacionados con el desarrollo de ojo seco posterior a cirugía refractiva corneal.

Observamos un mayor aumento en el grupo de *SMILE* contrario a lo que esperábamos encontrar, sin embargo, no podemos atribuir estos resultados a la técnica ya que los equivalentes esféricos tratados fueron diferentes entre ambos grupos.

Las limitaciones del estudio fueron el número de muestra y la diferencia de equivalente esférico tratado en ambos grupos lo que pudo haber sesgado los resultados.

## Conclusión

El aumento de las concentraciones de *IL-6* e *IL-17* a la hora postoperatoria indica el papel importante de estos mediadores proinflamatorios para la reparación de herida corneal en cirugía refractiva y podría tener relación con el efecto adverso de ojo seco.

Este es el primer estudio realizado en población mexicana y el primer estudio en determinar valores de *IL-17*, *IL-10*, *IL-4* e *IL-2* en lágrima de sujetos operados de *SMILE* y de *Femto-LASIK*. Así mismo, aportamos valores basales de las concentraciones de los diferentes mediadores los cuales pueden servir para determinar rangos normales para próximos estudios.

## **Perspectivas**

Hacen falta más estudios, idealmente estudios clínicos aleatorizados con una mayor muestra para indagar más sobre el papel de los distintos mediadores inflamatorios en la reparación de herida corneal, específicamente en cirugía refractiva, y así determinar cuál técnica quirúrgica desencadena mayor inflamación.

## **Financiamiento de la investigación**

Para la adquisición del material necesario y la realización de este trabajo de investigación se contó con el apoyo de las siguientes instituciones:

- Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana.
- Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. **CVU 746489**.

## **Declaración de conflicto de intereses de los investigadores**

Sin conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Vitale S, Ellwein L, Cotch MF, Ferris FL, Sperduto R. Prevalence of refractive error in the United States, 1994-2004. *Arch Ophthalmol* 2008; 126(8):1111-1119.
2. Basic and clinical science course (BCSC) Section 13: Refractive Surgery. American Academy of Ophthalmology; 2012: 16.
3. Cumberland PM, Chianca A, Rahi JS. Laser refractive surgery in the UK Biobank study. *J Cataract Refract Surg*. 2015;41:2466-75.
4. Ağca A, Demirok A, Yıldırım Y, Demircan A, Yaşa D, Yeşilkaya C, et al. Refractive lenticule extraction (ReLEx) through a small incision (SMILE) for correction of myopia and myopic astigmatism: current perspectives. *Clin Ophthalmol*. 2016;10:1905-12.
5. Pallikaris IG, Papatzanaki ME, Stathi EZ, Frenschok O, Georgiadis A. Laser in situ keratomileusis. *Lasers Surg Med*. 1990;10:463-468.
6. Leonardi A, Tavolato M, Curnow SJ, Fregona IA, Violato D, Alió JL. Cytokine and chemokine levels in tears and in corneal fibroblast cultures before and after excimer laser treatment. *J Cataract Refract Surg*. 2009; 35:240-7.
7. Denoyer A, Landman E, Trinh L, Faure JF, Auclin F, Baudouin C. Dry Eye Disease after Refractive Surgery Comparative Outcomes of Small Incision Lenticule Extraction versus LASIK. *Ophthalmology*. 2015; 122:669-76.
8. Shen Z, Shi K, Yu Y, Yu X, Lin Y, Yao K. Small Incision Lenticule Extraction (SMILE) versus Femtosecond Laser-Assisted In Situ Keratomileusis (FS-LASIK) for Myopia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2016;11: e0158176.
9. Chao C, Stapleton F, Zhou X, Chen S, Zhou S, Golebiowski B. Structural and functional changes in corneal innervation after laser in situ keratomileusis and their relationship with dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015; 253:2029-39.
10. Chao C, Golebiowski B, Stapleton F. The Role of Corneal Innervation in LASIK-Induced Neuropathic Dry Eye. *Ocul Surf*. 2014; 12:32-45.
11. Kobashi H, Kamiya K, Shimizu K. Dry Eye After Small Incision Lenticule Extraction and Femtosecond Laser-Assisted LASIK: Meta-Analysis. *Cornea*. 2016. [Epub ahead of print]
12. Gao S, Li S, Liu L, Wang Y, Ding H, Li L, et al. Early Changes in Ocular Surface and Tear Inflammatory Mediators after Small-Incision Lenticule Extraction and Femtosecond Laser-Assisted Laser In Situ Keratomileusis. *PLoS One*. 2014; 9:e107370.
13. Hyon JY, Hose S, Gongora C, Sinha D, O'Brien T. Effect of Macrophage Migration Inhibitory Factor on Corneal Sensitivity after Laser In Situ Keratomileusis in Rabbit. *Korean J Ophthalmol*. 2014;28:170-6.
14. Zhang C, Ding H, He M, Liu L, Liu L, Li G, et al. Comparison of Early Changes in Ocular Surface and Inflammatory Mediators. *PLoS One*. 2016;11:e0149503.
15. Kuo IC. Corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol*. 2014;15:311-5.

16. Słoniecka M, Le Roux S, Boman P, Byström B, Zhou Q, Danielson P. Expression Profiles of Neuropeptides, Neurotransmitters, and Their Receptors in Human Keratocytes In Vitro and In Situ. *PLoS One*. 2015; 10:e0134157.
17. Spaeda L, Giammaria D, Trabucco P. Corneal wound healing after laser vision correction. *Br J Ophthalmol* 2016; 100:28-33.
18. Li M, Niu L, Qin B, Zhou Z, Ni K, Le Q, et al. Confocal Comparison of Corneal Reinnervation after Small Incision Lenticule Extraction (SMILE) and Femtosecond Laser In Situ Keratomileusis (FS-LASIK). *PLoS One* 2013. 8:e81435.
19. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res*. 1998; 17:673-6.
20. Resan M, Stanojević I, Petković A, Pajić B, Vojvodić D. Levels of interleukin-6 in tears before and after excimer laser treatment. 2015; 72:350-5.
21. Sekundo W, Kunert KS, Blum M. Small incisión corneal refractive surgery using the small incisión lenticule extraction (SMILE) procedure for the correction of myopia and myopic astigmatism: results of a 6 month prospective study. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95:335-9.
22. Dong Z, Zhou X, Wu J, Zhang Z, Li T, Zhou Z, et al. Small incisión lenticule extraction (SMILE) and femtosecond laser LASIK: comparison of corneal wound healing and inflammation. *Br J Ophthalmol*. 2014;98:263-9.
23. Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Arch Ophthalmol*. 2012;30:90-100.
24. Flores-García Y, Talamás-Rohana P. Interleucina 17, funciones biológicas y su receptor. *Rev Educ Bioquímica* 2012; 31: 3-9.
25. Weinstein JE, Pepple KL. Cytokines in uveítis. *Curr Opin Ophthalmol* 2018;29:000-000.
26. Liu R, Rong B, Tu P, Tang Y, Song W, Toyos R, et al. Analysis of Cytokine Levels in Tears and Clinical Correlations After Intense Pulsed Light Treating Meibomian Gland Dysfunction. *Am J Ophthalmol* 2017; 183:81-90.
27. Zhang LW, Zhou PR, Wei P, Cong X, Wu LL, Hua H. Expression of interleukin-17 in primary Sjögren's síndrome and the correlation with disease severity: A systematic review and meta-analysis. *Scand J Immunol*. 2018;87:e12649.
28. Wisse RPL, Kuiper JJW, Gans R, Imhof S, Radstake TRDJ, Van Der Lelij A. Cytokine Expression in Keratoconus and its Corneal Microenvironment: A Systematic Review. *Ocul Surf* 2015;13:272-83.
29. Page AV, Liles WC. 2016. Inmunomoduladores. En Bennett JE, Dolin R, Blaser M. 2016. Enfermedades infecciosas Principios y Prácticas. España: Elsevier.
30. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2018. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier. Pp 225-242, capítulo 10.
31. Chen Y, Chauhan SK, Shao C, Omoto M, Inomata T, Dana R. INF-  $\gamma$ -Expressing Th17 Cells Are Required for Development of Severe Ocular Surface Autoimmunity. *J Immunol*. 2017. 1;199:1163-9
32. Zhang Y, Liang Q, Liu Y, Pan Z, Baudouin C, Labbé A, Lu Q. Expression of cytokines in aqueous humor from fungal keratitis patients. *BMC Ophthalmol*. 2018. 19;18:105.

33. Jackson DC, Zeng W, Wong CY, Mifsud EJ, Williamson NA, Ang CS, et al. Tear Interferon-Gamma as a Biomarker for Evaporative Dry Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016. 1;57:4824-30
34. Zidi S, Bediar-Goulaneb F, Belguendouz H, Belkhelfa M, Medjeber O, Laouar O, et al. Local pro-inflammatory cytokine and nitric oxide responses are elevated in patients with pterygium. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2017; 30:395-405.
35. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2018. *Cellular and Molecular Immunology.* Elsevier. Pp 209-223, capítulo 9.
36. Pinto-Fraga J, Enríquez-de-Salamanca A, Calonge M, González-García MJ, López-Miguel A, López-de la Rosa A, et al. Severity, therapeutic, and activity tear biomarkers in dry eye disease: An analysis from a phase III clinical trial. *Ocul Surf.* 2018;16:368-76.
37. Shetty R, Deshmukh R, Ghosh A, Sethu S, Jayadev C. Altered tear inflammatory profile in Indian keratoconus patients – The 2015 Col Rangachari Award paper. *Indian J Ophthalmol.* 2017;65:1105-8.

## Apéndices

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA\*

**Título del protocolo: Comparación de mediadores inflamatorios en lágrima de sujetos operados de cirugía refractiva con dos técnicas diferentes: Femto LASIK versus SMILE**

Investigador principal: Christian Denisse Pinkus Herrera

Lugar donde se realizará el estudio: Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

#### 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

El motivo de este estudio se debe a que cada vez es más frecuente la realización de cirugía refractiva, la técnica más realizada es LASIK, sin embargo la realización de la técnica de SMILE ha ido en aumento en los últimos años. En ambas se realiza una herida corneal lo que conlleva a mecanismos moleculares para su reparación. Estos mecanismos no son del todo conocidos, principalmente en la técnica de SMILE, por lo que hace falta su estudio y su correlación con sintomatología de ojo seco, ya que el ojo seco es el efecto adverso más frecuente en cirugía refractiva corneal.

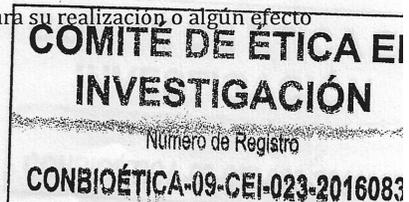
#### 2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo medir ciertas sustancias inflamatorias en lágrima antes y en diferentes tiempos después de realizar la cirugía refractiva que le corresponde, con el fin de conocer más sobre los procesos relacionados con la reparación de la herida en la córnea provocada por la cirugía, y si estas sustancias tienen alguna relación con sintomatología de ojo seco.

#### 3. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos, y antecedentes, así como una exploración oftalmológica. Se medirán las sustancias inflamatorias tomando una muestra de lágrima antes de realizarse la cirugía, y después de la cirugía en el día 1.

Ninguna medición requiere de procedimiento doloroso para su realización o algún efecto adverso.





**Instituto de Oftalmología**  
“Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”®

Ciudad de México, a 3 de Febrero del 2017

Dra. Christian Denisse Pinkus Herrera  
Dra. María del Carmen Jiménez Martínez

Departamento de Inmunología

Presente,

Mediante este conducto me permito informarles que el protocolo sometido por Ustedes a revisión por el Comité de Bioseguridad de esta Institución con nombre: “**Comparación de mediadores inflamatorios en lágrima de sujetos operados de cirugía refractiva con dos técnicas diferentes: LASIK versus SMILE**” (CB-051-2016) se **APROBÓ**, en su versión actual.

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

Dra. Beatriz Buentello Volante  
Secretaria, Comité de Bioseguridad  
Instituto de Oftalmología  
“Fundación de Asistencia Privada  
Conde Valenciana IAP”.



# Instituto de Oftalmología

“Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”®

Ciudad de México, a 20 de enero del 2017

Dra. Christian Denisse Pinkus Herrera  
Dra. María del Carmen Jiménez Martínez

Departamento de Córnea, Unidad de Investigación

Presente

Mediante este conducto me permito informarles que el protocolo sometido por Ustedes a revisión por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución con nombre: **“Comparación de mediadores inflamatorios en lágrima de sujetos operados de cirugía refractiva con dos técnicas diferentes: LASIK versus SMILE” (CEI-2016/12/02)**, se **APROBÓ**, en su versión actual.

De acuerdo a los lineamientos establecidos por este comité le notifico que la vigencia de esta carta es por un año. Asimismo se le solicita que realice y entregue un reporte al final del estudio para darlo por concluido. (Subir información en la liga [unidaddeinvestigación.org/fap/comités/información](http://unidaddeinvestigacion.org/fap/comités/información)).

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,



Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra  
Presidente, Comité de Ética en Investigación  
Instituto de Oftalmología  
“Fundación de Asistencia Privada  
Conde Valenciana IAP”.



Chimalpopoca 14 Colonia Obrera, Delegación Cuauhtemoc. C.P. 06800. México, Distrito Federal. Teléfono: 5442-1700.  
Web: [www.institutodeoftalmologia.org](http://www.institutodeoftalmologia.org) Correo: [buzon@institutodeoftalmologia.org](mailto:buzon@institutodeoftalmologia.org)

FCV-053-180815



# Instituto de Oftalmología

“Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”®

Ciudad de México, a 2 de diciembre del 2016

Dra. Christian Denisse Pinkus Herrera  
Dra. María del Carmen Jiménez Martínez  
Dr. Enrique Graue Hernández  
M. en C. Henry Velásquez Soto

Departamento de Córnea

Presente.

Con respecto al protocolo “**Comparación de mediadores inflamatorios en lágrima de sujetos operados de cirugía refractiva con dos técnicas diferentes: LASIK versus SMILE**”, (CI-051-2016), me permito informarle que el Comité de Investigación APROBÓ su realización. Se incluyen a la presente algunas observaciones menores realizadas por los revisores del Comité.

A fin de cumplir la normatividad de la institución, es necesario que obtenga las cartas de aprobación de los Comités de Ética en Investigación y Bioseguridad. Agradeciendo su valiosa labor en las actividades de investigación de nuestra institución, me reitero a sus órdenes para cualquier aclaración.

Atentamente,

Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz  
Presidente, Comité de Investigación  
Instituto de Oftalmología  
Fundación de Asistencia Privada  
Conde Valenciana I.A.P.



**COMITÉ DE INVESTIGACIÓN**  
No. de Registro ante la Cofepris  
13 CI 09 015 261



FCV-053-180815  
Chimalpopoca 14 Colonia Obrera, Delegación Cuauhtemoc. C.P. 06800. México, Distrito Federal. Teléfono: 5442-1700.  
Web: [www.institutodeoftalmologia.org](http://www.institutodeoftalmologia.org) Correo: [buzon@institutodeoftalmologia.org](mailto:buzon@institutodeoftalmologia.org)