



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

CONCEPTOS ACTUALES SOBRE LA DEFENSA ANTIMICROBIANA DE LA SUPERFICIE OCULAR.

Presentado por: Raquel Frías Benito

Tutelado por: Dr. Yolanda Diebold Luque

Tipo de TFG: Revisión Investigación

En Valladolid a, 27 mayo 2020

RESUMEN

La superficie ocular dispone de diferentes mecanismos defensivos estructurales y moleculares para protegerla de la colonización por microorganismos que han conseguido superar las primeras barreras defensivas. La película lagrimal cuenta con la protección de una gran cantidad de moléculas antimicrobianas cuyos mecanismos de acción son variados y efectivos: las cascadas de reacción, la acción de barrera, la absorción de hierro, la ruptura de la pared celular y la muerte por choque osmótico o la creación de una capa hidrofílica que evita la adherencia de microorganismos. Cada vez son más y de menor tamaño las moléculas antimicrobianas descritas en la película lagrimal.

La desestabilización de la superficie ocular puede producir variaciones en la concentración de moléculas antimicrobianas, lo que puede contribuir a la aparición de infecciones, algunas muy graves. Su impacto en la patología infecciosa de la superficie ocular se está empezando a conocer y es objeto de intensa investigación.

ABSTRACT

The ocular surface has different structural and molecular defensive mechanisms. Many different antimicrobial molecules found in the tear film prevents the colonization of ocular surface structures by microorganisms that have managed to overcome the first defensive barriers. The mechanisms of action of these antimicrobial molecules include reaction cascades, the barrier action against pathogens, the absorption of iron molecules, the rupture of the cell wall and death by osmotic shock or the creation of a hydrophilic layer that prevents the adhesion of microorganisms. Over time, more and more antimicrobial molecules have been discovered and of a smaller size, in the tear film.

The destabilization of the ocular surface can produce variations in the concentration of antimicrobial molecules in the tear film, which can contribute to the onset of infections, some of them very serious. The impact of those variations in infectious eye diseases, is beginning to be known and is the subject of intense research.

ÍNDICE

1. Introducción	4
1.1. Concepto de Unidad Funcional Lagrimal / Superficie Ocular.....	4
1.2. Película lagrimal.....	6
1.3. Primera línea defensiva de la SO.....	6
2. Justificación	7
3. Objetivos.....	7
4. Metodología.....	7
5. Resultados y discusión	8
5.1. Mecanismos defensivos clásicos.....	8
5.2. Mecanismos defensivos estudiados más recientemente	10
5.3. Situaciones de alteración en la presencia de las moléculas antimicrobianas en la SO.....	12
5.4. Discusión.....	15
6. Conclusiones.....	17
7. Bibliografía.....	18
Anexo I Abreviaturas.....	20

Agradecimientos:

Quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Yolanda Diebold Luque, su ayuda y entrega todos estos meses.

Este TFG va dedicado a todas las mujeres que dedicaron y dedican su vida a la ciencia.

1. Introducción

1.1. Concepto de unidad funcional lagrimal / superficie ocular

La **Unidad Funcional Lagrimal (UFL)** está compuesta por la superficie ocular, formada a su vez por la córnea, la conjuntiva y el limbo, el sistema glandular, del que forman parte la glándula lagrimal principal, las accesorias, las glándulas de Meibomio y las células caliciformes, y una red neural que conecta estas estructuras. Su función es proteger la **película lagrimal (PL)** y mantener su función normal preservando una superficie óptica lisa, ya que la alteración de cualquiera de sus componentes puede afectar a los demás y conducir a patologías. La UFL fue descrita por Michael Stern y sus colaboradores en 1998.¹

La UFL es una unidad anatómica, histológica y fisiopatológica que se encarga de proteger el ojo de agentes externos y defenderlo de posibles lesiones.² A partir de ahora, por simplificar, nos referiremos a la UFL como **superficie ocular (SO)**. A continuación, se procede a describir brevemente sus principales elementos.

La **córnea** es un tejido transparente y avascular de entre 551 y 565 μm de grosor que se encuentra en la parte anterior del globo ocular. Junto con la PL forma parte del dioptrio ocular aportando aproximadamente dos tercios de la refracción del ojo.³ La córnea presenta la siguiente estructura:³

- **Epitelio:** tiene un espesor de 50 μm y es un conjunto de 5 – 7 capas de células epiteliales estratificadas no queratinizadas.
- **Capa de Bowman:** es una condensación de 12 μm de espesor de proteoglicanos y de colágeno tipo I y IV. Es acelular, aporta estructura a la córnea y no tiene capacidad de regeneración.
- **Estroma:** constituye el 80%-85% del espesor de la córnea, aproximadamente 500 μm . Está compuesto fundamentalmente por colágeno tipo I, VI y XII. El colágeno se empaqueta en paralelo en haces llamados fibrillas y las fibrillas en laminillas. En el centro de la córnea hay unas 200 capas de laminillas, aproximadamente, de 0,2 μm de espesor cada una. Cada capa se organiza de forma muy precisa, situándose en ángulo recto con la siguiente, para hacer posible la transparencia de la córnea.
- **Membrana de Descemet:** es una capa de 7 μm de espesor compuesta por colágeno tipo IV que producen las células endoteliales.
- **Endotelio:** es una única capa de células hexagonales de 5 μm de espesor que no se regenera y cuya densidad celular disminuye con los años.

La **conjuntiva** es un tejido mucoso compuesto de una capa de epitelio escamoso estratificado no queratinizado secretor y por tejido conectivo laxo. La conjuntiva cubre la esclera y abarca desde el limbo esclero-corneal hasta los fórnicies y desde los fórnicies hasta la superficie posterior de los párpados. La conjuntiva tiene una abundante vascularización, procedente de la arteria carótida externa, que proporciona anticuerpos y células del sistema inmunitario. El epitelio conjuntival está especializado en la secreción, entre otras cosas, y es el encargado de secretar mucinas, que son elementos defensivos que se describirán en detalle más adelante. En el epitelio se encuentran las células caliciformes, que reciben ese nombre por su forma parecida a la de una copa o un cáliz, y que secretan específicamente la mucina MUC5AC.^{3,4}

Las mucosas como el intestino, el sistema respiratorio o el tracto genital tienen un sistema de defensa antimicrobiano en la que las células que forman el tejido linfoide regional se asocian al tejido mucoso. Esta defensa recibe el nombre de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT). La conjuntiva también es una mucosa y tiene su propio MALT, llamado **tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT)**, que está al servicio de la protección de la SO. El CALT está compuesto por linfocitos T y células plasmáticas (linfocitos B diferenciados terminalmente) que producen IgA como se procederá a explicar más adelante. El CALT se puede condensar y ordenar en folículos o puede encontrarse de forma difusa en las diferentes regiones de la conjuntiva.⁵

El **limbo** es la zona de transición entre la córnea transparente y la esclera, que es opaca. Su epitelio es de 4-15 capas no queratinizado. El limbo tiene mucha importancia fisiopatológica porque contiene las vías de drenaje del humor acuoso y constituye el nicho de las células madre de la córnea, además de ser la zona de incisiones quirúrgicas para cirugías de cataratas y de glaucoma.^{4,6}

Las **glándulas de Meibomio** son una parte de los anexos oculares cuya función es secretar los lípidos de la PL. Fueron descritas por primera vez en el año 1666 por Johann Heinrich Meibom. Las glándulas de Meibomio se sitúan en el interior de los párpados superior e inferior y son perpendiculares a su margen.⁷

Las **glándulas lagrimales principales** son unas glándulas exocrinas que secreta la capa acuosa de la PL. También liberan inmunoglobulinas a la PL ayudando en la defensa antimicrobiana. La glándula lagrimal primaria se encuentra en la órbita temporal superior y un conjunto de canales llevan la lagrime a la SO.⁸ Las **glándulas lagrimales accesorias (ALGs)** son glándulas tubulares y se encuentran en el borde de los párpados. Las ALGs fueron descritas por Wolfring y Krause, y representan el 10% de la masa lagrimal total.⁹

Las estructuras de la SO están inervadas por una **red de fibras nerviosas** procedentes de la rama oftálmica del nervio trigémino (V par). El origen de estos nervios está en el troncoencéfalo del que salen tres tipos de fibras diferentes: sensoriales, simpáticas y parasimpáticas. Para inervar la córnea el nervio trigémino da a unas ramas ciliares largas que penetran en la esclera y en la córnea por el limbo y avanzan hasta el epitelio, donde las terminaciones nerviosas son 30-40 veces superiores a las de las yemas de los dedos.¹⁰ En la **Figura 1** aparecen representadas las trayectorias de los nervios desde su origen hasta las estructuras de la SO

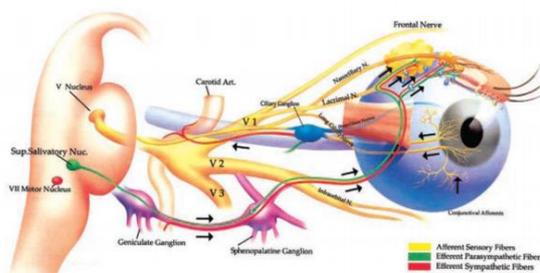


Figura 1. Esquema de la inervación del globo ocular (referencia 10).

La córnea está cubierta de receptores sensoriales (nociceptores) que se encargan de transducir estímulos térmicos, de sensación de sequedad ocular, químicos, mecánicos y dolorosos. Se sabe que el 20% de los nociceptores de la córnea son mecanorreceptores, el 70% nociceptores polimodales y el 10% receptores del frío. Cuando un patógeno se deposita sobre la SO los nervios de la córnea estimulan tanto la producción de lágrima como el parpadeo reflejo para ayudar a eliminarlo.¹¹

1.2. Película lagrimal

La PL es una estructura de 7-10 μm de espesor precorneal que se dispone separando la SO del ambiente exterior. Su función principal es lubricar e hidratar la SO. Fue descrita a finales de los años cuarenta por Eugene Wolff.¹²

Tradicionalmente se ha descrito como una estructura trilaminar compuesta por las capas lipídica, acuosa y mucosa. Esta diferenciación se hacía porque cada capa es secretada por una glándula diferente. Actualmente la PL se define como una estructura dinámica con dos capas, lipídica y mucoacuosa, puesto que los estudios recientes demuestran que la capa acuosa y la mucosa forman un gel muco-acuoso.¹²

La capa lipídica es la más externa de la PL y la secretan las glándulas de Meibomio. Consta de dos capas: una interna, compuesta por lípidos hidrofílicos polares, y otra capa externa de lípidos hidrofóbicos no polares. La función de la capa lipídica es la de retrasar la evaporación de la capa muco-acuosa. La capa muco-acuosa es un gel compuesto por mucinas, péptidos y proteínas, y electrolitos. Constituye aproximadamente el 90% del espesor de la PL. La parte acuosa es secretada por las glándulas lagrimales y la mucínica por las células caliciformes y el epitelio de la conjuntiva.

1.3. Primera línea defensiva de la SO

La SO necesita mantener su integridad estructural y su función. Para ello cuenta con un sistema defensivo que la protege de forma primaria y general. Esta protección la aportan a nivel morfológico la órbita, los párpados y las pestañas, y a nivel funcional el parpadeo junto con una población celular residente que forma parte de la inmunidad innata. Además, hay una flora bacteriana y fúngica saprófita residente que evita el sobrecrecimiento de **microorganismos (MO)** patógenos. En varios estudios se ha demostrado que estos MO protegen a la SO controlando la proliferación de MO patógenos y del desarrollo de patología.¹³

La **órbita** es una estructura ósea de forma piramidal e irregular formada por los huesos: frontal, maxilar, cigomático, esfenoides, etmoides, lagrimal y palatino. Es por ello por lo que protege el globo ocular de daños y golpes.¹⁴ Los encargados de la protección primaria de la SO son los párpados y las pestañas. Los párpados son pliegues epiteliales que además de proteger el globo ocular mantienen su posición, reparten la lágrima ayudando a hidratar la SO, y la redirigen hacia la vía lagrimal de drenaje.¹⁵ De los cantos de los párpados salen las pestañas, que son un conjunto de pelos cortos que protegen el ojo de partículas de todo tipo y se encargan de estimular el parpadeo.¹⁶

En la SO hay una población residente de células del sistema inmunitario que se encargan de la defensa antimicrobiana. Principalmente son dos tipos: macrófagos y células *Natural Killer*. Los **macrófagos** son células que permanecen inactivas hasta que las activa la presencia de MO y cuya capacidad fagocítica contribuye a eliminarlos.¹⁷ Las **células *Natural Killer*** son linfocitos inespecíficos que se encargan de matar células que puedan ser perjudiciales para la SO (infectadas, tumorales, etc.) y de regular las respuestas de las células presentadoras de antígeno y las células T adaptativas.¹⁸

2. Justificación

La SO es un complejo de estructuras que funcionan de forma conjunta para mantener la transparencia de la córnea y la visión. Al estar en contacto con el exterior, la SO está expuesta a una gran variedad de agentes patógenos que pueden poner en compromiso tanto su integridad como la del interior del globo ocular. Es por ello por lo que dispone de diferentes tipos de mecanismos defensivos, tanto inespecíficos más generales y como específicos.

Los avances tecnológicos desde el siglo XIX hasta el presente han permitido descubrir una gran variedad de moléculas antimicrobianas que contribuyen a la protección la SO de una forma más especializada.

En este **Trabajo de Fin de Grado (TFG)** se pretende actualizar los conocimientos que se tienen sobre la defensa de la SO a nivel molecular, analizando sus características y su mecanismo de acción.

3. Objetivos

El objetivo general de este TFG es realizar una investigación bibliográfica para revisar y actualizar la información que se conoce en relación con los mecanismos moleculares de defensa antimicrobiana de la SO. Los objetivos específicos son los siguientes:

- Presentar la evolución en el descubrimiento de distintas moléculas con capacidad antimicrobiana.
- Analizar los mecanismos de acción de cada una de las principales moléculas antimicrobianas.
- Describir los cambios que se producen como consecuencia de las alteraciones de la defensa de la SO.

4. Metodología

Este TFG se ha realizado llevando a cabo una investigación bibliográfica de los descubrimientos realizados en los últimos 125 años en el campo de la defensa antimicrobiana de la SO. Se han consultado las siguientes bases de datos: Scielo, Pubmed, Google académico y Medline plus.

Se han utilizado las siguientes palabras clave en castellano: moléculas antimicrobianas, protección antimicrobiana, defensa antimicrobiana, péptidos, proteínas, PL, superficie ocular, historia, lisozima, AMPs, lactoferrina y mucinas.

También se ha realizado una búsqueda en inglés con las siguientes key words: *Antimicrobial molecules, antimicrobial protection, antimicrobial defence, peptides, proteins, tear film, ocular surface, history, lysozyme, AMPs, lactoferrin and mucins.*

5. Resultados

Se ha revisado un total de 156 artículos publicados entre los años 1895 y 2020, de los cuales han sido utilizados y citados 54 por su relación y relevancia para los objetivos del TFG. Se ha realizado una lectura crítica para obtener los datos más específicos, que en ocasiones han supuesto búsquedas bibliográficas adicionales para completar la información, aunque no hayan sido citados.

5.1. Mecanismos defensivos clásicos

El **sistema del complemento** es parte de la inmunidad innata y es uno de los principales mecanismos de defensa mediada por anticuerpos. Fue observado por primera vez en el año 1895 por Jules Bodet ¹⁹ quien se dio cuenta que el suero infectado de algunos animales era capaz de lisis MO. descubrió que la capacidad de lisis del suero dependía de dos factores, uno termoestable y otro que era inactivado si se calentaba a 56°C durante 30 minutos. ²⁰

Hoy en día se conoce al sistema del complemento como la activación secuencial de moléculas de la membrana celular y la cascada de eventos que terminan en lisis celular. Consta de más 30 proteínas solubles en la sangre o asociadas a la membrana con actividad catalítica. Los componentes del sistema del complemento son glucoproteínas con algunas diferenciaciones fisicoquímicas. Se nombran con la letra C seguida de un número y un subíndice. Otros componentes tienen el nombre de la función que realizan. ²⁰

La activación del sistema se puede conseguir por varias vías como aparece esquematizado en la **Figura 2**.

- **Vía clásica**

La vía clásica comienza con la unión del anticuerpo a la superficie celular. En la vía clásica es imprescindible la unión de IgM o IgG a patógenos u otros agentes extraños externos. La activación se produce cuando más de dos fragmentos de Fc del anticuerpo reacciona con la molécula C1q que produce la activación de C1s y C1r. Las pentraxinas son unas proteínas que se sintetizan en el hígado y que son capaces de reconocer patógenos y eliminarlos uniéndose a las C1q.

El C3 se acorta para dividirse en C3a y C3b, el último actúa como una opsonina y activa aún más el sistema del complemento. El C3b forma otros complejos como las C3bBbC3b y C4bC2aC3b que son convertasas de la C5.

El C1q genera una reacción en cascada que daña la membrana celular y hace que el C8 penetre dentro de la célula. El complejo de ataque a la membrana (C5b-9, MAC) se crea luego de la unión de C6 y C7 ab y luego estas a C8 y C9. El complejo MAC desordena los lípidos de la membrana generando un poro a través de los que sale agua y iones terminando la cascada de reacciones con la lisis celular. ²⁰

- **Vía alternativa**

La vía alternativa se activa al hidrolizarse un enlace tioéster presente en la molécula C3 que se une a la molécula FB y genera las moléculas C3a y C3b. C3b se asocia al factor B que es escindido por el factor D en dos fragmentos Bb

y Ba. La properdina se une a el compuesto formado por el C3bBb para estabilizar la cascada de reacciones. Al compuesto C3bBb se le llama C3 convertasa y se le une otra molécula de C3 formando C3bBbC3 denominada C5 convertasa, que es capaz de cortar C5 en dos fragmentos C5a y C5b y que sirve como iniciador para la formación del complejo de ataque a la membrana al añadirse los componentes de C6 a C9.²¹

- **Vía de las lectinas**

Esta vía se activa cuando las lectinas se unen a la manosa (MBL) o cuando la ficolina se une a restos de carbohidratos que están en la superficie de los patógenos. El MBL y la ficolina están en el suero con proteínas asociadas a MBL y forman el MASP. El MASP se autoactiva haciendo que el C4 se divida en C4a y C4b. El C4b se une a la superficie del patógeno, que es escindida por MASPs para dividir C2 en C2a y C2b. C2a se une a C4b, adquieren propiedades enzimáticas y forman la convertasa lectina C3 C4bC2a.²⁰

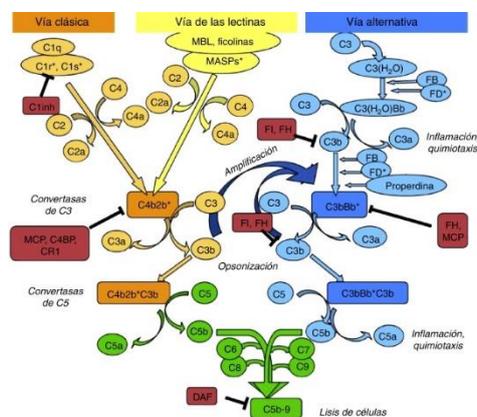


Figura 2. Esquema del sistema del complemento (referencia 21)

La **inmunoglobulina A secretora (slgA)** es el principal anticuerpo presente en la lágrima. En el ojo, fue descrita en el año 1963 por Chodirker y Tomasi.²² La producen las células plasmáticas que residen en la glándula lagrimal, las glándulas lagrimales accesorias y el CALT. A la IgA, que forma dímeros, la captan las células acinares en la glándula lagrimal y las epiteliales de la conjuntiva. La IgA atraviesa la célula por endocitosis y se libera por la zona apical unida a una proteína denominada componente secretor, producida por las propias células epiteliales. Esta proteína aporta estabilidad al complejo slgA. La slgA se une a los patógenos evitando que estos se unan a las células del epitelio de la SO, por lo que actúa como barrera inmune. También, forma un inmunocomplejo que pone en marcha la cascada que activa el sistema del complemento.^{23,24}

La **lisozima o muramidasa** es una enzima antimicrobiana muy abundante en el organismo. Está compuesto por 129 aminoácidos y tiene un peso molecular de 14 kD. Es una de las principales proteínas de la PL y se sitúa en la capa acuosa, representando entre el 20 y el 40% del total. La lisozima es secretada por las glándulas lagrimales principales y accesorias y sus niveles normales están entre 0,6 y 2,6 mg/mL. Fue descubierta por Alexander Fleming en 1922.²⁵ La lisozima se activa con las bacterias Gram⁺ y produce lisis en la pared celular.²⁶

La **lipocalina** pertenece a una familia de proteínas de bajo peso molecular entre 18-40 kD y constituye el 25% del total de proteínas en la lágrima. Es secretada por las células acinares de la glándula lagrimal principal. La función de las lipocalinas es muy diversa, como el transporte de retinol, la síntesis de prostaglandinas, la regulación de la respuesta inmune y la mediación del transporte celular. La lipocalina es capaz de unir compuestos que transportan hierro a los MO, llamados sideróforos, producidos por bacterias y hongos. También, la lipocalina inhibe las proteasas de origen microbiano.^{23,27}

La **lactoferrina** es una glucoproteína con actividad antibacteriana y antiinflamatoria que supone el 25% de las proteínas de la PL y su concentración es de 2,2 mg/mL Fue descrita en 1966 por Masson.²⁸ La lactoferrina se une a dos átomos de hierro de forma reversible activando su propiedad antimicrobiana. La unión con los dos átomos de hierro produce que la concentración de hierro disminuya y los patógenos no puedan absorber ese elemento.^{29,30}

5.2. Mecanismos defensivos estudiados más recientemente

En los últimos 30 años se han descubierto numerosas moléculas antimicrobianas con funciones específicas, que se describen a continuación junto con su mecanismo de acción.

La **fosfolipasa secretora enzimática A2 (sPLA2)** es una proteína producida por la glándula lagrimal y por las células epiteliales corneales y conjuntivales. Tiene un peso molecular de 13,9 kD, está compuesta por 124 aminoácidos y su concentración en la lágrima es de unos 30 mg/ml. La sPLA2 es la proteína lagrimal con más actividad contra las bacterias Gram⁺ aunque no presenta ninguna actividad con las Gram⁻.^{23,31}

La sPLA2 es una proteína catiónica que se une a la superficie bacteriana, que actúa como un anión. Mata a la bacteria a través de su actividad enzimática lipolítica hidrolizando el ácido graso sn-2 a partir de fosfolípidos, en particular el fosfatidilglicerol, que es abundante en las membranas celulares bacterianas.²³

El **inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora (SLPI)** es una proteína catiónica, compuesta por 107 aminoácidos y con un peso de 11,7 kD, que pertenece a la familia de la proteína ácida del suero. El SLPI es producido por las glándulas lagrimales y las células epiteliales de la SO.²³

El SLPI participa en la inmunidad innata y en la adaptativa, y tiene propiedades antiinflamatorias, antivirales, antifúngicas, antimicrobianas y anti-proteasas. Actúa como inhibidor de las serin proteasas, como la tripsina, la quimotripsina, la elastasa y la catepsina G. Presenta actividad contra las bacterias Gram⁺ y Gram⁻, los hongos y el VIH.

Las **mucinas** son glucoproteínas de alto peso molecular ricas en serinas y treoninas presentes en la PL. Las producen las células epiteliales caliciformes y secretoras no caliciformes de la conjuntiva, y también el epitelio corneal. Su principal misión es mantener la hidratación y lubricar la SO.^{23,32}

Se han caracterizado dos tipos de mucinas:

- **Mucinas secretoras:** son capaces de capturar alérgenos, restos celulares y patógenos. Pueden ser de tipo gelificante grande, como las MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 y MUC19, o pequeñas mucinas

solubles como las MUC7, MUC8 y MUC9. La MUC5AC es la única producida específicamente por las células caliciformes de la conjuntiva. Se la ha caracterizado como una molécula con función de limpieza, ya que presenta la capacidad de atrapar los patógenos que están atacando la SO y, junto con el parpadeo, ayudar a desplazar a los patógenos hacia la vía de drenaje lagrimal.

- **Mucinas asociadas a la membrana (MAM):** las MAM son proteínas transmembrana cuya función es la lubricación. Poseen mecanismos antiinflamatorios y barrera frente a los patógenos. La SO dispone de mucinas como las MUC1, MUC4 y MUC 16 que se localizan en la parte anterior de las células epiteliales apicales formando el glicocáliz. Las MAM están compuestas por heterodímeros de distinto tamaño unido entre sí por un enlace covalente.

Las proteínas surfactantes (SP) A y D son un tipo de proteína perteneciente a la familia de las lectinas solubles tipo C. La SPA y la SPD son producidas por las glándulas lagrimales y también por las células epiteliales corneales y conjuntivales. La SP-A tiene un peso molecular de 28 a 36 kD y la SP-D de 43 kD.^{23,33,34} Para actuar, ambas proteínas se unen a los carbohidratos de las superficies microbianas y a los receptores en las células fagocíticas que produce que los patógenos sean eliminados por estas últimas.^{24,34}

Los **péptidos antimicrobianos (AMPs)** son pequeñas moléculas anfipáticas de menos de 50 aminoácidos con capacidad antiinflamatoria y antibiótica de amplio espectro contra bacterias, virus, levaduras y hongos, que forman parte de la inmunidad innata. Clínicamente los AMPs son muy importantes porque no hay tanta resistencia a los AMPs como a los antibióticos.^{23,35}

El primer AMP lo descubrió Dubos en 1939, al extraer un AMP de una cepa de *Bacillus*.³⁶ En 1987 Zasloff aisló una familia de AMPs de la piel de la rana *Xenopus laevis*. Zasloff experimentó las propiedades antibacterianas de los AMPs contra bacterias, hongos y protozoos.³⁷

El mecanismo de acción de los AMPs se basa en la actividad catiónica de estos, es decir, tienen una carga positiva (+2 o más) y a través de una interacción electrostática lisa la pared celular y conduce a la muerte celular por alteración osmótica como aparece esquematizado en la **figura 3**. Esta carga positiva se debe a un exceso de aminoácidos como la arginina y la lisina.^{38,39}

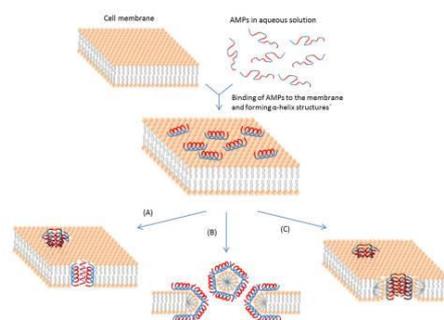


Figura 3. Esquema del mecanismo de acción de los AMPs (referencia 38).

Existen varios tipos de AMPs.^{40,41,42}

- Las **α -defensinas** son proteínas catiónicas secretadas por neutrófilos, de 2-4 kD y 29-34 aminoácidos, que participan en la inmunidad innata luchando contra bacterias Gram⁺ y Gram⁻, patógenos, hongos y virus. Se han identificado 6 α -defensinas, 4 de ellas en neutrófilos de la SO y la PL.

- Las **β -defensinas** son proteínas catiónicas de 29-34 aminoácidos y con un peso molecular de 2-4 kD, sintetizadas y secretadas por las células epiteliales de la SO. Se han identificado 4 β -defensinas en humanos en las células epiteliales de la córnea y la conjuntiva.

Las defensinas actúan gracias a la actividad catiónica de la proteína que provoca que en la superficie bacteriana aparezcan poros lisando así la célula.⁴⁰

- El **LL-37** es un tipo de AMP que pertenece al grupo de catelicidinas. Se trata de un péptido de 37 aminoácidos y un peso molecular de 18 kD que deriva de la excisión del péptido hCAP18.⁴³ El LL-37 lo secretan los neutrófilos de la SO y de la PL, y las células epiteliales de la conjuntiva y la córnea donde se almacena en gránulos.⁴⁴

El LL-37 presenta una gran actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos (especialmente *Candida sp.*) y virus (herpes simple, adenovirus y virus de la inmunodeficiencia humana), aunque la eficacia varía según la cepa. El LL-37 forma una estructura secundaria cuando está en una solución acuosa que altera la membrana celular dependiendo del aminoácido terminal y la longitud de la cadena.³⁹

En la **figura 4** se presenta un resumen de las principales moléculas antimicrobianas de la SO y las vías de producción de cada una.

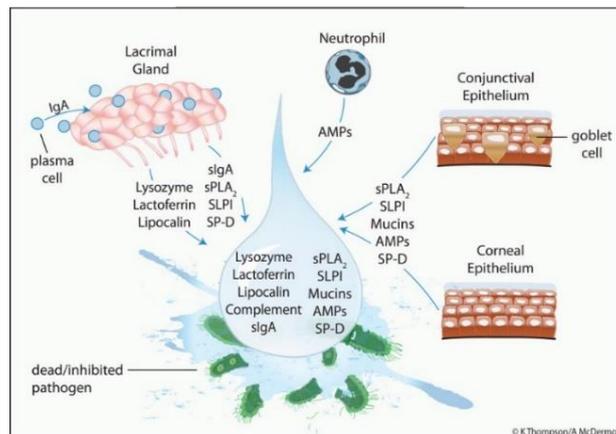


Figura 4. Resumen de las proteínas antimicrobianas de la lágrima (referencia 23).

5.3. Situaciones de alteración en la presencia de moléculas antimicrobianas en la SO

En los apartados anteriores se ha comentado que la lágrima tiene una gran cantidad de moléculas con actividad antimicrobiana cuya función es defender la SO de patógenos. Estas moléculas trabajan de forma conjunta para mantener la colonización a un nivel muy bajo en comparación con otras mucosas.⁴⁴

Los niveles de moléculas defensivas presentes de la PL pueden verse alterados en ciertas situaciones:⁴⁵

Frías R.

Conceptos actuales sobre la defensa antimicrobiana de la superficie ocular

- Uso crónico de medicamentos sistémicos que inhiben la producción de la lágrima, como los antidepresivos.
- Baja humedad y contacto directo con el flujo de aire acondicionado que aumentan la evaporación de la lágrima.
- Cirugía refractiva: los pacientes operados con técnica LASIK presentan síntomas de irritación ocular.
- Uso de **lentes de contacto (LC)**.

Por el elevado número de usuarios de LC en todo el mundo, se van a mencionar a continuación las alteraciones descritas en los niveles de moléculas antimicrobianas como consecuencia de su uso.

Las LC son una opción de corrección refractiva muy popular, sin embargo, un mal uso de LC puede poner en peligro la SO. La falta de higiene en la LC y durante su manipulación pueden favorecer la infección bacteriana.²³ Al poner una LC en la SO se producen unos cambios:⁴⁴

- División de la PL en pre-LC y post-LC.
- Aumento el tiempo de evaporación.
- Disminución del BUT a la mitad.
- Reducción del recambio epitelial.
- Hipoxia.
- Contacto mayor con la SO de posibles patógenos como la *Acanthamoeba sp* si existe contaminación.

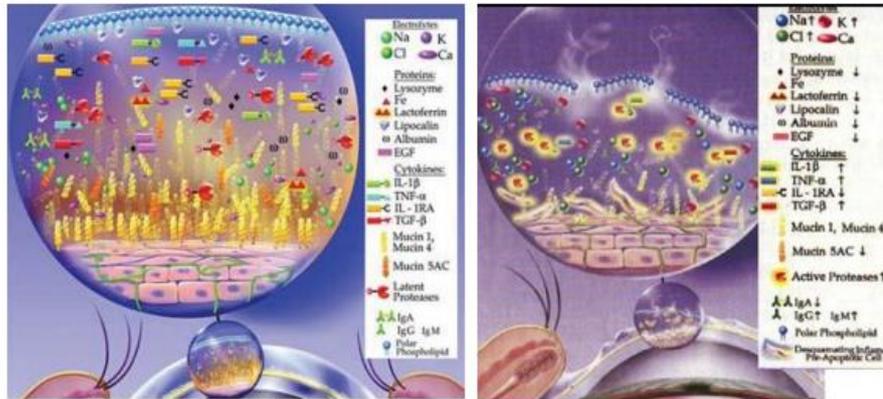
En los estudios realizados sobre las moléculas antimicrobianas de la lágrima en el uso de LC se han obtenido resultados contradictorios sobre el aumento o disminución de las proteínas. Esto se debe al tipo de LC que llevaba el usuario, a la manera de tomar la muestra y la cantidad tomada en cada estudio. En uno de ellos se concluyó que cuando un usuario se pone una LC la lisozima, la lactoferrina, la sPLA2 y las mucinas se unen a la superficie de la lente mejorando la adhesión bacteriana. En unos estudios se concluye que la cantidad de lisozima aumenta, mientras en otro estudio esta disminuye. En dos estudios el nivel de sPLA2 se mantiene igual, pero en un tercero el valor disminuye. A pesar de las contradicciones se encontraron algunas generalidades que están recogidas en la **Tabla 1**.²³

Tabla 1: resumen de los cambios en los niveles de moléculas defensivas de la SO de usuarios de LC (tomado de la referencia 23)

PERMANECEN IGUALES	DESCIENDEN
Lisozima	slgA
Lactoferrina	Mucinas
sPLA2	

También se han descrito alteraciones en los niveles de moléculas antimicrobianas en ciertas patologías. Una de las principales enfermedades que desestabilizan la SO es el **Síndrome del Ojo Seco (SOS)**. Según el informe de 2007 *Dry Eye Workshop* el SOS es una enfermedad inflamatoria multifactorial de la PL y de la SO que es causada por una disminución en la producción de lágrima o un aumento en su evaporación y cursa con síntomas de incomodidad,

perturbación visual e inestabilidad de la PL que puede dañar potencialmente la SO. En el SOS la osmolaridad de la PL aumenta hasta valores superiores a 300 mOsm/L.⁴⁶ En la **figura 5** podemos ver las diferencias entre una PL sana y una PL con SOS. En la imagen de la derecha se puede ver como la capa lipídica está fragmentada, la capa acuosa se evapora y pierde moléculas defensivas.



En pacientes diagnosticados de SOS se han estudiado los niveles de las moléculas antimicrobianas de la SO. En la **Tabla 2** se resumen los cambios encontrados.

Tabla 2: resumen de los cambios de la SO en un proceso de SOS (referencia 23).

DISMINUCIÓN DE LOS VALORES	AUMENTO DE LOS VALORES
Lisozima	sPLA2
Lactoferrina	MUC1
Lipocalina	
MUC5AC	

Al verse afectada la PL puede suponerse que un paciente con SOS tenga más riesgo de infección que una persona sana. Las **queratitis microbianas** son infecciones en la SO que pueden llegar a ser muy graves. Los síntomas de las queratitis bacterianas son el ojo rojo, dolor, inflamación, disminución de la agudeza visual y lagrimeo. Se diagnostica por infiltración estromal, hipopion, y signos de inyección conjuntival. Estas infecciones pueden estar causadas por bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* y *Serratia*, por hongos como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Phaeohiphomyces*, *Curvularia*, *Paecilomyces*, *Scedosporium* y *Candida*, o por patógenos protistas como *Acanthamoeba spp.*⁴⁷

En 2013 Narayanan y sus colaboradores⁴⁸ analizaron las posibles conexiones entre el SOS y las queratitis microbianas. El estudio concluyó que apenas existía relación entre ambas enfermedades debido a que la disminución de algunas moléculas quedaba compensada con el aumento de otras.²³

Un tipo de queratitis microbiana puede estar causada por *Pseudomonas aeruginosa* que es una bacteria que pertenece a la familia *Pseudomonas* y crece en zonas húmedas. Está presente en el suelo y en el agua. La infección suele ser accidental, grave y suele manifestarse con úlceras en la córnea incluso de forma penetrante. Se sabe que durante la infección por *Pseudomonas* las moléculas antimicrobianas trabajan de forma sinérgica y coordinada para impedir la colonización y proliferación del MO por la SO.^{49,50}

Sin embargo, existen queratitis microbianas que pueden derivar del mal uso de las LC. Este es el caso de la infección por *Acanthamoeba spp* que es una bacteria de vida libre y se encuentra en el agua dulce, del grifo, en piscinas cloradas o en el agua contaminada. La exposición a este MO puede producirse al nadar con LC, enjuagarlas con agua del grifo en vez de líquido estéril o al estar en contacto con agua contaminada. Esta bacteria coloniza la SO adhiriéndose al epitelio corneal pudiéndose producir infecciones recurrentes, por lo tanto, la infección corneal por *Acanthamoeba* no produce inmunidad.⁵¹

Los virus también pueden infectar la SO. Por ejemplo, el virus del herpes simple (HSV) es la principal causa de ceguera infecciosa en países desarrollados. El HSV infecta la córnea produciendo una disminución de la agudeza visual. Los AMPs presentan, entre otras, propiedades antivirales. Se han estudiado las propiedades del LL-37 contra el HSV concluyendo que causan una inhibición significativa, aunque esta inhibición puede variar dependiendo de la cepa del virus.⁵²

Las queratitis micóticas están provocadas por hongos. Estas infecciones son notablemente más dañinas para la SO que las infecciones bacterianas debido a la escasez de fármacos antifúngicos. Las moléculas antimicrobianas como la lisozima, lactoferrina, lipocalina, SLP, los AMPs junto con las defensinas y el LL-37, presentan actividad antifúngica y consiguen reducir la unión de los hongos a las células.⁵³

5.4. Discusión

Los resultados de este trabajo muestran la gran diversidad de moléculas que están implicadas en la defensa antimicrobiana de la SO y, por consiguiente, del globo ocular. Durante la segunda mitad del siglo XX se han descubierto nuevas moléculas con actividad antimicrobiana y mecanismos de acción diferentes. Estas moléculas, junto con las que ya eran conocidas de forma clásica, están ayudando a comprender mejor la estructura y el equilibrio de la SO y de la PL.

Las principales diferencias encontradas entre las moléculas descubiertas más recientemente y las ya conocidas se describen a continuación. Las moléculas más “clásicas” tienen cadenas largas de aminoácidos con un mayor peso molecular y representan un mayor porcentaje en la lágrima. Sin embargo, las moléculas descubiertas más recientemente son péptidos cortos, con menos aminoácidos y menor peso molecular, y representan menor porcentaje en la PL.

En este TFG se han presentado las moléculas por orden de descubrimiento, de más antiguas a más modernas. La **figura 6** presenta un cronograma de forma esquemática con las fechas del descubrimiento de las moléculas antimicrobianas más importantes.

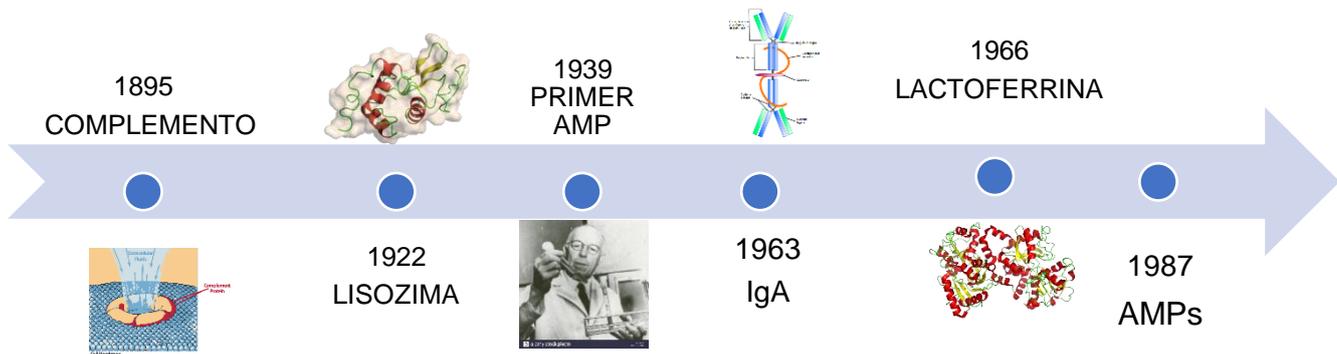


Figura 6. Cronograma sobre el descubrimiento de las principales moléculas antimicrobianas de la SO

Hoy en día, se siguen descubriendo y caracterizando proteínas nuevas en la PL. Para caracterizarlas se utiliza el espectrómetro de masas y desde 1997 el número ha aumentado de 6 a 1526, como se refleja en la **tabla 3**⁵⁴ Este hecho nos permite reflexionar sobre la complejidad de la composición de la PL y sobre la importancia de su función antimicrobiana. Es posible que en el futuro se sigan descubriendo moléculas de acción antimicrobiana directa presentes en la PL.

Tabla 3. Aumento de proteínas identificadas en la lágrima por el espectrómetro de masas desde 1997 hasta 2015 (referencia 54).

Publicación	Año	Proteínas
Molloy et al.	1997	6
Li et al.	2005	54
Zhou et al.	2006	60
De Souza et al.	2006	491
Zhou et al.	2012	1543
Aass et al.	2015	1526

Durante los últimos años cabe destacar la investigación que se está realizando sobre los AMPs. Se ha hecho una búsqueda en *PubMed* con las palabras clave *ocular surface AND antimicrobial peptides* y se ha hecho una gráfica (**figura 7**) comparando el número de artículos publicados (eje Y) por año (eje X) agrupados en intervalos de 5 años desde 1982 hasta 2020.

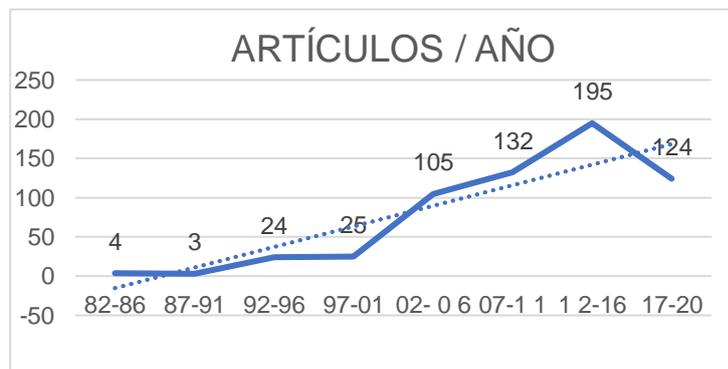


Figura 7. Evolución en la investigación sobre los AMPs

En la gráfica se observa como los estudios sobre los AMPs han ido aumentando de forma clara. Especialmente en los últimos 20 años, se aprecia un importante incremento en el número de publicaciones, lo que demuestra el gran interés que despiertan estas moléculas como protectoras de la SO.

Cuando la SO es atacada las moléculas antimicrobianas trabajan coordinadas para impedir que el patógeno cause cualquier daño. Dado que existen más moléculas antibacterianas que antifúngicas o antivirales, la participación de unas u otras moléculas variará dependiendo del tipo de MO (bacteria, virus u hongo) causante del ataque.

6. Conclusiones

La conclusión general de este trabajo es que la naturaleza ha dotado a la superficie del ojo con una gran variedad de mecanismos moleculares defensivos para ayudar a preservar la transparencia de la córnea y, por consiguiente, la visión. De forma específica:

- Se han identificado numerosas moléculas desde finales del siglo XIX y especialmente en la segunda mitad del siglo XX, cuya estructura varía desde largas cadenas proteicas a péptidos de muy pequeño tamaño, pero todas ellas con potente actividad antimicrobiana.
 - Los mecanismos de acción de estas moléculas son muy variados y van desde específicamente antibacterianos, antivirales o antifúngicos a mecanismos combinados o generales.
 - La desestabilización de la SO puede producir variaciones en la concentración de moléculas antimicrobianas en la PL, lo que podría contribuir a la aparición de infecciones, aunque no se conoce aún en muchos casos.
-

7. Bibliografía

- 1) Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: The interaction between the ocular surface and lacrimal glands. 1998; 17: 584-589.
- 2) Rolando M, Zierhut M. The Ocular Surface and Tear Film and Their Dysfunction in Dry Eye Disease. *Surv Ophthalmol.* 2001;45:203-210.
- 3) Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol.* 2018;66(2):190–194.
- 4) Nichols BA. Conjunctiva. *Microsc Res Tech.* 1996;33(4):296-319.
- 5) Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat.* 2005;206(3):271-285.
- 6) Van Buskirk EM. The anatomy of the limbus. *Eye (Lond).* 1989;3 (Pt 2)(2):101-108.
- 7) Butovich, I. Meibomian glands, meibum, and meibogenesis. *Exp Eye Res.* 2017;163:2-16.
- 8) Garg A, Zhang X. Lacrimal gland development: From signaling interactions to regenerative medicine. *Dev Dyn.* 2017;246(12):970-980.
- 9) Seifert P, Spitznas M, Koch F CA. The architecture of human accessory lacrimal glands. *Ger J Ophthalmol.* 1993;2:444-454.
- 10) Pflugfelder SC, Beuerman RW, Stern ME. *Dry Eye and Ocular Surface Disorders.* New York, Marcel Dekker. 2004.
- 11) Yang AY, Chow J, Liu J. Corneal innervation and sensation: The eye and beyond. *Yale Journal of Biology and Medicine.* 2018;Vol. 91: 13-21.
- 12) Gipson IK. The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision. *Ocul Surf.* 2010;48(10):4390-4398.
- 13) Lu LJ, Liu J. Human microbiota and ophthalmic disease. *Yale Journal of Biology and Medicine.* 2016: Vol. 89: 325-330.
- 14) Turvey TA, Golden BA. *Orbital Anatomy for the Surgeon.* *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2012;24(4):525-536.
- 15) Murillo Paz G, Buitrago Conde F. Unidad Didáctica 12: Patología de los anexos oculares. En: Pastor Jimeno JC, Maldonado Lopez MJ. *Guiones de Oftalmología.* 2012. p. 139-141.
- 16) Amador GJ, Mao W, DeMercurio P, Montero C, Clewis J, Alexeev A, et al. Eyelashes divert airflow to protect the eye. *J R Soc Interface.* 2015;12(105)
- 17) Valle U, Torre L, De A, Ximena M, Valle U, Delors J. *Inmunología ocular: síndromes de ojo seco.* 2002;
- 18) Kumar S. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology.* 2018;154(3):383-393.
- 19) Bordet J. Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccinés. *Ann Inst Pasteur.* 1895;9:462–506.
- 20) Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell and Tissue Research.* Nature Publishing Group. 2011: 343: 227-235.
- 21) Nozal P, López-Trascasa M. Autoanticuerpos frente a proteínas de la vía alternativa del complemento en enfermedad renal. *Nefrología.* 2016;36(5):489-495.
- 22) Chodirker WB, Tomasi TB. Gamma-Globulins: Quantitative Relationships in Human Serum and Nonvascular Fluids. *Science (80-)* 1963;142(3595):1080-1081.
- 23) McDermott AM. Antimicrobial compounds in tears. *Exp Eye Res.* 2013;117:53-61.
- 24) Sullivan DA, Allansmith MR. Source of IgA in tears of rats. *Immunology.* 1984;53(4):791-799.
- 25) Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc London Ser B, Contain Pap a Biol Character.* 1922;93(653):306-317.
- 26) Pérez-Calderón R, Gonzalo-Garijo MA, Lamilla-Yerga A, Mangas-Santos R, Moreno-Gastón I. Recurrent angioedema due to lysozyme allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2007;17(4):264-266.

- 27) Flower DR. The lipocalin protein family: Structure and function. *Biochem J.* 1996;318(1):1-14.
- 28) Masson PL, Heremans JF, Dive CH. An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin Chim Acta.* 1966;14(6):735-739.
- 29) Kijlstra A, Jeurissen SHM, Koning KM. Lactoferrin levels in normal human tears. *Br J Ophthalmol.* 1983;67(3):199-202.
- 30) Garreis F, Gottschalt M PF. Antimicrobial peptides as a major part of the innate immune defense at the ocular surface. *Dev Ophthalmol.* 2010;45:16-22.
- 31) Qu XD, Lehrer RI. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun.* 1998;66(6):2791-2797.
- 32) Mantelli F, Argüeso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(5):477-483.
- 33) Schicht M, Garreis F, Hartjen N, Beileke S, Jacobi C, Sahin A, et al. SFTA3 – a novel surfactant protein of the ocular surface and its role in corneal wound healing and tear film surface tension. *Sci Rep.* 2018;8(1):9791.
- 34) Brauer L, Kindler C, Jaeger K, Sel S, Nölle B, Pleyer U, et al. Detection of Surfactant Proteins A and D in Human Tear Fluid and the Human Lacrimal System. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2007;48(9):39-45.
- 35) Kang H-K, Kim C, Seo CH, Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol.* 2017;55(1):1-12.
- 36) Dubos RJ. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *J Exp Med.* 1939;70(1):1-10.
- 37) Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(15):5449-5453.
- 38) Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. 2010;14(1):55-67.
- 39) Bahar A, Ren D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals.* 2013;6(12):1543-1575.
- 40) McDermott AM. The Role of Antimicrobial Peptides at the Ocular Surface. *Ophthalmic Res.* 2009;41(2):60-75.
- 41) White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol.* 1995;5(4):521-527.
- 42) Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. Defensins. *Eur J Haematol.* 2009;44(1):1-8.
- 43) Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006;1758(9):1408-1425.
- 44) Dartt DA, Willcox MDP. Complexity of the tear film: Importance in homeostasis and dysfunction during disease. *Experimental Eye Research.* 2013;117: 1-3.
- 45) Barabino, S., Chen, Y., Chauhan, S., & Dana R. Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. *Prog Retin eye Res.* 2012;31:271-285.
- 46) Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):276-283.
- 47) Lakhundi S, Siddiqui R, Khan NA. Pathogenesis of microbial keratitis, *Microbial Pathogenesis.* Academic Press; 2017:104:97-109.
- 48) Narayanan S, Redfern RL, Miller WL, Nichols KK, McDermott AM. Dry eye disease and microbial keratitis: Is there a connection?, *Ocular Surface.* Elsevier Inc.; 2013: 11: 75-92
- 49) Larry M, Charles E. Manual MSD Infecciones por *Pseudomonas*. <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/infecciones-por-pseudomonas> (31 de marzo de 2020)
- 50) Evans DJ, Fleiszig SMJ. Why does the healthy cornea resist *pseudomonas aeruginosa* infection? *Am J Ophthalmol.* 2013;155(6):961-970.
- 51) Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors.* 2012;5:6. Published 2012 Jan 10.

Frías R.

Conceptos actuales sobre la defensa antimicrobiana de la superficie ocular

- 52) Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Proske RJ, McDermott AM. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res.* 2005;30(5):385-394.
- 53) Maharana PK, Sharma N, Nagpal R, Jhanji V, Das S, Vajpayee RB. Recent advances in diagnosis and management of Mycotic Keratitis. *Indian J Ophthalmol.* 2016;64(5):346-357.
- 54) Azkargorta M, Soria J, Acera A, Iloro I, Elortza F. Human tear proteomics and peptidomics in ophthalmology: Toward the translation of proteomic biomarkers into clinical practice. *J Proteomics.* 2017;150:359-367
-

Anexo I: Abreviaturas

ALGs: Glándulas lagrimales accesorias

AMPs: Péptidos Antimicrobianos

CALT: Tejido linfoide asociado a la conjuntiva

HVS: Virus del Herpes Simple

kD: kilo Dalton

LC: Lente de contacto

MALT: Tejido linfoide asociado a la mucosa

MAM: Mucinas asociadas a la membrana.

MBL: Manosa

MO: Microorganismos

MUC: Mucina

PL: Película lagrimal

slgA: Inmunoglobulina A secretora

SLPI: Inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora

SO: Superficie ocular

SOS: Síndrome del ojo seco

SPA: Proteína surfactante A

SPD: Proteína surfactante D

sPLA2: Fosfolipasa secretora enzimática A2

TFG: Trabajo de fin de grado

UFL: Unidad funcional lagrimal

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana