

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA,
DERMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**UTILIDAD DIAGNÓSTICA Y TERAPÉUTICA DEL ANÁLISIS MOLECULAR EN LA
QUERATOCONJUNTIVITIS VERNAL**

BEATRIZ IGLESIAS BLANCO

DIRECTORA: DRA. ALICIA ARMENTIA MEDINA

VALLADOLID, NOVIEMBRE 2014

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a los facultativos del Departamento de Alergología e Inmunología Clínica del Hospital Río Hortega de Valladolid con especial mención a mi Directora de Tesis Doctoral, la Dra. Alicia Armentia Medina por su bien hacer, su paciencia y ayuda constante durante la realización de este proyecto de Tesis Doctoral.

A Blanca Martin Armentia por su callada pero muy valiosa ayuda en la preparación y desarrollo de las técnicas de microarrays en el Laboratorio de Investigación del Hospital Río Hortega de Valladolid.

A mis padres Carmen y Darío y a mis hermanos David, Lucía y Raquel por su confianza y apoyo en los momentos difíciles.

ABREVIATURAS

AINE: Anti-inflamatorio no esteroideo.

ANOVA: Test de análisis de la varianza.

APCs: Células presentadoras de antígeno.

ARIA: *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma.*

CA: Conjuntivitis alérgica.

CAE: Conjuntivitis alérgica estacional.

CAP: Conjuntivitis alérgica perenne.

CDR: Diagnóstico molecular por componentes.

CPA: Célula presentadora de antígeno.

CPG: Conjuntivitis papilar gigante.

DCC: Dermatoconjuntivitis de contacto.

EAACI: *European Academy of Allergy and Clinical Immunology.*

EAPIQ: *Eye Allergy Patient Impact Questionnaire.*

EAST: Enzimo-inmunoensayo.

ECP: Proteína catiónica del eosinófilo.

ELISA: Método de enzimo-inmunoensayo.

FcεRI: Receptor específicos de alta afinidad para IgE.

GM-CSF8: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor-8.

HEDQ: *Health Economic and Demographic questionnaire.*

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular tipo I

IFNγ: Interferón-γ.

IL: Interleucina

ITE: Inmunoterapia específica

L Treg: Linfocitos T reguladores.

MBP: Major Basic Protein.

MCP: Proteína quimiotáctica de monocitos.

MHC-I: Molécula tipo I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

MHC-II: Molécula tipo II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

MIP-1 α : Proteína inflamatoria de macrófagos 1- α .

MMP: Metaloproteinasas de la matriz

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

PAF: Factor activador plaquetario.

PCA-test: *Passive Cutaneous Anaphylaxis Test*.

PCE: Provocación conjuntival específica.

QCA: Queratoconjuntivitis atópica.

QCV: Queratoconjuntivitis vernal.

RANTES: *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*; (quimioquina quimiotáctica para eosinófilos, basófilos y linfocitos).

RAST: Radioalergeno sorbent test. Método de radioinmunoensayo.

RCA: Rinoconjuntivitis alérgica.

RQLQ: *Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire*.

RT-PCR: *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*.

SPT: *Skin prick-test* (pruebas cutáneas intraepidérmicas).

T (CD4+): Linfocitos T colaboradores.

T (CD8+) o CTL: Linfocitos T citotóxicos.

TCR: Receptor de células T específico de antígeno.

TGF- β : Factor de transformación de crecimiento- β .

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α .

TPC: Test de provocación conjuntival.

VCAM-1: Molécula de adhesión a células vasculares, ligando de VLA-4.

VFQ-25: *Visual Functioning Questionnaire*.

WAO: World Allergy Organization.

FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1: Anatomía de la película lagrimal.....	10
Figura 2: Diferenciación de linfocitos Th1 y Th2.....	15
Figura 3: Degranulación del mastocito.....	18
Figura 4: Relación córnea conjuntiva a través de la córnea.....	21
Figura 5: Conjuntivitis alérgica estacional y perenne.....	28
Figura 6: Conjuntivitis alérgica atópica.....	29
Figura 7: Conjuntivitis alérgica de contacto.....	29
Figura 8: Conjuntivitis papilar gigante.....	32
Figura 9: Grados de queratoconjuntivitis vernal.....	35
Figura 10: Forma palpebral de QCV.....	38
Figura 11: Nódulos limbares	38
Figura 12: Úlcera en escudo y placa corneal.....	39
Figura 13: Interacción mastocitos terminaciones nerviosas.....	41
Figura 14: Determinación de IG específica.....	51
Figura 15: Mecanismo de acción de antihistamínicos.....	59
Figura 16: Preparación de microarrays.....	77
Figura 17: Fases de la preparación de microarrays.....	79
Figura 18: Pruebas cutáneas.....	97

TABLAS

Tabla 1: Variables clínicas y sociodemográficas.....	103
Tabla 2a: Resultados con microarrays.....	105
Tabla 2b: Resultados de pruebas cutáneas.....	106
Tabla 2c: Resultado IgE específica.....	109
Tabla 3: pacientes positivos dentro de cada grupo medido por arrays.....	112
Tabla 4: Sensibilidad y especificidad.....	114
Tabla 5: Asociación de variables.....	115
Tabla 6: Tratamiento y Evolución.....	116

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. ALERGIA OCULAR.....	7
1.2. CONJUNTIVITIS ALÉRGICA.....	7
1.3. ACTORES CELULARES DE LA ALERGIA OCULAR.....	9
1.4. RELACIÓN CórNEA-CONJUNTIVA EN LA ALERGIA OCULAR.....	19
1.5. FASES DE LA ALERGIA OCULAR.....	22
1.6. TIPOS CLÍNICOS DE CONJUNTIVITIS ALÉRGICAS.....	27
1.6.1. CONJUNTIVITIS ALÉRGICA ESTACIONAL (CAE) Y PERENNE (CAP).....	27
1.6.2. QUERATOCONJUNTIVITIS ATÓPICA (QCA).....	29
1.6.3. DERMATOCONJUNTIVITIS ALÉRGICA DE CONTACTO (DAC).....	30
1.6.4. CONJUNTIVITIS PAPILAR GIGANTE (CPG).....	31
1.7. QUERATOCONJUNTIVITIS VERNAL (QCV).....	33
1.7.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	33
1.7.2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA.....	34
1.7.3. ASPECTOS CLÍNICOS.....	37
1.7.4. HISTOPATOLOGÍA.....	40
1.7.5. IMPLICACIÓN DE SISTEMA NEURONAL Y ENDOCRINO.....	40
1.7.6. INMUNOPATOGÉNESIS.....	43
1.7.7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	45
1.7.8. FACTORES DE RIESGO.....	47
1.8. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS.....	48
1.8.1. PRUEBAS CUTÁNEAS INTRAEPIDÉRMICAS (SKIN PRICK-TEST, SPT).....	48
1.8.2. EXAMEN DE LA CONJUNTIVA.....	49
1.8.3. PRUEBAS DE PROVOCACIÓN CONJUNTIVAL.....	49
1.8.4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.....	50
1.8.5. RIESGO DE AFECTACIÓN VISUAL EN LA QCV.....	52
1.9. TRATAMIENTO DE LA QCV.....	54
1.9.1. MEDIDAS DE EVITACIÓN.....	54
1.9.2. TERAPIA FARMACOLÓGICA.....	55

1.9.3. FUTURO DE LA TERAPIA FARMACOLÓGICA EN QCV.....	65
1.9.4. NUEVOS SISTEMAS PARA LA ADMINISTRACIÓN OCULAR DE FÁRMACOS..	67
1.9.5. INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA (ITE O CRIT).....	67
1.9.6. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO.....	71
1.10. CONJUNTIVITIS ALÉRGICA Y CALIDAD DE VIDA DE LOS PACIENTES.....	73
1.11. IMPACTO ECONÓMICO DE LA CONJUNTIVITIS ALÉRGICA.....	74
1.12. TÉCNICA DE MICROARRAYS EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO MOLECULAR DE LA ALERGIA.....	75
1.12.1. PRINCIPIOS DE LA TÉCNICA.....	76
1.12.2. CORRELACIÓN CON LA DETERMINACIÓN ESPECÍFICA DE IGE.....	80
1.12.3. VENTAJAS DE LA TÉCNICA DE MICROARRAYS.....	81
1.12.4. ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA LÁGRIMA EN LA QCV.....	82
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	88
3. OBJETIVOS.....	91
4. MATERIAL Y METODOS.....	93
4.1. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES.....	95
4.2. PRUEBAS “ <i>IN VIVO</i> ”.....	97
4.3. PRUEBAS “ <i>IN VITRO</i> ”.....	98
4.4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO DIRIGIDO POR ARRAYS.....	100
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	101
5. RESULTADOS.....	102
6. DISCUSIÓN.....	117
7. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN.....	126
8. CONCLUSIONES.....	129
9. BIBLIOGRAFÍA.....	132
10. ANEXO.....	145

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

La queratoconjuntivitis vernal (QCV) es una forma clínica recurrente y grave de enfermedad alérgica que afecta a la conjuntiva tarsal y bulbar del globo ocular, con empeoramiento estacional y caracterizada por un intenso picor, lagrimeo, fotofobia y secreción mucosa asociada con hiperemia conjuntival, quémosis, hipertrofia de papilas en la conjuntiva tarsal y formación de nódulos en el limbo esclerocorneal. En los casos más graves se afecta la córnea en forma de queratitis punteada y úlceras en escudo que afectan a la calidad de vida del paciente y la agudeza visual.

La edad de comienzo es en la primera década de la vida afectando más a varones y con tendencia a la resolución en la edad adulta ¹. Es una patología poco frecuente en los países de clima templado, pero en los de clima cálido de Latino América, África y Asia es un motivo frecuente de consulta, pudiendo estar afectada de un 3% a un 6% de toda la población y de ellos de un 33% a 90% son niños y adolescentes². Las formas palpebrales son más frecuentes en Europa y América y las formas mixtas y limbares se ven con más frecuencia en África y Asia respectivamente ^{2,3}.

Su etiología y fisiopatología se desconocen aunque se sospecha que son mecanismos inmunoalérgicos los que puedan estar involucrados debido a su carácter estacional, la presencia de eosinofilia, el incremento de IgE e histamina en las lágrimas y el elevado número de eosinófilos, basófilos y mastocitos en las biopsias conjuntivales, así como la presencia de antecedentes personales y/o familiares de atopia.

Los estudios clínicos e inmunohistoquímicos sugieren que en su inmunopatogénesis están implicados mecanismos IgE dependientes (Alergia de tipo I) e IgE independiente

(Alergia de tipo IV) incluyendo diferentes subpoblaciones de células T que tendrían un papel activo por la vía de la cascada de los mediadores químicos.

Las técnicas alergológicas de rutina, punción test y la inmunodetección de IgE tienen un pobre valor diagnóstico para alérgenos en la QCV. Las técnicas de provocación con alérgenos están contraindicadas en este tipo de CA. Tampoco las medidas terapéuticas utilizadas hasta el momento (cambios en la dieta, control alérgico, antiinflamatorios) consiguen mejorar la clínica, produciéndose en algunos casos un grave deterioro de la calidad de vida de los pacientes y aunque el curso clínico del proceso suele ser benigno y autolimitado, en una minoría de pacientes puede evolucionar hacia complicaciones visuales graves por afectación corneal ⁴.

1.1. ALERGIA OCULAR.

Las enfermedades alérgicas tienen su origen en una respuesta exagerada del sistema inmune ante estímulos externos (alérgenos) en pacientes predispuestos. Los problemas alérgicos se han incrementado de forma considerable en las últimas décadas ⁵ y esto se debe a múltiples factores genéticos, ambientales, animales, alimenticios y a la exposición temprana a estos factores en la infancia. El coste asociado a estas patologías ha aumentado de forma considerable y cada vez más población requiere tratamiento por problemas alérgicos ⁶.

La alergia ocular representa una de las patologías más comunes en la práctica clínica diaria y dentro de este término incluimos un amplio grupo de patologías en las que están involucrados diferentes mecanismos inmunológicos. Nuevos descubrimientos relacionados con la patogénesis de la alergia ocular, ponen de manifiesto la participación de toda la superficie ocular en las enfermedades alérgicas, no sólo como consecuencia de la contigüidad de los tejidos involucrados, sino también en relación con un complejo intercambio de información entre estos tejidos a través de las comunicaciones químicas que se establecen entre las células gracias a moléculas de adhesión, mediadores y citocinas. También es posible que mecanismos neuronales y endocrinos puedan influir en el proceso alérgico.

1.2 CONJUNTIVITIS ALÉRGICA.

La conjuntivitis alérgica (CA) es una patología ocular producida por la inflamación alérgica de la superficie ocular. Puede presentarse como una entidad aislada aunque con frecuencia se asocia a rinitis alérgica. Engloba a varias entidades clínicas que tienen diferentes mecanismos patogénicos, criterios diagnósticos de hipersensibilidad y

tratamiento. La inflamación se produce, en pacientes previamente sensibilizados, como resultado del contacto directo de un alérgeno con la superficie conjuntival, por un mecanismo inmediato o mediado por IgE, poniendo en marcha la liberación por parte de los mastocitos de diferentes mediadores. En este proceso inflamatorio también pueden estar implicados otros mecanismos como los neurogénicos, endocrinos y reacciones inmunológicas que contribuyen a la aparición de los signos y síntomas que caracterizan a esta enfermedad.

El comienzo suele ser brusco, bilateral con importante sintomatología: picor, escozor, sensación de cuerpo extraño, fotofobia, lagrimeo y rinorrea intensa. En la exploración ocular encontramos, edema conjuntival y palpebral que en algunos casos puede llegar a ser importante, abundante secreción de origen seroso, papilas, folículos, hiperemia conjuntival y dermatitis en el caso de que el origen sea de contacto.

En el año 2007 se realizó una clasificación de las CA por parte de Bielory et al.⁷ que tenía en cuenta los mecanismos inmunopatogénicos implicados con el fin de intentar explicar la interrelación existente entre las diferentes formas de CA. Por un lado tenemos los procesos alérgicos mediados por IgE como la conjuntivitis alérgica estacional (CAE) y la conjuntivitis alérgica perenne (CAP) y por otro las conjuntivitis en las que se mezclan diferentes mecanismos patogénicos con especial protagonismo de linfocitos, mastocitos y eosinófilos (QCV y queratoconjuntivitis atópica (QCA)) y aquellas otras entidades en las que predomina la actividad de linfocitos específicos como ocurre en la conjuntivitis papilar gigante (CPG).

La QCA y la QCV tienen características clínicas y patofisiológicas diferentes a la estacional y a la perenne a pesar de tener los mismos síntomas comunes de alergia⁸. A la

conjuntivitis papilar gigante (CPG) se la relaciona con el uso de lentes de contacto y prótesis oculares incluyéndose a veces en el grupo de enfermedades alérgicas oculares, y sin embargo no se la considera una verdadera alergia ocular.

Con objeto de relacionar la fisiopatología y la evolución clínica Leonardi et al.⁹ en el año 2012, propusieron una nueva clasificación similar a la clasificación aceptada en el documento ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*)¹⁰ en la que según la duración en el tiempo de los síntomas las dividen en: Perennes o Intermitentes y según la intensidad de los mismos en: Leves, Moderadas y Graves. Este grupo de trabajo propone además otros objetivos y líneas de trabajo con el fin de incentivar la investigación de los diferentes fenotipos de lo procesos inmunológicos de la superficie ocular para intentar aclarar las discrepancias actuales y poder desarrollar modelos diagnósticos y de tratamiento más eficaces para los procesos más graves.

1.3. ACTORES CELULARES DE LA ALERGIA OCULAR.

a). Película lagrimal.

Es la primera barrera con la que se van a encontrar los alérgenos. Es un elemento no tisular pero indispensable para la vitalidad de la superficie ocular. Después de los párpados es el primer sistema de defensa de los ojos. Desarrolla este papel mediante una acción mecánica, química e inmunológica. Representa el vector principal de mediadores como las citoquinas y juega así un papel esencial en las patologías inflamatorias agudas o crónicas que afectan a la conjuntiva o a la córnea.

En el plano anatómico (Figura 1) está formado por tres capas de profundidad a superficie: la capa mucosa, la acuosa y la lipídica ¹¹. Las dos primeras en realidad son indisociables formando un gel acuoso que se adhiere a la superficie epitelial.

La capa mucosa está formada por mucus producido principalmente por las células caliciformes del epitelio conjuntival. Su papel es de protección de la córnea ya que la superficie del epitelio corneal es hidrófoba favoreciendo la permanencia del componente acuoso de la lágrima sobre la superficie ocular.

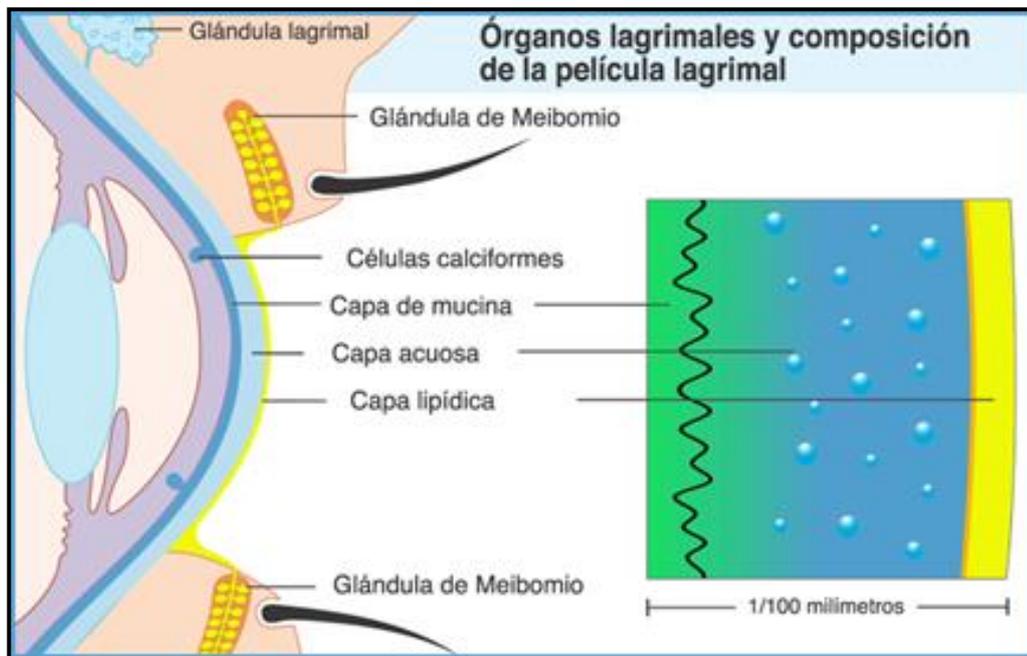


Figura 1: Anatomía de la película lagrimal

La capa acuosa es cuantitativamente la parte más importante del film lagrimal y procede de la glándula lagrimal principal y de las accesorias. La capa lipídica está formada por ceras, colesterol y ácidos grasos saturados. Estos elementos están sintetizados por las glándulas de Meibomio situadas en el espesor de los tarsos palpebrales

que segregan su contenido en el reborde palpebral. Tiene como función principal limitar la evaporación de la capa acuosa y estabilizar la película lagrimal.

Más allá de su papel de protección mecánica, la capa lagrimal tiene también un papel de defensa inmunológica y química por su alto contenido en lisozima, lisinas, lactoferrina así como una alta concentración en anticuerpos IgA e IgE, sintetizados por los plasmocitos presentes en las glándulas lagrimales ¹². Por otra parte la película lagrimal contiene proteínas séricas principalmente albúmina, haptoglobina, IgG, IgA, IgM e IgE. También contiene macroglobulinas, proteínas del complemento, transferrina, 1-antitripsina y 2-microglobulinas, procedentes por filtración de la vascularización conjuntival.

b). Conjuntiva.

La conjuntiva es una fina membrana mucosa translúcida y vascularizada que recubre la parte anterior de la esclera y la interior de los párpados. Junto con el aparato palpebral participa activamente en la protección del globo ocular. Se subdivide en tres zonas:

- Zona palpebral o tarsal: tapiza la cara posterior de los párpados.
- Zona bulbar: recubre el globo hasta el limbo donde se une a la córnea.
- Zona de reflexión: donde tapiza los fondos de saco conjuntivales.

La inflamación de la conjuntiva se conoce como conjuntivitis y se caracteriza por la dilatación de los vasos conjuntivales que da lugar a hiperemia y edema con producción o no de secreciones.

La conjuntiva está formada por un epitelio superficial, estratificado de tipo cilíndrico formando dos capas de células, que se asientan sobre una capa coriónica separada por una membrana basal. El epitelio conjuntival presenta una superficie festoneada formada por células que tienen microvellosidades para aumentar la superficie de intercambio. Los grupos celulares más importantes son: las células epiteliales con función secretora y las células de mucus que aseguran la producción de mucina imprescindible en la formación de la capa lagrimal. Posee abundante vascularización.

La conjuntiva cumple un papel de defensa no solamente mecánico, sino también inmunitario gracias a la presencia de células inmunocompetentes: los linfocitos T y B y las células presentadoras de antígeno conocidas como células de Langerhans, dotadas de capacidad migratoria y reclutamiento en superficie durante una agresión o un episodio inflamatorio.

c). Células dendríticas conjuntivales.

Conocidas como células de Langerhans, están en una posición intraepitelial a nivel del epitelio conjuntival. Proceden de la médula ósea y poseen marcadores de superficie característicos de las células inmunocompetentes. Representan a los primeros actores de la reacción inflamatoria. Forman a este nivel una red celular con papel de centinela. Realizan la presentación del alérgeno como células presentadoras de antígenos (CPAs). Esto es posible por la presencia en su superficie de antígenos de la clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH-II). Estas células tienen capacidad migratoria y son capaces de aumentar su densidad tisular bajo la influencia de citoquinas, principalmente la GM-CSF8 (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor-8) y TNF-alfa (Tumor Necrosis Factor alfa). Las moléculas de adhesión intercelular, como las ICAMs

(Intercellular Adhesión Molecule), son igualmente necesarias para el buen funcionamiento de las células conjuntivales.

Las células dendríticas poseen en su superficie receptores para IgE. Estos están implicados en ciertos fenómenos de cronificación de la alergia por estimulación de la inmunidad de mediación celular por intermedio del sistema de linfocitos TH2¹³.

d). Macrófagos.

Son células formadas en la médula ósea. Una vez los monocitos salen de los capilares sanguíneos y se localizan en la conjuntiva se transforman en macrófagos. Esta diferenciación de monocito a macrófago da lugar a numerosos cambios como el que la célula aumenta su tamaño de 5 a 10 veces, sus orgánulos incrementan tanto su número como su complejidad, adquiere capacidad fagocítica, produce altas concentraciones de enzimas líticas y empieza a secretar gran variedad de sustancias solubles que realizan diferentes funciones que tienen como función principal la fagocitosis dirigida principalmente contra microorganismos. Los macrófagos están habitualmente en estado de reposo y pueden ser activados por gran variedad de estímulos durante la respuesta inmune. La fagocitosis de antígenos sirve como estímulo inicial; sin embargo, los macrófagos pueden aumentar su actividad por la acción de citoquinas secretadas por linfocitos T colaboradores, o mediante el contacto con los mismos. Uno de los más potentes activadores de macrófagos es el interferón- γ (IFN- γ). También son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos. Cuando los macrófagos fagocitan un alérgeno procesan y sitúan sus antígenos en la superficie externa de su membrana plasmática, donde serán reconocidos por los linfocitos T colaboradores; tras este reconocimiento, estos linfocitos T producen linfoquinas que activan a los linfocitos B. Por eso los macrófagos

forman parte de las llamadas CPA, ya que poseen en sus membranas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II) de clase II. Los linfocitos B activados producen y liberan anticuerpos específicos a los antígenos presentados por el macrófago.

e). Linfocitos.

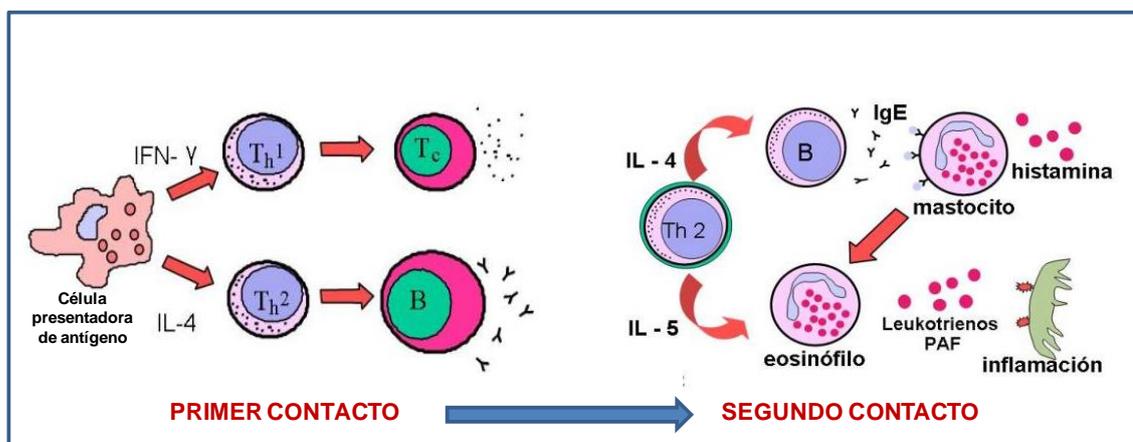
Son células linfáticas fabricadas por las células linfoides presentes en la médula ósea y que posteriormente migran a órganos linfoides como el timo, ganglios linfáticos y bazo constituyendo el 99% de las células linfáticas. Son células circulantes del sistema inmunitario que reaccionan frente a materiales extraños y están encargadas de la inmunidad específica o adquirida. Se diferencian esencialmente en dos tipos: linfocitos B y linfocitos T cuya característica está en sus marcadores de superficie y en sus funciones.

Los linfocitos B: son responsables de la respuesta inmune humoral, es decir, de la producción de inmunoglobulinas de superficie del tipo IgM e IgD que se adhieren a un antígeno específico (al cual reconocen de manera unívoca). Se diferencian en el hígado y bazo fetal, y en la médula ósea del adulto. Los linfocitos B activados producen en estado de normalidad una cantidad ínfima de IgE. Estos linfocitos son los que están implicados en las reacciones de hipersensibilidad inmediata e intervienen en las conjuntivitis alérgicas estacionales y perennes. La activación de los linfocitos B necesita una colaboración celular, especialmente de las células presentadoras de antígeno: los linfocitos T auxiliares (Helpers)

Los linfocitos T: se denominan así porque su maduración tiene lugar en el timo y se activan después del contacto con el antígeno que le es específico, transformándose entonces en plasmocito responsable de la síntesis de anticuerpos específicos para el

antígeno implicado. Detectan antígenos proteicos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

Las IgM son los primeros anticuerpos segregados y secundariamente las IgG. Están implicados en las reacciones de inmunidad de mediación celular, principalmente en los fenómenos de de hipersensibilidad retardada. Según sus marcadores de superficie se clasifican en linfocitos TCD4+ y TCD8+ y si tenemos en cuenta el tipo de citoquinas que segregan se clasifican en Th1 y Th2. Los Th1 se activan en las reacciones de hipersensibilidad retardada (tipo IV) y en algunos procesos de autoinmunidad. Cuando se activan los Th2 se producen reacciones de respuesta inmediata.



Primer contacto: Si predomina la producción de interferón gamma (IFN-g) se activan y proliferan linfocitos Th1 y estos activan a los linfocitos citotóxicos (Tc). Si predomina la citoquina IL-4 se activan los Th2 que actúan sobre los linfocitos B que se transforman en células plasmáticas y producen anticuerpos específicos según el antígeno: respuesta alérgica mediada por IgE.

Segundo contacto: Los linfocitos Th2 producen IL-4 que activan a los linfocitos B, transformándolos en una célula plasmática que sintetiza IgE específica que uniéndose al mastocito a través de su fragmento Fc captan el antígeno y activan el mastocito que libera mediadores como respuesta inmediata generando un fenómeno inflamatorio. El mismo TH2 a través de la producción de IL-5 actúa sobre el eosinófilo produce la fase tardía de reacción inflamatoria y daño epitelial.

Figura 2. Activación de linfocitos Th1 y Th2.

La diferenciación en linfocitos Th1 y Th2 se basa, no en un perfil de membrana sino en los productos de síntesis y en las reacciones inmunitarias que ponen en marcha (Figura 2).

Así los linfocitos Th1 producen fundamentalmente interleucinas IL-2 e IL-12, interferón γ y TNF. Están implicados principalmente en los mecanismos de hipersensibilización retardada. Activan los macrófagos a través del interferón γ . Los linfocitos Th2 activan los linfocitos B y producen interleucinas 3, 4, 5 y el GM-CSF. La IL-5 activa los eosinófilos y la IL-4 activa los mastocitos. Permiten el reclutamiento de mastocitos y de eosinófilos que entrañan la producción de IgE estando de esta forma muy implicados en las reacciones alérgicas.

Se ha encontrado una presencia importante de linfocitos del tipo Th2 en el desarrollo de QCV ¹⁴. Los estudios más recientes ponen en evidencia una imbricación de los dos mecanismos Th1 y Th2 en las enfermedades inflamatorias de la superficie ocular ¹⁵.

La activación del linfocito T se realiza después del contacto con el antígeno que le es específico, transformándose entonces en plasmocito responsable de la síntesis de anticuerpos específicos para el antígeno implicado. Las IgM son los primeros anticuerpos segregados y secundariamente las IgG.

El balance Th1/Th2 depende de la expresión de señales reguladoras intracelulares. Los inhibidores de señales de citoquinas SOCS3 y SOCS5 se expresan fundamentalmente en los linfocitos Th2 y Th1 respectivamente e inhiben de forma recíproca los procesos de diferenciación a Th1 o Th2.

Linfocitos T cooperadores (T Helper) o linfocitos CD4+: reconocen antígenos presentados por el MHC-II. Se les denomina cooperadores porque están involucrados en la activación y dirección de otras células inmunitarias e iniciar la cascada inmune.

Linfocitos T citotóxicos (CTL) o linfocitos CD8+: intervienen en la inmunidad celular por interacción con el péptido MHC-I y tienen capacidad lítica.

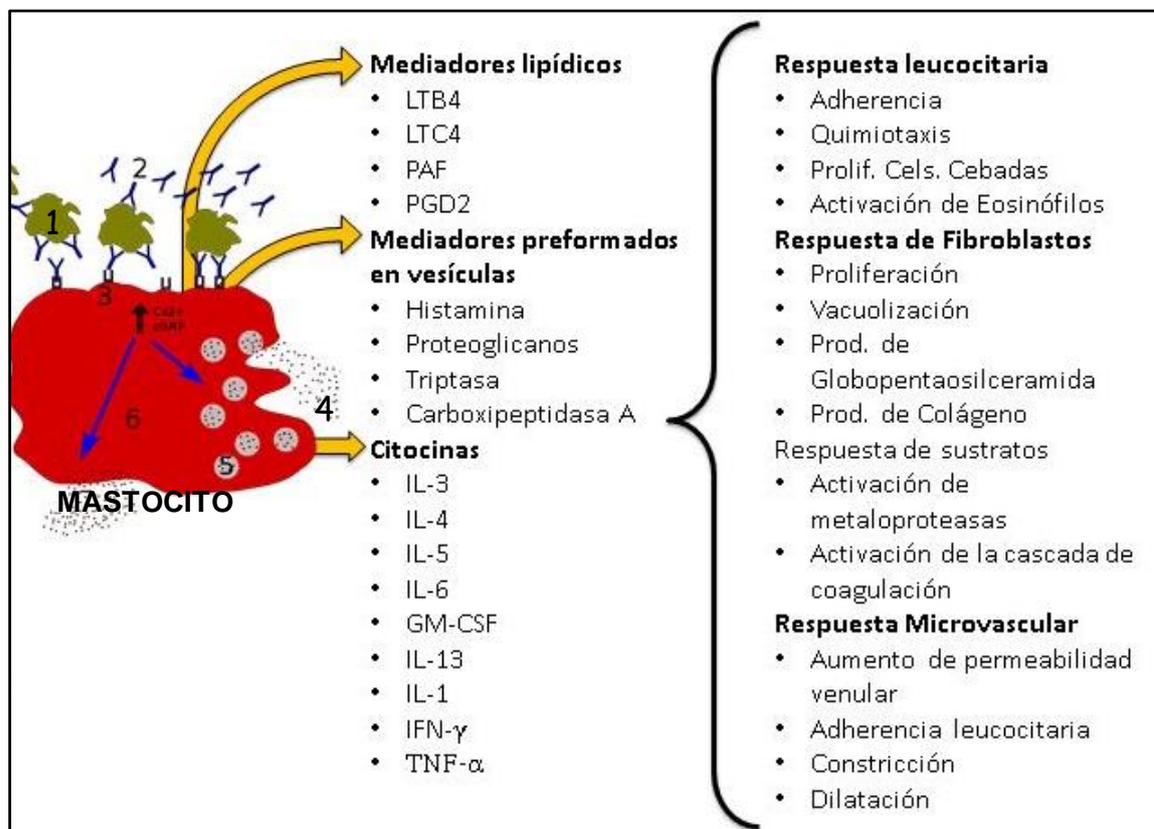
Linfocito granular grande: células asesinas naturales NK (Natural Killer). No tienen marcadores característicos. Participan en la inmunidad innata, con capacidad de reconocer lo "propio" y también tienen propiedades líticas.

f). Mastocitos.

Son células grandes redondas localizadas en el tejido conjuntival, piel y mucosas en la proximidad de los vasos. Se caracterizan por sus receptores de superficie para las IgE y por los productos de síntesis que liberan: histamina, proteoglicanos y proteasas (Figura 3).

Los mastocitos están en el centro de la reacción alérgica de hipersensibilidad inmediata después que un antígeno específico se fije sobre la IgE en la superficie de la célula y desencadene su degranulación aguda con la liberación de los mediadores contenidos en sus gránulos. La histamina almacenada en los gránulos citoplásmicos, una vez liberada, es la responsable de los principales signos clínicos de la alergia como la vasodilatación, edema y prurito. Actúa sobre los receptores H1 y H2 situados a nivel de los capilares vasculares. Otros mediadores son también liberados después de la degranulación como la triptasa, activadores de las fracciones del complemento o la calicreína pro-inflamatoria. Los mastocitos pueden también producir directamente otros mediadores

después de su activación como la fosfolipasa A2 necesaria para la síntesis del ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos o PAF (Factor Activador de las Plaquetas) o también interferón o TGF (Factor de Crecimiento Transformante).



Degranulación del mastocito: 1-antígeno, 2-anticuerpo (IgE), 3-receptor, 4-mediadores, 5-gránulos,

Figura 3. Degranulación del mastocito y liberación de mediadores y citocinas.

Los mastocitos conjuntivales son fundamentales para que de comienzo la fase precoz de la respuesta alérgica y para la posterior infiltración eosinofílica en la fase tardía¹⁶. Es por esto que el mastocito aparece como la célula llave de la reacción alérgica y constituye el objetivo primordial directo en el tratamiento con antidegranulantes o

indirectamente actuando sobre los productos de síntesis que libera como hacen los clásicos antihistamínicos o de forma más reciente los anti-leucotrienos ¹⁷.

g). Eosinófilos Polinucleares.

Los eosinófilos forman parte de los granulocitos de la sangre circulante que por intermedio de moléculas de adhesión pueden migrar al tejido conjuntival. Se caracterizan por la presencia de receptores para el Complemento y la porción Fc (Fracción Constante) de las IgG, IgA, IgM y IgE y porque sintetizan mediadores pro-inflamatorios como la MBP (Major Basic Protein) o la ECP (Proteína Catiónica Eosinófila) que actúan en la fisiopatología de las lesiones de la QCV. También se han encontrado tasas anormalmente elevadas de eosinófilos en la conjuntiva de pacientes afectados de QCV con aumento de la concentración de ECP en las lágrimas de estos pacientes. Estas dos proteínas sintetizadas por los eosinófilos, tienen una acción tóxica directa sobre el epitelio corneal y serían responsables, en gran parte, de las úlceras corneales recidivantes que complican de forma grave la enfermedad ¹⁸.

1.4. RELACIÓN CÓRNEA-CONJUNTIVA EN LA ALERGIA OCULAR

Las enfermedades alérgicas oculares graves como son la QCV y la QCA no presentan solamente patología conjuntival, sino que la córnea también se puede encontrar afectada. Algunas complicaciones corneales como las erosiones persistentes, pueden afectar a la visión de los pacientes y con frecuencia son difíciles de tratar. La córnea y la conjuntiva están físicamente próximas, solamente separadas por el film lagrimal. Estos dos tejidos tienen distintas características. La conjuntiva tiene una buena vascularización y un abundante número de células inmunes y una débil propiedad como barrera como se demuestra en las reacciones alérgicas.

Por el contrario la córnea, en condiciones normales, no posee células de inmunidad ni vasos y el epitelio corneal le confiere un importante papel de barrera, por lo que la córnea no es lugar de reacciones alérgicas de forma primaria. Estos dos tejidos están bajo la influencia el uno del otro por la liberación en la lágrima de sustancias bioactivas como mediadores químicos y citoquinas ¹⁹.

La conjuntiva tiene un papel de centinela, siendo la primera en reaccionar en caso de una agresión alérgica. Así como la conjuntiva es el lugar en el que actúan los mecanismos celulares activados por fenómenos inflamatorios locales, incluyendo los relacionados con la alergia, la córnea puede estar implicada en ciertas patologías severas. El sistema inmunitario corneal es más reducido que el de la conjuntiva con el fin de evitar reacciones celulares perjudiciales para su transparencia. La presencia de células dendríticas corneales es importante a nivel del limbo corneo-conjuntival en relación, por un lado, con el tejido conjuntival y por otro con las células inmunitarias del estroma corneal. Otras células dendríticas, con marcadores de superficie diferentes, están igualmente presentes en las capas basales del epitelio corneal periférico ²⁰.

Las complicaciones corneales encontradas en la QCV o en la QCA son debidas a una agresión química directa por acción de las proteínas citotóxicas sintetizadas por los eosinófilos polinucleares que tienen una acción mecánica e inmunológica ²¹. Los fibroblastos de la córnea y de la conjuntiva se activan a través de citoquinas proinflamatorias derivadas de linfocitos T Helper 2 (Th2). Los fibroblastos corneales aumentan su respuesta alérgica como resultado de su activación por la expresión de quemoquinas y eotaxina y TARC así como por moléculas de adhesión como la ICAM-1 y

la VCAM-1, todo lo cual promueve la activación y la infiltración de eosinófilos y linfocitos Th2. En contraste las células epiteliales de la córnea inhiben tales reacciones, separando físicamente los fibroblastos corneales de las sustancias bioactivas presentes en el líquido lagrimal (Figura 4).

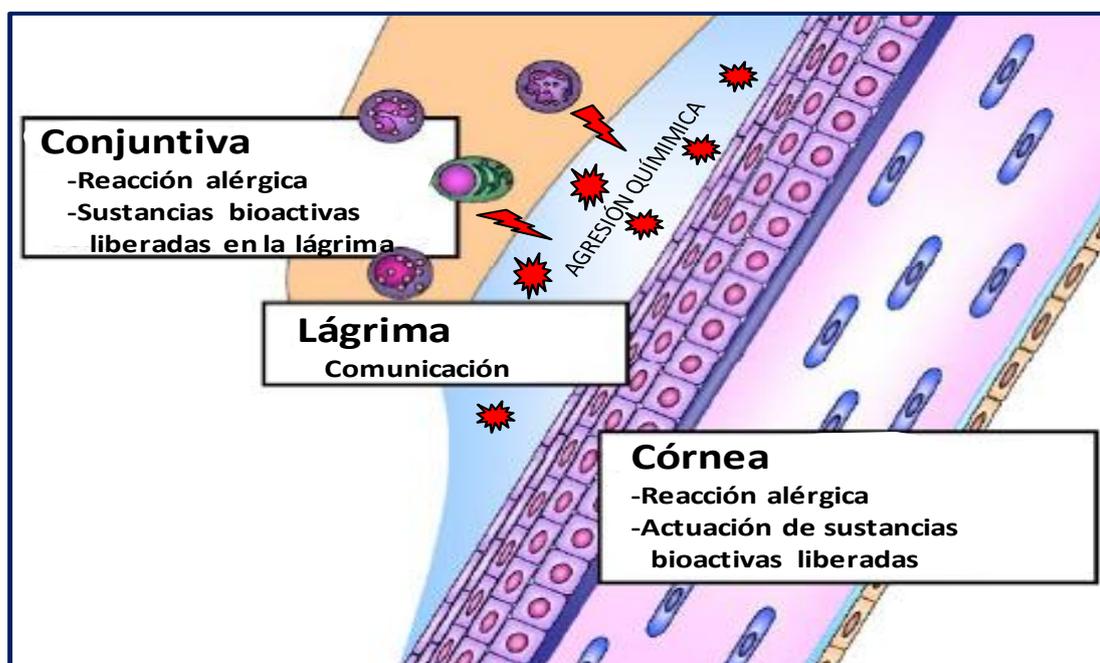


Figura: 4 *Relación conjuntiva córnea a través de la lágrima.*

Modificado de N. Kumagai et al ²². La reacción alérgica conjuntiva libera sustancias bioactivas que pasan a la película lagrimal precorneal desde donde actúan sobre la córnea.

La proliferación excesiva y los depósitos de matriz extracelular producida por los fibroblastos conjuntivales probablemente exacerban la inflamación corneal. La recuperación de la integridad del epitelio corneal y la inhibición de las actividad de los fibroblastos corneales y conjuntivales puede proporcionar una buena base para el

desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de estas enfermedades alérgicas oculares graves ²².

1.5. FASES DE LA ALERGIA OCULAR.

La conjuntivitis alérgica tiene lugar en tres fases:

- a) Fase de sensibilización alérgica conjuntival.
- b) Fase de respuesta alérgica conjuntival precoz.
- b) Fase de respuesta alérgica conjuntival tardía.

a) Fase de sensibilización alérgica conjuntival.

Esta fase tiene lugar después de la primera exposición de un individuo genéticamente predispuesto, a un alérgeno que se pone en contacto con la superficie ocular. Las células presentadoras de antígeno (APCs) o las células dendríticas de la conjuntiva fagocitan el alérgeno. Las células dendríticas participan de forma activa en la alergia ocular y las células presentadoras de antígeno tienen un papel fundamental en el inicio del proceso alérgico.

Los macrófagos que expresan CD11b y CD18 también podrían actuar como APCs en algunos tipos de CA ²³. Las APCs procesan los alérgenos y los transportan en su superficie celular como un péptido asociado a las moléculas tipo II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II).

Las APCs interactúa con los linfocitos CD4+ naïve o linfocitos helper (Th0) que expresan el receptor de células T específico de antígeno (TCR), induciendo la diferenciación y maduración de estos linfocitos Th0 en linfocitos efectores.

Para que se produzca la activación completa de los linfocitos CD4+ debe producirse una interacción entre las moléculas co-estimuladoras B7 de las APCs y el CD28 de los linfocitos CD4+. Los linfocitos activados liberan IL-2 que favorece la diferenciación de los linfocitos T hacia linfocitos T efectores que se diferencian en Th1 y Th2 por el tipo de citocinas que liberan y también linfocitos T “de memoria” que tienen una vida media larga.

En la respuesta alérgica inmediata están implicados los linfocitos Th2 que liberan IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 y son responsables de la producción de IgE específica por parte de las células plasmáticas, desarrollo de las células mastocitarias, acumulación de eosinófilos y la hiperproducción de moco ²³.

La interacción entre el complejo MHC-II (en la APC) y el complejo TCR (en el linfocito), hace que a su vez se produzca una interacción entre las moléculas de adhesión y moléculas co-estimuladoras que activan a los linfocitos B para que proliferen y se diferencien hacia células plasmáticas, que a su vez liberan IgE específica frente al antígeno y que se unirá a los receptores de alta afinidad de IgE (FcεRI) localizados en la superficie de mastocitos y de basófilos, completándose así el proceso de sensibilización.

Es muy importante en esta fase el mantenimiento de la integridad epitelial y de las uniones epiteliales para que éste mantenga su integridad y capacidad como barrera impermeable frente a los alérgenos.

b) Fase de respuesta alérgica conjuntival precoz.

Tras la primera fase de sensibilización tiene lugar la fase de respuesta precoz o inmediata que se produce tras la exposición de la conjuntiva a un alérgeno y la unión de la IgE específica a la superficie de los mastocitos conjuntivales a través de los receptores específicos de alta afinidad FcεRI.

Durante la sensibilización inicial en la superficie conjuntival los alérgenos se ponen en contacto con las células presentadoras de antígeno (dendríticas) y / o con inmunoglobulinas reconocedoras de antígenos de las células B. En las personas alérgicas, las células T se diferencian hacia el fenotipo Th2, favorecido por factores especiales en la mucosa, factores genéticos, lugar de contacto del alérgeno, cantidad y forma del alérgeno y otros factores. Los Th2 segregan factores como por ejemplo, IL-4, IL-13 que favorecen la producción por parte de células B de inmunoglobulinas IgE específicas.

La proceso de sensibilización alérgica está unido a la formación de células T con memoria específica hacia el alérgeno, así como de células B con memoria específica para IgE, las cuales se pueden activar fuertemente por contacto con los alérgenos.

Los mecanismos de inflamación alérgica (panel inferior). Las manifestaciones de alérgica pueden ser inmediatas o tardías. Las reacciones inmediatas se producen la unión de las IgE de las células efectoras (mastocitos, basófilos) con el alérgeno lo que conduce a la liberación de mediadores biológicamente activos como histamina, leucotrienos y citocinas proinflamatorias (IL-4). Las reacciones tardías y crónicas son causadas por la presentación de los alérgenos a las células T, que se activan, proliferan, y liberan citoquinas. La presentación de los alérgenos a las células T se puede producir de una forma eficiente por un mecanismo dependiente de IgE que utiliza FcεRI o FcεRII en las células

presentadoras de antígenos. Además, los alérgenos pueden ser absorbidos por las APCs independiente de IgE ser presentados a las células T. Las células Th2 activadas liberan IL-4, IL-13, e IL-5 lo que produce un aumento tisular de eosinófilos. También los Th1 secretores de IFN- γ pueden ser activados por los alérgenos, especialmente durante la fase tardía de la reacción.

Al tener lugar un nuevo contacto con el alérgeno, éste se une al menos a dos moléculas de IgE desencadenándose la respuesta alérgica precoz, con la liberación de diferentes mediadores por parte del mastocito. Algunos de estos mediadores están preformados y asociados a gránulos citoplasmáticos: histamina, proteoglicanos (heparina, condroitín sulfato), proteasas neutras (triptasa, quimasa), hidrolasas ácidas y enzimas oxidativas, mientras que otros se forman en este momento, como los mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos), interleuquinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13), el factor de necrosis tumoral (TNF α) y el factor activador plaquetario (PAF). La respuesta precoz tiene una duración de unos 20-30 minutos como puede comprobarse en los estudios de provocación conjuntival específica (PCE) con alérgenos.

El principal mediador implicado en el proceso alérgico es la histamina ²⁴. Los receptores de histamina H1R, H2R y H4R están ligados a la alergia ocular, y la actividad que la histamina desencadenada a través de los receptores H1R y H2R es la responsable del incremento de la permeabilidad vascular, de la hiperemia conjuntival secreción de citoquinas, proliferación de fibroblastos, producción de pro-colágeno y expresión de moléculas de adhesión ²³. Los receptores de histamina se expresan en las células inflamatorias estromales y la unión de la histamina a su receptor H4R podría reclutar mastocitos, eosinófilos, células dendríticas y linfocitos hacia la conjuntiva de forma

selectiva. El receptor H4R, descubierto recientemente, es un modulador de diferentes funciones fisiológicas, que incluyen la liberación de citoquinas y quimioquinas y la expresión de moléculas de adhesión.

Los mastocitos liberan los mediadores sintetizados: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, PAF y citoquinas que favorecen la vasodilatación, la permeabilidad microvascular, la quimiotaxis y la activación de neutrófilos, eosinófilos y otras células inflamatorias que serán las responsables de la respuesta alérgica tardía.

En esta fase se produce en la lágrima un incremento de los niveles de histamina, triptasa, prostaglandinas, leucotrienos y se pone en marcha el reclutamiento de células inflamatorias²⁵, fundamentalmente eosinófilos y linfocitos T. Clínicamente aparecen los síntomas de prurito, lagrimeo, enrojecimiento y quémosis que pueden tardar unos segundos después del contacto con el alérgeno.

c) Fase de respuesta alérgica conjuntival tardía.

Gracias a los estudios de CA experimentales y PCE, se han podido describir las características de la respuesta tardía conjuntival. La fase de respuesta alérgica tardía es variable según los pacientes. En algunos casos, la respuesta sigue un patrón clásico, en el que 4-8 horas después del contacto alérgico continuado, reaparecen los síntomas y puede detectarse un incremento de mediadores aunque en otros casos, los síntomas son intermitentes o discontinuos.

La fase de respuesta tardía parece depender de la intensidad de la respuesta alérgica inmediata. En este contexto se ha observado que en las PCE con dosis bajas de alérgenos

se observa una reacción inmediata autolimitada mientras que en pacientes altamente sensibilizados, en las PCE con dosis altas de alérgenos, se produce una reacción tardía intensa y prolongada. Este tipo de respuesta la podemos encontrar en otras formas de alergia como la rinitis y el asma alérgica, aunque se ha cuestionado en las respuestas alérgicas oculares, posiblemente debido a la heterogeneidad de los mastocitos tisulares en diferentes localizaciones ²⁶.

En el análisis de los frotis conjuntivales y de las muestras de lágrimas se detecta una acumulación temprana de neutrófilos, seguida de un reclutamiento de eosinófilos a las 6-10 horas y una infiltración linfocitaria en las fases más tardías ²⁷.

Los mastocitos activados, las células epiteliales conjuntivales y corneales y los fibroblastos son capaces de expresar y segregar citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión que inician el reclutamiento de las células inflamatorias hacia la conjuntiva ²⁸, produciendo la respuesta tardía que tiende a evolucionar hacia una inflamación crónica de la superficie ocular, con un papel fundamental en la fisiopatología de las formas más graves de inflamación alérgica ocular.

1.6. TIPOS CLÍNICOS DE CONJUNTIVITIS ALÉRGICAS.

1.6.1. CONJUNTIVITIS ALÉRGICA ESTACIONAL (CAE) Y PERENNE (CAP).

Ambas son las dos formas de alergia ocular más frecuentes y estos dos tipos de alergia se estima que afectan a entre un 15% y 20% de la población ²⁹.

Se produce por la reacción inflamatoria inducida por un alérgeno interactuando con un IgE que sensibiliza a los mastocitos. La patogénesis es una reacción de

hipersensibilidad mediada por IgE. La activación de los mastocitos produce su degranulación liberando histamina en la lágrima donde se detectan unos niveles altos de esta sustancia así como de triptasa, prostaglandinas y leucotrienos. Esta respuesta inmediata o temprana tarda unos 20 o 30 minutos en aparecer. Se encuentran anticuerpos IgE específicos para alérgenos estacionales o perianuales en la mayoría de los pacientes de este tipo de alergia ³⁰.



Figura 5. *Conjuntivitis estacional y perenne.*

Enrojecimiento y edema conjuntival.

Los signos y síntomas de estos dos tipos de CA son similares. Lo que los diferencia es el alérgeno específico al que el paciente es alérgico. La conjuntivitis estacional suele estar producida por pólenes aéreos con manifestación de los síntomas en primavera y verano disminuyendo en los meses de invierno excepto en las conjuntivitis por cupresáceas (enero-marzo), y la perenne puede aparecer en cualquier época del año al ponerse el paciente en contacto con los alérgenos que la desencadenan. Los síntomas en ambos casos consisten en escozor, enrojecimiento y edema de la conjuntiva. El enrojecimiento o inyección conjuntival es de grado medio a moderado. La quémosis conjuntival es de grado

moderado y a veces prominente. El picor es el síntoma más constante en estos dos procesos y la afectación corneal es rara (Figura 5).

1.6.2. QUERATOCONJUNTIVITIS ATÓPICA (QCA).

Es una inflamación bilateral crónica de la superficie ocular y de los párpados, propia de climas templados. En su patomecanismo están implicados por un lado la degranulación crónica de los mastocitos mediado por IgE y un mecanismo inmune mediado por linfocitos Th1 y Th2 y citoquinas. Eosinófilos y otras células inflamatorias tienen un papel en su patogenia³⁰. Se considera la forma ocular de la dermatitis atópica.



Figura 6: *Conjuntivitis alérgica atópica.*

Los cuadros más frecuentes y graves suelen aparecer en adultos aunque los niños también pueden estar afectados. Casi siempre hay antecedentes familiares y personales de atopia asociándose a rinitis o asma en un 87% de casos^{31,32}. Se pueden apreciar lesiones eccematosas en los párpados y en cualquier parte del cuerpo. Las lesiones de la piel son rojizas y elevadas. A menudo aparecen en la región antecubital o poplítea. Típicamente las lesiones eccematosas son irritantes y pruriginosas. Los hallazgos oculares varían. La piel de los párpados aparece con textura similar al papel de lija y puede apreciarse quémosis y una inyección conjuntival de moderada a grave (Figura 6). Pueden aparecer papilas conjuntivales grandes en la conjuntiva tarsal inferior a diferencia de la QCV que se localizan

en el superior y los fenómenos de cicatrización son frecuentes con reacciones pseudopenfigoides. A nivel de la córnea puede aparecer ulceración punteada que puede evolucionar a úlceras localizadas sobre todo en la mitad inferior. Algunos pueden desarrollar cataratas atópicas que típicamente son anteriores pero también pueden desarrollarse catarata nucleares corticales e incluso posteriores. Como consecuencia del tratamiento crónico con corticoides pueden incrementarse la presión ocular y dar lugar aun glaucoma

En algunos aspectos la queratoconjuntivitis vernal y la atópica son parecidas. En ambas pueden aparecer papilas gigantes y nódulos de Horner, sin embargo la vernal suele mejorar y desaparecer en la edad adulta mientras que la atópica es para toda la vida. Muchos pacientes con QCV tienen las pruebas alérgicas cutáneas negativas para los alérgenos comunes.

1.6.3. DÉRMATOCONJUNTIVITIS ALÉRGICA DE CONTACTO (DAC).

La alergia de contacto o dermatitis alérgica de contacto no es una alergia mediada por IgE y puede considerarse un tipo de alergia diferente de las descritas hasta ahora. Es una forma de hipersensibilidad retardada tipo IV que implica una respuesta alérgica mediada por antígenos con linfocitos Th1 y Th2 y liberación de citoquinas³³. Ocurre en dos fases: una primera de sensibilización con la primera exposición a los alérgenos y la formación de linfocitos T y una segunda fase de inducción de la respuesta inflamatoria con la re-exposición al antígeno mediado por la activación de los linfocitos T con memoria específica.

Generalmente los alérgenos son haptenos solubles de bajo peso molecular lo que les permite atravesar el estrato córneo de la piel y combinarse con proteínas cutáneas para formar alérgenos completos (hapteno-proteína). Entre estos alérgenos se encuentran níquel, neomicina, látex, atropina y sus derivados etc. El compuesto formado es reconocido como un cuerpo extraño por las células dendríticas que interiorizan la proteína y la transportan a los ganglios linfáticos regionales donde lo presentan a los linfocitos T. Estas células T se dividen y diferencian y responderán de forma más agresiva si el antígeno se pone de nuevo en contacto con el individuo.



Figura 7: *Alergia de contacto.*

La alergia ocular de contacto afecta la superficie ocular: los párpados y piel periocular (Figura 7), aunque también puede tener lugar en la conjuntiva. La sensibilización a un alérgeno puede tardar varios días. La reexposición al alérgeno hace que aparezca una reacción eritematosa indurada que se desarrolla lentamente y puede tardar de 2 a 5 días en manifestarse. El retardo en el desarrollo de la reacción se debe a la lenta migración de los linfocitos hacia el depósito de antígeno. La alergia de contacto suelen acompañarse de picor.

1.6.4. CONJUNTIVITIS PAPILAR GIGANTE (CPG).

La CPG es una patología inflamatoria caracterizada por hipertrofia papilar de la conjuntiva tarsal superior. La apariencia es similar a la de la QCV pero sin patología corneal asociada ³⁴. Este tipo de conjuntivitis no es una enfermedad alérgica verdadera y la incidencia de alergia sistémica en estos pacientes es similar a la del resto de la población. El estímulo para la aparición de los cambios papilares en la conjuntiva están provocados por sustancias inertes más que por alérgenos. Este tipo de conjuntivitis se puede deber a suturas limbares, lentes de contacto, prótesis oculares y dermoides limbares ³⁵(Figura: 8). Cuando estos estímulos irritativos se retiran, los cambios papilares desaparecen.

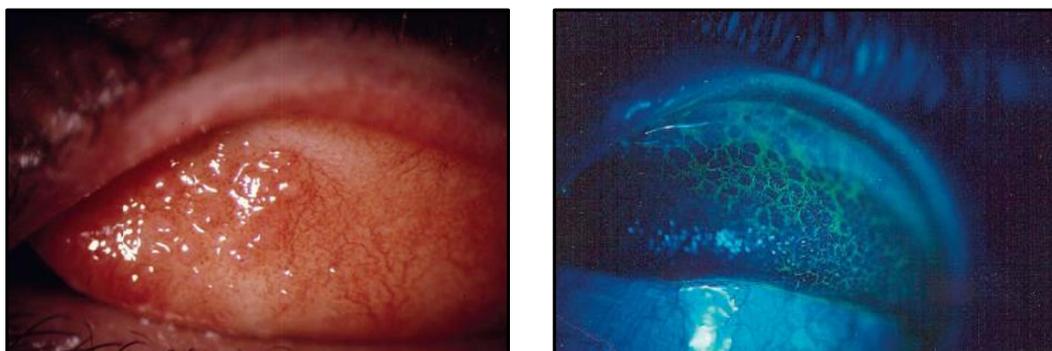


Figura 8: *Conjuntivitis papilar gigante.*

Las papilas pueden contener mastocitos, basófilos, o eosinófilos pero no como en las reacciones alérgicas. No hay incremento de la IgE o de histamina en las lágrimas de estos pacientes. Parece que la causa del problema serían las proteínas que se depositan en la superficie de las lentes de contacto y en los bordes irregulares de las mismas. Por un mecanismo inmune o mecánico estas proteínas pueden hacerse antigénicas y estimular la producción de IgE. El trauma mecánicos y la irritación crónica pueden hacer que se liberen determinados mediadores como el CXCL8 y el TNF-alfa desde las células conjuntivales irritadas ^{36 34}.

1.7. QUERATOCONJUNTIVITIS VERNAL (QCV).

Es una forma clínica recurrente y grave de enfermedad alérgica ocular, con empeoramiento estacional, que afecta a la conjuntiva bulbar y tarsal del globo ocular y en casos más graves a la córnea con efectos adversos sobre la visión y la calidad de vida del paciente. Habitualmente el comienzo es en la infancia, siendo más frecuente en varones y con tendencia a la resolución en la edad adulta ^{1,37}.

La QCV es una alteración incluida dentro de las conjuntivitis alérgicas junto a las conjuntivitis estacionales, las conjuntivitis crónicas y las queratoconjuntivitis atópicas. A pesar de tener características inmunológicas y clínicas similares, la QCV se diferencia de otras CA por la edad de comienzo, los hallazgos clínicos, el bajo porcentaje de pacientes con respuesta positiva a los test de diagnóstico estándar y la escasa respuesta a los tratamientos habituales.

La falta de criterios estándar de diagnóstico y la falta de un lenguaje común entre médicos (alérgólogos, oftalmólogos) en lo referente a su definición y la gravedad de la QCV hacen de esta patología difícil de diagnosticar y de tratar.

1.7.1 EPIDEMIOLOGÍA.

Es una patología poco frecuente en los climas templados pero en países de África, América Latina y Asia representa una causa importante de atención hospitalaria afectando a un 3% - 6% de los pacientes de todas las edades y a un 33%- 90% de niños y adolescentes. Generalmente no produce secuelas o alteraciones visuales permanentes, salvo en un 5%-6% de los pacientes afectados ³⁸. En algunos países africanos se ha encontrado en los niños una prevalencia del 4% al 6% ³⁹. Es más frecuente en varones, jóvenes, con un

pico de incidencias entre los 11-13 años de edad y no se observan diferencias respecto al sexo tras la pubertad. Es poco frecuente en adultos ⁴⁰. Las formas palpebrales son más prevalentes en Europa y en América, mientras que las formas mixtas son más frecuentes en Asia y África respectivamente con algunas variaciones geográficas ^{39, 41, 42, 43}. En Europa y en Asia existe una variación estacional importante en su manifestación. En África sin embargo es menos estacional y sus síntomas se mantienen a lo largo de todo el año. En la UE se ha calculado que tiene una prevalencia de 3,2 por 10.000 habitantes ⁴⁴.

1.7.2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA.

Según las características clínicas, localización y gravedad de los síntomas, podemos clasificar las QCV en diferentes grados según Bonini et al. ⁴⁵ (Figura: 9)

a) Grado 0, inactiva: La patología ha estado presente en el pasado, un año aproximadamente, pero en el momento de la exploración el paciente está asintomático. Puede presentar o no una ligera hiperemia conjuntival y la córnea no presentar ninguna alteración. En contraste con la ausencia de síntomas, podemos observar hipertrofia papilar tarsal moderada pero sin inflamación.

b) Grado 1, leve: el paciente nota síntomas iniciales como lagrimeo y fotofobia moderada durante la época primaveral. Los síntomas duran poco y son bien tolerados. Comienza la inflamación palpebral con hiperemia de grado medio pero sin afectación corneal. Reacción papilar moderada y pueden aparecer papilas gigantes.

c) Grado 2, moderado: que dividimos a su vez en dos subgrupos según la gravedad de los síntomas y la afectación corneal en:

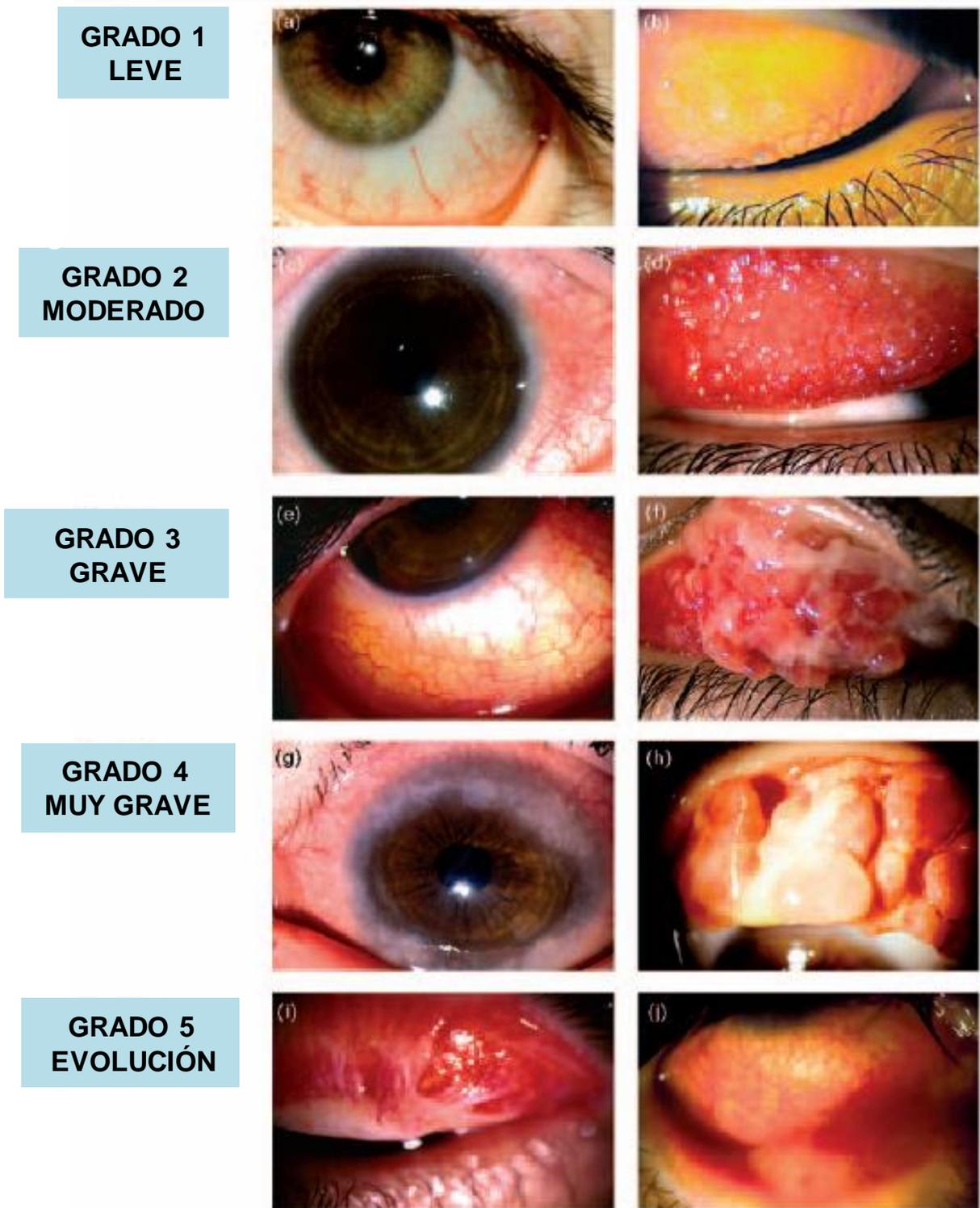


Figura 9: Grados de QCV (Bonini et al.⁴⁵).

Grado 2 moderado intermitente: los síntomas son esporádicos, son como en el grado 1 pero más frecuentes y con molestias diurnas por lagrimeo y secreción mucosa. Puede verse reacción papilar de media a grave así como hiperemia conjuntival, sin afectación corneal

Grado 2 moderado persistente: el paciente tiene síntomas todos los días con hiperemia conjuntival, secreción y lagrimeo constantes. La córnea puede estar afectada por una queratitis punteada superficial. La afectación papilar conjuntival puede ser de media a grave

d) Grado 3, grave: los síntomas son diarios con intenso lagrimeo y fotofobia. La hiperemia conjuntival varía entre moderada y severa y la secreción se puede asociar a la presencia de nódulos de Horner-Trantas en el limbo corneal. La cornea esta afectada con queratitis punteada superficial. Conjuntivitis papilar tarsal presente con hiperemia e inflamación de las papilas

e) Grado 4, muy grave: constante lagrimeo y fotofobia con producción abundante de mucosidad en la superficie ocular y entre las papilas. La queratopatía con erosión y ulceración corneal es frecuente. Presencia de nódulos de Horner-Trantas en limbo y reacción papilar en grado de medio a grave con hiperemia e inflamación

f) Grado 5, evolución: el paciente tiene síntomas ocasionales. Puede haber reacción de conjuntivitis papilar pero sin afectación corneal. Pueden apreciarse signos fibrosis conjuntival en el párpado superior o en el fórnix.

Las formas palpebrales son más frecuentes en Europa y en América y las formas mixtas y limbares se ven con más frecuencia en Asia y África respectivamente^{46 2 3}

Los estudios clínicos e inmunohistoquímicos sugieren que en su inmunopatogénesis están implicados mecanismos IgE dependientes (Alergia de tipo I) y IgE independiente (Alergia de tipo IV) incluyendo diferentes subpoblaciones de células T que tienen un papel activo vía de la cascada de los mediadores químicos.

Se han identificado factores endocrinos, genéticos, neurogénicos, ambientales y socioeconómicos como factores de riesgo. Sin embargo su etiología y su patofisiología permanecen desconocidas. El curso clínico del proceso suele ser benigno y autolimitado pero una minoría de pacientes pueden evolucionar hacia complicaciones visuales graves por afectación corneal.

1.7.3. ASPECTOS CLÍNICOS.

El diagnóstico comienza identificando los signos clínicos y continúa por pruebas de laboratorio que nos pueden ayudar a confirmar el diagnóstico.

Signos y síntomas.

La QCV habitualmente es bilateral aunque, ocasionalmente en las formas iniciales, puede presentarse de forma unilateral. El síntoma más habitual es el picor, seguido de lagrimeo, fotofobia, secreción mucosa importante, blefaroespasmos y sensación de cuerpo extraño. Puede manifestarse como una forma puramente palpebral o puramente limbar pero también existen las formas mixtas.

Forma palpebral: (Figura 10) el signo principal es la hiperplasia conjuntival en la conjuntiva tarsal superior con papilas que pueden ir de 1 mm de diámetro hasta las llamadas papilas gigantes dando a la conjuntiva aspecto de adoquinado.

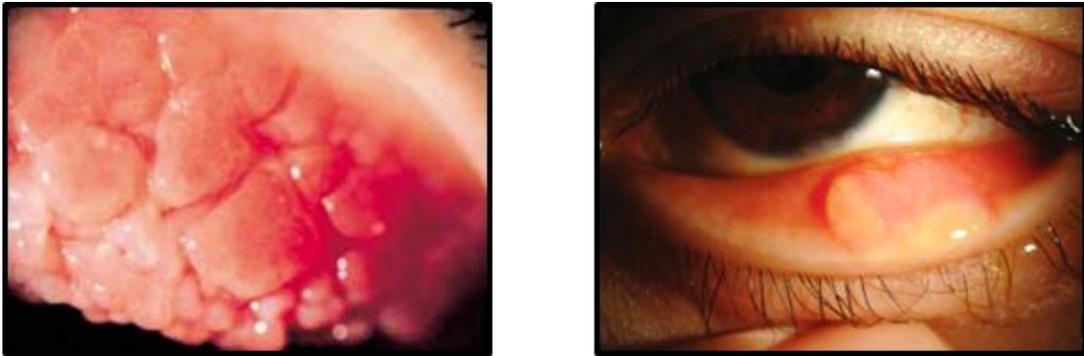


Figura 10: *Hipertrofia papilar en párpado superior e inferior.*

Forma limbar: el signo clínico dominante es la infiltración del tejido limbar subconjuntival formando nódulos, acompañado a veces de pannus y neovascularización de la periferia corneal apareciendo el limbo corneal engrosado y opaco (Figura: 11). A veces aparecen excrecencias blancas calcáreas conocidas como nódulos de Horner-Trantas. El aumento de la pigmentación de la conjuntiva interpalpebral expuesta es frecuente entre los pacientes de África y Asia y especialmente entre los niños muy pequeños ⁴⁷.

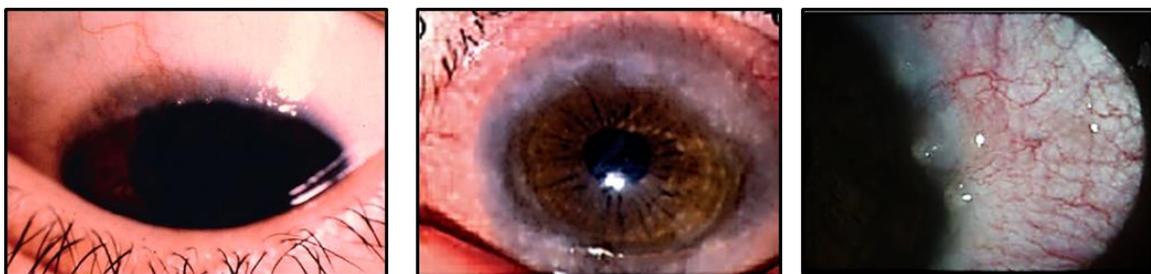


Figura 11: *Nódulos limbares de Horner-Trantas en QCV*

Durante la exacerbación de las formas palpebrales puede desarrollarse una queratitis punteada superficial y evolucionar hacia una macroerosión corneal que da lugar a una úlcera en escudo pudiendo afectar a la agudeza visual. La úlcera en escudo se

diferencia de una infecciosa por su contorno oval y su localización en el centro del tercio superior de la córnea (Figura 12), aunque también puede tener lugar una sobreinfección. La base de la úlcera en escudo puede ser translúcida o transparente y puede estar ocupada por depósitos blanco amarillentos que a veces forman una placa sobreelevada ⁴⁸.



Figura 12: *Úlcera en escudo y placa corneal*

En a) podemos observar una úlcera corneal y en b) una placa

La alteración limbar puede producir deficiencia en las células madre localizadas en el limbo llevando a un compromiso de de la superficie corneal. Se caracteriza por la aparición de vascularización corneal, inflamación crónica estromal, defectos epiteliales persistentes y crecimiento del epitelio conjuntival sobre la superficie corneal que puede afectar a la visión ⁴⁹. Otros signos corneales que pueden aparecer son cicatrices subepiteliales, reblandecimientos estériles del estroma corneal, pseudogerontoxon y queratocono ⁵⁰. En las regiones tropicales las complicaciones corneales pueden aparecer en el 7 al 50% de los pacientes con QCV que acuden a los servicios hospitalarios.

Aunque algunos signos y síntomas pueden ser similares a los de otras conjuntivitis alérgicas, la presencia de papilas gigantes tarsales ó nódulos límbicos diferencia a las QCV de otras CA.

Las QCV y las QA son formas severas de enfermedad alérgica ocular. En contraste con las vernaes, las atópicas son más frecuentes en jóvenes y adultos con historia previa de atopía, como la dermatitis facial atópica, y no mejoran después de la juventud, como ocurre con las vernaes ⁵¹.

1.7.4. HISTOPATOLOGÍA.

Las biopsias conjuntivales realizadas en pacientes con QCV activa, muestran una abundante y variada presencia de células inflamatorias, hiperplasia del epitelio, proliferación de neovasos y extensos depósitos de componentes de la matriz extracelular. La sustancia propia y el epitelio están infiltrados por mastocitos, eosinófilos, basófilos, células plasmáticas monocitos/macrófagos, células dendríticas, CD4 linfocitos T, fibroblastos y linfocitos B, organizados como pequeños folículos linfoides ⁵².

La inflamación del limbo y de la conjuntiva tarsal produce nódulos. Las papilas gigantes se caracterizan por una hiperplasia epitelial escamosa y tejido fibroso denso. La forma limbal se diferencia histológicamente de la palpebral por el importante crecimiento epitelial con extensiones fibrovasculares hacia el tejido limbar. No hay todavía explicación para el hecho de que las formas limbares sean más frecuentes en las regiones tropicales y las formas tarsales más frecuentes en los climas templados.

1.7.5. IMPLICACIÓN DE SISTEMA NEURONAL Y ENDOCRINO.

La relación existente entre el sistema nervioso central y el ojo se establece fácilmente si tenemos en cuenta los orígenes anatómicos y embriológicos comunes. Esta correlación también está bien establecida con el sistema inmune y tiene lugar a través de la interacción entre las terminaciones nerviosas y los mastocitos (Figura 12).

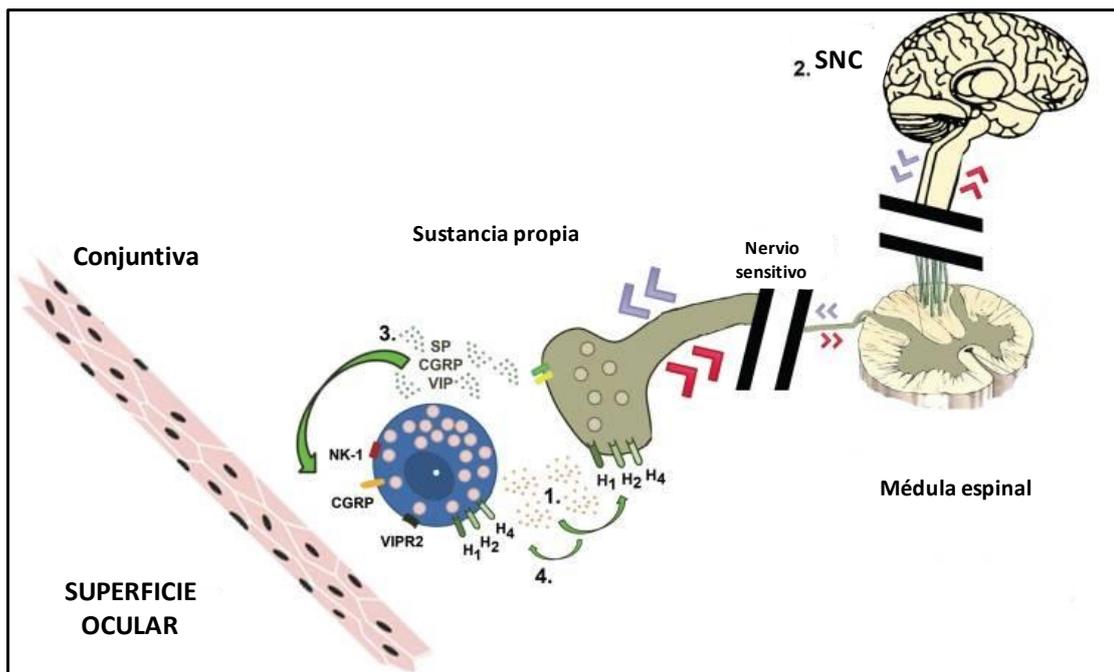


Figura 13: Posible interacción entre los mastocitos y las terminaciones nerviosa a nivel conjuntival. Los neuropéptidos liberados en las terminaciones nerviosas actúan sobre los mastocitos. Estos a su vez liberan mediadores que actúan sobre las terminaciones nerviosas. 1): Histamina 2): SNC. 3): Neuropéptidos. 4): Liberación de histamina. (Rosa AC and Fantozzi 2013⁵³)

En la actualidad todavía no está claro como los neuropéptidos y las neurotrofinas pueden influir en la inflamación conjuntival. La sustancia P es un neuropéptido con

actividad bien conocida en las células inmunes se encuentra elevada tanto en las lágrimas como en el suero de estos paciente ^{54, 55}.

En el epitelio y la sustancia propia de la conjuntiva se han encontrado receptores para el factor de crecimiento nervioso (NGF), y niveles séricos altos de esta sustancia se pueden detectar en la forma activa de la enfermedad, estando directamente relacionados con el número de mastocitos en el tejido conjuntival, lo que sugiere que las relaciones neuronales pueden tener un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad alérgica ^{54, 56}.

El papel de las hormonas sexuales también se ha postulado en la patogénesis de la enfermedad. Esta suposición se debe a la observación de una prevalencia de los varones sobre las mujeres y una resolución espontánea de la enfermedad en la pubertad. Las hormonas sexuales pueden jugar un papel relevante en la fisiopatología de las enfermedades alérgicas por relaciones de interacción entre los sistemas inmune y el endocrino. Los estrógenos y la progesterona han demostrado tener un papel activo en el sistema inmune ocular, como ha quedado bien establecido en otras enfermedades inmunológicas. Por estudios inmunohistoquímicos en pacientes con QCV se ha podido comprobar que los receptores de estrógeno y progesterona están sobreexpresados en la conjuntiva por los eosinófilos y otras células inflamatorias ⁵⁷. Estas hormonas pueden unirse a receptores conjuntivales y ejercer un efecto proinflamatorio a través del reclutamiento de eosinófilos en la conjuntiva ⁵⁸.

1.7.6 .INMUNOPATOGENESIS.

Los pacientes con QCV tienen antecedentes familiares de enfermedad atópica en el 49% de los casos y también pueden tener antecedentes de procesos asmáticos (26,7%), rinitis (20%), y eccema (9,7%)³. Los datos referentes a la frecuencia de sensibilización son contradictorios y así Ballow y Mendelson⁵⁹ encuentran un 19% de sensibilización positiva y en cambio Easty et al⁶⁰ señalan un 80%. En una serie de 195 pacientes, se encontró respuesta positiva a las pruebas cutáneas (prick) y RAST del 57% y el 52%, respectivamente³. La IgE total tiene niveles altos en suero y se cree que hay incremento en la producción de la misma en las lágrimas⁵⁹.

Estudios recientes sugieren un mecanismo patogénico más complejo que el IgE independiente. Multitud de células y mediadores han sido detectados en suero, conjuntiva y lágrimas de los pacientes con QCV, que pueden tener un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad⁶¹. Aunque muchas características de la QCV sugieren una patogénesis alérgica⁶², este tipo de alergia ocular no puede ser considerado un tipo clásico de alergia tipo I mediada por IgE, tal y como se incluye en la clasificación de Gell y Coombs⁶³. De hecho, la mayor parte de los pacientes con QCV tienen las pruebas cutáneas y RAST negativas.

Sobre la base de estudios inmunohistoquímicos y de estudios de mediadores, se ha sugerido un mecanismo dirigido por Th2 similar al del asma, con implicación de mastocitos, eosinófilos, y linfocitos³. Esta idea está basada en el hallazgo de un número importante de clones de linfocitos T en la conjuntiva de los pacientes con QCV del tipo Th2 con incremento en las lágrimas de estos pacientes de los niveles de IL5, pero no de IL2, sugiriendo una actividad mayor de los Th2 que los Th1⁶⁴. Es posible que la

patogénesis de de la QCV sea debida a una alteración de los linfocitos Th2 mientras que la respuesta exagerada IgE a los alérgenos comunes sea un evento inconsistente y quizás secundario. Los linfocitos Th2 son responsables tanto de la hiperproducción de IgE como de la diferenciación y activación de los mastocitos y de los eosinófilos. Los mastocitos y basófilos producen una reacción inmediata a través de la liberación de histamina y el reclutamiento de células inflamatorias como linfocitos y eosinófilos. Este reclutamiento de células está favorecido por una sobreexpresión de moléculas de adhesión, dando como resultado la liberación de otros mediadores celulares tóxicos tales como la proteína catiónica de eosinófilos EDN / EPX, responsables del daño en el epitelio corneal ⁶⁵, ⁶⁶. De hecho, varias células inflamatorias y epiteliales pueden inducir la proliferación de fibroblastos y colágeno que conducen a los característicos hallazgos conjuntivales en la QCV.

Mientras que la histamina es el principal mediador en las reacciones alérgicas con mecanismo de hipersensibilidad tipo I, como en las CAE y CAP y en la fase temprana de la reacción, otros mediadores están implicados en la QCV como los mediadores eosinófilos y sustancias derivadas del metabolismo del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) ⁶², ⁶⁷ potentes mediadores de la hipersensibilidad y reacciones inflamatorias. Sus propiedades incluyen la contracción del músculo liso, dilatación de microvasos, aumento de la permeabilidad vascular, estimulación de la secreción de glicoproteínas por parte de las glándulas epiteliales aumento del flujo sanguíneo nasal y aumento de la resistencia al flujo aéreo de las vías respiratorias ⁶⁸, ⁶⁹.

Se ha demostrado que los leucotrienos también se pueden producir en la conjuntiva ⁶⁹ y pueden detectarse en la lágrima de los pacientes afectados por conjuntivitis alérgica

incluyendo la QCV ⁷⁰. La actividad biológica de los leucotrienos en la conjuntiva puede contribuir a la presencia de los síntomas característicos observados en la QCV tales como secreción mucosa, hiperemia conjuntival y quémosis.

1.7.7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Varios procesos clínicos se pueden presentar con las mismas características clínicas (prurito, hiperemia, fotofobia, lagrimeo) de los trastornos de hipersensibilidad de la superficie ocular, como las infecciones subagudas y crónicas de diferentes etiologías.

Las formas más leves de QCV pueden confundirse con CAE, queratoconjuntivitis flictenular, o tracoma (en áreas endémicas). Las blefaritis recurrentes con afectación corneal (rosácea ocular) pueden ser confundidas también con QCV. Los casos leves de penfigoide ocular cicatricial pueden imitar signos de QCA. Epiescleritis y uveítis anterior aguda son procesos unilaterales dolorosos que se asocian con trastornos autoinmunes

El diagnóstico diferencial de la QCV debe incluir a todas las causas de conjuntivitis alérgica ⁷, y aunque un caso típico de QCV puede diagnosticarse fácilmente por la clínica, las formas más leves pueden ser de más difícil diagnóstico, haciéndose necesarias pruebas adicionales para llegar a un diagnóstico definitivo.

Las QCV y la QCA pueden ser difíciles de distinguir. El inicio de la QCA suele ser en los años de la adolescencia y puede persistir por muchos años, también es bilateral con variaciones estacionales y tiene una asociación menor con los climas cálidos que la QCV ⁷¹. Los signos y síntomas son similares a los asociados a la QCV, incluyendo picor intenso

ocular, escozor, lagrimeo, secreción mucosa, nódulos de Horner, vascularización corneal y ulceración, queratocono y pseudogerontoxon.

Los párpados de las personas con QCA presentan con frecuencia blefaritis crónica, eccema e infecciones secundarias de la piel. En contraste con la QCV los pacientes con QCA tiene más afectada la conjuntiva palpebral inferior y las papilas de la conjuntiva tarsal son más pequeñas. En la QCA puede producirse fenómenos de fibrosis y cicatrización conjuntival con disminución de la profundidad de los fondos de saco conjuntivales inferiores. La neovascularización de la córnea tiende a ser más profunda en la QCV, y las complicaciones corneales son potencialmente más graves y con mayor afectación visual. En general, la QCA es una enfermedad más grave que la QCV.

La conjuntivitis alérgica estacional (CAE) es la conjuntivitis alérgica más frecuente, tiende a presentarse con prurito bilateral, hiperemia conjuntival y lagrimeo. Los alérgenos más conocidos que causan CAE son el polen de ambrosía, polen de gramíneas y árboles, caspa de animales, y los ácaros domésticos. Estos alérgenos se diluyen en en la película lagrimal y atraviesan el epitelio conjuntival y contactan con los mastocitos desencadenando su degranulación y la liberación de mediadores inflamatorios. Es característico de la CAE después de la exposición al alérgeno el inicio rápido concomitante con una rinitis alérgica o sinusitis. La afectación corneal es excepcional en este tipo de conjuntivitis.

Se cree que la conjuntivitis papilar gigante (CPG) es el resultado del contacto directo de alérgenos adheridos a cuerpos extraños con la conjuntiva. Aunque la mayoría de las veces se asocia a lentes de contacto, otros irritantes, como las suturas y las prótesis

oculares, también pueden causar CPG. Generalmente, los pacientes se quejan de picor, lagrimeo y sensación de cuerpo extraño cuando las lentes de contacto están deterioradas. Pueden aparecer macropapilas conjuntivales tarsales en el párpado superior como en la QCV. La respuesta tarsal superior y la producción de secreción mucosa puede parecer idéntica a la de la QCV pero la QCA se cura al retirar la causa desencadenante del problema.

La hipersensibilidad a determinados medicamentos también puede producir un cuadro similar al de la QCV. Medicamentos habituales como la atropina, anestésicos tópicos, antibióticos fenilefrina, antiglaucomatosos y excipientes de varios tipos de colirios pueden dar un cuadro de hipersensibilidad. La respuesta conjuntival suele ser menos manifiesta y la reacción conjuntival suele tener lugar en el párpado inferior. Los folículos son más frecuentes que las papilas en estas situaciones.

El tracoma produce lesiones en la conjuntiva tarsal superior y en la parte superior del limbo esclerocorneal que en un principio podrían parecer similares a la QCV, sin embargo el tracoma es una conjuntivitis infecciosa folicular y puede ocasionar también cicatrización conjuntival y opacificación corneal con afectación visual. En esta patología en el raspado conjuntival no se encuentran eosinófilos. La QCV y el tracoma puede coexistir en el mismo paciente ya que estas dos patologías son frecuentes en las mismas zonas climáticas ⁷².

1.7.8. FACTORES DE RIESGO.

Se ha sugerido un posible factor de riesgo de origen endocrino y genético por los siguientes hallazgos inmunohistológicos y clínicos:

- La disparidad sexual en la prevalencia de la enfermedad ⁴².
- El papel de las hormonas sexuales en otros trastornos inmunológicos ⁷³.
- En el epitelio conjuntival se ha encontrado sobreexpresión de receptores de estrógenos y progesterona con eosinófilos conjuntivales y alteración de la expresión de neuroreceptores ⁷⁴.
- Altas concentraciones en el suero y las lágrimas de pacientes con QCV ⁷⁵ de factores de crecimiento, neuropéptidos, como la sustancia P y prostaglandinas.

Hacen pensar en un papel importante del factor de riesgo genético la diferente prevalencia entre las formas limbares y conjuntivales en diferentes razas, en la misma localización geográfica, y la identificación de genes susceptibles para sufrir alergia ocular ⁷⁶. La exposición a la luz ultravioleta, contaminación atmosférica o humo de tabaco pueden dar signos y síntomas de conjuntivitis alérgica ⁷⁷. La colonización por estafilococos del borde palpebral también se ha sugerido que puede influir en la patogénesis de la QCV ⁷⁸.

1.8. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS.

1.8.1 PRUEBAS CUTÁNEAS INTRAEPIDÉRMICAS.

Las pruebas de alergia, como los test cutáneos o pruebas RAST (Radio Allergo Sorbent Test), se han utilizado para identificar los desencadenantes específicos de QCV, especialmente en pacientes con alergia sistémica o atopia o en pacientes con un curso de la enfermedad persistente. Sin embargo, el rendimiento relativamente bajo de estas pruebas puede limitar su utilidad y, por tanto, no son recomendadas de forma rutinaria

1.8.2. EXAMEN DE LA CONJUNTIVA.

Los raspados conjuntivales y las muestras de biopsia, aunque rara vez son necesarios, puede facilitar el diagnóstico de un proceso alérgico ocular. Los raspados conjuntivales teñidos con Giemsa pueden indicar la presencia de un proceso alérgico debido a que los eosinófilos y gránulos de eosinófilos normalmente no están presentes en la conjuntiva humana ⁷⁹. En una biopsia de la conjuntiva podemos identificar y contar mastocitos, basófilos y eosinófilos. La microscopía también se puede utilizar para visualizar infiltración celular, pero puede no ser tan precisa en la identificación de mastocitos degranulados ⁸⁰.

1.8.3. PRUEBAS DE PROVOCACIÓN CONJUNTIVAL.

Se pueden realizar pruebas de provocación conjuntival con alérgenos secos o en solución depositados en el fondo de saco conjuntival inferior o mediante lentes de contacto saturadas con el alérgeno y colocadas sobre la córnea. De esta manera la respuesta puede ser observada clínicamente y las lágrimas y los raspados conjuntivales se pueden estudiar para ver la respuesta celular y los mediadores liberados. Esta prueba es la más utilizada experimentalmente para medir en el fluido lagrimal mediadores tales como histamina, triptasa, prostaglandinas o leucotrienos en diferentes periodos de tiempo después de una provocación con diferentes alérgenos específicos. Se utiliza principalmente para evaluar la eficacia terapéutica de agentes antialérgicos, pero pueden ser usados para evaluar las respuestas a alérgenos específicos en pacientes con QCV ⁷⁹.

Leonardi et al ⁸¹ realizaron una prueba de provocación ocular en 103 pacientes que habían sido sometidos previamente a pruebas cutáneas con los mismos alérgenos. De los pacientes estudiados, el 59% fueron positivas para al menos un alérgeno. De los pacientes

que fueron negativos a las pruebas cutáneas o al test con IgE sérica específica, el 42,4% fueron positivos para el test de provocación conjuntival.

1.8.4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

Si bien el diagnóstico de la QCV es en gran medida por la clínica, las pruebas de laboratorio pueden ser útiles para diferenciarla de otras formas de alergia ocular.

a). Evaluación de las lágrimas.

El examen citológico de la lágrima es relativamente rápido y no invasivo. La presencia de neutrófilos, linfocitos, y especialmente eosinófilos en el fluido lagrimal sugiere un proceso alérgico. Si bien no hay un único mediador inflamatorio que pueda considerarse específico para el diagnóstico de QCV, la evaluación del fluido lagrimal puede proporcionar pistas importantes en la patogénesis de la QCV. En un estudio de IgA en lágrima, se encontraron bajos niveles de IgA total y altos niveles IgA específica para ácaros domésticos, lo que sugiere una producción local y una posible relación con un alérgeno específico en la patogénesis de la QCV ⁸², que se correlaciona con el estudio israelí que relacionaba los ácaros domésticos con el incremento de los síntomas en la QCV ⁸³. Las citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- α , incrementan su concentración de forma significativa con relación a los controles y al grado de gravedad del proceso ⁸⁴.

IgE específica frente a alérgeno completo.

La IgE específica se determina habitualmente mediante técnicas de enzimo-inmunoensayo (EAST) (Figura 14) en discos de celulosa a los que se han acoplado los alérgenos y donde va tener lugar la reacción con los diferentes reactivos. Se considera menos sensible que los tests cutáneos pero algunos autores la encuentran más específica ⁸⁵.

Permite una interpretación cuantitativa del diagnóstico, pero no existe una relación lineal entre la cantidad de IgE específica circulante y la gravedad del proceso.



Figura 14: *Determinación de IgE específica. Unicap IgE®, Thermofisher.*

IgE específica frente a alérgenos mediante diagnóstico molecular (CDR)

La proteómica consiste en el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). La hibridación genómica y la aplicación de los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos a gran escala (micromatrices o microarrays) permite que se pueda disponer biochips o paneles de alérgenos o epítomos, recombinantes y naturales, que nos permite mejorar las técnicas diagnósticas tradicionales de detección de IgE específica basadas en el uso de extractos completos en cuanto a reproducibilidad y estabilidad, especialmente en el caso de alimentos vegetales con bajo contenido proteico y que poseen actividad enzimática que degrada los alérgenos ⁸⁶.

El CDR nos va a permitir identificar los patrones individuales de sensibilización frente a diferentes proteínas de una misma fuente alergénica, con posibilidades de identificar:

- Patrones de sensibilización según el área geográfica ^{87, 88}.
- Sensibilización a proteínas asociadas a un mayor riesgo de reacciones graves, como las proteínas transportadoras de lípidos proteín (lipid transfer proteins (LTP)) ⁸⁹.
- Sensibilización a proteínas homólogas en diferentes fuentes alergénicas con posible implicación en fenómenos de reactividad cruzada ⁹⁰.
- Indicar de forma precisa tratamiento con inmunoterapia.

1.8.5. RIESGO DE AFECTACIÓN VISUAL EN LA QCV.

La QCV puede inducir alteraciones graves de la anatomía ocular que conducen a la pérdida permanente de la agudeza visual. En un estudio de seguimiento a largo plazo ³ se ha descrito la disminución de la agudeza visual en el 2% de los pacientes, siendo las causas más frecuentes de esta afectación visual las cicatrices corneales centrales y las cataratas y glaucomas inducidos por el tratamiento con corticoides. Además, la presencia de queratocono o de un astigmatismo irregular superior a 2 dioptrías, son seis veces más frecuentes en estos pacientes que en los pacientes control.

En otro estudio ⁹¹ realizado sobre 58 pacientes consecutivos diagnosticados de QCV, 12 de ellos (21%) tenían como mejor agudeza visual corregida en uno o en ambos ojos de 20/200 o menor, otros 20 pacientes (34%) tenían una visión de 20/50 a 20/200 y 26

(45%) la tenían de de 20/20 a 20/50. Las complicaciones oculares responsables de la disminución de la visión fueron cataratas (8 pacientes) y glaucoma (4) como consecuencia de la toma de corticoides, cicatrices corneales centrales (7), astigmatismo irregular (4), queratocono (3) y por hiperplasia de tejido limbar (3). De los 32 pacientes afectados, 12 tenían síndrome de ojo seco, que puede contribuir a la afectación visual. Además de la afectación visual, la queratitis bacteriana, la úlcera en escudo persistente y la mayor probabilidad de ulceración estéril pueden llevar a la perforación del globo ocular ⁹¹. Las queratitis micóticas se pueden asociar con QCV.

No está clara la hipótesis de que el escozor de ojos y frotárselos con frecuencia en los procesos alérgicos que cursan con prurito ocular, pueda ser relevante para la patogénesis del queratocono. Se ha publicado que en una población sana, el 3% de los individuos tienen eccema, mientras que en pacientes con queratocono, el 32% de los pacientes tenían eccema y picor de ojos ⁹². En otro estudio ⁹³ encuentran que la prevalencia de asma en el grupo de control fue del 1%, mientras que en pacientes con queratocono fue del 17,9%. En los pacientes con queratocono y atopia, la progresión del queratocono se produce más rápidamente, y la necesidad de cirugía de queratoplastia es más precoz, siendo las complicaciones refractivas ⁹⁴ más frecuentes.

Los niños con QCV a los que se les realizan mapas videoqueratográficos tienen una alta incidencia de queratocono y tienen patrones de topografía corneal más anormales de lo esperado en comparación con normales ⁵⁰. Las características topográficas de los ojos con queratocono y atopia son diferentes de los ojos con queratocono sin problemas de atopia. Los pacientes con atopia parecen tener un modo propio de desarrollar queratocono. La

aproximación clínica a los pacientes con queratocono y ciertas formas de alergia no está bien estandarizada.

El queratoglobo se ha encontrado en pacientes con QCV ⁹⁵, se caracteriza por un adelgazamiento global de la córnea con ectasia de la misma. Estos pacientes tienen una predisposición mayor de sufrir queratitis microbianas que responden mal a la terapia antibiótica y tienen un alto riesgo de perforación corneal.

A pesar de la abundante literatura que describe las posibles complicaciones que amenazan la visión en las QCV, el análisis de los ensayos clínicos realizados para evaluar la seguridad y eficacia del tratamiento médico en cuanto a resultado visual en la conjuntivitis alérgica, tanto en pacientes con QCV como QA, demuestran claramente que hasta la fecha ha sido una cuestión que ha preocupado poco a los investigadores ^{96 97}. En ensayos abiertos, no controlados, la agudeza visual nunca representa un objetivo primario en los resultados y objetivo final del tratamiento, y pocas veces se avalúa como resultado secundario de la eficacia del tratamiento. Se debe hacer énfasis en la necesidad de considerar la agudeza visual como un objetivo primario de los futuros ensayos clínicos sobre alergia ocular que pueden afectar a la córnea.

1.9. TRATAMIENTO DE LA QCV.

El cumplimiento de las instrucciones por un paciente bien informado hace que el resultado del tratamiento se vuelva más efectivo y gratificante. La educación del paciente y sus familiares sobre la naturaleza crónica y recidivante de su patología, pero con tendencia a la resolución, es un aspecto muy importante en el manejo de la QCV.

1.9.1. MEDIDAS DE EVITACIÓN.

Debido a que la exposición a estímulos no específicos son causa frecuente de hiperemia conjuntival entre los pacientes con QCV, la no exposición a factores desencadenantes como el sol, el viento y el agua salada son útiles, aunque no lo suficiente, para controlar los síntomas. Se debe evitar el contacto con los alérgenos comúnmente conocidos como plantas y flores. El uso de gafas de sol o cualquier otra medida de protección lumínica también tiene utilidad y deben ser recomendados. La aplicación de compresas frías y el uso de lágrimas artificiales han demostrado ser eficaces en el alivio de los síntomas por eliminación directa y dilución del alérgeno de la superficie ocular ⁹⁸. Las compresas frías proporcionan alivio sintomático del prurito ocular. Puede ser útil el lavado frecuente de las manos, cara y cabello, especialmente antes de ir a la cama ⁹⁹.

1.9.2 TERAPIA FARMACOLÓGICA.

La variedad de fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de la QCV incluye antihistamínicos, estabilizadores de mastocitos, agentes de doble acción, corticoesteroides e inmunomoduladores pero ninguno es suficiente por sí solo para tratar todos los aspectos de las múltiples facetas de la fisiopatología de QCV. La mayoría de los fármacos utilizados son meramente paliativos y no eliminan la compleja respuesta inmune que se desencadena con el inicio y mantenimiento de los síntomas cuando se interrumpe la terapia. Debido a que hay pocos ensayos de control aleatorizado, la selección de un fármaco, entre las muchas opciones disponibles, se realiza en la mayoría de los casos sobre la base de la experiencia y la preferencia personal del médico que realiza el tratamiento. En algunos pacientes, para el control satisfactorio de los síntomas, la medicación se debe utilizar a lo largo de todo el año. Cada vez se utiliza con más frecuencia medicación tópica en forma de colirios sin conservantes y en forma de unidosis para evitar los posibles

efectos contralaterales que podrían enmascarar el efecto del principio farmacológico que se esté empleando.

a). Vasoconstrictores.

La Oximetazolina es el más potente y de acción más rápida y duradera ¹⁰⁰. Son efectivos sobre la hiperemia conjuntival por su efecto alfa-adrenérgico aunque su efecto es corto (2 a 4 horas). Los más utilizados son oximetazolina, tetrahidrozolina y fenilefrina. Su uso debe ser puntual ya que además de la molestia que produce su instilación tienen efectos secundarios locales como conjuntivitis folicular e hiperemia de rebote tras tratamientos prolongados y están contraindicados en pacientes glaucomatosos y pacientes con enfermedades cardiovasculares ¹⁰¹.

b). Bloqueantes de receptores histamínicos.

La combinación de colirios vasoconstrictores y de antihistamínicos no específicos tienen un aval de muchos años de uso y han resistido la prueba del tiempo. Contienen vasoconstrictores como oximetazolina, nafazolina o tetrahidrozolina y antihistamínicos como pirilamina o feniramina. Estas gotas son seguras y eficaces, al menos temporalmente y debido a su disponibilidad son utilizados por muchos pacientes como tratamiento de primera línea durante la primera fase de la enfermedad ¹⁰².

En virtud de sus constituyentes, vasoconstrictor y antihistamínico no específico, alivian el picor y reducen el enrojecimiento. Tienen efectos secundarios comunes como son ardor o escozor en la instilación así como la reaparición de la hiperemia al suspenderlos.

c). Estabilizadores de mastocitos.

Los fármacos de este grupo estabilizan los mastocitos y evitan su degranulación. Siendo la degranulación de los mastocitos un elemento clave en la QCV, el tratamiento se ha centrado en la prevención de la degranulación o en neutralizar el efecto del mediador primario (histamina) liberado por los mastocitos ¹⁰². Los mediadores liberados por los mastocitos son responsables de muchos de los síntomas y signos asociados con la QCV. La modulación medicamentosa de la actividad de los mastocitos alivia los síntomas agudos de la enfermedad y también reduce el estímulo de las citoquinas para el desarrollo de la inflamación alérgica crónica ¹⁰³.

Se ha demostrado en muchos estudios la eficacia del cromoglicato de sodio, lodoxamida, nedocromil y pemirolast en el control de los síntomas y la prevención de las exacerbaciones ^{104, 105, 106}. Estos deben utilizarse como primera línea de defensa en el inicio de la temporada alérgica y mantenerse a lo largo de todo el período estacional.

Cromoglicato 4%, es el prototipo de estabilizador de mastocitos y se viene utilizando para el tratamiento de la alergia desde hace más de 25 años. Puede utilizarse durante largos períodos de tiempo sin efectos secundarios, pero hasta alcanzar plena efectividad tarda varios días ¹⁰⁷. El cromoglicato de sodio puede tener un efecto sinérgico en combinación con un corticoesteroide para el tratamiento de la QCV ¹⁰⁸.

Lodoxamida 0,1%, se ha mostrado eficaz por actuar de forma más rápida ¹⁰⁹. Ha demostrado una eficacia mayor para controlar los signos y síntomas que el cromoglicato y levocabastina ^{15, 110, 111}. La mayor eficacia de lodoxamida está relacionada con la

significativa disminución en la conjuntiva de células CD4 y otras células inflamatorias como los eosinófilos.

Nedocromil 2%, además de la estabilización de los mastocitos, también inhibe la quimiotaxis, y la activación y liberación de mediadores de otras células inflamatorias. El nedocromil sódico y lodoxamida han demostrado ser superiores al cromoglicato en el tratamiento de la QCV pero un meta-análisis de eficacia y efectividad del uso tópico de estabilizadores de mastocitos en el tratamiento de de la alergia estacional con estabilizadores de mastocitos no encuentra evidencias suficientes como para recomendar uno u otro ¹¹².

Pemirolast, es un componente de la piridopirimidina con propiedades de estabilización de mastocitos, y es efectiva en el tratamiento de la conjuntivitis alérgica.

Antihistamínicos orales son una buena opción cuando el proceso alérgico afecta a los ojos, la nariz o la faringe simultáneamente (Figura: 15). Bilastina es uno de los antihistamínicos más modernos con un perfil similar al de la cetiricina ¹¹³ y desloratadina¹¹⁴, tanto a nivel de eficacia en el control de la sintomatología como en el perfil de seguridad.

En la actualidad no hay un nivel de evidencia suficiente para recomendar un antihistamínico oral en concreto para tratar la CA y su elección dependerá de las características individuales de cada paciente. Cuando la alergia se limita a los ojos, el tratamiento con antihistamínicos tópicos es eficaz y sin los efectos adversos relacionados con los antihistamínicos orales.

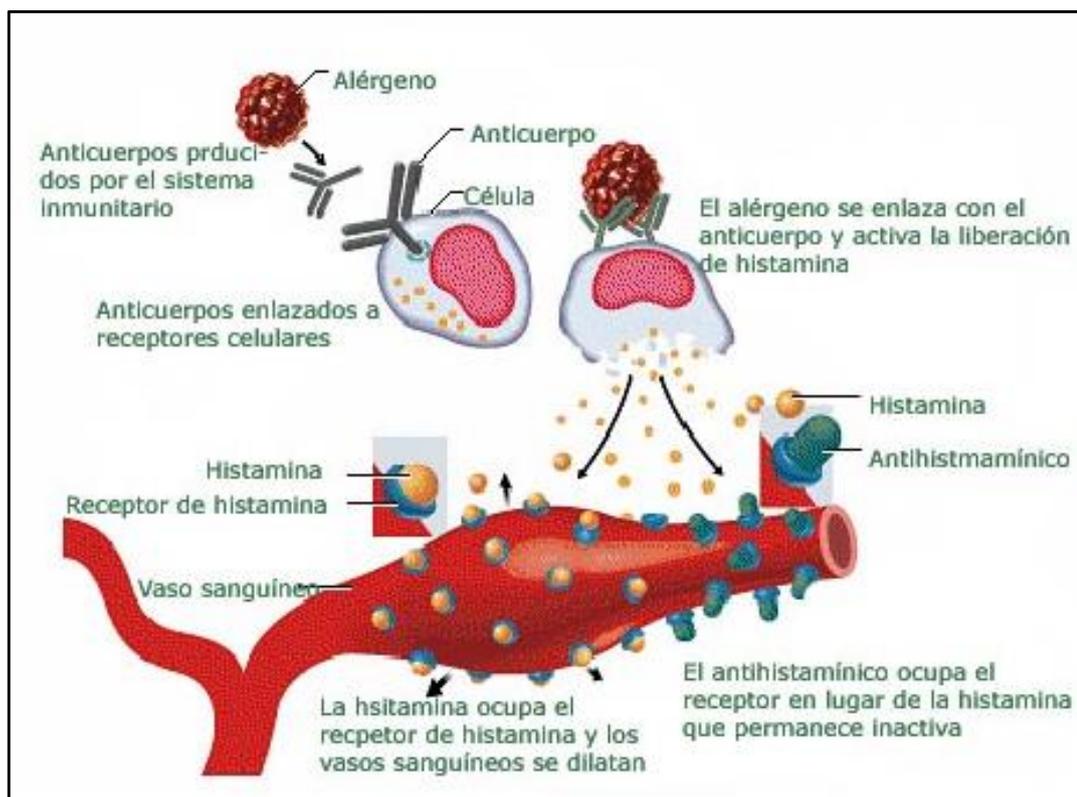


Figura 15: Mecanismo de acción de los antihistamínicos sobre los receptores vasculares de histamina.

d). Antagonista de los receptores H1.

Emedastina y levocabastina, son bloqueadores tópicos selectivos H1, son mejores que la combinación de vasoconstrictor / antihistamínico no específicos para el control de los signos y síntomas de la QCV. Levocabastine 0,05% es un potente antihistamínico tópico con rápida y prolongada actividad selectiva anti-H1. Muchos estudios demuestran su eficacia en el tratamiento de la conjuntivitis alérgica estacional en comparación con el placebo ¹¹⁵. Emedastina 0,05% es un antagonista relativamente selectivo de los receptores H1 sin aparente efecto sobre los receptores adrenérgicos, dopaminérgicos o los receptores

de serotonina. Emedastina como antagonista del receptor H1, inhibe la producción de citoquinas por las células epiteliales conjuntivales ¹¹⁶.

La eficacia clínica de emedastina, levocabastina y olopatadina sobre los de primera generación, antazolina y fenilamina, puede deberse a la acción inhibidora de los de segunda generación sobre las citoquinas pro-inflamatorias producidas por las células epiteliales conjuntivales

El efecto antiinflamatorio observado con los antihistamínicos puros como levocabastina y emedastina se atribuye al bloqueo de los receptores histamínicos y disminución de la expresión de ICAM-1, limitando la quimiotaxis de las células inflamatorias ¹¹⁷.

e). Medicamentos de mecanismo de doble acción.

Bloqueantes de los receptores H1 y estabilizadores de mastocitos.

Una nueva generación de fármacos como olopatadina, epinastina, ketotifeno y azelastina, con perfil de actuación doble, han demostrado actividad sobre la estabilidad del mastocito y el bloqueo de los receptores H1. El bloqueo rápido de los receptores H1 junto a la estabilización del mastocito hace posible su utilización de forma tópica con una frecuencia de dos veces al día. La acción de estos medicamentos no se limita a la estabilización de los mastocitos y el bloqueo de receptor H1 sino que también ejercen efectos anti-inflamatorios a través de diferentes mecanismos ¹¹⁸.

Olopatadina 0,1%: es un antagonista H1 selectivo, con propiedades de estabilización de mastocitos. Actúa en la liberación de TNF-a y diversas citoquinas a partir

de las células del epitelio conjuntival, controlando de forma más eficaz la inflamación alérgica que las otras formulaciones anti-histamina tópicas ¹¹⁹. Disminuye la secreción de moco en la QCV por reducción de la densidad de células caliciformes en la conjuntiva ¹²⁰.

Ketotifeno 0,025%: además de la estabilización de mastocitos y antagonismo de los receptores H1, evita la acumulación de eosinófilos. Se ha demostrado que ketotifeno inhibe la liberación de mediadores inflamatorios a partir de los basófilos y eosinófilos, la quimiotaxis, y la actividad de los leucotrienos y la activación de las plaquetas. También disminuye la permeabilidad vascular ¹²¹.

Epinastina 0,05%: es un antagonista del receptor HR1 y HR2 con actividad estabilizadora del mastocito y actividad antiinflamatoria. Reduce el prurito ocular aunque menos que olopatadina ¹²².

Azelastina 0,05%: es un antagonista selectivo del receptor HR1 que inhibe liberación de histamina y otros mediadores tanto en la fase precoz como en la tardía ¹²³. Disminuye la expresión de ICAM-1 en la conjuntiva, reduce la quimiotaxis de eosinófilos e inhibe la activación factores plaquetarios ¹¹⁸.

f). Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

Estos fármacos bloquean la vía de la ciclooxigenasa reduciendo la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. Las formulaciones tópicas de ketorolaco 0,5% y diclofenaco 0,1% pueden disminuir el prurito ocular y la hiperemia conjuntival asociado a la conjuntivitis alérgica. Se ha demostrado que las prostaglandinas E2 e I2 son pruritogénicas. En un estudio abierto prospectivo, el colirio sin conservantes de

diclofenaco 0,1% reduce los síntomas de la QCV en el 40% de los pacientes a través de la inhibición de la producción de prostaglandinas. Aunque la hiperemia conjuntival se reduce de forma significativa, el tamaño de las papilas y las lesiones de la córnea se mantienen sin cambios ¹²⁴.

En un estudio prospectivo aleatorio cruzado, trometamina y ketorolaco 0,5% sin conservantes, reducen los signos y síntomas de QCV de forma más rápida que la ciclosporina tópica 0,5% ¹²⁵. El ketorolaco puede ser una buena alternativa a los esteroides tópicos ya que reducen el prurito inhibiendo la síntesis de prostaglandinas ¹²⁶.

g). Corticoesteroides.

Los corticoesteroides tópicos son unos de los fármacos más eficaces para controlar los signos y síntomas de la QCV. Son los agentes antiinflamatorios más potentes ya que inhiben la síntesis intracelular de proteínas y la fosfolipasaA2 que es la responsable de la formación del ácido arquidónico, uno de los marcadores más importantes en la fase tardía del proceso alérgico. También inhiben la producción de citoquinas y la migración de células inflamatorias. Debido a sus efectos secundarios no son fármacos de primera elección. El uso prolongado de corticoides puede inducir la aparición de cataratas, glaucoma y aumento de susceptibilidad frente a infecciones víricas y fúngicas.

Recientemente se han desarrollado esteroides modificados, como etabonato de loteprednol y rimexolona que en comparación con los otros esteroides, tienen un perfil de seguridad superior atribuido a su conversión rápida en un metabolito inactivo con mínima absorción sistémica ¹²⁷.

Loteprednol es muy eficaz en el tratamiento agudo y profiláctico de la conjuntivitis alérgica. En un estudio retrospectiva el etabonato de loteprednol ha demostrado ser seguro y eficaz cuando se usa durante 12 meses o más para el tratamiento de la CAE o CAP ¹²⁸.

Rrimexolona es un derivado de prednisolona que se inactiva rápidamente en la cámara anterior del ojo y no eleva la presión intraocular

Fluorometalona es un corticoesteroide poco potente y eficaz en el control de los signos y síntomas de QCV. El fosfato desonido de fluorometalona se ha comprobado que es tan eficaz como fluormetolona en el tratamiento de la conjuntivitis alérgica ¹²⁹.

La inyección supratarsal de corticoesteroides se puede utilizar para el tratamiento de QCV refractaria al tratamiento convencional ¹³⁰. La inyección de dexametasona, triamcinolona o de hidrocortisona supratarsal es eficaz en la supresión temporal de la inflamación asociada con QCV ^{131, 132}. La resolución de la forma limbar de la enfermedad fue más efectiva que la forma palpebral ¹³². Sin embargo aunque los corticoesteroides son los fármacos más eficaces, existen formas resistentes al tratamiento con ellos haciendo necesaria una terapia alternativa.

h). Inmunomoduladores.

Ciclosporina, un metabolito fúngico, disminuye los signos y síntomas de la QCV. ¹³³. Se comenzó a utilizar colirio de ciclosporina al 2% en solución oleosa para tratar las formas graves, alcanzando rápido alivio de los síntomas subjetivos en el 86% de los pacientes. Sin embargo, los síntomas recurren siendo necesarias en la mayoría de los pacientes terapias adicionales al suspender la medicación ¹³³. La ciclosporina es lipofílica

por lo que debe disolverse en una base de alcohol-aceite, que causa irritación ocular. La ciclosporina al 0,5-2% emulsionada en aceite de oliva o aceite de ricino se tolera mejor y debe aplicarse cuatro veces al día, siendo eficaz en el tratamiento de QCV. La mejoría clínica en QCV después del tratamiento con ciclosporina puede deberse a su efecto inmunomodulador sobre la respuesta inmune humoral y la mediada por células ¹³⁴.

Ciclosporina bloquea la proliferación de linfocitos Th2 y la producción de IL-2, y además inhibe la liberación de histamina a través de la reducción de la producción de IL-5 ¹³³, ¹³⁵. La rápida apoptosis inducida por la ciclosporina en cultivos de fibroblastos obtenidos de pacientes con VKC sugiere un potencial papel en el tratamiento de los trastornos hiperproliferativos de la conjuntiva en la QCV ¹³⁶.

En estudios controlados doble ciego con placebo, los colirios de ciclosporina al 2% son eficaces y seguros en el tratamiento de formas graves de QCV ¹³⁷; ¹³⁸. En la mayor parte de los casos se logra el efecto terapéutico 2 semanas después de iniciar el tratamiento y se mantiene durante los siguientes 3 meses de medicación continua ¹³⁷. En un estudio prospectivo de 10 casos con QCV grave la ciclosporina tópica al 2% redujo de forma significativa los signos clínicos. La disminución de la población de células CD4 y CD28 en la superficie conjuntival puede ser responsable, al menos en parte, de la mejoría clínica después del tratamiento con ciclosporina ¹³⁹. La ciclosporina al 1% ha demostrado que controla los síntomas de la QCV, aunque son necesarios más ensayos de control para encontrar la concentración óptima de ciclosporina necesario para el tratamiento de la QCV

La ciclosporina tópica ayuda en la curación de las úlceras en escudo de la QCV pero pueden aparecer recurrencias a concentraciones bajas, que pueden ser tratadas aumentando la concentración ¹⁴¹. Los corticoesteroides tópicos y las lágrimas artificiales actúan de forma sinérgica con los colirios de ciclosporina 0,05% y ayudan en la reepitelización de las úlceras en escudo resistentes al tratamiento con corticoesteroides ¹⁴².

Actualmente la ciclosporina tópica está disponible comercialmente en USA, pero sólo como emulsión, a la concentración de 0,05% (Restasis). Serían necesarias formulaciones a concentración mayor para uso hospitalario. En Europa se ha completado un ensayo clínico fase III para una nueva preparación de ciclosporina, Vekacia, que estaría indicada para la conjuntivitis vernal.

i). Antimetabolitos.

La mitomicina-C es un inhibidor de la proliferación de fibroblastos. Su utilización en gotas a una concentración de 0,01%, puede disminuir la secreción mucosa, la hiperemia conjuntival y el edema limbal en los pacientes refractarios al tratamiento con esteroides tópicos y estabilizadores de mastocitos ¹⁴³, ¹⁴⁴.

1.9.3. FUTURO DE LA TERAPIA FARMACOLÓGICA EN QCV.

A pesar del desarrollo de nuevas drogas en la última década, la situación actual de los pacientes con QCV grave sigue siendo de dependencia de los esteroides tópicos, con todos los riesgos asociados, lo que hace necesario disponer de medidas terapéuticas más selectivas para un mejor y duradero control de la QCV ¹⁴⁵, ¹⁴⁶.

La inhibición del receptor CC-3 quemoquina, puede ser un tratamiento eficaz de la ulceración corneal ¹⁴⁷. Hasta el momento actual, los resultados con ciclosporina tópica son muy alentadores, pero debido a la falta de disponibilidad comercial en concentraciones más altas, su uso en QCV es limitada. También pueden ser relevantes futuros desarrollos en la manipulación de productos de los eosinófilos, citoquinas y moléculas de adhesión.

Montelukast es un antagonista de los receptores de leucotrienos. En las lágrimas de pacientes con QCV se detectan niveles altos de leucotrienos y se ha observado mejoría en los signos y síntomas tras su administración oral. Esto hace pensar que los antileucotrienos tienen un potencial terapéutico aunque son necesarios más ensayos ^{148, 149}.

Tacrolimus (FK-506) es un inmunosupresor que ofrece resultados esperanzadores en el tratamiento de casos de QCV en los que han fallado los tratamientos convencionales ¹⁵⁰.

Anti-flammin es una macrobiomolécula capaz de inhibir la fosfolipasa A2. Se ha demostrado que determinadas macrobiomoléculas son capaces de inhibir reacciones alérgicas. Antiflammin tópico ha sido utilizado para inhibir las respuestas alérgicas en los modelos murinos de conjuntivitis. Oligonucleótidos immunoestimuladores (ISS) o CpG motifs, son otras macrobiomoléculas que inhiben la respuesta Th2 en la conjuntivitis alérgica murina ¹⁵¹.

Los probióticos mejoran la reacción inflamatoria de la alergia. Un informe ¹⁵² ha demostrado que el *Lactobacillus acidophilus* diluido en solución salina y administrada en forma de colirio mejora los signos y síntomas en pacientes con QCV.

1.9.4. NUEVOS SISTEMAS PARA LA ADMINISTRACIÓN OCULAR DE FÁRMACOS.

Están descritos sistemas de liberación de fármacos basados en partículas que facilitarían la adaptación adecuada de la posología y un efecto más localizado en la zona a tratar que los sistemas clásicos de administración tópica.

Entre ellos destacan los nanotransportadores (nanocarriers) de quitosán. Quitosán presenta una gran afinidad por el epitelio conjuntival y prolonga la vida media de los fármacos conjugados con estas nanopartículas. Se han encontrado niveles elevados de fluorescencia tras la administración tópica de nanopartículas de quitosán conjugadas con fluoresceína en el epitelio conjuntival y en el estroma de conejos ¹⁵³ y recientemente también se ha demostrado su buena tolerancia sin producir efectos adversos en conejos ¹⁵⁴.

Otro sistema en estudio está basado en la utilización de oligonucleótidos TGF- β 2 en microesferas de ácido polilacto-co-glicólico. Estas microesferas se detectaron 6 días después de su inyección subconjuntival ¹⁵⁵, por lo que podrían tenerse en cuenta para permitir la administración tópica y disminuir el número de aplicaciones.

1.9.5. INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA (ITE O CRIT)

La inmunoterapia con alérgenos específicos consiste en la administración de dosis crecientes de extractos purificados de alérgenos específicos por distintas vías y en cantidades crecientes a pacientes alérgicos con el objeto de inducir un estado de no respuesta alérgica. La forma más habitual de administrar inmunoterapia es por vía subcutánea.

El papel de la inmunoterapia específica (ITE) como tratamiento para la CA no está suficientemente establecido, aunque el 50% de los ensayos publicados en los últimos años está dirigido a la evaluación de este tratamiento. Se le considera como el único tratamiento específico frente al agente causal, en pacientes alérgicos que tienen además afectación a nivel nasal y bronquial ¹⁵⁶, incluso ventajoso desde un punto de vista fármaco-económico ¹⁵⁷. Al analizar los datos clínicos de pacientes con rinoconjuntivitis que han recibido este tratamiento, parece que sí es eficaz para mejorar los síntomas oculares ¹⁵⁸.

La utilización del tratamiento mediante ITE se basa en que el fenotipo de las células T cambia de un fenotipo Th2, con la producción de citoquinas e interleuquinas (IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 y IL-32) hacia una respuesta Th1, en la que se incrementa la síntesis de IFN- γ y de IL-12. También se ha pensado que induce un incremento en la tolerancia de las células T hacia los antígenos por reducción de la proliferación de células T específicas contra estos antígenos ¹⁵⁹ y esto se debería al el incremento de células Treg específicas que producen IL-10 y TGF- β y que parecen presentar una actividad reguladora o inmunosupresora ¹⁶⁰.

La ITE con preparados alérgicos, ha demostrado ser eficaz en el alivio de los síntomas de la alergia de forma similar (o aún más efectiva) a la de los tratamientos farmacológicos para el asma ¹⁶¹, la rinitis alérgica ¹⁶² y la conjuntivitis alérgica ¹⁶³. A diferencia de los tratamientos sintomáticos los beneficios del tratamiento continúan varios años después de dejar el tratamiento. En estudios recientes se ha demostrado que la inmunoterapia específica con alérgenos tiene un papel importante en el tratamiento de la alergia a los alimentos a fin de reducir el riesgo de anafilaxis fatales. La inmunoterapia es actualmente el único tratamiento médico que podría potencialmente revertir la tendencia al aumento de la enfermedad alérgica.

Sin embargo, los diseños de la mayoría de estos trabajos no permiten establecer el grado de respuesta a nivel ocular de forma independiente de la clínica nasal ¹⁶⁴, aunque en los estudios en los que se describen los cambios en la respuesta ocular de forma independiente, se ha observado que la mejoría de los síntomas se mantiene incluso años después de haber completado la administración de la ITE, tanto en ITE subcutánea ^{165, 166} como con ITE sublingual ¹⁶⁷, independientemente de la pauta de administración utilizada ¹⁵⁷.

En las últimas directrices internacionales y declaraciones de posición académica, se ha abogado por utilizarlo en aquellos pacientes con enfermedad más leve con el fin de prevenir cambios estructurales irreversibles crónicos de las vías respiratorias. La inmunoterapia específica con alérgenos se debe considerar como estrategia de tratamiento de suma importancia en los pacientes con inicio temprano y/o enfermedad leve, con el fin de maximizar el potencial de modificar la enfermedad ^{168 169}.

Los avances tecnológicos en la calidad y la formulación de los nuevos extractos utilizados, menos agresivos para el paciente, y una comprensión más profunda de los mecanismos de las enfermedades alérgicas ha llevado a la expectativa de un gran avance en el tratamiento de alergia, en el que la inmunoterapia específica con alérgenos debe desempeñar un papel crucial. Cuando se utiliza correctamente, siguiendo un cuidadoso protocolo diagnóstico, con extractos de buena calidad, bien caracterizados y clínicamente bien documentados, se puede cambiar la vida de las personas con enfermedades alérgicas.

Los alérgenos más comunes utilizados en la práctica clínica son aeroalérgenos para alergia estacional y perenne y más recientemente han sido evaluados en ensayos clínicos con resultados prometedores, por confirmar, para pacientes alérgicos al látex y alérgenos alimentarios ¹⁷⁰.

Estos tratamientos no solo reducen los síntomas, sino que también dan firmes esperanzas de que la alergia subyacente pueda ser curada y/o detenida en su progresión, especialmente en niños en los que la perspectiva de una alergia que sigue a otra (la "marcha alérgica") está siempre presente.

Actualmente la inmunoterapia específica con alérgenos es el único tratamiento que ofrece la posibilidad de reducir la carga de la enfermedad alérgica y alterar el curso natural de la enfermedad a largo plazo y de ese modo reducir de forma considerable los costos asociados con el tratamiento. Hay evidencia de que los niños que reciben inmunoterapia específica con alérgenos para la rinitis alérgica desarrollan menos asma al cabo de 10 años, en comparación con los niños que no la reciben (control) ¹⁷¹, lo que apoya la idea de que la inmunoterapia con alérgenos previene de la evolución hacia formas más graves.

Un meta-análisis de 42 ensayos clínicos, publicado en 2011 por Calderon et al. ¹⁶³ concluyó que la ITE sublingual es moderadamente más eficaz que el placebo para reducir los síntomas oculares totales e individuales en pacientes con RC o CA. Sin embargo, se necesitan más estudios que establezcan la eficacia a largo plazo tras suspender este tratamiento y el coste-efectividad de la ITE sublingual.

La inmunoterapia específica ha pasado del dogma y la experiencia a la medicina basada en la evidencia y de los hechos ¹⁷². Cabe la posibilidad de que investigaciones adicionales puedan conducir a la vacunación preventiva para la alergia, como ya está bien establecido en relación con muchas enfermedades infecciosas.

1.9.6. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO.

Se recomienda la extirpación quirúrgica de las papilas cuando causan lesiones corneales. La escisión o criocoagulación de las papilas grandes ayuda en la resolución temprana de la epiteliopatía corneal o de la úlcera, aunque las papilas vuelven a crecer en la mayoría de los pacientes. La crioterapia de las papilas promueve la inflamación y puede provocar la cicatrización fibrosa de la conjuntiva formando pseudopenfigoides.

La aplicación intraoperatoria de mitomicina-C al 0,02% (MMC) durante 2 minutos después de la resección de las papilas reduce las posibilidades de recurrencia de forma significativa. No se aprecian complicaciones relacionadas con el uso de MMC durante un período de seguimiento de entre 12 y 18 meses ¹⁷³. Las papilas gigantes puede ser eliminadas mediante láser de CO₂ y el procedimiento se puede repetir si las papilas recurren ¹⁷⁴.

Las úlceras en escudo pueden responder favorablemente al uso de lentes de contacto terapéuticas. Cuando no responden a los tratamientos conservadores o aparecen depósitos inflamatorios en la base de la úlcera puede ser necesaria la limpieza quirúrgica, aunque en casos graves puede ser necesario realizar una tarsorrafia.

El desbridamiento de la base de la úlcera, y la eliminación quirúrgica de la base de la placa o el uso del láser excimer para realizar una queratectomía ayuda en la rápida reepitelización de las úlceras refractarias al tratamiento médico ^{175,176}.

El implante de membrana amniótica ayuda a completar la reepitelización de los defectos epiteliales persistentes y de las placas vernaes recalcitrantes junto con el tratamiento médico convencional ^{177, 178}.

El injerto autólogo libre de conjuntiva después de la resección de las papilas gigantes favorece la reepitelización de la úlcera en escudo ¹⁷⁹.

Cultivos de células corneales epiteliales pueden trasplantarse para tratar las alteraciones más graves de la superficie ocular. Los trasplantes de células epiteliales corneales pueden ser beneficiosos cuando el trasplante de membrana amniótica no es suficiente para restablecer la superficie ocular. La visión mejora significativamente después del trasplante. También el trasplante de células madre limbares puede ayudar a la reepitelización de las úlceras. ¹⁸⁰.

Las queratoplastia total o parcial pueden ser la única solución para aquellos pacientes en los que su visión se encuentra profundamente afectada por cicatrices corneales residuales que afectan de forma grave su agudeza visual o que pueden ser causa de ambliopía profunda en los pacientes más jóvenes.

1.10. CONJUNTIVITIS ALÉRGICA Y CALIDAD DE VIDA DE LOS PACIENTES

Los síntomas habituales de las CA como son el prurito ocular intenso, la fotofobia y la sensación de sequedad ocular, producen visión borrosa tanto de lejos como de cerca que dificulta la actividad habitual. Diferentes cuestionarios de calidad de vida específicos se han diseñado para valorar los problemas que generan la rinitis, entre los que destacan el RQLQ (Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire) ¹⁸¹ específico para rinoconjunctivitis (RC), con las formas abreviadas mini RQLQ ¹⁸² y ESRINT-25 ¹⁸³, validado recientemente para su aplicación en España, en el que se ha incluido una metodología específica para evaluar los síntomas oculares mediante diferentes preguntas, que reflejan la importancia de estos síntomas en los pacientes con RCA. A señalar también el EAPIQ (Eye Allergy Patient Impact Questionnaire), que se centra en preguntas de calidad de vida específico para CA, en el que se puede establecer la importancia de la RCA ¹⁸⁴, pero todavía no está validado para la población española.

Se ha realizado por oftalmólogos un estudio sobre 201 pacientes diagnosticados de CAE y en 200 controles, valorándose la forma en que la enfermedad afectaba a la calidad de vida mediante el RQLQ, el EQ-5D (Health Questionnaire), el VFQ-25 (Visual Functioning Questionnaire) y el HEDQ (Health Economic and Demographic questionnaire) ¹⁸⁵, que recogen aspectos relacionados con la salud desde una perspectiva económica y demográfica. En este estudio los autores llegaron a la conclusión de que la CAE afectaba de forma significativa al estado de salud general percibida, la calidad de vida de los pacientes y a algunos aspectos a la función visual ¹⁸⁶.

1.11. IMPACTO ECONÓMICO DE LA CA.

Siendo las CA las formas más benignas de la patología inmunológica ocular, la actividad diaria de los pacientes se ve afectada de forma severa ya que interfieren con la actividad laboral o académica y las relaciones sociales, causando importantes trastornos económicos que varían según los países ya que los modelos sanitarios difieren de unos a otros.

A pesar de que los costes directos e indirectos de la CA son importantes hay pocos estudios que midan el impacto económico de esta entidad, sin tener en cuenta la rinitis alérgica. El estudio publicado por Pitt et al.¹⁸⁵ ha sido el primero en relacionar el coste económico y la calidad de vida en un grupo de pacientes en la Sanidad Pública, evaluados por CAE durante la estación de polinización en 2002 en Oxfordshire, comparándolo con un grupo control. Este estudio estimó el coste anual por paciente entre 70 y 155 euros, con una reducción de la productividad de unas 2,3 horas por semana durante la época polínica. Un estudio similar se llevó a cabo en España en 2003¹⁸⁷. Este estudio se realizó en pacientes atendidos en centros privados, con un coste estimado de 348,50 euros/año por cada paciente con CAE.

En 2009, Navarro et al.¹⁸⁸ recogieron los datos del estudio multicéntrico ALERGOLÓGICA 2005, en el que la rinoconjuntivitis/conjuntivitis fue la causa de absentismo laboral en un 6% de los pacientes, con una duración media de 15,6 días. En una muestra de 337 estudiantes, el absentismo escolar medio fue de 8 días, y aproximadamente el 15% de los padres pidieron un permiso laboral de unos 4 días de duración en una muestra de 510 niños.

Respecto a la calidad de vida, en este estudio se realizó el cuestionario general SF-12 con una media general de 46,7 respecto al componente físico (PCS-12) y 44 para el componente mental (MCS-12).

La Inmunoterapia específica con alérgenos ha demostrado ser eficaz para reducir los síntomas del asma y de la rinitis alérgica mejorando la calidad de vida de los pacientes alérgicos. También permite disminuir la utilización de medicamentos para aliviar los síntomas de la alergia. La Inmunoterapia específica con alérgenos es capaz de aliviar los síntomas incluso después de cesar con el tratamiento. En pacientes con alergia al veneno de insectos o a alimentos, es capaz de prevenir las reacciones que ponen en riesgo la vida.

Se han evaluado diferentes vías para la administración de inmunoterapia, tales como la subcutánea, sublingual, oral, nasal, bronquial, e intra-linfática. Actualmente las dos primeras son las más utilizadas en la práctica clínica. Los alérgenos más comunes son aero-alérgenos para la alergia estacional y perennes y últimamente el látex y los alérgenos alimenticios se están evaluando en la clínica diaria con resultados prometedores ¹⁷⁰.

1.12. TÉCNICA DE MICROARRAYS EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO MOLECULAR DE LA ALERGIA.

A finales de 1980, cuando el primer alérgeno fue clonado ¹⁸⁹, se abrió una nueva era para la producción de alérgenos recombinantes purificados y su utilización en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas ¹⁹⁰. Hasta ese momento era posible determinar la fuente alérgica a la que un determinado paciente era sensible. Con la aplicación del diagnóstico molecular (Component Resolved Diagnosis (CRD)) o técnicas

de diagnóstico por componentes, se abre una nueva etapa en el concepto de diagnóstico e inmunopatológico de la alergia. Se hace posible definir el perfil de sensibilización de cada individuo, es decir, podemos establecer qué partes del alérgeno son reconocidos por cada paciente individualmente.

En los últimos años hemos visto la caracterización y la producción de los más relevantes alérgenos a nivel molecular, y la mayoría se han generado como proteínas recombinantes ¹⁹¹. El número de nuevos alérgenos recombinantes purificados ha aumentado de manera constante, y es casi imposible estudiar todas las familias de recombinantes relacionados en un mismo paciente.

Posteriormente, el esfuerzo se centró (y permanece centrado) en la confirmación de qué alérgenos recombinantes disponibles o alérgenos naturales, son reconocidos por la IgE del paciente, y desencadenan los síntomas. El objetivo es establecer que poseen un perfil de reconocimiento del epítipo IgE similar al de los alérgenos que han sido estudiados hasta la fecha. Además, se están realizando determinaciones para establecer qué panel de alérgenos es representativo de un determinado tipo de sensibilización ¹⁹².

1.12.1. PRINCIPIOS DE LA TÉCNICA.

Los microarrays o biochips se han desarrollado como una herramienta para el análisis de la expresión de genes en los genomas. Desde su introducción a principios de 1990, la tecnología de microarrays de ADN se ha aplicado para la determinación de ácido nucleico, y esto a su vez fue seguido del análisis de la expresión de ARN. Se necesitaba este paso, entre otras razones, porque la exploración de la expresión génica necesita herramientas cada vez más eficaces para el estudio de la expresión de proteínas a nivel

intracelular. La técnica de microarrays para proteínas se desarrolló así, adoptando la misma tecnología de microarray utilizada inicialmente en el ADN.



Figura 16: *Preparación de microarrays.*

La técnica de microarrays (Figura 16) es un inmunoensayo múltiple en el que las proteínas (alérgenos naturales o recombinantes purificados) se inmovilizan en una fase sólida, y cantidades muy pequeñas de suero se incuban con estas proteínas en condiciones estandarizadas. Los anticuerpos presentes en el suero son captados por los diferentes alérgenos, y después de un lavado para eliminar las sustancias que no se han unido, se detectan los anticuerpos por medio de un anticuerpo antiisótopo marcado con fluoresceína o por medio de una enzima que se detecta mediante láser o quimioluminiscencia.

Hasta la fecha, la IgE específica se ha determinado con un alérgeno individual por un alérgeno base. Con la técnica de microarrays, en un mismo suero o lágrima de muestra

se pueden determinar múltiples componentes alérgicos y también podemos determinar en la misma muestra de suero y de forma simultánea, no sólo IgE, sino también IgG, IgM e IgA dirigidas a los mismos alérgenos.

Como en el caso de los microarrays de ADN, la técnica se realiza sobre superficies sólidas, como puede ser un portaobjetos de vidrio de alta calidad, del mismo tipo de los utilizados en la microscopía de luz. Para la inmovilización de la proteína en la placa, la superficie se puede modificar con nitrocelulosa o estructuras gelatinosas¹⁹³. Los diferentes tipos de proteínas (recombinantes, anticuerpos, péptidos o heptámeros) se depositan en espacios micrométricos utilizando la robótica (en la actualidad esto permite depositar más de 30.000), seguido por la reacción con el ligando.

Esta reacción de unión es detectada por anticuerpos marcados con fluorescencia o mediante técnicas de tinción o técnicas combinadas. La fluorescencia se detecta habitualmente por láser. Para calcular y analizar los resultados de una manera semicuantitativa, se necesita un software especial que compare la fluorescencia de los alérgenos de estudio con la curva de concentración de una IgE conocida, lo que sirve para extrapolar el resultado de la prueba.

En general, todo el proceso no dura más de cinco horas y no plantea mayores dificultades técnicas. El número de pacientes depende del número de placas procesadas al mismo tiempo. En el caso de IgE específicas, cada portaobjeto se puede utilizar para estudiar hasta cuatro pacientes (Figura 17).

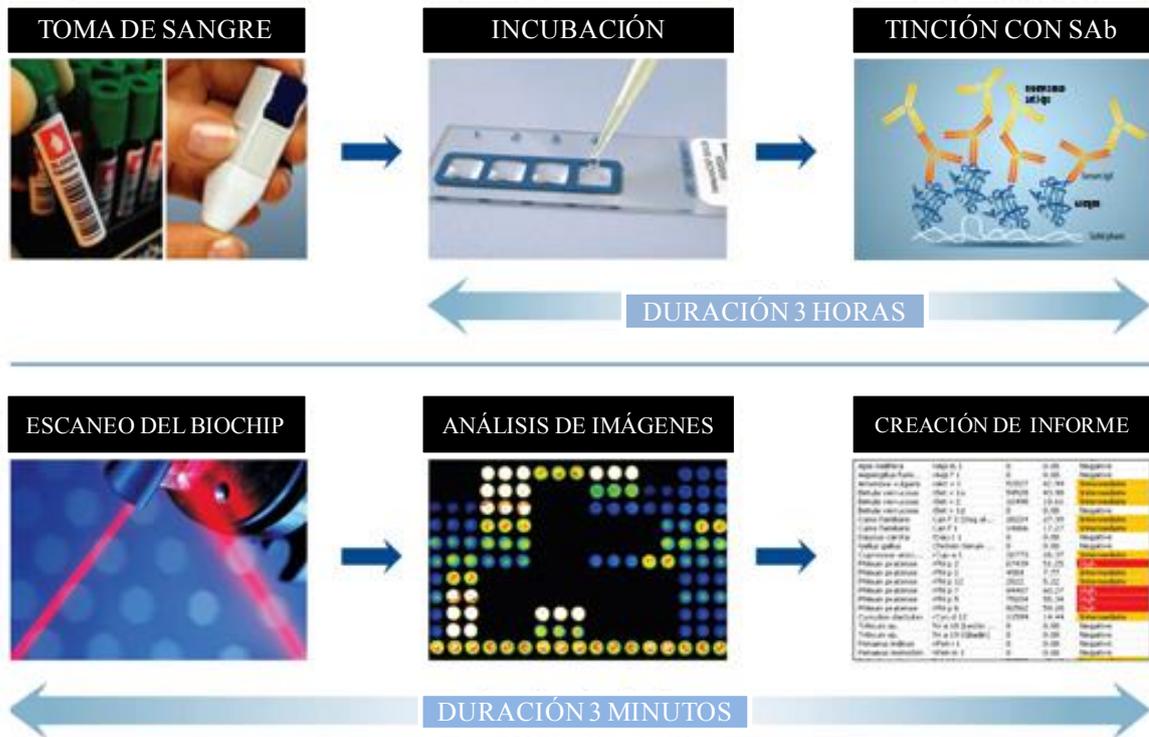


Figura 17: Fases de la técnica de microarrays

El concepto de una “protein ligand reaction” se publicó por primera vez en 1990¹⁹⁴. Estas reacciones no se pudieron hacer antes por la dificultad de fijar proteínas en un espacio tan pequeño debido a su tamaño, su carga y su estructura tridimensional. No fue hasta 10 años más tarde cuando el uso de microarrays con alérgeno en portaobjetos convencionales fue publicado por vez primera utilizando un amplificador de señal¹⁹⁵. Posteriormente, Kim et al. realizaron la técnica utilizando nitrocelulosa como base del chip¹⁹⁶. Además, hay que señalar la dificultad que plantea la posible desnaturalización de las proteínas durante el proceso de fijación, y el hecho de que el reconocimiento por la IgE requiere la preservación de la estructura terciaria.

En resumen, la técnica constituye un enzimoimmunoensayo específico indirecto semicuantitativo IgE (EIA). La principal ventaja con respecto a otros métodos es que podemos realizar múltiples determinaciones de IgE específica dirigida a un panel de componentes alérgicos que puede ser ampliado. La técnica reconoce la IgE del paciente por medio de un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína. Como se ha comentado anteriormente, un panel de proteínas recombinantes o alérgenos naturales están inmovilizados en un chip con dimensiones que permiten su fácil manejo (el tamaño de un portaobjetos de vidrio). Con la técnica disponible actualmente, cada alérgeno se une al portaobjetos por triplicado, para asegurar la reproducibilidad de la prueba. La cantidad de suero requerida es de 50 µl, junto con el calibrador. Cada pocillo que contiene el alérgeno está rodeado de Teflón a fin de evitar el derramamiento de la muestra. El número de alérgenos que se pueden inmovilizar por promedio con esta técnica es prácticamente ilimitado.

1.12.2. CORRELACIÓN CON LA DETERMINACIÓN ESPECÍFICA DE IgE.

Algunos trabajos han estudiado la correlación de la técnica de microarrays y los diferentes métodos utilizados hasta la fecha. El primer estudio comparando la técnica de microarrays fue desarrollado por VBC-Genómics con el sistema Phadia CAP para la determinación de IgE específica para tres alérgenos de: gramíneas, abedul y ácaros del polvo, y mostraron una correlación de 0,9¹⁹⁷. Lebrun¹⁹⁸ publicó los resultados obtenidos con una técnica colorimétrica aplica a los alérgenos comunes, detectando niveles de IgE específico por debajo del punto de corte aceptado para la técnica convencional (0,35 Ku/l).

Recientemente, Wohrl et al.¹⁹⁹ publicaron sus resultados comparando microarrays con la versión técnica CRD-50 ISAC de VBC-Genómics y UniCAP Phadia. El diagnóstico

de recombinantes se mostró igual de sensible que la del diagnóstico de alérgenos completos con el UniCAP para pacientes alérgicos a las gramíneas, gatos y abedul. La sensibilidad para con los ácaros del polvo es menor, pero se mantuvo alta (de la misma manera la especificidad), y fue igualmente menor para la detección de los pacientes sensibles a Artemisia.

1.12.3. VENTAJAS DE LA TÉCNICA DE MICROARRAYS

La principal ventaja de la técnica es que permite analizar cientos de alérgenos al mismo tiempo, con un cantidad mínima de muestra (sólo 50 ml de suero), y con un único análisis. En el caso de VCB-genómics, se utilizan 103 alérgenos por chip. La técnica hace que sea posible mostrar el mayor número posible de epítomos reconocibles para IgE.

Otra ventaja de la técnica es que facilita el diagnóstico basado en componentes ¹⁹⁹. Este hecho ofrece una mayor seguridad para establecer qué alérgeno es reconocido por un paciente dado, lo que ayuda a explicar reacciones cruzadas, y resolver enigmas como el de los pacientes con positividad a múltiples pólenes a los que nunca ha estado expuestos (la explicación en estos casos sería la sensibilización a panalérgenos). Con los métodos tradicionales sería prácticamente imposible analizar el panel de alérgenos naturales y recombinantes que garanticen la presentación de un número significativo de epítomos. Por otro lado, las moléculas podrían no presentar la misma reacción inmune que la de los alérgenos naturales completos.

Ventajas de la técnica de microarrays

- Sencillez
- Volumen mínimo de muestra
- Flexibilidad
- Alto rendimiento
- Alta capacidad de producción
- Necesidad de sólo escasa alérgeno
- Escalabilidad
- Automatización

La técnica también permite analizar diferentes resultados de fluorescencia y en una misma prueba se pueden medir IgE e IgG específicas.

Una ventaja importante de esta técnica es que permite realizar el estudio en individuos en los que las pruebas cutáneas están contraindicadas, tales como pacientes con dermatitis atópica severa, dermografismo o niños, o casos en los que la intensidad de la reacción contraindicaría la realización de dichas pruebas cutáneas.

1.12.4. ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA LÁGRIMA EN LA QCV.

Varios métodos de análisis proteómicos han sido probados para obtener datos diferenciales de la amplia gama de proteínas detectadas en lágrimas y entre estos podemos resaltar el uso de la técnica de microarrays en pacientes con QCV. En estos pacientes se

puso de manifiesto en la lágrima un incremento en la concentración de IL-4, fosfolipasa A2, albúmina, lactoferrina, hemopexina y lipocalina. El aumento en la concentración de hemopexina en la lágrima de estos pacientes se asoció de forma significativa con la gravedad de la enfermedad ²⁰⁰, ²⁰¹. El incremento de la presencia en la lágrima de hemopexina podría atribuirse únicamente al incremento de la de la permeabilidad vascular pero sin embargo la hemopexina parece que actúa modulando la respuesta inflamatoria local y en la reparación de tejidos dañados mediante fibrosis y angiogénesis.

Mediadores, citocinas y quimiocinas se expresan y producen localmente no sólo por las células inflamatorias, sino también por las células epiteliales y del tejido conectivo de la superficie ocular y por lo tanto es imposible por el momento identificar directamente en los pacientes el origen y el estado de activación de muchos de estos mecanismos inflamatorios.

Las tecnologías basadas en microarrays los multiplex, y otras técnicas de proteómica pueden caracterizar la distribución de una amplia gama de proteínas bioactivas en la lágrima. Decenas de mediadores, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, moduladores angiogénicos, enzimas e inhibidores han sido identificados en pequeñas muestras de lágrima utilizando estas técnicas junto con las técnicas de ensayo tradicionales de ELISA o RIA. En varios estudios, estos análisis han permitido la identificación de proteínas no detectadas previamente que podrán participar en el sistema de defensa del huésped o en diferentes procesos inflamatorios. La capacidad de medir múltiples citoquinas en lágrimas, junto con el conocimiento obtenido a partir de análisis in vitro de los efectos individuales y combinados de estos factores en diversas células conjuntivales (mastocitos, células epiteliales, fibroblastos) facilitan una mayor comprensión de los

procesos específicos que contribuyen al mantenimiento de la inflamación y la progresión en el deterioro de la visión y facilitan el camino para hacia un nuevo objetivo terapéutico.

Aunque varios mediadores y factores se pueden detectar en las lágrimas como marcadores de inflamación ocular, ninguno puede ser considerado como un claro marcador de la alergia ocular. Hasta el momento, ninguna de las pruebas se ha estandarizado para alcanzar el uso clínico en pacientes, excluyendo la determinación total de de IgE en las lágrimas.

Una posibilidad sería diseñar un kit de ensayo para detectar un panel de marcadores, tales como IgE total, triptasa, eotaxina, ECP, IL-4, IL-5, MMP-9 que se han encontrado constantemente aumentadas en la alergia ocular y validarlo en los diferentes fenotipos alérgicos oculares lo que ayudaría a encontrar nuevas estrategias terapéuticas incluyendo el desarrollo de de terapias personalizadas contra las enfermedades alérgicas

202

Se está utilizando la técnica de microarray específicos múltiples (ImmunoCAP ISAC, Phadia, Milán, Italia) con muestras de lágrima de pacientes con QCV para la medida directa de IgE dirigida contra 103 componentes derivados de 47 alérgenos²⁰². Este método detecta la sensibilización a alérgenos a nivel de componentes y puede aportar información adicional importante por definir reacciones cruzadas y cosensibilización a una gran variedad de moléculas de alérgeno en pequeñas muestras de lágrima. La presencia de IgE específica sólo en lágrimas de pacientes con QCV refuerza el concepto de una posible sensibilización local.

Las muestras de lágrimas se pueden obtener fácilmente en la superficie ocular utilizando diferentes métodos y técnicas a la búsqueda de un mediador específico en la alergia ocular. Existen diferentes métodos para la recolección de las lágrimas: el método de tubo microcapilar, el papel de filtro y el de las esponjas oftálmicas. La obtención de lágrimas ha de ser de ambos ojos ya que en muchos casos de conjuntivitis alérgica hay un predominio unilateral.

Mediante la aspiración de lágrimas con tubos capilares de vidrio o pipetas podemos obtener volúmenes de 20 a 50 mL, pero la recolección es laboriosa, consume bastante tiempo y en muchas ocasiones es incómoda para los pacientes y los niños, pudiendo ocasionar lagrimeo reflejo al tocar la conjuntiva con el tubo. Las lágrimas también se pueden obtener mediante una tira de Schirmer pero hay un hiperlagrimeo reflejo por la irritación que producen.

Podemos utilizar esponjas oftálmicas pero tienen el inconveniente que para la extracción de las lágrimas de las esponjas debemos utilizar tampones que pueden modificar los resultados con lo que es difícil evaluar la viabilidad de los protocolos y comparar los resultados. Por otra parte, algunas citoquinas se unen fuertemente a las esponjas, y la difusión de las citoquinas de las esponjas durante el procedimiento de extracción puede ser difícil.

Como vemos el resultado final podría verse afectado por el método elegido para la recolección de lágrimas²⁰³. En nuestra experiencia, el tubo capilar es el mejor método para evitar el lagrimeo reflejo.

IgE en lágrimas

La inmunoglobulina IgE juega un papel fundamental en la patogénesis de la reacción alérgica de tipo I. La medida de los niveles de IgE en suero refleja una alteración atópica sistémica independientemente de una determinada la sensibilización. La medida de IgE específica a un alérgeno es un marcador de la sensibilización a un antígeno específico. La concentración en lágrima de IgE aumenta en los pacientes con CA, lo que sugiere que la medición de concentraciones de IgE lagrimal pueden ayudar a diagnosticar la alergia mediada por IgE en las conjuntivitis alérgicas ²⁰⁴. Esta inmunoglobulina sufre un incremento significativo en la QCV cuando se compara con sujetos normales ²⁰⁵

La detección de IgE específica de alérgeno en suero se realiza normalmente con un ensayo inmunoenzimático (ELISA), una prueba radioalergosorbente CAP como métodos estándar. En las lágrimas no hay niveles detectables de IgE específica en sujetos que no sean alérgicos.

Se está utilizando la técnica de microarray específicos múltiples (ImmunoCAP ISAC, Phadia, Milán, Italia) con muestras de lágrima de pacientes con QCV para la medida directa de IgE dirigida contra 103 componentes derivado de 47 alérgenos ²⁰². Este método detecta la sensibilización a alérgenos a nivel de componentes y puede aportar información adicional importante por definir reacciones cruzadas y cosensibilización a una gran variedad de moléculas de alérgeno en pequeñas muestras de lágrima. La presencia de IgE específica sólo en lágrimas de pacientes con QCV refuerza el concepto de una posible sensibilización local.

Las pruebas in vitro basadas en componentes alergénicos permitirán caracterizar con gran detalle los perfiles de sensibilización de los pacientes. La cuantificación de los anticuerpos IgE tanto frente a componentes alergénicos específicos como a componentes de reactividad cruzada, contribuirán a identificar la fuente alergénica sensibilizante.

Proponemos utilizar la técnica ImmunoCAP.ISAC® Immuno Solid-Phase Allergen Chip, tanto en el estudio en suero como en lágrima de los pacientes. Pensamos que los resultados de ImmunoCAP. ISAC® darán un valor de extrema utilidad para una mejor y más específica definición del patrón de sensibilización del paciente y será una herramienta que nos ayudará a instaurar una más adecuada y eficaz inmunoterapia específica si no podemos evitar el alérgeno implicado.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

La QCV es una forma crónica grave de alergia ocular bilateral que afecta principalmente a niños en la primera década de la vida con exacerbaciones estacionales en primavera y otoño, con persistente activación de los mastocitos, eosinófilos y linfocitos y asociada con importantes alteraciones conjuntivales, fibrosis tisular y posibilidad de opacificación corneal ⁴. La exacerbación de la alergia y los episodios agudos están provocados por la exposición alérgica, y con más frecuencia por estímulos no específicos como pueden ser el viento, la luz y el polvo ³⁷. Afecta de forma significativa a la calidad de vida de los pacientes y puede afectar gravemente a la visión. La QCV está mediada por IgE y Th2, pero sin embargo sólo un 50% de los pacientes presentan una clara sensibilización ³.

Su etiología y fisiopatología se desconocen aunque se sospecha que dado su carácter estacional puedan estar involucrados mecanismos inmunoalérgicos por la presencia en lágrimas de eosinofilia, incremento de IgE e histamina, así como un elevado número de eosinófilos, basófilos y mastocitos en las biopsias conjuntivales ⁶¹. Los antecedentes personales y familiares de atopia son comunes en estos pacientes.

En el momento actual las pruebas diagnósticas de rutina alérgicas (prick, IgE específica) no resuelven el diagnóstico etiológico ni terapéutico y las técnicas de provocación con alérgenos pueden estar contraindicadas si existe afectación visual.

La hipótesis que planteamos, en la realización del presente trabajo, es que pensamos que la respuesta de hipersensibilidad pueda ser local, y por esta razón no se evidencia al hacer los prick test en la piel de brazo que se encuentra distante del órgano

diana. Es posible también que las lágrimas contenga IgE específica a alérgenos en el momento de máxima actividad, pero en cantidades no medibles con los autoanalizadores de IgE en suero.

Debido a que las técnicas alergológicas de rutina (pruebas de punción o prick tests) y la inmunodetección de IgE tienen un pobre valor predictivo para alérgenos en la QCV pensamos que es necesario intentar nuevos métodos de detección de alérgenos, basados en técnicas de diagnóstico molecular. Los alérgenos recombinantes y purificados han mejorado el diagnóstico de otras patologías alergológicas complejas²⁰⁶.

La disponibilidad de un ensayo de multiplexado capaz de identificar inmunoglobulinas específicas para 112 epítomos alergénicos (nativos y recombinantes) diferentes resulta muy interesante sobretodo en pacientes polisensibilizados en los que el diagnóstico etiológico preciso es complejo debido a la presencia de alérgenos verdaderos y componentes de reacciones cruzadas. Al mismo tiempo será una herramienta que nos ayudará a instaurar un tratamiento mediante Inmunoterapia específica y eficaz si la evitación del alérgeno implicado no es posible.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS.

Dado que en el momento actual las pruebas diagnósticas de rutina alergológicas (prick, IgE específica) no resuelven el diagnóstico etiológico de la QCV, y tampoco existe un tratamiento específico para este tipo de conjuntivitis alérgica, nos hemos propuesto los siguientes objetivos en nuestro estudio:

1). Valorar la utilidad diagnóstica y terapéutica del análisis molecular (CRD) en la queratoconjuntivitis vernal utilizando la técnica de ImmunoCAP ISAC Immuno Solid-Phase Allergen Chip en lágrimas y suero de pacientes afectados por QCV ya que solamente son necesarios 30 microlitros de lágrima o suero por análisis.

2). Caracterizar con precisión los perfiles de sensibilización de estos pacientes, mediante las pruebas *in vitro* basadas en componentes alérgicos.

3). Cuantificar los anticuerpos IgE frente a componentes, tanto a alérgenos específicos como a componentes de reactividad cruzada, contribuyendo a identificar la fuente alérgica sensibilizante.

4). Una vez definido el patrón de respuesta en cada paciente, instaurar inmunoterapia específica con los alérgenos detectados y valorar su eficacia terapéutica después de un año de tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y METODOS.

Para la consecución de estos objetivos, se procedió a realizar una búsqueda eficiente de la bibliografía publicada hasta la fecha mediante filtros metodológicos (Clinical queries, SUM Search, Grade, Cochrane Library) y se aplicaron los criterios de la normativa CONSORT de febrero 2009 y de CALIDAD 2013 del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, intentando ofrecer un servicio de máxima confortabilidad a los pacientes que consientan su inclusión en el estudio (Declaración de Helsinki y UNESCO) y teniendo en cuenta la complejidad de la interacción humano-técnológica, primando siempre al factor humano.

El diseño del estudio será exploratorio, de carácter transversal con casos y controles. La selección de la muestra se realizará a razón de un caso por cada dos controles. Los pacientes diagnosticados de QCV procedieron de una base de datos de pacientes con esta etiología, recogidos durante años en el Servicio de Alergología y de Oftalmología del Hospital Universitario Río Hortega y a los que se añadirán los nuevos casos que aparezcan durante el tiempo en que se realice este proyecto.

Se estudiarán también de la misma manera pacientes con conjuntivitis alérgica polínica perenne y para ello se parte de un registro de 23.873 pacientes atendidos en los últimos 22 años en la consulta de Alergia del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, de los que seleccionamos de forma aleatoria simple 50 pacientes polínicos con residencia habitual en Valladolid o provincia, de ambos sexos, que desde su nacimiento hayan vivido en la misma casa y ambientes y que cumplan criterios similares de severidad clínica de su conjuntivitis.

4.1. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES.

Los pacientes han sido reclutados entre enero y diciembre de 2012 y el período de estudio se ha realizado entre enero del 2013 y julio del 2014.

- 1) Pacientes con QCV (25 pacientes).
- 2) Pacientes alérgicos a pólenes de gramíneas con conjuntivitis estacional (50 pacientes).
- 3) Controles de población sana procedente de Hemodonación (50 pacientes)

Por cada paciente con QCV, se incluyeron 2 pacientes con CA a pólén de gramíneas de gravedad comparable, seleccionados de la base de datos del Servicio de Alergología del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid. Todos los pacientes se estudiaron simultáneamente utilizando los mismos test diagnósticos y en el mismo período de tiempo.

La sensibilización a pólenes se definió por la presencia de:

- a) Una o más pruebas cutáneas positivas a polen.
- b) Un CAP (IgE) positivo $> 0,35$ IU/mL a estos alérgenos.
- c) Prueba de provocación específica positiva.

La conjuntivitis causada por pólenes de gramíneas fue definida por prick test, IgE específica y criterios clínicos alergológicos y oftalmológicos.

Excluimos pacientes no nacidos en nuestra área o residentes en otras zonas distantes. Consideramos las posibles variables sociales, ambientales, genéticas y biológicas que pudieran actuar como agentes de confusión. Intentamos aumentar la validez

disminuyendo los sesgos. Todos los pacientes fueron estudiados simultáneamente utilizando las mismas pruebas diagnósticas y en el mismo período de tiempo (primavera-verano 2014).

Se admite que todos ellos han sido expuestos a similares concentraciones de pólenes y polución y otros factores ambientales, gracias a los análisis de niveles de calidad ambiental enviados cada semana desde la Dirección de Salud Pública de la Consejería de Sanidad. También se realizaron encuestas nutricionales para descartar a los pacientes con dietas fuera de la dieta mediterránea.

Una vez que nuestros pacientes acepten participar en el estudio (consentimiento informado) se les realizará encuesta clínico-epidemiológica que incluya las características y origen de su hipersensibilidad, la posible aparición de reacciones adversas (se preguntará a sus allegados próximos), potencial implicación de órganos y sistemas y tratamiento requerido. En los pacientes diagnosticados de QCV se realiza un estudio oftalmológico que incluye:

- Estudio de agudeza visual monocular y binocular.
- Estudio de la motilidad ocular y reflejos pupilares.
- Examen externo de piel periocular y de párpados.
- Examen con Lámpara de Hendidura de borde palpebral, conjuntiva bulbar, tarsal y fondos de saco conjuntivales, córnea, cámara anterior y cristalino.
- Presión intraocular con Tonómetro de Goldmann.
- Examen de fondo de ojo mediante oftalmoscopio.

El grupo control (concurrente, su evaluación coincidió con el grupo de pacientes problema) estuvo constituido por 50 personas sanas, no fumadores ni expuestos a tabaco, seleccionados de forma aleatoria por la Unidad de Hemodonación del SACYL. Además en el grupo control ninguno de ellos tendrá antecedentes de procesos alérgicos.

4.2. PRUEBAS “*IN VIVO*”.

Pruebas cutáneas:

Se realizaron con técnica convencional de prick para el caso de alérgenos comercializados y con proteínas purificadas de trigo, ambas nativas y recombinantes. Para la realización de las pruebas de prick se procedió de acuerdo con las normas de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI). Así, tras depositar una gota de cada alérgeno a testar en la zona volar del antebrazo, se realizó una mínima punción con una lanceta, a través de la gota, que no debe alcanzar la dermis (Figura 18).



Figura18: *Pruebas cutáneas*

El exceso de extracto se retiró a continuación y tras un tiempo de espera de 15 minutos, se procede a la lectura del resultado, considerando positiva aquella prueba que produzca un habón cuyo diámetro mayor sea igual o superior a 3 mm. Cada alérgeno se

probó por duplicado y los resultados se registraron en una hoja de recogida de datos para su posterior digitalización.

Extractos alergénicos: Utilizaremos una batería estándar de aeroalérgenos y alimentos que incluye pólenes (gramíneas, árboles, maleza y flores), ácaros (dermatophagoides y de almacenamiento), hongos, antígenos de animales y alimentos comunes: trigo, cebada, centeno, huevo, leche, legumbres, frutos secos, pescados, mariscos, anisakis, profilinas (ALK -Abelló, Madrid, España).

4.3. PRUEBAS "*IN VITRO*".

Técnicas de arrays y proteómica:

Se realizaron en dos muestras biológicas: lágrima y suero

Lágrimas

Las muestras de lágrima se pueden obtener fácilmente a partir de la superficie ocular utilizando diferentes métodos y técnicas:

- Método de tubo microcapilar.
- Papel de filtro.
- Esponjas oftálmicas.

Tubo microcapilar: se debe recoger la lágrima de ambos ojos ya que en muchos casos de conjuntivitis alérgica hay una asimetría en la afectación con predominio de un ojo sobre el otro. Con la aspiración de las lágrimas por tubos capilares de vidrio o pipetas podemos obtener volúmenes de 20 a 50 mL, pero la recolección es difícil, incómoda para

el paciente y consume mucho tiempo. En niños es imposible en muchos casos, y al tocar la conjuntiva con el tubo se produce un lagrimeo reflejo (Figura19).

Papel de filtro: las lágrimas se pueden recuperar de una tira de Schirmer pero su contacto con la conjuntiva también producen un exceso de lagrimeo por la irritación que produce la misma tira de papel.



Figura 19: *Recogida de lágrima con tubo capilar*

Esponja oftálmica: una vez recogida la lágrima debemos recuperarla de la esponja mediante tampones lo que hace que los protocolos de evaluación sean poco fiables y los resultados poco comparables. Por otra parte, algunas citoquinas se unen fuertemente a las esponjas, y su extracción durante el procedimiento de recuperación es difícil.

Con todos estos métodos, la hiperproducción de lágrimas es lo habitual diluyendo los factores que queremos evaluar, con lo que el resultado final podría verse afectado por el método elegido para la recolección y la consistencia del protocolo de extracción ²⁰³. En nuestra experiencia, el mejor método para evitar el lagrimeo reflejo es el tubo capilar.

Las muestras se deben almacenar a -70° hasta su utilización en arrays.

Suero.

Medimos la respuesta a 112 proteínas de diferentes orígenes mediante la técnica de microarray ISAC Thermofisher Scientific®, Upsala, Suecia, siguiendo las instrucciones del fabricante y valoramos la respuesta debida a reactividad cruzada con otros alérgenos vegetales (profilinas, CCDs, polcalcinas, etc..).

Se elige el polen *Lolium perenne* como parámetro mensurable en los resultados de las pruebas anteriores, por ser este polen de gramínea el de más importancia alergológica en nuestra región.

El tratamiento con inmunoterapia se realizó entre enero de 2013 y julio de 2014.

4.4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO DIRIGIDO POR ARRAYS.

En aquellos pacientes en los que CRD mostró hipersensibilidad a alérgenos para los cuales existe un tratamiento eficaz se instauró inmunoterapia específica depot (ALK-Abelló, Dinamarca) durante un año y su eficacia se evaluó en la primavera-verano de 2014.

Cuando se identificó el alérgeno a los pacientes se les recomendó terapia de evitación del alérgeno responsable.

Los exámenes oculares de control se realizaron a los 6 meses de instaurada la IMTE. Se consideró que los pacientes tuvieron una evolución favorable si un año después de iniciado el tratamiento los signos clínicos y los síntomas mejoraban o desaparecían y el examen conjuntival era normal.

Se utilizó por parte de los pacientes un registro diario para evaluar la calidad de vida, el número y la gravedad de los síntomas, y la dosis de la medicación requerida al inicio del estudio y después de 6 y 12 meses. La eficacia se evaluó mediante la puntuación obtenida por la utilización del Average Rhinoconjunctivitis Total Symptom Score²⁰⁷.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para analizar las asociaciones entre las variables del estudio. Si el número de celdas con valores inferiores a 5 eran más del 20%, éstas se calcularon utilizando el test de Fisher o un test de coeficiente de probabilidad. Se utilizó la prueba *t* de Student para muestras independientes con el fin de comparar los valores promedios. Cuando el número de grupos a comparar era mayor, se utilizó la prueba de ANOVA. Si estas pruebas no eran adecuadas, utilizamos el test no paramétrico de Mann-Whitney (para dos grupos) o el test H de Kruskal Wallis (para más de dos grupos). Se realizó un análisis multivariante mediante un modelo de regresión logística multinomial ajustado. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS versión 15.0.

RESULTADOS

5. RESULTADOS.

Hemos incluido en nuestro estudio 25 pacientes con QCV, 50 con CAE y 50 pacientes sanos procedentes del Centro de Hemodonación regional de Castilla y León.

En la tabla 1 recogemos las variables clínicas y sociodemográficas de los pacientes incluidos en nuestro estudio.

La edad media de los pacientes estudiados fue de 28.50 años \pm 13,2 años, sin diferencias significativas en el promedio de edad de los tres grupos estudiados: $p < 0.083$.

Los varones predominaron entre los pacientes polínicos (27/23) y las mujeres en el grupo de QCV (14/11), sin diferencias significativas de género entre los 3 grupos estudiados $p > 0.07$.

TABLA 1.

Tabla 1: Variables clínicas y sociodemográficas

Pacientes	Sanos	Alérgicos al polen	QCV
Número	50	50	25
Edad	31.62 \pm 11.48	25.82 \pm 10.26	27.64 \pm 19.52
Sexo (mujeres)	15	23	14

TABLAS 2: (a, b y c).

Se indican sobre el total de pacientes (sanos, polínicos y vernaes) el porcentaje de los que son positivos a cada alérgeno testado tanto por arrays (**a**) como los estudiados con técnicas convencionales de prick (**b**) y de IgE (**c**).

Con el método de arrays el 44% (11) de los pacientes con QCV respondieron a **Lol p1**, alérgeno del grupo 1 de gramíneas predominante en nuestra área²⁰⁸. Respondieron a él el 75% de los polínicos. Esta positividad fue seguida en frecuencia por los pacientes con QCV por **cyn d 1** (alérgeno específico de la grama o cynodon dactylon) (36%), un 20% al grupo 5 **pol d5**, 12% de pacientes con QCV respondieron al grupo 4 **pol d 4**, y el 4% de pacientes con QCV a las profilinas de polen de árboles.

El 8% de pacientes con QCV respondieron al **der p1** y **der p2**, alérgenos mayores de ácaros y un 12% a ovomucoide de la clara de huevo. Un 8% respondieron a proteínas transportadoras de lípidos (LTPs) de avellana y melocotón.

Con el método de prick sólo dos pacientes (4.7%) con QCV presentaron pruebas en prick positivas a pólenes, y no se detectó por prick la hipersensibilidad a ácaros y a huevo que se detectaba con arrays.

Con el estudio de IgE se detectó IgE a lolium en el 13.8 % de pacientes con QCV. Se detectó IgE específica a ovoalbúmina en 2 pacientes. No detectamos por prick IgE+ a los alérgicos a ácaros ni a otros alimentos (melocotón, avellana).

Tabla 2a: Resultados con método de Microarrays

Microarrays	Resultado	Controles sanos	CAE	QCV	Valor de P
pol 1	Negativo	49 (63.64%)	14 (18.18%)	14 (18.18%)	<0.001
	Positivo	1 (2.08%)	36 (75%)	11 (22.92%)	
pol 2	Negativo	50 (56.18%)	16 (17.98%)	23 (25.84%)	<0.001
	Positivo	0 (0%)	34 (94.44%)	2 (5.56%)	
Pol 4	Negativo	50 (49.5%)	29 (28.71%)	22 (21.78%)	<0.001
	Positivo	0 (0%)	21 (87.5%)	3 (12.5%)	
pol 5	Negativo	50 (43.86%)	44 (38.6%)	20 (17.54%)	0.009
	Positivo	0 (0%)	6 (54.55%)	5 (45.45%)	
pol 6	Negativo	50 (46.3%)	36 (33.33%)	22 (20.37%)	<0.001
	Positivo	0 (0%)	14 (82.35%)	3 (17.65%)	
cynd 1	Negativo	50 (50.51%)	33 (33.33%)	16 (16.16%)	<0.001
	Positivo	0 (0%)	17 (65.38%)	9 (34.62%)	
dp 1	Negativo	50 (40.98%)	49 (40.16%)	23 (18.85%)	0.1
	Positivo	0 (0%)	1 (33.33%)	2 (66.67%)	
dp 2	Negativo	49 (40.5%)	49 (40.5%)	23 (19.01%)	0.31
	Positivo	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	
Alt 1	Negativo	50 (40.98%)	48 (39.34%)	24 (19.67%)	0.36
	Positivo	0 (0%)	2 (66.67%)	1 (33.33%)	
perro	Negativo	50 (40.32%)	50 (40.32%)	24 (19.35%)	0.13
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
gato	Negativo	50 (40.65%)	49 (39.84%)	24 (19.51%)	0.41
	Positivo	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	
Anis 1	Negativo	48 (40%)	47 (39.17%)	25 (20.83%)	0.46
	Positivo	2 (40%)	3 (60%)	0 (0%)	
pruo 3	Negativo	50 (40.98%)	49 (40.16%)	23 (18.85%)	1
	Positivo	0 (0%)	1 (33.33%)	2 (66.67%)	
cora 8	Negativo	50 (41.32%)	48 (39.67%)	23 (19.01%)	0.16
	Positivo	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	
Art 3	Negativo	50 (41.32%)	48 (39.67%)	23 (19.01%)	0.16
	Positivo	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	
PR_cacahue	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
kiwi	Negativo	49 (39.84%)	49 (39.84%)	25 (20.33%)	0.78
	Positivo	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	
nuez	Negativo	50 (41.32%)	47 (38.84%)	24 (19.83%)	0.23
	Positivo	0 (0%)	3 (75%)	1 (25%)	
huevo	Negativo	50 (40.98%)	50 (40.98%)	22 (18.03%)	0.002
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	
leche	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	

Tabla 2b: Resultados de las pruebas cutáneas (prick-test)

Test cutáneo	Resultados	Controles sanos	CAE	QCV	Valor-P
prickloliium	Negativo	48 (62.34%)	6 (7.79%)	23 (29.87%)	<0.001
	Positivo	2 (4.17%)	44 (91.67%)	2 (4.17%)	
prickcynodon	Negativo	49 (48.04%)	30 (29.41%)	23 (22.55%)	<0.001
	Positivo	1 (4.35%)	20 (86.96%)	2 (8.7%)	
prickolea	Negativo	50 (45.87%)	36 (33.03%)	23 (21.1%)	<0.001
	Positivo	0 (0%)	14 (87.5%)	2 (12.5%)	
pricplatano	Negativo	50 (44.64%)	38 (33.93%)	24 (21.43%)	<0.001
	Positivo	0 (0%)	12 (92.31%)	1 (7.69%)	
prickarizónica	Negativo	50 (41.32%)	46 (38.02%)	25 (20.66%)	0.045
	Positivo	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	
prickphleum	Negativo	50 (45.87%)	34 (31.19%)	25 (22.94%)	<0.001
	Positivo	0 (0%)	16 (100%)	0 (0%)	
prickartemisía	Negativo	50 (42.37%)	43 (36.44%)	25 (21.19%)	0.004
	Positivo	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	
prickchenopodium	Negativo	50 (43.48%)	41 (35.65%)	24 (20.87%)	0.003
	Positivo	0 (0%)	9 (90%)	1 (10%)	
prickperro	Negativo	49 (39.52%)	50 (40.32%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
prickgato	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
prickconejo	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
prickcaballo	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
prickdpteryony	Negativo	50 (40.65%)	49 (39.84%)	24 (19.51%)	0.41
	Positivo	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	
prickdfarinae	Negativo	49 (39.84%)	49 (39.84%)	25 (20.33%)	0.78
	Positivo	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	
pricklepidoglyph	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
prickalternaria	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	

Tabla 2b: (Continuación) Resultados de las pruebas cutáneas (**prick-test**)

Test cutáneo		Controles sanos	CAE	QCV	Valor de P
prickcladospo	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
prickaspergill	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
pricktrigo	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
prickcebada	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
prickrye	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
Prickclara huevo	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
prickyema	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
prickleche	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
prickpea	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
prickcacahuet	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
prickavellana	Negativo	50 (40.98%)	47 (38.52%)	25 (20.49%)	0.1
	Positivo	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	
prickcastaña	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
prickpiñon	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
pricklegume	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
prickmostaza	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
prickmelocoton	Negativo	50 (40.98%)	47 (38.52%)	25 (20.49%)	0.1
	Positivo	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	
prickpescado	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

Tabla 2b: (Continuación) Resultados de las pruebas cutáneas (**prick test**)

Test cutáneo	Resultado	Controles sanos	CAE	QCV	Valor de P
prickanisakis	Negativo	47 (39.17%)	48 (40%)	25 (20.83%)	0.46
	Positivo	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	
prickmariscos	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
pricklechuga	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
pricktomate	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
prickmelon	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
prickbanana	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
prickalmendra	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
prickmanzana	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
prickpollo	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
prickperejil	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
prickpistacho	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
prickcashew	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
pricklatex	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

Tabla 2c: Resultados con antígeno **IgE específica** después del test cutáneo +

IgE específica	Resultado	Controles sanos	CAE	QCV	Valor de P
IgElolium	Negativo	50 (100%)	25 (26.04%)	21 (21.88%)	<0.001
	Positivo	0 (0%)	25 (86.21%)	4 (13.79%)	
IgEcynodon	Negativo	50 (45.45%)	38 (34.55%)	22 (20%)	0.001
	Positivo	0 (0%)	12 (80%)	3 (20%)	
IgEolea	Negativo	50 (42.37%)	44 (37.29%)	24 (20.34%)	0.031
	Positivo	0 (0%)	6 (85.71%)	1 (14.29%)	
IgEplatano	Negativo	50 (42.37%)	44 (37.29%)	24 (20.34%)	0.031
	Positivo	0 (0%)	6 (85.71%)	1 (14.29%)	
IgEarizónica	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEphleum	Negativo	50 (43.1%)	41 (35.34%)	25 (21.55%)	0.001
	Positivo	0 (0%)	9 (100%)	0 (0%)	
IgEartemisia	Negativo	50 (41.32%)	46 (38.02%)	25 (20.66%)	0.045
	Positivo	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	
IgEchenopodium	Negativo	50 (41.67%)	46 (38.33%)	24 (20%)	0.12
	Positivo	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	
IgEperro	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEgato	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEconejo	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEcaballo	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEpteron	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEharina	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgElepidog	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEalternaria	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	

Tabla 2c: (IgE Continuación) Resultados con antígeno **IgE específica** después del test cutáneo +.

IgE específica	Resultado	Controles sanos	CAE	QCV	Valor de P
IgEcladosporium	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEasperg	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEtrigo	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEcebada	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEcenteno	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEclara huevo	Negativo	50 (40.65%)	50 (40.65%)	23 (18.7%)	0.017
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
IgEyema huevo	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEleche	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEpea	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEcacahuete	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEavellana	Negativo	50 (41.32%)	46 (38.02%)	25 (20.66%)	0.045
	Positivo	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	
IgEcastaña	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEpiñon	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
IgElegum	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEmostaza	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	

Tabla 2c: (IgE Continuación). Resultados con antígeno **IgE específica** después del test cutáneo +.

IgE específica	Resultado	Controles sanos	CAE	QCV	Valor de P
IgEmelocoton	Negativo	50 (42.37%)	43 (36.44%)	25 (21.19%)	0.004
	Positivo	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	
IgEpescado	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEanisakis	Negativo	48 (39.67%)	48 (39.67%)	25 (20.66%)	0.
	Positivo	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	
IgEmariscos	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgElettuce	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEtomate	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEmelon	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEbanana	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEalmendra	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
IgEmanzana	Negativo	50 (40.32%)	49 (39.52%)	25 (20.16%)	0.47
	Positivo	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
IgEpollo	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgEperejil	Negativo	50 (40.65%)	48 (39.02%)	25 (20.33%)	0.22
	Positivo	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
IgEpistacho	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IgElatex	Negativo	50 (40%)	50 (40%)	25 (20%)	
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

TABLA 3.

Porcentaje de pacientes positivos dentro de cada grupo medidos por arrays.

POSITIVOS POR GRUPOS		CONTROLES SANOS (%)	CAE (%)	QCV (%)
Género	Mujer	15 (30%)	23 (46%)	14 (56%)
	Varón	35 (70%)	27 (54%)	11 (44%)
Polen	Negativo	50 (100%)	0 (0%)	20 (80%)
	Positivo	0 (0%)	50 (100%)	5 (20%)
Anafilaxia	Negativo	50 (100%)	49 (98%)	25 (100%)
	Positivo	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)
Estado	Enfermo	0 (0%)	50 (100%)	25 (100%)
	Sano	50 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
pol 1	Negativo	49 (98%)	14 (28%)	14 (56%)
	Positivo	1 (2%)	36 (72%)	11 (44%)
pol 2	Negativo	50 (100%)	16 (32%)	23 (92%)
	Positivo	0 (0%)	34 (68%)	2 (8%)
pol 4	Negativo	50 (100%)	29 (58%)	22 (88%)
	Positivo	0 (0%)	21 (42%)	3 (12%)
pol 5	Negativo	50 (100%)	44 (88%)	20 (80%)
	Positivo	0 (0%)	6 (12%)	5 (20%)
pol 6	Negativo	50 (100%)	36 (72%)	22 (88%)
	Positivo	0 (0%)	14 (28%)	3 (12%)
cynd 1	Negativo	50 (100%)	33 (66%)	16 (64%)
	Positivo	0 (0%)	17 (34%)	9 (36%)
dp 1	Negativo	50 (100%)	49 (98%)	23 (92%)
	Positivo	0 (0%)	1 (2%)	2 (8%)
dp 2	Negativo	49 (98%)	49 (98%)	23 (92%)
	Positivo	1 (2%)	1 (2%)	2 (8%)
Alt 1	Negativo	50 (100%)	48 (96%)	24 (96%)
	Positivo	0 (0%)	2 (4%)	1 (4%)
Apim 1	Negativo	50 (100%)	50 (100%)	25 (100%)
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Fav 5	Negativo	50 (100%)	50 (100%)	25 (100%)
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabla: 3 (Continuación) Positivos por grupos.

POSITIVOS POR GRUPOS		CONTROLES SANOS (%)	CAE (%)	QCV (%)
perro	Negativo	50 (100%)	50 (100%)	24 (96%)
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)
gato	Negativo	50 (100%)	49 (98%)	24 (96%)
	Positivo	0 (0%)	1 (2%)	1 (4%)
Anis 1	Negativo	48 (96%)	47 (94%)	25 (100%)
	Positivo	2 (4%)	3 (6%)	0 (0%)
pruo 3	Negativo	50 (100%)	49 (98%)	23 (92%)
	Positivo	0 (0%)	1 (2%)	2 (8%)
cora 8	Negativo	50 (100%)	48 (96%)	23 (92%)
	Positivo	0 (0%)	2 (4%)	2 (8%)
Art 3	Negativo	50 (100%)	48 (96%)	23 (92%)
	Positivo	0 (0%)	2 (4%)	2 (8%)
ProfT	Negativo	50 (100%)	48 (96%)	24 (96%)
	Positivo	0 (0%)	2 (4%)	1 (4%)
ProfL	Negativo	50 (100%)	48 (96%)	24 (96%)
	Positivo	0 (0%)	2 (4%)	1 (4%)
ProfG	Negativo	50 (100%)	43 (86%)	24 (96%)
	Positivo	0 (0%)	7 (14%)	1 (4%)
Polt	Negativo	50 (100%)	49 (98%)	24 (96%)
	Positivo	0 (0%)	1 (2%)	1 (4%)
Polg	Negativo	50 (100%)	47 (94%)	24 (96%)
	Positivo	0 (0%)	3 (6%)	1 (4%)
CCD	Negativo	50 (100%)	50 (100%)	25 (100%)
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
PR_avellana	Negativo	50 (100%)	47 (94%)	25 (100%)
	Positivo	0 (0%)	3 (6%)	0 (0%)
PR_manzana	Negativo	50 (100%)	50 (100%)	25 (100%)
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
PR_pea	Negativo	50 (100%)	50 (100%)	25 (100%)
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
I am	Negativo	50 (100%)	50 (100%)	25 (100%)
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
PR_cacahuet	Negativo	50 (100%)	49 (98%)	25 (100%)
	Positivo	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)
Kiwi	Negativo	49 (98%)	49 (98%)	25 (100%)
	Positivo	1 (2%)	1 (2%)	0 (0%)
nuez	Negativo	50 (100%)	47 (94%)	24 (96%)
	Positivo	0 (0%)	3 (6%)	1 (4%)
huevo	Negativo	50 (100%)	50 (100%)	22 (88%)
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	3 (12%)
leche	Negativo	50 (100%)	49 (98%)	25 (100%)
	Positivo	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)

TABLA 4.

Sensibilidad y Especificidad: se estudiaron la sensibilidad y especificidad de las tres pruebas diagnósticas en el grupo de alérgenos vegetales con mayor número de respuestas. La Tabla 4 indica que los estudios moleculares por arrays presentaron una especificidad del 98% y una sensibilidad (48%) mayor que las técnicas diagnósticas de prick e IgE específica (8% y 16% respectivamente).

MÉTODO DIAGNÓSTICO	QCV n (%)	Control n (%)	Sensibilidad n (%)	Especificidad n (%)
Test cutáneo	2 (8%)	2 (4%)	8 (0, 20.6)	96 (59.6, 100)
IgE	4 (16%)	0 (0%)	16 (0, 30.4)	100 (100, 100)
CRD	12 (44%)	1 (2%)	48 (26.4, 69.6)	97.99 (93.11, 100)

n (%): número de casos en %

Sensibilidad y especificidad de cada técnica diagnóstica en los diferentes grupos estudiados.

TABLA 5.

En esta tabla se indica qué variables están o no asociadas. En nuestro estudio sólo los alérgenos de pólenes presentaron una asociación significativa, $p < 0.001$, IC 95%.

Concordancia: se estudió la concordancia entre las pruebas empleadas con el índice *Kappa* que nos indica el grado de acuerdo en las pruebas analizadas. En su mayoría fueron positivas:

El grado de acuerdo entre el Prick e IgE a *lolium* es del 0,76%: sustancial.

El grado de acuerdo entre el Prick e IgE a *cynodon* es del 0,77%: sustancial.

El grado de acuerdo entre el Prick e IgE a *olea* es del 0,64%: sustancial.

El grado de acuerdo entre el Prick e IgE a *platanus* es del 1%: casi perfecto.

El grado de acuerdo entre el Prick e IgE a clara de huevo es del 0,77%: sustancial.

Medidas simétricas					
		Valor	Error típ. Saint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	0,54	0,076	6,476	0
Nº de casos válidos		125			

a: Asumiendo la hipótesis alternativa.

b: Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Asociación de las variables estudiadas medidas por tablas de contingencia:

Significación aproximada >0,5 con valor Kappa estadísticamente significativo.

TABLA 6.

Tras instaurar Inmunoterapia dirigida (ITD) por arrays durante un año, de los 37 pacientes que siguieron el tratamiento de ITD, 36 mejoraron, y en el caso de pacientes con QCV, los 13 pacientes vacunados mejoraron, con una $p < 0.001$. Si utilizamos sólo la evitación del alérgeno (en el caso de ser un animal o un alimento) sólo en el caso de la QCV se obtiene una mejoría significativa ($p < 0,05$).

GRUPO	Tratamiento	Evolución n (%)		Total (%)
		Desfavorable	Favorable	
No conjuntivitis	Sin tratamiento		50 (100%)	50 (100%)
	Máximo total esperado		50 (100%)	50 (100%)
CAE (p-valor <0.001)	Sin tratamiento	8 (100%)	0 (0%)	8 (100%)
	Evitación	5 (100%)	0 (0%)	5 (100%)
	Inmunoterapia	0 (0%)	30 (100%)	30 (100%)
	Ambos	1 (14.3%)	6 (85.7%)	7 (100%)
	Máximo total esperado	14 (28.0%)	36 (72%)	50 (100%)
QCV (p-valor <0.001)	Sin tratamiento	11 (100%)	0 (0%)	11 (100%)
	Evitación	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
	Inmunoterapia	0 (0%)	9 (100%)	9 (100%)
	Ambos	0 (0%)	4 (100%)	4 (100%)
	Máximo total esperado	11 (44%)	14 (56%)	25 (100%)
Total (p-valor <0.001)	Sin tratamiento	19 (27.5%)	50 (72.5%)	69 (100%)
	Evitación	5 (83.3%)	1 (16.7%)	6 (100%)
	Inmunoterapia	0 (0%)	39 (100%)	39 (100%)
	Ambos	1 (9.1%)	10 (90.90%)	11 (100%)
	Máximo total esperado	25 (20%)	100 (80%)	125 (100%)

Evolución clínica en cada grupo de pacientes tras un año de tratamiento con inmunoterapia y/o evitación de los alérgenos detectados en los arrays.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN.

Las conjuntivitis alérgicas (CA) constituyen la forma más frecuente de presentación clínica de alergia ocular y la reacción inmunológica que subyace en su patogenia suele estar mediada por IgE^{6, 5, 4}. La CA es importante no sólo por ser una de las entidades clínicas que más demanda produce en las consultas de Oftalmología y Alergología (afecta a más del 40% de la población general) sino por ser muchas veces la primera expresión clínica de una enfermedad alérgica posiblemente evitable, si se pudiera descubrir su etiología.

Hasta en un 32% de niños aparece una conjuntivitis como inicio de la enfermedad alérgica, mayormente asociado a rinitis⁸. Por otro lado provoca en los pacientes que la sufre un grave impacto en su calidad de vida y además tiene importantes repercusiones económicas desde el punto de vista de la Salud pública tanto a nivel de productividad escolar y laboral como en el gasto de recursos²⁰⁹.

Teniendo en cuenta la tendencia al alza mostrada por estudios epidemiológicos, la World Health Organization predice que en las próximas décadas más de la mitad de la población va a sufrir algún tipo de alergia, por lo que el diagnóstico precoz es tarea prioritaria para intentar la curación y prevenir su cronificación²¹⁰.

En la actualidad se consideran conjuntivitis de origen inmunológico los procesos alérgicos mediados por IgE: conjuntivitis alérgica estacional (CAE), conjuntivitis alérgica perenne (CAP), las entidades en las que se mezclan diferentes mecanismos patogénicos, con relevancia especial de linfocitos, mastocitos y eosinófilos queratoconjuntivitis vernal (QCV) y queratoconjuntivitis atópica, QCA) y los cuadros en los que predomina la actividad de linfocitos específicos como ocurre en la conjuntivitis papilar gigante (CPG)

^{211, 212}. En ocasiones formas pseudoalérgicas con manifestaciones clínicas similares a las de la alergia, pero con patogénesis diferente, son difíciles de diferenciar de la alergia. De hecho varias patologías graves del polo anterior como las disfunciones de la película lagrimal, blefaritis, infecciones subagudas, crónicas y afectaciones tóxicas y mecánicas de la superficie ocular mimetizan los signos clínicos de las conjuntivitis alérgicas.

En el caso de las conjuntivitis alérgicas no existe una prueba de laboratorio específica para el diagnóstico y seguimiento de estas patologías. Las pruebas complementarias, tales como los test cutáneos y la identificación de IgE sérica específica, pueden ser útiles para el diagnóstico y tratamiento, sin embargo, es bien conocido que las pruebas cutáneas no siempre son concluyentes ni parece indicado un tratamiento con inmunoterapia específica, a pesar de que existen estudios en los que se evidencia buena respuesta a esta terapia ^{158 37}.

La QCV es un tipo de inflamación alérgica crónica recurrente de la superficie ocular que se caracteriza por la inflamación crónica de la conjuntiva con sobreexpresión de los mastocitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos ²¹³. Parece ser más prevalente en países africanos y asiáticos y su etiología no está clara, siendo en muchos casos su pronóstico grave ¹⁴⁰. Estudios clínicos e inmunohistoquímicos recientes sugieren que mecanismos IgE dependientes e IgE independientes, están implicados en la inmunopatogénesis de la QCV en el que varias células inflamatorias, incluida una subpoblación diferente de células T, juegan un papel muy activo ¹⁴⁰. A pesar de que se han identificado factores endocrinos, genéticos, neurogénicos, ambientales y socioeconómicos su etiología permanece desconocida.

Las pruebas diagnósticas alergológicas de rutina (prick, IgE específica) no resuelven el diagnóstico etiológico de la QCV. La hipótesis en la que nos basamos fue la posibilidad de que la respuesta de hipersensibilidad fuera local y que la lágrima contuviera IgE específica a alérgenos, pero en cantidades no mensurables con autoanalizadores habituales de IgE en suero.

Las técnicas moleculares en Alergia se han desarrollado recientemente para el diagnóstico de patologías con trasfondo alérgico en las que las técnicas convencionales no son rentables para el diagnóstico^{193, 190, 199, 214, 89, 215}. En el momento actual la disponibilidad de alérgenos recombinantes y purificados permite determinar IgE específica frente a diversos componentes alergénicos. De esta manera es posible diagnosticar el perfil de sensibilización individual de cada paciente. La técnica de las micromatrices (microarrays) permite determinar IgE específica frente a múltiples alérgenos (112 alérgenos recombinantes y nativos) en un mismo paciente con una mínima cantidad de suero e incluso permite en una misma muestra de suero determinar IgG e IgM frente a los mismos alérgenos.

Con la aplicación del diagnóstico molecular o técnicas de diagnóstico por componentes (CRD), es posible definir el perfil de sensibilización de cada individuo y establecer qué partes del alérgeno son reconocidos por cada paciente individualmente. En los últimos años se ha logrado la caracterización y la producción de los más relevantes alérgenos a nivel molecular, y la mayoría se han generado como proteínas recombinantes¹⁹⁹.

En este estudio aplicamos la técnica de los microarrays para valorar su eficacia en el diagnóstico de las CAE y evaluar si en la QCV con una etiología alérgica difícil de

detectar con técnicas alergológicas de rutina (prick y determinación de IgE específica) podíamos llegar a un diagnóstico más preciso. Nos interesó estudiar qué porcentajes de QCV eran sensibles a cada alérgeno, mediante estudio molecular, por prick y por IgE y valorar cual de las tres pruebas era más sensible para llegar al diagnóstico (conseguía más diagnósticos positivos, era mas sensible y específica).

Hemos utilizado lágrima de los pacientes con la esperanza de poder demostrar un fenómeno local pero los arrays resultaron negativos, aunque no descartamos un defecto de nuestra técnica. En otros estudios, la utilización de la técnica de arrays en el estudio de los componentes lagrimales ha dado resultados positivos para el estudio de diversas citoquinas, factores de crecimiento y MMPs (metaloproteinasas de la matriz extracelular). En las lágrimas de los pacientes con QCV se han localizado mediante esta técnica diferentes factores que no habían sido identificados previamente incluyendo MMP-3 y MMP-10 y varias proteasas, factores de crecimiento y citoquinas, que pueden tener un papel relevante en la patogénesis de la inflamación de la conjuntiva.

Decidimos a hacer el estudio sólo en suero demostrándose sensibilización a alérgenos recombinantes y nativos. El 44% de los pacientes con QCV respondieron al n Lol p1, alérgeno predominante en nuestra atmósfera local. Responden a él el 75% de nuestros polínicos. Estos resultados pueden ser especialmente relevantes si tenemos en cuenta que, en la atmósfera de Valladolid, la presencia de polen de gramíneas representa solamente entre el 10% y el 18% del total de polen anual, sin embargo los alérgenos del grupo 1 de gramíneas (Lol p 1) aparecen en la atmosfera durante un largo periodo de tiempo (abril a julio) y en cantidades importantes (ratio alérgeno/gramíneas = 2,8 pg/polen), duplicando a los alérgenos del grupo 5 de gramíneas (Lol p 5, ratio 1,7pg/polen) y superando en mucho a Pla a 1 (ratio 0,2 pg/polen), alérgeno del polen mayoritario en la

ciudad de Valladolid (plátano de sombra). Es decir el aeroalérgeno Lol p 1 representa *a priori* un gran factor de riesgo para los afectados de CAE y otros problemas respiratorios, como ha sido puesto de manifiesto en estudios ambientales realizados en otras localidades

208, 216.

Los siguientes alérgenos positivos por orden de frecuencia fueron el n Cyn d1 al que respondieron un 36% de las QCV, 22% al grupo 4 y 6 de gramíneas, 20% al grupo 5 y 8% a profilinas de polen de árboles. El 8% de QCV respondieron al r der p1 y r der p2, y un 12% a ovomucoide (n Gald1) de la clara de huevo. Un 8% respondieron a LTPs de avellana rCor a 8 y melocotón rPru p3.

Con los métodos de Prick e IgE específica la detección de respuesta IgE fue significativamente menor, aunque el grado asociación entre las pruebas positivas fue alto entre los tres métodos utilizados. Las pruebas convencionales no detectaron alérgicos a ácaros ni a alimentos entre los pacientes con QCV pero las pruebas moleculares consiguieron detectar un 12% más de pacientes sensibles a pólenes y en concreto cuales eran las moléculas específicamente sensibilizantes.

Apoiados en los resultados obtenidos mediante el diagnóstico molecular, aplicamos un tratamiento dirigido de evitación del alérgeno (en el caso de un alimento o alérgeno evitable) o de inmunoterapia específica convencional, en el caso de pólenes y ácaros. Tras un año de aplicación del tratamiento, y utilizando sólo la evitación del alérgeno (en el caso de ser un animal o un alimento) sólo en el caso de la QCV se obtuvo un resultado de mejora significativo. En el caso de polínicos parece que la evitación no sirve de nada, lo que indica que el evitar la exposición exterior no mejora la conjuntivitis en nuestro grupo de pacientes. Si utilizamos un tratamiento combinado (evitar el alérgeno y la

inmunoterapia) obtenemos una mejoría significativa tanto en polínicos (CAE) como en vernaes (QCV).

Varios estudios han demostrado que la inmunoterapia dirigida a los alérgenos recombinantes es a la vez eficaz y segura^{193, 190, 199, 214, 89, 215}, y además, permite el uso especial de formas hipoalergénicas con gran potencial inmunogénico. En el caso de las gramíneas, se ha demostrado que un panel de 5 recombinantes (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5a, Phl p 5b)⁸⁹, y el Panel plus Phl p 6²¹⁵, reducen significativamente los síntomas e inducen intensa respuesta específica mediada por IgE frente a estos alérgenos.

Los resultados del diagnóstico molecular pueden ayudar a decidir una inmunoterapia mas precisa en un área de polinización compleja²¹⁷. Ayudarán a explicar reacciones cruzadas, y facilitarán evaluar a pacientes en los que no podemos realizar puebas cutáneas. Va a suponer un gran impulso para el desarrollo de la inmunoterapia dirigida a las sensibilizaciones de cada paciente, al conseguir formas especialmente hipoalergénicas con gran poder inmunogénico y como consecuencia, en un futuro próximo, la calidad, seguridad y eficacia de la inmunoterapia se verá reforzada²¹⁴.

En este contexto, hemos constatado las ventajas conseguidas por el uso de microarrays en la práctica clínica diaria, que es donde esta técnica es más ventajosa económicamente ya que, el uso de microarrays supone una mejora en la precisión del diagnóstico y la adecuación del tratamiento en un porcentaje de casos variable que va desde 25% al 50% de los pacientes, sobre la base del nivel de precisión utilizado para el diagnóstico molecular.

El costo del procedimiento sigue siendo un importante inconveniente. Pero teniendo en cuenta que hay un número significativo de pacientes polisensibilizados en los que no se pueden identificar completamente todos los alérgenos usando sólo parámetros clínicos, un enfoque más sofisticado puede ser de gran utilidad. Cuando se necesitan muchos alérgenos recombinantes individuales para definir un perfil exacto de sensibilización, es preferible la técnica de microarrays en términos de costes económicos.

La tecnología de los microarrays constituye un avance importante en el diagnóstico de la alergia y nos permite establecer un diagnóstico molecular preciso, conocer los patrones de sensibilización que presenta un paciente, con las diferencias propias según el área geográfica a la que pertenece y detectar sensibilización a moléculas responsables de síndromes de reactividad cruzada. Una clara indicación de esta tecnología es en el estudio del paciente polisensibilizado y en la indicación precisa de tratamiento con inmunoterapia específica. Son necesarios ensayos con suficiente poder estadístico para validar esta tecnología²¹⁸.

Como indican Salcedo y Díaz-Perales⁸⁹, existen algunas limitaciones en la técnica tales como la composición del panel de alérgenos que puede no ser el más adecuado para determinadas áreas geográficas. Por otra parte la evaluación de la sensibilidad, especificidad y puntos de corte para cada alérgeno en series de pacientes verdaderamente alérgicos y en controles para cada proteína representada en el microarray, constituye una necesidad real para poder situar esta prometedora herramienta en su justo lugar tanto en el diagnóstico alergológico en general como en la CA en particular.

No debemos olvidar que todos los test *in vitro* deben ser evaluados junto con la historia clínica de los pacientes ya que una sensibilización (detectada *in vitro* por la

presencia de anticuerpos IgE específicos) no implica necesariamente una respuesta clínica frente a dichos alérgenos

En conclusión, la técnica de microarrays ha mostrado valores clínicos adicionales en un entorno de práctica clínica real en pacientes polisensibilizados. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el diagnóstico de una sensibilización con una prueba de laboratorio no implica automáticamente alergia, y por lo tanto, la evaluación clínica detallada todavía sigue siendo el pilar del proceso de diagnóstico, dejando la técnica de microarrays como un enfoque de diagnóstico de tercer nivel.

LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

7. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN.

Nuestro estudio pretendió describir en un grupo de pacientes con QCV y en dos grupos de control (polínico y sano) la respuesta molecular a distintos alérgenos ambientales y alimentarios, así como investigar los epítomos empleados y, en su vertiente analítica, pretendió comparar los resultados entre los diferentes grupos. La validez y viabilidad de nuestro estudio podría comprometerse por el hecho de que sólo se detectarían posibles alérgenos causales en pacientes con conjuntivitis y un trasfondo atópico, no siendo aplicable a conjuntivitis infecciosa o por otras causas.

Es posible que al no detectarse hipersensibilidad en las pruebas cutáneas (Prick test) en la QCV tampoco se detecta en las pruebas *invitro*. Puede suceder que la lágrima solo posea IgE detectable en el momento de máxima actividad clínica y que la IgE en suero tenga unos niveles indetectables.

Al ser un método de análisis humoral no pudimos estudiar los mecanismos celulares implicados en la QCV.

Aunque el panel de alérgenos contenido en la placa de microarrays es importante (112 alérgenos) puede suceder que exista hipersensibilidad cruzada a otros alérgenos no incluidos en la placa.

Tampoco podríamos determinar si la respuesta obtenida a un epítomo alimenticio tendría o no valor clínico ya que en pacientes alérgicos está descrita la sensibilización subclínica a diferentes alérgenos sin una clara correlación con la enfermedad. Para esto habría que hacer un estudio de la evolución clínica de los pacientes una vez retirado el posible alérgeno implicado o tratado al menos durante tres años con inmunoterapia

LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

dirigida, pero esto sería otro estudio posterior a realizar en los próximos años una vez valorada la rentabilidad diagnóstica y la eficacia del tratamiento que vamos a emplear dirigido con microarrays tras un año de su aplicación.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES.

El diagnóstico molecular por componentes alergénicos con técnicas de microarrays fue útil para llegar al diagnóstico etiológico en un 44% de las QCV estudiadas.

Los alérgenos más prevalentes que se detectaron fueron principalmente el grupo 1 de pólenes de gramíneas y dentro de este grupo el epítipo Lo1 p1 del *ballico lolium perenne*, que es el antígeno predominante en la atmósfera de nuestra región, seguido del Cyn d1, alérgeno principal de la grama o *Cynodon dactylon*.

Los alérgenos del grupo 4, 5, 6 de los pólenes de gramíneas y las profilinas de pólenes de árboles fueron los siguientes alérgenos más sensibilizantes, seguidos de alérgenos mayores de ácaros (Der p1 y Der p2) y de alérgenos alimentarios (clara de huevo, avellana y melocotón).

La concordancia entre las técnicas convencionales y las moleculares, medida por el índice kappa, fue sustancial y, en el caso del polen de plátano de sombra, casi perfecto. Las técnicas de arrays demostraron una alta especificidad y menor sensibilidad.

Con el método de análisis molecular logramos diagnosticar etiológicamente un 12% más de pacientes que utilizando las técnicas convencionales de Prick e IgE específicas.

Tras un año de inmunoterapia dirigida por microarrays en nuestros pacientes con QCV, se observó una mejoría clínica objetiva, subjetiva y de calidad percibida sin necesidad de tratamiento sintomático.

CONCLUSIONES

Creemos necesaria la realización de ensayos clínicos con inmunoterapia dirigida a más largo plazo, durante al menos 3 años, para validar esta eficacia. Pensamos que el diagnóstico y tratamiento dirigido por arrays es una opción prometedora para el diagnóstico y tratamiento de esta grave y compleja enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Chenge B, Makumyamviri AM, Kaimbo WA, Kaimbo D. [Tropical endemic limbo-conjunctivitis in Lubumbashi, Democratic Republic of the Congo]. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 2003(290):9-16.
2. McMoli TE, Assonganyi T. Limbal vernal kerato-conjunctivitis in Yaounde, Cameroon. A clinico-immunology study. *Rev Int Trach Pathol Ocul Trop Subtrop Sante Publique* 1991;68:157-70.
3. Bonini S, Lambiase A, Marchi S, et al. Vernal keratoconjunctivitis revisited: a case series of 195 patients with long-term followup. *Ophthalmology* 2000;107(6):1157-63.
4. Leonardi A, Bonini S. Is visual function affected in severe ocular allergies? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;13(5):558-62.
5. La Rosa M, Lionetti E, Reibaldi M, et al. Allergic conjunctivitis: a comprehensive review of the literature. *Ital J Pediatr* 2013;39:18.
6. Friedlaender MH. Ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11(5):477-82.
7. Bielory L. Differential diagnoses of conjunctivitis for clinical allergist-immunologists. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98(2):105-14; quiz 14-7, 52.
8. Bielory L. Allergic and immunologic disorders of the eye. Part II: ocular allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(6):1019-32.
9. Leonardi A, Lazzarini D, Motterle L, et al. Vernal keratoconjunctivitis-like disease in adults. *Am J Ophthalmol* 2012;155(5):796-803.
10. Brozek JL, Baena-Cagnani CE, Bonini S, et al. Methodology for development of the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma guideline 2008 update. *Allergy* 2008;63(1):38-46.
11. Kantelip B GC, . . Inflammation chronique de la conjonctiva: Anatomie descriptive. Hoang Xuan T. *Bulletin des sociétés d'ophtalmologie de France, rapport annuel* 1998:21-45.
12. Pisella PJ. [The cellular players in allergy]. *J Fr Ophtalmol* 2007;30(3):283-7.
13. Metz DP, Hingorani M, Calder VL, et al. T-cell cytokines in chronic allergic eye disease. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100(6 Pt 1):817-24.
14. Romagnani S, Maggi E, Parronchi P, et al. Increased numbers of Th2-like CD4+ T cells in target organs and in the allergen-specific repertoire of allergic patients.

Possible role of IL-4 produced by non-T cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;94(1-4):133-6.

15. Leonardi A, Borghesan F, Avarello A, et al. Effect of lodoxamide and disodium cromoglycate on tear eosinophil cationic protein in vernal keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 1997;81(1):23-6.

16. Mishra GP, Tamboli V, Jwala J, Mitra AK. Recent patents and emerging therapeutics in the treatment of allergic conjunctivitis. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2011;5(1):26-36.

17. Zhang G, Spickett J, Lee AH, et al. Household hygiene practices in relation to dampness at home and current wheezing and rhino-conjunctivitis among school age children. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16(7):587-92.

18. Messmer EM, May CA, Stefani FH, et al. Toxic eosinophil granule protein deposition in corneal ulcerations and scars associated with atopic keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 2002;134(6):816-21.

19. Fukuda K, Nishida T. Reciprocal interaction of the conjunctiva and cornea in ocular allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2):493-6 e2.

20. Yamagami S, Yokoo S, Usui T, et al. Distinct populations of dendritic cells in the normal human donor corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(12):4489-94.

21. Trocme SD, Kephart GM, Bourne WM, et al. Eosinophil granule major basic protein in contact lenses of patients with giant papillary conjunctivitis. *CLAO J* 1990;16(3):219-22.

22. Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, et al. Role of structural cells of the cornea and conjunctiva in the pathogenesis of vernal keratoconjunctivitis. *Prog Retin Eye Res* 2006;25(2):165-87.

23. Irkec MT, Bozkurt B. Molecular immunology of allergic conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012.

24. Ohbayashi M, Manzouri B, Morohoshi K, et al. The role of histamine in ocular allergy. *Adv Exp Med Biol* 2010;709:43-52.

25. Leonardi A, Borghesan F, Faggian D, et al. Tear and serum soluble leukocyte activation markers in conjunctival allergic diseases. *Am J Ophthalmol* 2000;129(2):151-8.

26. Leonardi A, De Dominicis C, Motterle L. Immunopathogenesis of ocular allergy: a schematic approach to different clinical entities. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(5):429-35.

27. Choi SH, Bielory L. Late-phase reaction in ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8(5):438-44.

28. Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, Calder VL. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Exp Allergy* 2006;36(6):777-84.
29. Wong AH, Barg SS, Leung AK. Seasonal and perennial allergic conjunctivitis. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009;3(2):118-27.
30. Bonini S. Atopic keratoconjunctivitis. *Allergy* 2004;59 Suppl 78:71-3.
31. Foster CS, Calonge M. Atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1990;97(8):992-1000.
32. Calonge M, Herreras JM. Clinical grading of atopic keratoconjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(5):442-5.
33. Niederkorn JY. Immune regulatory mechanisms in allergic conjunctivitis: insights from mouse models. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8(5):472-6.
34. Elhers WH, Donshik PC. Giant papillary conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8(5):445-9.
35. Forister JF, Forister EF, Yeung KK, et al. Prevalence of contact lens-related complications: UCLA contact lens study. *Eye Contact Lens* 2009;35(4):176-80.
36. Donshik PC, Ehlers WH, Ballow M. Giant papillary conjunctivitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2008;28(1):83-103, vi.
37. Khan MD KNea. A study of 530 cases of vernal conjunctivitis from the North West Frontier Province of Pakistan. *Pak J Ophthalmol* 1986;2:111-4.
38. Bonini S, Coassin M, Aronni S, Lambiase A. Vernal keratoconjunctivitis. *Eye* 2004;18(4):345-51.
39. Resnikoff S, Cornand G, Filliard G, Hugard L. Limbal vernal keratoconjunctivitis in the tropics. *Rev Int Trach Pathol Ocul Trop Subtrop Sante Publique* 1988;65(3-4):21-72.
40. Lambiase A, Minchiotti S, Leonardi A, et al. Prospective, multicenter demographic and epidemiological study on vernal keratoconjunctivitis: a glimpse of ocular surface in Italian population. *Ophthalmic Epidemiol* 2009;16(1):38-41.
41. Dantas PE, Alves MR, Nishiwaki-Dantas MC. Topographic corneal changes in patients with vernal keratoconjunctivitis. *Arq Bras Oftalmol* 2005;68(5):593-8.
42. De Smedt SK, Nkurikiye J, Fonteyne YS, et al. Vernal keratoconjunctivitis in school children in Rwanda: clinical presentation, impact on school attendance, and access to medical care. *Ophthalmology*;119(9):1766-72.
43. Pucci N, Novembre E, Lombardi E, et al. Long eyelashes in a case series of 93 children with vernal keratoconjunctivitis. *Pediatrics* 2005;115(1):e86-91.

44. Bremond-Gignac D, Donadieu J, Leonardi A, et al. Prevalence of vernal keratoconjunctivitis: a rare disease? *Br J Ophthalmol* 2008;92(8):1097-102.
45. Bonini S, Sacchetti M, Mantelli F, Lambiase A. Clinical grading of vernal keratoconjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(5):436-41.
46. Chenge B, Makumyamviri AM, Kaimbo WA, Kaimbo D. [Tropical endemic limbo-conjunctivitis in L'Ambashi, Democratic Republic of the Congo]. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 2003(290):9-16.
47. Rao SK, Meenakshi S, Srinivasan B, Baluswamy S. Perilimbal bulbar conjunctival pigmentation in vernal conjunctivitis: prospective evaluation of a new clinical sign in an Indian population. *Cornea* 2004;23(4):356-9.
48. Cameron JA. Shield ulcers and plaques of the cornea in vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1995;102(6):985-93.
49. Sangwan VS, Jain V, Vemuganti GK, Murthy SI. Vernal keratoconjunctivitis with limbal stem cell deficiency. *Cornea* 2011;30(5):491-6.
50. Totan Y, Hepsen IF, Cekic O, et al. Incidence of keratoconus in subjects with vernal keratoconjunctivitis: a videokeratographic study. *Ophthalmology* 2001;108(4):824-7.
51. Tuft SJ, Kemeny DM, Dart JK, Buckley RJ. Clinical features of atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1991;98(2):150-8.
52. Abu El-Asrar A GK, AL-Kharashi S, et al. Adhesionmolecules in vernal keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 1997;81:1099-106.
53. Rosa AC, Fantozzi R. The role of histamine in neurogenic inflammation. *Br J Pharmacol* 2013;170(1):38-45.
54. Lambiase A, Bonini S, Micera A, et al. Increased plasma levels of substance P in vernal keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(10):2161-4.
55. Fujishima H, Takeyama M, Takeuchi T, et al. Elevated levels of substance P in tears of patients with allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 1997;27(4):372-8.
56. Bonini S, Lambiase A, Angelucci F, et al. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(20):10955-60.
57. Bonini S, Lambiase A, Schiavone M, et al. Estrogen and progesterone receptors in vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1995;102(9):1374-9.
58. Grunert G, Porcia M, Neumann G, et al. Progesterone interaction with eosinophils and with responses already induced by oestrogen in the uterus. *J Endocrinol* 1984;102(3):295-303.

59. Ballow M, Mendelson L. Specific immunoglobulin E antibodies in tear secretions of patients with vernal conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1980;66(2):112-8.
60. Easty DL, Birkenshaw M, Merrett T, et al. Immunological investigations in vernal eye disease. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1980;100(Pt 1):98-107.
61. Montan PG, van Hage-Hamsten M. Eosinophil cationic protein in tears in allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 1996;80(6):556-60.
62. Abelson MB, Schaefer K. Conjunctivitis of allergic origin: immunologic mechanisms and current approaches to therapy. *Surv Ophthalmol* 1993;38 Suppl:115-32.
63. Bonini S. IgE and non-IgE mechanisms in ocular allergy. *Ann Allergy* 1993;71(3):296-9.
64. Metz DP, Bacon AS, Holgate S, Lightman SL. Phenotypic characterization of T cells infiltrating the conjunctiva in chronic allergic eye disease. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98(3):686-96.
65. Trocme SD, Leiferman KM, George T, et al. Neutrophil and eosinophil participation in atopic and vernal keratoconjunctivitis. *Curr Eye Res* 2003;26(6):319-25.
66. Gill KS, Yannariello-Brown J, Patel J, et al. ICAM-1 expression in corneal epithelium of a patient with vernal keratoconjunctivitis: case report. *Cornea* 1997;16(1):107-11.
67. Fujishima H, Shimazaki J, Takeuchi T, et al. Interleukin-4 and IgE in seasonal allergic conjunctivitis. *Ophthalmologica* 1996;210(6):325-8.
68. Creticos PS, Peters SP, Adkinson NF, Jr., et al. Peptide leukotriene release after antigen challenge in patients sensitive to ragweed. *N Engl J Med* 1984;310(25):1626-30.
69. Bisgaard H, Olsson P, Bende M. Effect of leukotriene D4 on nasal mucosal blood flow, nasal airway resistance and nasal secretion in humans. *Clin Allergy* 1986;16(4):289-97.
70. Nathan H, Naveh N, Meyer E. Levels of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in tears of vernal conjunctivitis patients during a therapeutic trial with indomethacin. *Doc Ophthalmol* 1994;85(3):247-57.
71. Bielory L. Allergic diseases of the eye. *Med Clin North Am* 2006;90(1):129-48.
72. Dawson CR, Juster R, Marx R, et al. Limbal disease in trachoma and other ocular chlamydial infections: risk factors for corneal vascularisation. *Eye (Lond)* 1989;3 (Pt 2):204-9.

73. Seamon V VK, Zylberberg C, et al. Sex hormone regulation of tear lipocalin in the rabbit lacrimal gland. . *Exp Eye Res* 2008;87:184-90.
74. Calonge M, Enriquez-de-Salamanca A. The role of the conjunctival epithelium in ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5(5):441-5.
75. Fujishima H TM, Takeuchi T, et al. Elevated levels of substance P in tears of patients with allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. . *Clin Exp Allergy* 1997;27:372-78.
76. Ono SJ. Vernal keratoconjunctivitis: evidence for immunoglobulin E-dependent and immunoglobulin E-independent eosinophilia. *Clin Exp Allergy* 2003;33(3):279-81.
77. Tuft SJ, Dart JK, Kemeny M. Limbal vernal keratoconjunctivitis: clinical characteristics and immunoglobulin E expression compared with palpebral vernal. *Eye (Lond)* 1989;3 (Pt 4):420-7.
78. Tuft SJ, Ramakrishnan M, Seal DV, et al. Role of *Staphylococcus aureus* in chronic allergic conjunctivitis. *Ophthalmology* 1992;99(2):180-4.
79. Butrus SI, Abelson MB. Laboratory evaluation of ocular allergy. *Int Ophthalmol Clin* 1988;28(4):324-8.
80. Henriquez AS, Kenyon KR, Allansmith MR. Mast cell ultrastructure. Comparison in contact lens-associated giant papillary conjunctivitis and vernal conjunctivitis. *Arch Ophthalmol* 1981;99(7):1266-72.
81. Leonardi A, Busca F, Motterle L, et al. Case series of 406 vernal keratoconjunctivitis patients: a demographic and epidemiological study. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84(3):406-10.
82. Inada N, Shoji J, Hoshino M, Sawa M. Evaluation of total and allergen-specific secretory IgA in tears of allergic conjunctival disease patients. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51(5):338-42.
83. Mumcuoglu YK, Zavaro A, Samra Z, Lazarowitz Z. House dust mites and vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmologica* 1988;196(4):175-81.
84. Leonardi A, Brun P, Tavolato M, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Eur J Ophthalmol* 2003;13(7):606-10.
85. Moreno C, Carnes M, Cimarra M, et al. Inmunoterapia como herramienta clinica moderna. *Madri. Ediciones Mayo S.A.* 2012.
86. Bublin M, Pfister M, Radauer C, et al. Component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy with purified natural and recombinant kiwifruit allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(3):687-94, 94 e1.

87. Moreno C, Fernandez-Tavora L, Acero S, et al. Tolerance of a cluster schedule on the treatment of seasonal allergic respiratory disease with pollen extracts quantified in mass units. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2003;13(4):221-7.
88. Gamboa PM, Caceres O, Antepará I, et al. Two different profiles of peach allergy in the north of Spain. *Allergy* 2007;62(4):408-14.
89. Salcedo G, Diaz-Perales A. Component-resolved diagnosis of allergy: more is better? *Clin Exp Allergy* 2010;40(6):836-8.
90. Sicherer SH. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(6):881-90.
91. Tabbara KF. Ocular complications of vernal keratoconjunctivitis. *Can J Ophthalmol* 1999;34(2):88-92.
92. Copeman PW. Eczema and keratoconus. *Br Med J* 1965;2:977-9.
93. Rahi A, Davies, P., Ruben, M. et al. Keratoconus and coexisting atopic disease. *Br J Ophthalmol* 1977;61:761-4.
94. Lapid-Gortzak R, Rosen S, Weitzman S, Lifshitz T. Videokeratography findings in children with vernal keratoconjunctivitis versus those of healthy children. *Ophthalmology* 2002;109(11):2018-23.
95. Cameron JA, Al-Rajhi AA, Badr IA. Corneal ectasia in vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1989;96(11):1615-23.
96. Mantelli F, Santos MS, Petitti T, et al. Systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials on topical treatments for vernal keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 2007;91(12):1656-61.
97. Mantelli F, Lambiase A, Bonini S. Clinical trials in allergic conjunctivitis: a systematic review. *Allergy* 2011;66(7):919-24.
98. Bielory L. Ocular allergy guidelines: a practical treatment algorithm. *Drugs* 2002;62(11):1611-34.
99. Leonardi A. Vernal keratoconjunctivitis: pathogenesis and treatment. *Prog Retin Eye Res* 2002;21(3):319-39.
100. Duzman E, Warman A, Warman R. Efficacy and safety of topical oxymetazoline in treating allergic and environmental conjunctivitis. *Ann Ophthalmol* 1986;18(1):28-31.
101. Chigbu DI. The management of allergic eye diseases in primary eye care. *Cont Lens Anterior Eye* 2009;32(6):260-72.

102. Sanchis-Merino ME, Montero JA, Ruiz-Moreno JM, et al. Comparative efficacy of topical antihistamines in an animal model of early phase allergic conjunctivitis. *Exp Eye Res* 2008;86(5):791-7.
103. Church MK, McGill JI. Human ocular mast cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002;2(5):419-22.
104. Tabbara KF, Arafat NT. Cromolyn effects on vernal keratoconjunctivitis in children. *Arch Ophthalmol* 1977;95(12):2184-6.
105. Bonini S, Schiavone M, Centofanti M, et al. Conjunctival hyperresponsiveness to ocular histamine challenge in patients with vernal conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89(1 Pt 1):103-7.
106. Caldwell DR, Verin P, Hartwich-Young R, et al. Efficacy and safety of lodoxamide 0.1% vs cromolyn sodium 4% in patients with vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1992;113(6):632-7.
107. Sorkin EM, Ward A. Ocular sodium cromoglycate. An overview of its therapeutic efficacy in allergic eye disease. *Drugs* 1986;31(2):131-48.
108. Dahan E, Appel R. Vernal keratoconjunctivitis in the black child and its response to therapy. *Br J Ophthalmol* 1983;67(10):688-92.
109. Fahy GT, Easty DL, Collum LM, et al. Randomised double-masked trial of lodoxamide and sodium cromoglycate in allergic eye disease. A multicentre study. *Eur J Ophthalmol* 1992;2(3):144-9.
110. Avunduk AM, Avunduk MC, Kapicioglu Z, et al. Mechanisms and comparison of anti-allergic efficacy of topical lodoxamide and cromolyn sodium treatment in vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 2000;107(7):1333-7.
111. Verin P, Allewaert R, Joyaux JC, et al. Comparison of lodoxamide 0.1% ophthalmic solution and levocabastine 0.05% ophthalmic suspension in vernal keratoconjunctivitis. *Eur J Ophthalmol* 2001;11(2):120-5.
112. Verin PH, Dicker ID, Mortemousque B. Nedocromil sodium eye drops are more effective than sodium cromoglycate eye drops for the long-term management of vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 1999;29(4):529-36.
113. Kuna P, Bachert C, Nowacki Z, et al. Efficacy and safety of bilastine 20 mg compared with cetirizine 10 mg and placebo for the symptomatic treatment of seasonal allergic rhinitis: a randomized, double-blind, parallel-group study. *Clin Exp Allergy* 2009;39(9):1338-47.
114. Bachert C, Kuna P, Sanquer F, et al. Comparison of the efficacy and safety of bilastine 20 mg vs desloratadine 5 mg in seasonal allergic rhinitis patients. *Allergy* 2009;64(1):158-65.

115. Qasem AR, Bucolo C, Baiula M, et al. Contribution of alpha4beta1 integrin to the antiallergic effect of levocabastine. *Biochem Pharmacol* 2008;76(6):751-62.
116. Weimer LK, Gamache DA, Yanni JM. Histamine-stimulated cytokine secretion from human conjunctival epithelial cells: inhibition by the histamine H1 antagonist emedastine. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;115(4):288-93.
117. Bielory L, Lien KW, Bigelsen S. Efficacy and tolerability of newer antihistamines in the treatment of allergic conjunctivitis. *Drugs* 2005;65(2):215-28.
118. Lambiase A, Micera A, Bonini S. Multiple action agents and the eye: do they really stabilize mast cells? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9(5):454-65.
119. McGill JI. A review of the use of olopatadine in allergic conjunctivitis. *Int Ophthalmol* 2004;25(3):171-9.
120. Corum I, Yeniad B, Bilgin LK, Ilhan R. Efficiency of olopatadine hydrochloride 0.1% in the treatment of vernal keratoconjunctivitis and goblet cell density. *J Ocul Pharmacol Ther* 2005;21(5):400-5.
121. Schoch C. Effect of ketotifen fumarate, olopatadine, and levocabastine on ocular active anaphylaxis in the guinea pig and ocular immediate hypersensitivity in the albino rat. *Ocul Immunol Inflamm* 2005;13(1):39-44.
122. Lanier BQ, Finegold I, D'Arienzo P, et al. Clinical efficacy of olopatadine vs epinastine ophthalmic solution in the conjunctival allergen challenge model. *Curr Med Res Opin* 2004;20(8):1227-33.
123. Duarte C, Baehre M, Gharakhanian S, Leynadier F. Treatment of severe seasonal rhinoconjunctivitis by a combination of azelastine nasal spray and eye drops: a double-blind, double-placebo study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2001;11(1):34-40.
124. D'Angelo G, Lambiase A, Cortes M, et al. Preservative-free diclofenac sodium 0.1% for vernal keratoconjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241(3):192-5.
125. Kosrirukvongs P, Luengchaichawange C. Topical cyclosporine 0.5 per cent and preservative-free ketorolac tromethamine 0.5 per cent in vernal keratoconjunctivitis. *J Med Assoc Thai* 2004;87(2):190-7.
126. Sharma A, Gupta R, Ram J, Gupta A. Topical ketorolac 0.5% solution for the treatment of vernal keratoconjunctivitis. *Indian J Ophthalmol* 1997;45(3):177-80.
127. Bielory BP, Perez VL, Bielory L. Treatment of seasonal allergic conjunctivitis with ophthalmic corticosteroids: in search of the perfect ocular corticosteroids in the treatment of allergic conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10(5):469-77.

128. Ilyas H, Slonim CB, Braswell GR, et al. Long-term safety of loteprednol etabonate 0.2% in the treatment of seasonal and perennial allergic conjunctivitis. *Eye Contact Lens* 2004;30(1):10-3.
129. Leonardi A, Papa V, Milazzo G, Secchi AG. Efficacy and safety of desonide phosphate for the treatment of allergic conjunctivitis. *Cornea* 2002;21(5):476-81.
130. Holsclaw DS, Witcher JP, Wong IG, Margolis TP. Supratarsal injection of corticosteroid in the treatment of refractory vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1996;121(3):243-9.
131. Saini JS, Gupta A, Pandey SK, et al. Efficacy of supratarsal dexamethasone versus triamcinolone injection in recalcitrant vernal keratoconjunctivitis. *Acta Ophthalmol Scand* 1999;77(5):515-8.
132. Lisanework M. Supra-tarsal injection of dexamethasone in the treatment of patients with refractory vernal keratoconjunctivitis. *Ethiop Med J* 2003;41(1):19-24.
133. BenEzra D, Matamoros N, Cohen E. Treatment of severe vernal keratoconjunctivitis with cyclosporine A eyedrops. *Transplant Proc* 1988;20(2 Suppl 2):644-9.
134. Abu el-Asrar AM, Geboes K, Tabbara KF, et al. Immunopathogenesis of vernal keratoconjunctivitis. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 1996;261:15-24.
135. Secchi AG, Tognon MS, Leonardi A. Topical use of cyclosporine in the treatment of vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1990;110(6):641-5.
136. Leonardi A, DeFranchis G, Fregona IA, et al. Effects of cyclosporin A on human conjunctival fibroblasts. *Arch Ophthalmol* 2001;119(10):1512-7.
137. Pucci N, Novembre E, Cianferoni A, et al. Efficacy and safety of cyclosporine eyedrops in vernal keratoconjunctivitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89(3):298-303.
138. Kilic A, Gurler B. Topical 2% cyclosporine A in preservative-free artificial tears for the treatment of vernal keratoconjunctivitis. *Can J Ophthalmol* 2006;41(6):693-8.
139. Avunduk AM, Avunduk MC, Erdem H, et al. Cyclosporine effects on clinical findings and impression cytology specimens in severe vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmologica* 2001;215(4):290-3.
140. Spadavecchia L, Fanelli P, Tesse R, et al. [Prognosis and treatment of Vernal keratoconjunctivitis in pediatric age: pilot study on 197 patients]. *Minerva Pediatr* 2010;62(3):239-44.
141. Cetinkaya A, Akova YA, Dursun D, Pelit A. Topical cyclosporine in the management of shield ulcers. *Cornea* 2004;23(2):194-200.

142. Kumar S. Combined therapy for vernal shield ulcer. *Clin Exp Optom* 2008;91(1):111-4.
143. Akpek EK, Hasiripi H, Christen WG, Kalayci D. A randomized trial of low-dose, topical mitomycin-C in the treatment of severe vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 2000;107(2):263-9.
144. Jain AK, Sukhija J. Low dose mitomycin-C in severe vernal keratoconjunctivitis: a randomized prospective double blind study. *Indian J Ophthalmol* 2006;54(2):111-6.
145. Hingorani M, Lightman S. Therapeutic options in ocular allergic disease. *Drugs* 1995;50(2):208-21.
146. Lightman S. Therapeutic considerations: symptoms, cells and mediators. *Allergy* 1995;50(21 Suppl):10-3; discussion 34-8.
147. Fukagawa K, Okada N, Fujishima H, et al. CC-chemokine receptor 3: a possible target in treatment of allergy-related corneal ulcer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(1):58-62.
148. Akman A, Irkec M, Orhan M. Effects of lodoxamide, disodium cromoglycate and fluorometholone on tear leukotriene levels in vernal keratoconjunctivitis. *Eye (Lond)* 1998;12 (Pt 2):291-5.
149. Lambiase A, Bonini S, Rasi G, et al. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, in vernal keratoconjunctivitis associated with asthma. *Arch Ophthalmol* 2003;121(5):615-20.
150. Vichyanond P, Tantimongkolsuk C, Dumrongkigchaiporn P, et al. Vernal keratoconjunctivitis: Result of a novel therapy with 0.1% topical ophthalmic FK-506 ointment. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(2):355-8.
151. Tuo J, Chan, CC. Ocular application of macrobiomolécules in anti-allergy an anti-inflammation. *Current medicinal chemistry-antiinflamamatory and antiallrgy agents*. Benthem science publishers 2003;3:219-27.
152. Iovieno A, Lambiase A, Sacchetti M, et al. Preliminary evidence of the efficacy of probiotic eye-drop treatment in patients with vernal keratoconjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(3):435-41.
153. Motterle L, Diebold Y, Enriquez de Salamanca A, et al. Altered expression of neurotransmitter receptors and neuromediators in vernal keratoconjunctivitis. *Arch Ophthalmol* 2006;124(4):462-8.
154. Contreras-Ruiz L, de la Fuente M, Garcia-Vazquez C, et al. Ocular tolerance to a topical formulation of hyaluronic acid and chitosan-based nanoparticles. *Cornea* 2010;29(5):550-8.

155. Pflugfelder SC, Stern ME. Future directions in therapeutic interventions for conjunctival inflammatory disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(5):450-3.
156. Moote W, Kim H. Allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2011;7 Suppl 1:S5.
157. Bonini S, Gramiccioni C, Bonini M, Bresciani M. Practical approach to diagnosis and treatment of ocular allergy: a 1-year systematic review. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(5):446-9.
158. Bielory L, Mongia A. Current opinion of immunotherapy for ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002;2(5):447-52.
159. Deniz G, Akdis M, Aktas E, et al. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol* 2002;32(3):879-84.
160. Kari O, Saari KM. Updates in the treatment of ocular allergies. *J Asthma Allergy* 2010;3:149-58.
161. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Injection allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2011(8):CD001186.
162. Calderon MA, Penagos M, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic Rhinoconjunctivitis, allergic asthma, and prevention of allergic diseases. *Clin Allergy Immunol* 2008;21:359-75.
163. Calderon MA, Penagos M, Sheikh A, et al. Sublingual immunotherapy for allergic conjunctivitis: Cochrane systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy* 2011;41(9):1263-72.
164. Del Prete A, Loffredo C, Carderopoli A, et al. Local specific immunotherapy in allergic conjunctivitis. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1994;72(5):631-4.
165. Dreborg S, Agrell B, Foucard T, et al. A double-blind, multicenter immunotherapy trial in children, using a purified and standardized *Cladosporium herbarum* preparation. I. Clinical results. *Allergy* 1986;41(2):131-40.
166. Balda BR, Wolf H, Baumgarten C, et al. Tree-pollen allergy is efficiently treated by short-term immunotherapy (STI) with seven preseasonal injections of molecular standardized allergens. *Allergy* 1998;53(8):740-8.
167. Didier A, Malling HJ, Worm M, et al. Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(6):1338-45.
168. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008;63 Suppl 86:8-160.

169. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81(5 Pt 1):401-5.
170. Passalacqua G, Compalati E, Canonica GW. Advances in allergen-specific immunotherapy. *Curr Drug Targets* 2009;10(12):1255-62.
171. Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, et al. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy* 2007;62(8):943-8.
172. Calderon MA, Casale TB, Togias A, et al. Allergen-specific immunotherapy for respiratory allergies: from meta-analysis to registration and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(1):30-8.
173. Tanaka M, Takano Y, Dogru M, et al. A comparative evaluation of the efficacy of intraoperative mitomycin C use after the excision of cobblestone-like papillae in severe atopic and vernal keratoconjunctivitis. *Cornea* 2004;23(4):326-9.
174. Belfair N, Monos T, Levy J, et al. Removal of giant vernal papillae by CO2 laser. *Can J Ophthalmol* 2005;40(4):472-6.
175. Cameron JA, Antonios SR, Badr IA. Excimer laser phototherapeutic keratectomy for shield ulcers and corneal plaques in vernal keratoconjunctivitis. *J Refract Surg* 1995;11(1):31-5.
176. Ozbek Z, Burakgazi AZ, Rapuano CJ. Rapid healing of vernal shield ulcer after surgical debridement: A case report. *Cornea* 2006;25(4):472-3.
177. Rouher N, Pilon F, Dalens H, et al. [Implantation of preserved human amniotic membrane for the treatment of shield ulcers and persistent corneal epithelial defects in chronic allergic keratoconjunctivitis]. *J Fr Ophtalmol* 2004;27(10):1091-7.
178. Pelegrin L, Gris O, Adan A, Plazas A. Superficial keratectomy and amniotic membrane patch in the treatment of corneal plaque of vernal keratoconjunctivitis. *Eur J Ophthalmol* 2008;18(1):131-3.
179. Nishiwaki-Dantas MC, Dantas PE, Pezzutti S, Finzi S. Surgical resection of giant papillae and autologous conjunctival graft in patients with severe vernal keratoconjunctivitis and giant papillae. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 2000;16(6):438-42.
180. Sangwan VS, Murthy SI, Vemuganti GK, et al. Cultivated corneal epithelial transplantation for severe ocular surface disease in vernal keratoconjunctivitis. *Cornea* 2005;24(4):426-30.
181. Juniper EF, Thompson AK, Ferrie PJ, Roberts JN. Validation of the standardized version of the Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(2 Pt 1):364-9.

182. Juniper EF, Thompson AK, Ferrie PJ, Roberts JN. Development and validation of the mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire. *Clin Exp Allergy* 2000;30(1):132-40.
183. Valero A, Alonso J, Antepara I, et al. Health-related quality of life in allergic rhinitis: comparing the short form ESPRINT-15 and MiniRQLQ questionnaires. *Allergy* 2007;62(12):1372-8.
184. Alexander M, Berger W, Buchholz P, et al. The reliability, validity, and preliminary responsiveness of the Eye Allergy Patient Impact Questionnaire (EAPIQ). *Health Qual Life Outcomes* 2005;3:67.
185. Pitt AD, Smith AF, Lindsell L, et al. Economic and quality-of-life impact of seasonal allergic conjunctivitis in Oxfordshire. *Ophthalmic Epidemiol* 2004;11(1):17-33.
186. Bartra J, Mullol J, Montoro J, et al. Effect of bilastine upon the ocular symptoms of allergic rhinoconjunctivitis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21 Suppl 3:24-33.
187. Smith AF, Pitt AD, Rodruiguez AE, et al. The economic and quality of life impact of seasonal allergic conjunctivitis in a Spanish setting. *Ophthalmic Epidemiol* 2005;12(4):233-42.
188. Navarro A, Colas C, Anton E, et al. Epidemiology of allergic rhinitis in allergy consultations in Spain: Alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009;19 Suppl 2:7-13.
189. Thomas WR, Stewart GA, Simpson RJ, et al. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *Escherichia coli*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988;85(1):127-9.
190. Gonzalez-Buitrago JM, Ferreira L, Isidoro-Garcia M, et al. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. *Clin Chim Acta* 2007;385(1-2):21-7.
191. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, et al. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(3):409-18.
192. Vrtala S. From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment. *Allergy* 2008;63(3):299-309.
193. Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006;38(7):232-6.
194. Ekins R, Chu F, Biggart E. Fluorescence spectroscopy and its application to a new generation of high sensitivity, multi-microspot, multianalyte, immunoassay. *Clin Chim Acta* 1990;194(1):91-114.

195. Wiltshire S, O'Malley S, Lambert J, et al. Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by immunoassay with rolling circle amplification. *Clin Chem* 2000;46(12):1990-3.
196. Kim TE, Park SW, Cho NY, et al. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp Mol Med* 2002;34(2):152-8.
197. Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* 2003;33(10):1443-9.
198. Lebrun SJ, Suquilanda E, Petchpud WN. Development of an individual-specific autoantibody (ISA) protein microarray. *Biotechnol Appl Biochem* 2005;41(Pt 1):85-8.
199. Wohrl S, Vigl K, Zehetmayer S, et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy* 2006;61(5):633-9.
200. Pong JC, Chu CY, Chu KO, et al. Identification of hemopexin in tear film. *Anal Biochem* 2010;404(1):82-5.
201. Pong JC, Chu CY, Li WY, et al. Association of hemopexin in tear film and conjunctival macrophages with vernal keratoconjunctivitis. *Arch Ophthalmol* 2011;129(4):453-61.
202. Leonardi A. Allergy and allergic mediators in tears. *Exp Eye Res* 2013;117:106-17.
203. Inic-Kanada A, Nussbaumer A, Montanaro J, et al. Comparison of ophthalmic sponges and extraction buffers for quantifying cytokine profiles in tears using Luminex technology. *Mol Vis*;18:2717-25.
204. Leonardi A, Battista MC, Gismondi M, et al. Antigen sensitivity evaluated by tear-specific and serum-specific IgE, skin tests, and conjunctival and nasal provocation tests in patients with ocular allergic disease. *Eye (Lond)* 1993;7 (Pt 3):461-4.
205. Nomura K, Takamura E. Tear IgE concentrations in allergic conjunctivitis. *Eye (Lond)* 1998;12 (Pt 2):296-8.
206. Armentia A, Martin S, Barrio J, et al. Value of microarray allergen assay in the management of eosinophilic oesophagitis. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2014.
207. Grouin JM, Vicaut E, Jean-Alphonse S, et al. The average Adjusted Symptom Score, a new primary efficacy end-point for specific allergen immunotherapy trials. *Clin Exp Allergy* 2011;41(9):1282-8.
208. Fernandez-Gonzalez D, Rodriguez Rajo F, Gonzalez Parrado Z, et al. Differences in atmospheric emissions of Poaceae pollen and Lo1 p 1 allergen. *Aerobiologia* 2011;27(4):301-4.

209. Virchow JC, Kay S, Demoly P, et al. Impact of ocular symptoms on quality of life (QoL), work productivity and resource utilisation in allergic rhinitis patients--an observational, cross sectional study in four countries in Europe. *J Med Econ* 2011;14(3):305-14.
210. Punekar YS, Sheikh A. Establishing the incidence and prevalence of clinician-diagnosed allergic conditions in children and adolescents using routinely collected data from general practices. *Clin Exp Allergy* 2009;39(8):1209-16.
211. Bielory L, Katelaris CH, Lightman S, Naclerio RM. Treating the ocular component of allergic rhinoconjunctivitis and related eye disorders. *MedGenMed* 2007;9(3):35.
212. Leonardi A, Bogacka E, Fauquert JL, et al. Ocular allergy: recognizing and diagnosing hypersensitivity disorders of the ocular surface. *Allergy* 2009;67(11):1327-37.
213. Bonini S, Coassin M, Aronni S, Lambiase A. Vernal keratoconjunctivitis. *Eye (Lond)* 2004;18(4):345-51.
214. Eigenmann PA. Component-resolved diagnosis in food allergy, are micro-array assays helpful to the clinician? *Allergy* 2008;63(11):1519-20.
215. Ballmer-Weber BK, Skamstrup Hansen K, Sastre J, et al. Component-resolved in vitro diagnosis of carrot allergy in three different regions of Europe. *Allergy* 2012;67(6):758-66.
216. Rodriguez Lajo F, Jato V, Gonzalez Parrado Z, et al. The combination of airborne pollen and allergen quantification to reliably assess the real pollinosis risk in different bioclimatic areas. *Aerobiologia* 2011;27(1):1-12.
217. Sastre J, Landivar ME, Ruiz-Garcia M, et al. How molecular diagnosis can change allergen-specific immunotherapy prescription in a complex pollen area. *Allergy* 2012;67(5):709-11.
218. Reuter A, Lidholm J, Andersson K, et al. A critical assessment of allergen component-based in vitro diagnosis in cherry allergy across Europe. *Clin Exp Allergy* 2006;36(6):815-23.

10. ANEXO

Anexo 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se está realizando una investigación de alergia ocular y le rogamos su consentimiento para realizar en una muestra de suero determinación de anticuerpos (IgE específica) a diferentes alérgenos (pólenes, trigo, vegetales) que pueden estar provocando su enfermedad.

Para ello se le citará a consulta de alergia (Dr^a Armentia, Hospital Río Hortega, puerta 211, teléfono de contacto 983420400, ext. 84211) para la realización de pruebas cutáneas.

Estas pruebas se realizaran depositando una gota de extracto de los alérgenos sospechosos en la superficie de la piel de su antebrazo. Posteriormente se realizará una micropunción para una vez transcurridos 15 minutos comprobar la presencia de un habón que indicaría una respuesta al alérgeno probado.

En el caso de que la respuesta fuera positiva, se le pedirá consentimiento para realizar una extracción de sangre para realizar un estudio molecular a 112 alérgenos en su suero. Esta prueba le beneficiará en el conocimiento del aeroalérgeno o alimento al que puede ser alérgico y puede mejorar sus síntomas tras su evitación. Las molestias que puede sufrir son locales y leves: Picor en el punto de punción que desaparecerá en 30 minutos.

En pocas ocasiones aparece un hematoma en el lugar de extracción. Debe de comunicar si ha tomado alguna medicación que puede modificar la prueba cutánea.

Este documento sirve para que usted o quien lo represente de su consentimiento para estas pruebas y nos autorice a realizarlas.

Puede retirar este consentimiento cuando lo desee. Firmarlo no le obliga a usted a seguir la investigación si no lo desea ya. De su rechazo no se derivará ninguna consecuencia adversa respecto a la calidad de resto de la atención recibida.

Yo _____ doy mi consentimiento para la realización de estas pruebas, tras ser informado verbalmente y por escrito por el Dr/Dra..

En Valladolid a _____ de _____ de _____ Fdo:
