



Universidad de Valladolid

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

TESIS DOCTORAL:

**BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL
DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE LA
CONJUNTIVITIS ALÉRGICA ESTACIONAL Y PERENNE**

Presentada por José Carlos Zarzuela Velasco para optar al
grado de

Doctor/a por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Alfredo Corell Almuzara

FINANCIACIÓN

El proyecto que engloba esta tesis ha sido cofinanciado por el Ministerio de Economía y Competitividad, el Instituto de Salud Carlos III y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Número de referencia: PI14/01886, BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE LA CONJUNTIVITIS ALÉRGICA. Periodo desde 2014 a 2020.

Total concedido: 74.415,00 €

AUTONOMÍA	CENTRO	CIF	EXPEDIENTE	TÍTULO	CONCEDIDO			
					Total	1ª anualidad	2ª anualidad	3ª anualidad
CASTILLA Y LEÓN								
	UNIVERSIDAD DE VALLADOLID	Q4718001C	PI14/01886	BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE CONJUNTIVITIS ALÉRGICA	74.415,00 €	36.300,00 €	18.755,00 €	19.360,00 €

Esta ayuda está cofinanciada por el FEDER, Programa Operativo Crecimiento Inteligente 2014-2020

PUBLICACIONES, CONGRESOS Y TRABAJOS RESULTANTES

Derivado del trabajo de investigación y laboratorio de esta tesis se han generado las siguientes publicaciones, ponencias y trabajos académicos:

Artículos científicos:

Zarzuela JC, Reinoso R, Armentia A, Enríquez-de-Salamanca A, Corell A. Conjunctival Intraepithelial Lymphocytes, Lacrimal Cytokines and Ocular Commensal Microbiota: Analysis of the Three Main Players in Allergic Conjunctivitis. *Front Immunol.* 2022 Jul 19;13:911022. doi: 10.3389/fimmu.2022.911022. PMID: 35935953; PMCID: PMC9351602.

Comunicaciones en congresos:

- 1. Increased $\gamma\delta$ T cells in the conjunctiva and decreased NKT, Th and B1 cells in the elderly: main findings when comparing lymphocyte subsets in peripheral blood and conjunctival IELs.**
Nombre del congreso: Congreso de la sociedad española de inmunología, Alicante, España.
Fecha de celebración: 05/05/2016 Fecha de finalización: 07/05/2016
- 2. Increased $\gamma\delta$ T cells in the conjunctiva and decreased NKT, Th and B1 cells in the elderly: main findings when comparing lymphocyte subsets in peripheral blood and conjunctival IELs.**
Nombre del congreso: International Congress of Immunology, Melbourne, Australia
Fecha de celebración: 04/08/2016 Fecha de finalización: 07/08/2016
- 3. Fine characterization of healthy Conjunctiva: Main differences when comparing IELs and peripheral blood lymphocyte subsets.**
Nombre del congreso: 40 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología, Zaragoza, España
Fecha de celebración: 25/05/2017
- 4. Fine characterization of healthy conjunctiva: main findings when comparing IELs and peripheral blood fine lymphocytes subsets.**
Nombre del congreso: 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, Holanda
Fecha de celebración: del 02/09/2018 Fecha de finalización: 05/09/2018
- 5. Biomarcadores inflamatorios para el diagnóstico diferencial y seguimiento de la conjuntivitis alérgica estacional y perenne.**
Nombre del congreso: 44 Congreso de la sociedad española de inmunología, Bilbao, España.
Fecha de celebración: 10/05/2023 Fecha de finalización: 13/05/2023

Trabajos académicos:

- 1. TFM - Análisis de subpoblaciones linfocitarias periféricas y linfocitos intraepiteliales en la conjuntiva tarsal.** Autor: José Carlos Zarzuela Velasco. Julio 2015. Universidad de Valladolid.
- 2. TFG – Caracterización de subpoblaciones linfocitarias periféricas y conjuntivales en pacientes con conjuntivitis alérgica.** Autor: Marcos Lorenzo Andrés. Julio 2017. Universidad de Valladolid.
- 3. TFM - Análisis de subpoblaciones linfocitarias y linfocitos intraepiteliales en sangre periférica y la conjuntiva tarsal.** Autor: María Inés Llorente González. Julio 2017. Universidad de Valladolid.
- 4. TFG - Caracterización de subpoblaciones linfocitarias periféricas y conjuntivales en individuos sanos.** Autor: Félix Valentín Martín. Julio 2019. Universidad de Valladolid.

AGRADECIMIENTOS

Una de las grandes frases de Leonardo Da Vinci decía que “los hombres geniales empiezan grandes obras, los hombres trabajadores las terminan”. Yo no me considero ni trabajador ni genial, pero sí comprometido. Me hice la promesa de que este trabajo lo empezaba para acabarlo. Han sido muchos años y el proceso ha ido más lento y ha sido más desesperante de lo que esperaba, pero finalmente se ha podido concluir, con sus malos y no tan malos momentos...

Desde pequeño, por mi forma de ser, nunca he valorado mis logros y seguiré sin hacerlo, pero si he llegado hasta aquí es principalmente gracias a mí mismo. Es a la primera persona a la que tengo que agradecer el esfuerzo Espero que mi “yo del futuro” pueda leer esto y enorgullecerse pensando que todo el trabajo realizado ha merecido la pena.

Ha habido muchos momentos en los que tenía ganas de tirar la toalla, de dejarlo todo, mucho tiempo perdido, muchos quebraderos de cabeza, de borrón y cuenta nueva, de volver a empezar y de desconexión total. Sentimientos de frustración, de no saber si has elegido bien o si merece la pena seguir, de cansarte de los resultados de tu estudio y ver que ya no son tan buenos como pensabas, de sentirte repetitivo y perder las ganas. Sentir que el trabajo que has hecho, al final, no es tan bueno. por ser un inconformista...

Lidiar con todos estos sentimientos es complicado y pueden llevar a la desesperación. Pero, al final, te das cuenta de que en ocasiones solo necesitas que una persona te dé otro punto de vista y valore tu trabajo. Ese es el motor que te hace recuperar la cordura y retomar el trabajo con más ganas.

Creo que muchas veces no somos conscientes de que tenemos que parar para reflexionar y pedir ayuda, aunque nos cueste asumir que hay cosas que no podemos hacer solos.

Las personas que siempre han permanecido a tu lado para echar una mano, para apoyarme, para distraerme o para sacarme una sonrisa, son las que realmente te recargan las pilas. Familia, amigos, compañeros, o gente que no te conoce de nada, pero quiere ayudarte. Todas las personas, y todas las situaciones vividas en estos años han sido el motor y la causa que me han llevado hasta este punto.

Gente del departamento de inmunología que ha pasado por el laboratorio, amigos del máster, gente de la quinta planta, profesores, sanitarios, alumnos, investigadores y predocs. ¡Gracias!

Gracias en especial a Alfredo por dirigirme la tesis, por confiar en mí, por aguantar mi ritmo y, en ocasiones, por devolverme la cordura. A mi pareja, Marina, por aguantar todos estos años a una criatura amargada y pesimista.

A todos los compañeros de piso que han pasado por mi vida y han convivido conmigo. A mis amigos de toda la vida que me daban un soplo de aire fresco. A todos los profesionales que han aportado su granito de arena en este trabajo.

Al equipo del Centro de Salud Pilarica-Circular por ayudar en la captación de voluntarios. Al personal del IOBA, y en especial al equipo de enfermeras, ópticos y oftalmólogos. Al personal de laboratorio, Carmen y Amalia. A mi tutor, Alberto. A, Yolanda, la coordinadora del doctorado por su paciencia conmigo.

A toda la gente que he ido conociendo estos años en el Centro VirtUVa que se han portado genial conmigo. Y en especial a Susana, por ser tan cercana y estar dispuesta siempre a ayudar.

¡Gracias de corazón!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	19
RESUMEN	22
INTRODUCCIÓN	27
1. LA CONJUNTIVA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	27
1.1. El tejido linfoide asociado a la conjuntiva	28
2. EL COMPONENTE CELULAR DE LA CONJUNTIVA	31
2.1. Células estructurales.....	31
2.2. Células del sistema inmunitario	33
3. LA GLÁNDULA LACRIMAL	45
3.1. La película lacrimal.....	45
3.2. Principales factores solubles de la lágrima.....	46
4. LA MICROBIOTA COMENSAL	54
4.1. Microbiota bacteriana: principales especies.....	56
4.2. Microbiota fúngica: principales especies	56
5. LA INFLAMACIÓN DE LA CONJUNTIVA Y LA ALERGIA	57
5.1. Tipos de conjuntivitis	61
5.2. Diagnóstico diferencial de las conjuntivitis	62
5.3. Tratamiento y cuidado de las conjuntivitis.....	64
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	67
MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	71
1.1. Criterios de inclusión y exclusión	73
1.2. Sujetos del estudio.....	74
2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE MUESTRA	76
3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	78
3.1. Citometría de flujo	78
3.2. Luminex® xMAP tm – multiplexado de alto rendimiento	84
3.3. Secuenciación de alto rendimiento.....	86
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	87
ANEXO I - TÉCNICAS DE GATING	88

RESULTADOS	101
1. DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA	101
2. ANÁLISIS DE LAS CONCENTRACIONES DE POLEN Y TOMA DE MUESTRAS	102
3. SISTEMA INMUNITARIO CELULAR.....	103
3.1. Diferencias asociadas a la patología en sangre periférica	103
3.2. Diferencias asociadas a la patología en conjuntiva	105
3.3. Diferencias asociadas a la edad y el género en conjuntiva.....	108
3.4. Diferencias en el componente celular entre sangre y conjuntiva	110
3.5. Análisis de la correlación entre el componente celular circulante y el regional ...	113
4. SISTEMA INMUNITARIO HUMORAL	114
4.1. Diferencias asociadas a la patología en plasma sanguíneo	114
4.2. Diferencias asociadas a la patología en lágrima.....	115
4.3. Diferencias en el componente humoral entre plasma y lágrima.....	118
5. MICROBIOTA OCULAR	121
5.1. Diferencias asociadas a la patología en bacterias.....	121
5.2. Diferencias asociadas a la patología en hongos	123
5.3. Análisis de la diversidad de la microbiota.....	125
6. PROPUESTA DE POSIBLES BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA CONJUNTIVITIS ALÉRGICA.....	126
ANEXO II – ESPECIES ANALIZADAS	128
DISCUSIÓN	135
1. La conjuntiva como tejido al amparo de la inmunidad innata.	137
2. El papel de los IELs y las citocinas durante el proceso alérgico	142
3. La contribución de la microbiota a la conjuntivitis alérgica	146
4. Un modelo representativo del proceso alérgico en la superficie ocular.....	153
5. Posibles limitaciones y vistas al futuro	156
CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFÍA	165
ANEXO III – DOC. COMPLEMENTARIA.....	180
1. Cuaderno de recogida de datos	181
2. Consentimiento informado	187
3. Informes favorables del CEIC	190

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Estructura de la conjuntiva.	27
Figura 2. Estructura del tejido linfoide asociado a la mucosa, ejemplo del intestino delgado...	29
Figura 3. Interacciones de las células epiteliales.....	32
Figura 4. Diferenciación de las principales células del sistema inmunitario	33
Figura 5. Diferenciación de los linfocitos T CD4 y CD8.....	37
Figura 6. Diferenciación de las células CD4+	40
Figura 7. Subpoblaciones de NK (CD3-).....	43
Figura 8. Modelo de 3 Capas de la película lacrimal	45
Figura 9. Red de citocinas: principales productores y receptores celulares.....	47
Figura 10. Clasificación de los distintos tipos de conjuntivitis.....	60
Figura 11. Conjuntivitis alérgica perenne crónica y estacional aguda	61
Figura 12. Ejemplo de queratoconjuntivitis vernal	61
Figura 13. Ejemplo de queratoconjuntivitis atópica.....	62

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 14. Test OSDI utilizado	72
Figura 15. Técnica de cepillado conjuntival.	76
Figura 16. Capilares Drummond Microcaps 4 µL	76
Figura 17. Tubo Vacuette de tapón morado con EDTA.....	77
Figura 18. Partes de un citómetro	79
Figura 19. Bandas de detección de un citómetro	80
Figura 20. Poblaciones y subpoblaciones linfoides que serán objeto de estudio	82
Figura 21. Protocolo utilizado para el análisis celular	83
Figura 22. Esquema del ensayo para el Luminex.....	84
Figura 23. Protocolo para la cuantificación de factores solubles en plasma y lágrima.....	85
Figura 24. Analizador MiSeq™ System – Illumina y Biome Makers Valladolid	86

ANEXO I - Técnicas de *gating*

Figura 25. TUBO 1 linfocitos CD4 y CD8 vírgenes y memoria - SANGRE PERIFÉRICA ..	89
Figura 26. TUBO 1 linfocitos CD4 y CD8 vírgenes y memoria - CONJUNTIVA	90
Figura 27. TUBO 2 linfocitos Th – SANGRE PERIFÉRICA.....	91
Figura 28. TUBO 2 linfocitos Th – CONJUNTIVA	92
Figura 29. TUBO 3 linfocitos T reguladores - SANGRE PERIFÉRICA.....	93
Figura 30. TUBO 3 linfocitos T reguladores - CONJUNTIVA	94
Figura 31. TUBO 4 linfocitos NK, NKT - SANGRE PERIFÉRICA.....	95
Figura 32. TUBO 4 linfocitos NK, NKT - CONJUNTIVA	96
Figura 33. TUBO 5 linfocitos B1, B2 y TCRγδ+ - SANGRE PERIFÉRICA.....	97
Figura 34. TUBO 5 linfocitos B1, B2 y TCRγδ+ - CONJUNTIVA.	98

RESULTADOS

Figura 35. Cambios en las concentraciones de polen en Valladolid, del año 2016 al 2019.....	102
Figura 36. Diferencias sanos vs alérgicos en sangre periférica para los linfocitos T CD4+....	103
Figura 37. Diferencias sanos vs alérgicos en sangre periférica para linfocitos B y CD4 vírgenes y memoria.....	104
Figura 38. Comparación de los distintos subtipos de linfocitos T CD4+.....	105
Figura 39. Diferencias en las poblaciones de NKT, TCR $\gamma\delta$ + y MAIT	106
Figura 40. Correlación entre los valores obtenidos en sangre periférica y conjuntiva para los subtipos Th1, Th17 y Th2 dentro del grupo de conjuntivitis alérgicas estacionales.....	107
Figura 41. Evolución de las distintas subpoblaciones linfoides en conjuntiva. distribuido por tramos de edad.....	108
Figura 42. Evolución, por tramos de edad, de los subtipos de linfocitos T CD4	109
Figura 43. Resumen de los hallazgos por género.....	109
Figura 44. Proporciones de los subtipos linfoides del sistema inmunitario en sangre periférica y conjuntiva dentro del grupo control.	110
Figura 45. Correlación entre los valores obtenidos en sangre periférica y conjuntiva para los subtipos Th22, NKT totales, CD8R0 y CD8RA	113
Figura 46. Diferencias más relevantes en algunas citocinas e IgE por grupo de estudio en plasma sanguíneo	114
Figura 47. Diferencias más relevantes en algunas citocinas, MMP-9 y TGF- β 2 por grupo de estudio en lágrima.	115
Figura 48. Porcentajes de las citocinas en lágrima, por tipo de respuesta celular.....	116
Figura 49. Moléculas solubles analizadas en plasma y lágrima.....	120
Figura 50. Proporciones obtenidas para las poblaciones de BACTERIAS.....	121
Figura 51. Proporciones obtenidas para las poblaciones de HONGOS	123
Figura 52. Diversidad alfa para comunidades procariotas (16S) y fúngicas (ITS)	125
Figura 53. Posibles biomarcadores para el diagnóstico de las conjuntivitis alérgicas	127
Figura 54. Especies de bacterias analizadas.....	129
Figura 55. Especies de hongos analizadas.	131

DISCUSIÓN

Figura 56. Organización folicular y difusa en conjuntiva sana.....	135
Figura 57. Esquema del modelo de “doble señal” de las células MAIT	139
Figura 58. Representación gráfica de la conjuntiva tarsal superior de un sujeto sano	141
Figura 59. Teoría de la FASE INFLAMATORIA de la conjuntiva.....	151
Figura 60. Teoría de la FASE DE RECUPERACIÓN de la conjuntiva.	152
Figura 61. Esquema global de cómo sería el proceso inflamatorio en la conjuntiva	155

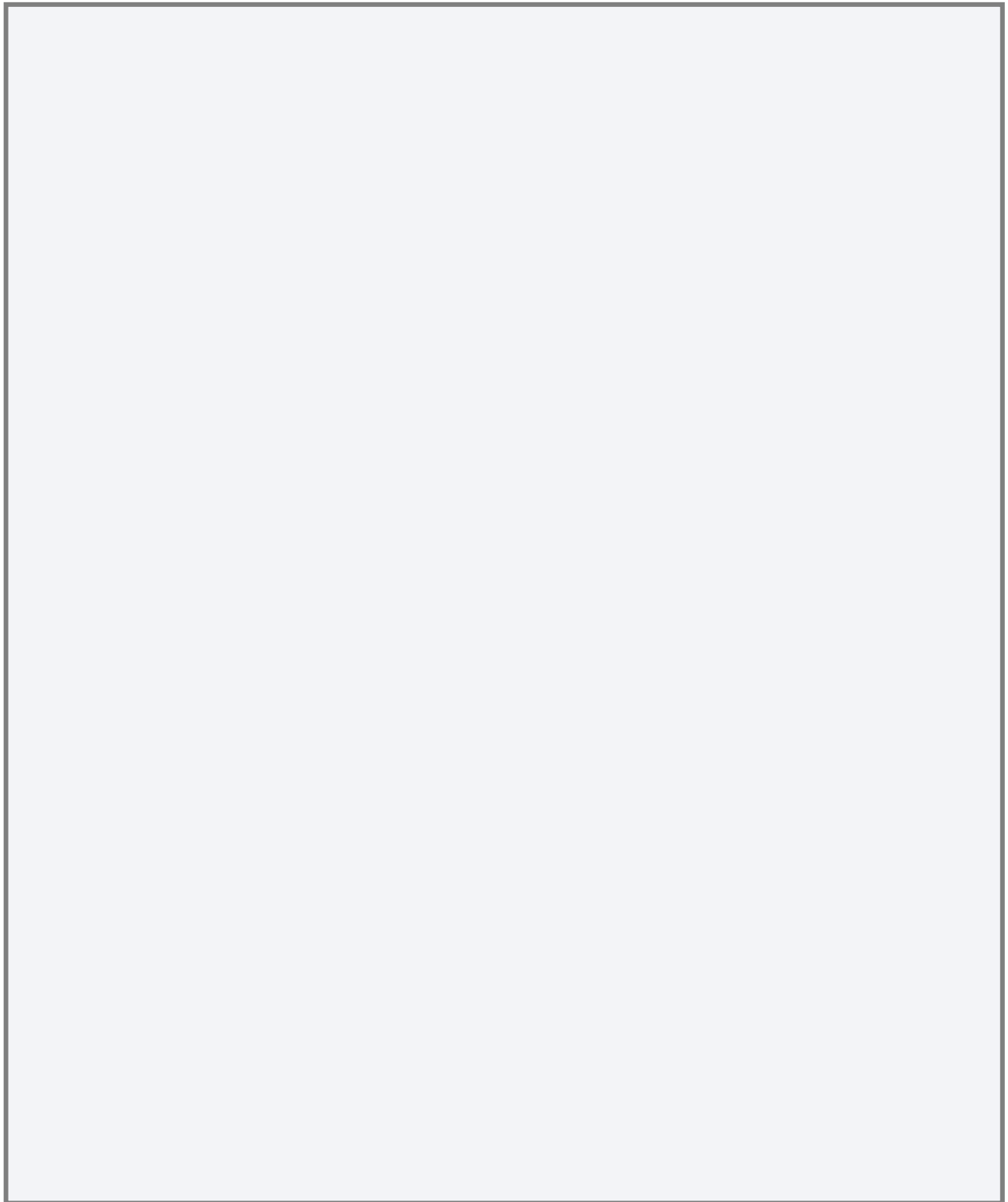
Resúmenes de resultados

Resumen de resultados 1. Diferencias entre los grupos de conjuntivitis alérgica estacional y perenne en las poblaciones de linfocitos de sangre periférica.....	104
Resumen de resultados 2. Diferencias entre los grupos de conjuntivitis alérgica estacional y perenne en las poblaciones de linfocitos de la conjuntiva.....	106
Resumen de resultados 3. Diferencias en las proporciones de linfocitos intraepiteliales de la conjuntiva con respecto a la sangre periférica.....	111
Resumen de resultados 4. Diferencias entre los grupos de conjuntivitis alérgica estacional y perenne en las moléculas de la lágrima.	114
Resumen de resultados 5. Diferencias entre los grupos de conjuntivitis alérgica estacional y perenne en las concentraciones de factores solubles de la lágrima.	116
Resumen de resultados 6. Diferencias en las concentraciones de los factores solubles de la lágrima con respecto del plasma sanguíneo.	119

Tablas

Tabla 1. Resumen de los factores solubles.....	53
Tabla 2. Principales especies de la flora normal humana.....	57
Tabla 3. Relación de pacientes con datos de sexo edad y tipo de muestra.....	75
Tabla 4. Diseño del panel de anticuerpos.....	81
Tabla 5. Referencias de los kits comerciales utilizados y moléculas analizadas.....	85
Tabla 6. Datos descriptivos de la muestra.....	101
Tabla 7. Proporciones de las poblaciones linfoides en conjuntiva y sangre periférica.....	112
Tabla 8. Concentraciones de los factores solubles analizados en lágrima y plasma.....	117
Tabla 9. Porcentajes de las especies de hongos.....	124
Tabla 10. Resumen de los resultados y su relación con lo hallado por otros autores.....	137
Tabla 11. Comparación de nuestros resultados en lágrima con otros estudios.....	145

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APC	Dos significados: <i>Antigen presenting cell</i> (célula presentadora de antígeno), cuando hablamos de células o; o Alofocianina, cuando hablamos de fluorocromos
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosómico
Bright	Del inglés, significa brillante
CA	Conjuntivitis alérgica
CAE	Conjuntivitis alérgica estacional
CALT	<i>Conjunctiva-associated lymphoid tissue</i>
CAP	Conjuntivitis alérgica perenne
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
DA	Dermatitis atópica
DC	<i>Dendritic cell (Célula dendrítica)</i>
dim	Del inglés, significa tenue
ECD	PE (phycoerythrin)-Texas Red
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	<i>Fluorescein IsoTioCyanate</i>
FL	Fotomultiplicador/Fotodetector
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
IEL	<i>Intraepithelial Lymphocytes (Linfocitos Intraepiteliales)</i>
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	<i>Innate lymphoid cells</i>
IOBA	Instituto de oftalmobiología aplicada (Valladolid)
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (espaciador transcrito interno)
MAIT	<i>Mucosal associated invariant T cell</i>
MALT	<i>Mucosal-associated lymphoid tissue</i>
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
mL	Mililitro
MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i>
μL	Microlitro
ng	Nanogramo

NK	<i>Natural Killer cell</i>
NKT	<i>Natural Killer T cell</i>
OS	<i>Ojo seco</i>
OSDI	<i>Ocular Surface Disease Index</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
QC	<i>Queratocono</i>
QCV	<i>Queratoconjuntivitis vernal</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RPMI	Medio de cultivo desarrollado por Roswell Park Memorial Institute
T^a	Temperatura
TBUT	<i>Tear breakup time</i> (Tiempo de rotura lacrimal)
T_c	Linfocito T citotóxico
TCR	<i>T cell receptor</i> (Receptor del linfocito T)
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	<i>T Helper cell</i> (Linfocito T cooperador)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Treg	Linfocito T regulador
TSLP	<i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
xMAP	<i>Multi-Analyte Profiling</i>

RESUMEN

La conjuntiva y la lágrima junto con la microbiota comensal constituyen la principal barrera de defensa contra los patógenos en la superficie ocular.

Las enfermedades alérgicas son uno de los principales motivos de consulta médica, donde la prevalencia de la conjuntivitis alérgica se sitúa actualmente en torno al 30-40%. Existen varios tipos de conjuntivitis alérgica y todas ellas pueden presentar síntomas similares (picor, enrojecimiento, lagrimeo...), aunque la respuesta inmunitaria, tanto celular como humoral, pueda ser completamente diferente.

En la actualidad, no existen estudios previos que hayan analizado e interrelacionado los tres principales factores implicados en la respuesta inflamatoria de la superficie ocular. Para ello, compararemos el sistema inmunitario regional (conjuntiva tarsal superior y lágrima) con el circulante (sangre periférica y plasma); haremos una caracterización detallada de los **linfocitos intraepiteliales conjuntivales, los factores solubles lacrimales y la microbiota comensal** de individuos sanos; e identificaremos las diferencias con los pacientes que tienen conjuntivitis alérgica. Por último, analizaremos los datos obtenidos para encontrar biomarcadores diferenciales que permitan mejorar el diagnóstico y el tratamiento de la conjuntivitis alérgica.

Para este estudio se reclutaron **33 sujetos sanos, 28 sujetos con conjuntivitis alérgica estacional y 31 sujetos con conjuntivitis alérgica perenne** para obtener muestras de: sangre periférica por venopunción, citología mediante cepillado de la conjuntiva tarsal superior, lágrima por capilaridad y microbiota por frotis de la conjuntiva bulbar inferior.

Se utilizó la citometría de flujo para analizar el fenotipo linfoide en sangre y conjuntiva, los ensayos Xmap para medir la concentración de las distintas citocinas en plasma y lágrima y la secuenciación de ADN de alto rendimiento para el análisis de la microbiota ocular.

Se utilizaron los siguientes marcadores de membrana para la citometría: CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD25, CD45, CD45RA, CD45R0, CD56, , CD127, CD183, CD194, CD196, CCR10, y TCR $\gamma\delta$; y se analizaron los siguientes factores solubles: Eotaxin, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-12p40, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-17E, IL-21 y IL-22, MCP-1 (CCL2), RANTES* y TNF- α , MMP-9, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TSLP, IgA e IgE.

Pudimos observar, en el caso de la conjuntivitis alérgica perenne, **un aumento de la proporción de linfocitos Th2 y NKT**, mientras que disminuían los linfocitos CD3+TCR $\gamma\delta$ + y las células MAIT doble negativas (CD3+CD8-CD4-). En cambio, la conjuntivitis alérgica estacional se caracterizaba por **un aumento de las proporciones de células Th17 y Th22**, mientras que la proporción de células Th1 disminuía.

En lagrimea, la gran mayoría de las citocinas proinflamatorias (**principalmente las citocinas Th2 y Th17**) en las alergias perennes, y la MMP-9 junto con la IgA en las alergias estacionales, estaban aumentadas. En cambio, el TGF- β 2 estaba disminuido en ambas formas de conjuntivitis.

Por último, se observó **una colonización fúngica** (especies de *Malassezia*) y **bacteriana** (especies de *Kocuria* y *Propionobacterium acnes*) en el grupo de conjuntivitis alérgica perenne.

Con este estudio hemos podido comprobar que existen diferencias significativas tanto en conjuntiva como lágrima y microbiota en conjuntivitis alérgicas perennes, principalmente, y que hay cierta correlación entre los linfocitos circulantes y los regionales.

Estos resultados proporcionan las bases para el desarrollo de un perfil de enfermedad para la conjuntivitis alérgica perenne y abren las puertas hacia nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico.

1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo desglosaremos las diferentes partes implicadas en la defensa de la superficie ocular, tanto celular como humoral y microbiana. Además, se describirá sucintamente el proceso alérgico y la conjuntivitis.

1. La conjuntiva: Estructura y función
 - 1.1. Tejido linfoide asociado a la conjuntiva
2. El componente celular de la conjuntiva
 - 2.1. Células estructurales
 - 2.2. Células del sistema inmunitario
3. La glándula lacrimal
 - 3.1. La película lacrimal
 - 3.2. Principales factores solubles
4. La microbiota comensal
 - 4.1. Microbiota fúngica: principales especies
 - 4.2. Microbiota bacteriana: principales especies
5. La inflamación de la conjuntiva y la alergia
 - 5.1. Tipos de conjuntivitis
 - 5.2. Diagnóstico diferencial de la conjuntivitis
 - 5.3. Tratamiento y cuidado de la conjuntivitis

INTRODUCCIÓN

1. LA CONJUNTIVA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

La conjuntiva es la membrana mucosa que recubre la cara interna de los párpados, fórnix y la esclera hasta el limbo corneal. Estas zonas dan nombre a las tres grandes regiones de la conjuntiva: Conjuntiva palpebral (subdividida en orbital, tarsal y marginal), conjuntiva bulbar (compuesta por la bulbar y la limbar) y fórnix o fondo de saco, que es la que une las dos anteriores (**Figura 1A**)(1).

La conjuntiva está formada histológicamente por dos capas de tejido: el epitelio estratificado no queratinizado de unas 2 a 6 capas de células poligonales (capa superficial) y el estroma (capa más interna). El epitelio de la conjuntiva tiene cierta variabilidad dependiendo de la región, siendo columnar en el fórnix y párpados, cuboidal en conjuntiva bulbar y escamoso en los bordes palpebrales. Acompañando a esas células epiteliales vamos a encontrar ciertas células infiltradas entre ellas como son, por ejemplo, las células caliciformes productoras de *mucus* (*Goblet cells*) y linfocitos intraepiteliales (IELs, *Intraepithelial Lymphocytes*), pertenecientes al tejido linfoide difuso y del que hablaremos más adelante. Por otro lado, el estroma está formado por tejido conectivo y está separado del epitelio por una lámina basal. El estroma contiene vasos sanguíneos y linfáticos, además de colágeno, fibroblastos, leucocitos y otras células (**Figura 1B**). (2)

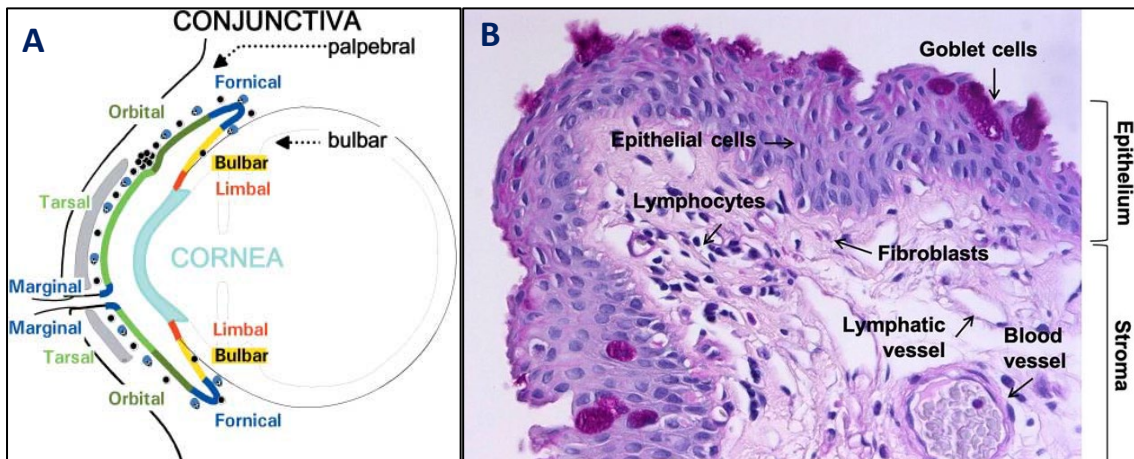


Figura 1. Estructura de la conjuntiva. (A) Partes de la conjuntiva. Imagen extraída del artículo de Enrich Knop "The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection".(1) (B) Corte histológico de la conjuntiva. Imagen publicada en el artículo "Is the Conjunctiva a Potential Target for Advanced Therapy Medicinal Products?"(192) del grupo de superficie Ocular del IOBA.

Además, el epitelio de la conjuntiva está unido célula a célula por desmosomas, cerrando cualquier espacio libre que pueda haber, lo que otorga a este tejido de una barrera casi impenetrable ante posibles agresiones. Las células epiteliales están en

constante comunicación con su entorno. Cuando éstas reciben un estímulo propio o ajeno activan vías de señalización para la liberación de ciertas proteínas que funcionarán como señales a otras células. Entre estas proteínas encontramos defensinas y citocinas como IL-6, TNF- α e IFN- γ que a su vez podrán servir de inductoras para la producción de otro tipo de moléculas como quimiocinas, moléculas de adhesión o péptidos antimicrobiales.(3) Esta cascada de señalización puede ir intensificándose a medida que se involucra más linaje celular, de tal manera que las señales puedan pasar del epitelio al estroma, produciendo quimioatracción y la diferenciación de células del sistema inmunitario en capas más internas como la lámina propia.

La lámina propia contiene células derivadas de la médula ósea y diferentes tipos de vasos, tanto sanguíneos como linfáticos que sirven de transporte a los leucocitos. Estos vasos aportan nutrientes y reguladores hormonales a todas las células del epitelio. En esta capa existe una gran reserva de linfocitos, organizados en folículos y preparados para posibles infecciones. (3)

1.1. EL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA CONJUNTIVA

El tejido linfoide asociado a las mucosas o MALT (del inglés "*Mucosal Associated Lymphoid Tissue*") constituye la primera línea de defensa en muchos tejidos del organismo. El MALT engloba a todos los demás tejidos linfoides asociados de la anatomía humana, cada uno con características muy similares. Existen, por ejemplo, el GALT (Gástrico), el BALT (Bronquial), el NALT (Nasal) o el EALT (Ocular) que comprende el CALT (Conjuntival), el LDALT (sistema de Drenaje Lacrimal) y el LGALT (Glándula Lacrimal).

El CALT puede estar organizado de modo **difuso o folicular** dependiendo en qué capa de la mucosa se encuentre. El tejido linfoide difuso se encuentra en la capa epitelial en forma de linfocitos intraepiteliales y principalmente está formado por linfocitos T CD3+, de los cuales la gran mayoría son células T CD8+ citotóxicas. En cambio, los folículos linfoides se encuentran en la lámina propia y están formados principalmente por linfocitos T CD3+ de los cuales la mayoría son CD4+ (linfocitos T cooperadores, en inglés: T *helper* o Th) además de células plasmáticas diferenciadas (3–5). Las células T rodean a las células plasmáticas y estas, a su vez, rodean las vénulas del endotelio alto, siendo los folículos zonas de contacto y maduración de linfocitos (ver **Figura 2**). Tanto

los linfocitos como las células dendríticas, una vez hayan tenido contacto con el antígeno pueden abandonar la conjuntiva a través de los vasos linfáticos para madurar la respuesta adaptativa y comenzar la expansión clonal. (3,6,7) Gran parte de la IgA secretora (sIgA) de la lágrima es producida por las células B diferenciadas de la conjuntiva y la glándula lacrimal. Esta inmunoglobulina tiene efectos proinflamatorios e inmunoreguladores, induciendo la liberación de TGF- β e IL-10, además de jugar un papel muy importante en la defensa frente a microbios potencialmente patológicos.

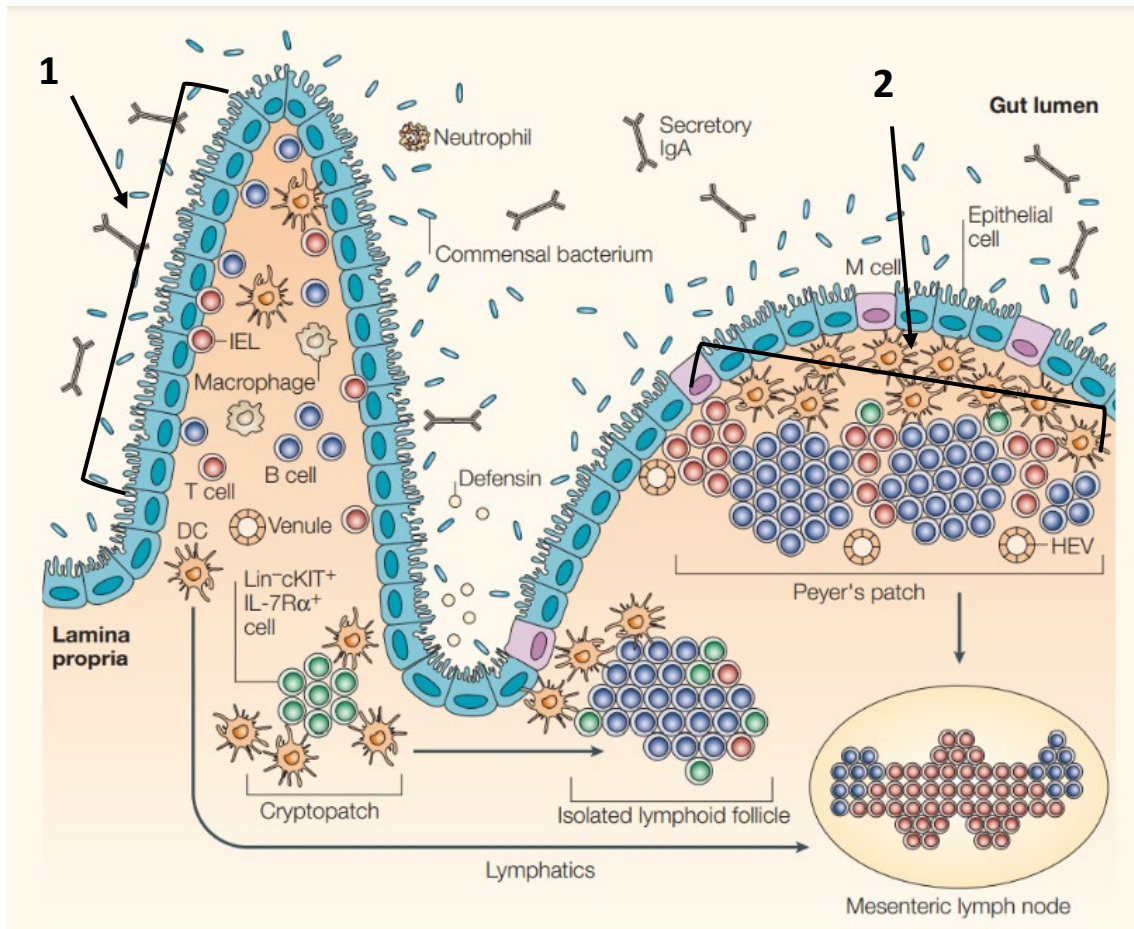


Figura 2. Estructura del tejido linfoides asociado a la mucosa, ejemplo del intestino delgado. (1) En forma difusa (linfocito intraepitelial, IEL) y (2) en forma folicular (placas de Peyer). Figura extraída del artículo científico "Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway?". (8)

Además de los linfocitos intraepiteliales, en el epitelio de la conjuntiva podemos encontrar otras células del sistema inmunitario como: monocitos, con capacidad fagocítica como son los macrófagos, mastocitos o células dendríticas (DC); y granulocitos como neutrófilos y eosinófilos.

Los monocitos también pueden actuar como células presentadoras de antígenos y activar la respuesta adaptativa. Los mastocitos, por ejemplo, son los encargados de mediar

la respuesta alérgica con IgE, liberando las citocinas necesarias para la diferenciación de las Th0 a células Th1 y Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 y TNF- α). (3)

Al igual que ocurre en otras mucosas, en la capa epitelial más externa se encuentran las células M o células bolsillo que sirven de alojamiento a los linfocitos para la captación de antígenos. Las capas de epitelio que se encuentran próximas a los folículos linfoides son más delgadas y tienen un bajo número de células caliciformes. Estos folículos van decreciendo en número a medida que la edad avanza y son más comunes en la zona tarsal, a la altura de la córnea, la cual carece de conjuntiva y está más desprotegida. (3,4,6) Por esa razón es tan importante el parpadeo y tener un cierre completo de los párpados cuando dormimos.

Gran parte de la respuesta inmunitaria es responsabilidad del CALT, tanto innata como adaptativa. Cuando existe una alteración epitelial, una irritación o estrés, que pueda comprometer la integridad del epitelio se produce una respuesta por parte de las células epiteliales, secretando citocinas proinflamatorias y proteasas (como las metaloproteinasas de matriz, MMP), y expresando marcadores de superficie, lo que favorecerá la interacción con las células del sistema inmune. Por lo tanto, son principalmente las células epiteliales las encargadas de iniciar el proceso inflamatorio y activar el sistema inmunitario.

A continuación, describiremos los principales componentes celulares y moleculares que participan activamente en la defensa de la superficie ocular y el proceso inflamatorio. Comenzaremos detallando histológicamente las capas de la conjuntiva, continuando con los principales factores solubles de la lágrima y finalizando con las especies fúngicas y bacterianas más comunes de la microbiota ocular.

2. EL COMPONENTE CELULAR DE LA CONJUNTIVA

Como hemos visto anteriormente, hay numerosos tipos celulares implicados en la defensa de la superficie ocular. En este apartado veremos que función cumplen las células que componen estructuralmente la conjuntiva (Células caliciformes, células M, células epiteliales, entre otras) y las células del sistema inmunitario (granulocitos, monocitos y linfocitos).

2.1. CÉLULAS ESTRUCTURALES

Células caliciformes (*Goblet cells*). La conjuntiva es un tejido rico en este tipo de células cuya función principal es la de secretar mucinas, generando una capa mucosa protectora entre la superficie epitelial y la capa acuosa de la lágrima. Las mucinas tienen propiedades lubricantes que mantienen la hidratación de la superficie ocular y la estabilidad de la lágrima, además de permitir la eliminación de desechos, reteniendo patógenos y restos biológicos. Esta producción de mucinas es estimulada por la presencia de factores de crecimiento (EGF) de la lágrima y la IL-13, producida principalmente por células Th2 (9–11) o la IL-6 e IFN- γ , producidas por las células dendríticas. (12) Las células caliciformes tienen también funciones inmunoregulatoras ya que son buenas productoras de **TGF- β** y **ácido retinoico** (10) y permiten el paso de antígenos al estroma para su fagocitosis, contribuyendo a la tolerancia inmunológica de la superficie ocular. (13)

Células epiteliales. Como hemos mencionado anteriormente, las células epiteliales tienen funciones de vital importancia. No solo forman una barrera mecánica para evitar el paso de patógenos, sino que median la comunicación entre el exterior (superficie) y el interior (capas más internas). Esta última función la llevan a cabo mediante la expresión de moléculas de superficie y liberando mediadores proinflamatorios (Quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento, entre otras) para contribuir en la proliferación, diferenciación, activación y quimioatracción de células inflamatorias (ver **Figura 3**). La expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) por parte de las células epiteliales y endoteliales vasculares (VCAM-1) permite a los leucocitos la migración a los lugares de inflamación. (14) Por lo tanto, la sobreexpresión de ICAM-1 está relacionada con el desarrollo de ciertas patologías inflamatorias como, por ejemplo, las conjuntivitis. (15) Proteínas como TNF- α , histamina, IFN- γ e IL-1 β favorecen la expresión de moléculas de

adhesión y liberación de citocinas por parte de las células epiteliales. Entre las moléculas liberadas por estas células podemos encontrar: **IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-25, IL-33, GM-CSF, TGF- α , TNF- α , TSLP, RANTES, eotaxina o MCP-1.** (16–21)

Células M. Estas células, características de las mucosas, desarrollan una importante labor en la defensa de este tejido. Las células M, son células “bolsillo” que forman una cavidad orientada hacia el interior del epitelio donde pueden alojarse distintas células del sistema inmunitario para facilitar la captación de antígenos. Las células M permiten, mediante transcitosis, el transporte selectivo de antígenos a través del epitelio hasta la lámina propia. De este modo se prepara el sistema inmunitario antes de que se rompa la barrera epitelial y que los microorganismos/alérgenos accedan a capas más internas. (7,22)

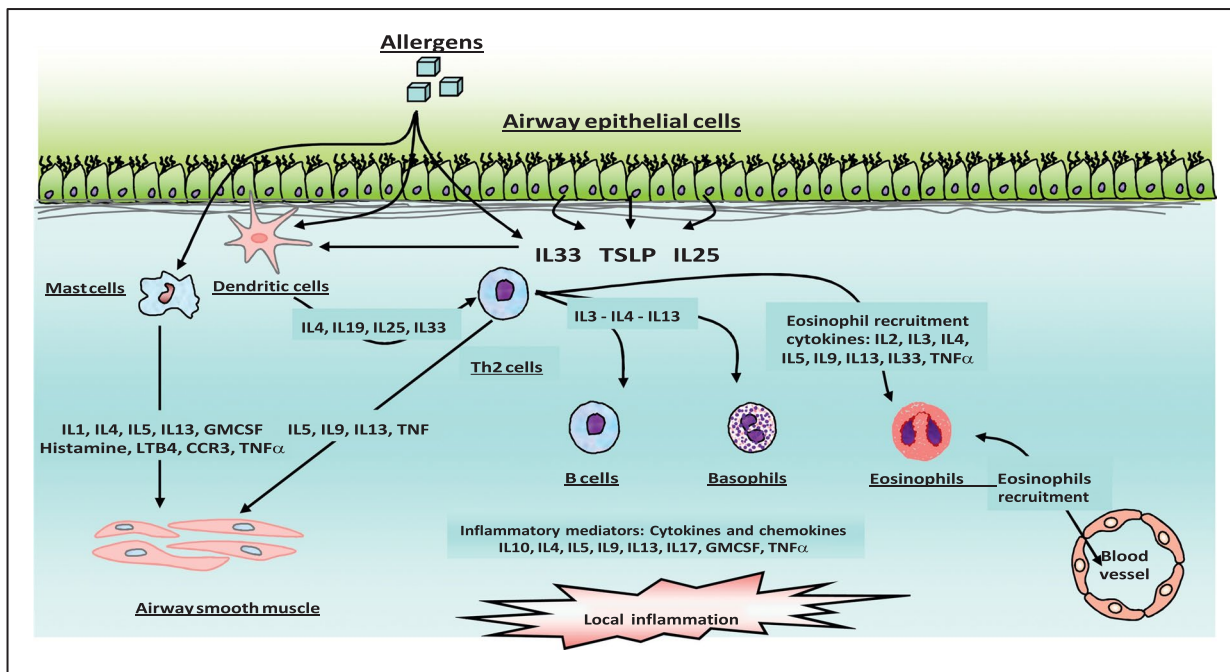


Figura 3. Interacciones de las células epiteliales. En este caso, con el sistema inmunológico cuando existe una inflamación local en la mucosa bronquial. Imagen extraída de “The role of eosinophils and basophils in allergic diseases considering genetic findings”.(21)

Fibroblastos. Los fibroblastos son células que forman el tejido conectivo, es decir, el punto de unión entre dos capas, en nuestro caso, entre el epitelio y la lámina propia. Cumplen la función de mantenimiento estructural, cicatrización y reparación tisular. Además, regulan la función inmunitaria produciendo mediadores proinflamatorios en respuesta a un estímulo como puede ser la IL-1 β producida por células epiteliales y macrófagos. Esta citocina activa a los fibroblastos y les induce a liberar gran cantidad de

citocinas y quimiocinas como **MCP-1**, **IL-6** e **IL-8** y **VEGF** (Factor de crecimiento del endotelio vascular) promotoras de la infiltración celular. (23)

2.2. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO

Dentro de las células del sistema inmunitario podemos encontrarnos dos linajes dependiendo del fenotipo de la célula precursora: mieloide y linfoide. Una célula precursora mieloide puede diferenciarse en monocito, granulocito, mastocito, megacariocito o eritrocito, mientras que una célula precursora linfoide puede diferenciarse en linfocito T, B o NK (ver **Figura 4**).

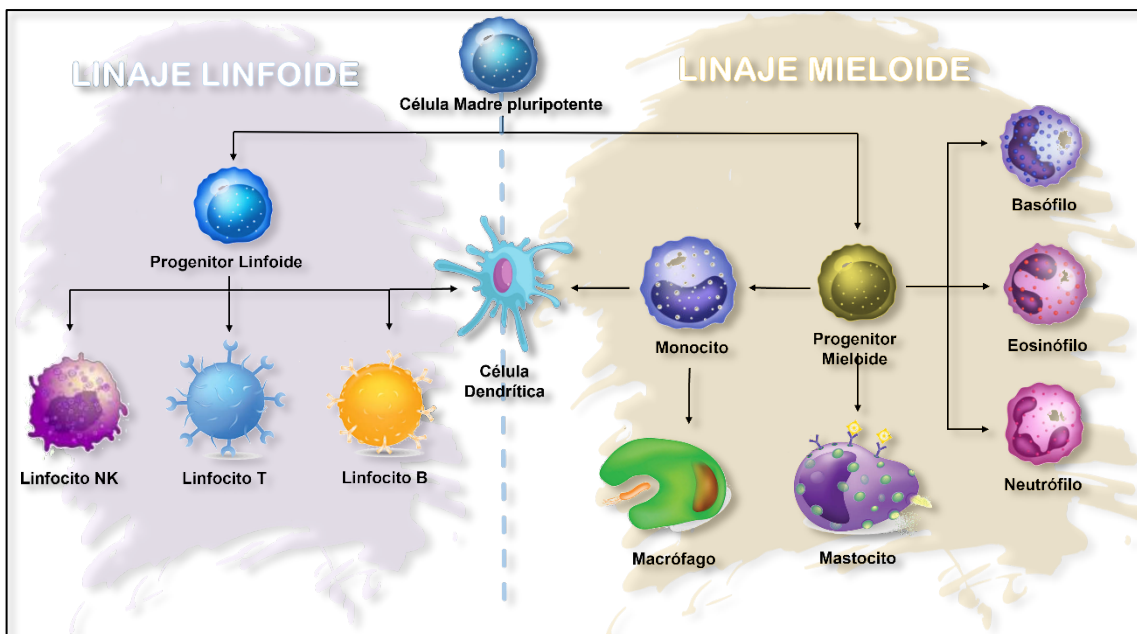


Figura 4. Diferenciación y subdivisiones de las principales células del sistema inmunitario, tanto mieloides como linfoides.

2.2.1. GRANULOCITOS

Neutrófilos. Los neutrófilos son células polimorfonucleares de corta duración y forman parte del sistema inmunitario innato, pero también participan en la inmunidad adaptativa a través de interacciones con células T y B. Tienen capacidad fagocítica e inmunorreguladora, son buenas secretoras de citocinas y recientemente se ha descubierto que juegan un papel importante como células presentadoras de antígeno en alergias mediadas por IgE. (24) Entre las moléculas que pueden liberar los neutrófilos se encuentran: **TNF- α** , **IL-1 β** , **IL-8**, **IP-10**, **MIP-1 α** , **MMP-9** y **VEGF**. (25)

Eosinófilos. Los eosinófilos también son células polimorfonucleares. Su crecimiento y diferenciación depende de ciertas citocinas, como son la IL-3, GM-CSF e IL-5, esta última conocida como factor de diferenciación de eosinófilos. Pueden expresar el receptor para la porción Fc de las inmunoglobulinas, siendo la IgA secretora la que se une con más fuerza, más incluso que la IgA sérica. Los eosinófilos tienen capacidad de colaborar como células presentadoras de antígeno y de liberar principalmente **Eotaxina** (quimioatrayente de eosinófilos), **RANTES**, y **MIP-1 α** y otras, relacionadas con la reparación del tejido como son **TGF- α** , **TGF- β 1**, **TNF- α** , **VEGF**, **IL-1**, **IL-6**, e **IL-8**. (26)

Basófilos. Los basófilos representan la tercera población de polimorfonucleares. Desarrollan un rol importante en las enfermedades alérgicas contribuyendo a las reacciones de hipersensibilidad y regulando la respuesta de Th2 a través de la expresión de IL-4. Citocinas como IL-3, IL-4, IL-13, IL-18, IL-33 y TSLP son los principales reguladores de los basófilos. Al igual que los neutrófilos, estas células también pueden asumir roles de presentación de antígeno. (21) Los basófilos son buenos productores de histamina, leucotrienos, **IL-1 β** , **IL-4**, **IL-5**, **IL-6**, **IL-8** e **IL-13**. (27)

2.2.2. MONOCITOS

Los monocitos tienen la capacidad de diferenciarse a distintos tipos de células con función fagocítica y/o de presentación de antígeno: Macrófagos y Células dendríticas.

Macrófagos. Los monocitos del torrente sanguíneo cuando llegan a cualquier tejido se diferencian en macrófagos. Estos macrófagos obtendrán una denominación diferente dependiendo del tejido en el que se encuentre: osteoclastos en los huesos, microglía en el sistema nervioso, histiocitos o células de Langerhans en el tejido conjuntivo y mucosas, etc. Los macrófagos son los fagocitos por excelencia, encargándose de eliminar microbios y células senescentes, promoviendo la homeostasis de los tejidos. Son capaces de liberar citocinas que ayudan a la diferenciación y regulación de los linfocitos: **IL-1 β** , **TNF- α** , **TGF- β 1**, **IL-6**, **IL-10**, **IL-12** e **IL-23**. (28,29)

Células Dendríticas (*Dendritic Cells*, DC). Los monocitos también pueden diferenciarse a célula dendrítica que, aunque también son fagocitos, su función principal es la de servir como células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen Presenting Cell*). Debido a su doble función, se dice que las Células Dendríticas están entre la inmunidad

innata (eliminando patógenos) y la inmunidad adaptativa (activando linfocitos T). Las células dendríticas pueden cambiar su fenotipo y su función biológica dependiendo de su localización en la mucosa, adaptándose al microambiente. Por ejemplo, las DC intraepiteliales son capaces de extender sus dendritas desde el epitelio hasta el lumen para capturar antígenos, y desempeñan funciones distintas a las DC que se encuentren en la lámina propia. Las DC pueden expresar **IL-6, IL-10, IFN- β y TGF- β** , y ayudar a la diferenciación y regulación de otras células. Se sabe que estas células inducen la diferenciación de los linfocitos T CD4 a Th2, Th3 o Treg, mientras que pueden inhibir a Th1. También pueden inducir el cambio de clase de los linfocitos B para producir IgA. (30)

2.2.3.MASTOCITOS

Los mastocitos son otro tipo de células de origen mieloide que toman gran importancia en las reacciones alérgicas e hipersensibilidad. Éstas expresan receptores de gran afinidad para IgE (Fc3RI), activando la liberación de mediadores de la inflamación como: **Histamina, proteoglicanos, proteasas, factores de crecimiento de fibroblastos, leucotrieno C4, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, GM-CSF y TNF- α** . La histamina tiene múltiples funciones: aumenta la vasodilatación y permeabilidad capilar, estimula la secreción mucosa, suprime la actividad de linfocitos citotóxicos y granulocitos, y regulan a las células endoteliales. Los mastocitos, por tanto, se encontrarán sobreexpresados en personas con enfermedades alérgicas o inflamatorias oculares como las conjuntivitis alérgicas o queratoconjuntivitis vernal y atópica. (31)

2.2.4.LINFOCITOS

Los linfocitos, a diferencia del resto de células del sistema inmunitario, desarrollan una defensa más específica y personalizada dependiendo del patógeno que haya que combatir. De este modo, estas células son capaces de optimizar los recursos celulares y moleculares del sistema inmunitario. Existen 3 grandes familias de linfocitos: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK (*Natural Killer*). Los linfocitos T y B pertenecen a la inmunidad adaptativa y poseen memoria, mientras que los NK pertenecen a la inmunidad innata. Estas tres familias de linfocitos pueden diferenciarse a otros subtipos, dotando a

estas “nuevas” células de unas características propias y unas funciones únicas frente a los patógenos. Toda la comunidad leucocitaria, incluyendo granulocitos, monocitos y linfocitos, expresan el marcador de membrana CD45 (panleucocitario).

2.2.4.1. LINFOCITOS T

Las células T se originan a partir de progenitores linfoides y pueden viajar desde la médula al timo para llevar a cabo su diferenciación, expresar el receptor TCR $\alpha\beta$ (característico de la sangre periférica) o $\gamma\delta$ (más frecuente en linfocitos intraepiteliales) y convirtiéndose en un Linfocito T virgen. El marcador de linaje diferencial de los linfocitos T es el CD3, y es único para estas células. Además de CD3, estas células pueden expresar, de modo exclusivo, el correceptor CD4 o CD8, y el marcador de superficie CD45RA, si son “vírgenes”, o CD45RO si son “memoria”, es decir, han tenido contacto con un antígeno y han sido activadas. (32)

Existen linfocitos T que son negativos para CD8 y CD4 y que expresan el receptor TCR $\alpha\beta$. Estas células, denominadas **MAIT** (*Mucosa-associated invariant T*), son más frecuentes en mucosas y se consideran familia de los linfocitos NKT. Recientemente se ha descubierto que estas células cumplen una labor esencial en la defensa frente a patógenos. Son consideradas como células de la inmunidad innata y pueden liberar gran variedad de citocinas como: **IFN- γ , TNF, IL-17 e IL-22**. (33)

A su vez los linfocitos CD4 pueden subdividirse en reguladores: Treg; o cooperadores: Th0, Th1, Th2, Th17/Th1, Th9, Th22. Ocurre lo mismo con los linfocitos T CD8 y su homología con esta clasificación. Así pues, estas células CD8+ podrán diferenciarse a reguladoras: Treg; o citotóxicas: Tc0, Tc1, Tc2, Tc9 o Tc22. (32,34,35)

Esta capacidad de polarización de los linfocitos T está mediada por factores de transcripción que pueden inducir la expresión de genes específicos de linaje o reprimir la expresión de genes asociados a linajes alternativos. Los linfocitos T indiferenciados expresan varios factores de transcripción, lo que les confiere de cierta plasticidad. Induciendo unos factores de transcripción y suprimiendo otros, un mismo precursor de linfocito T puede tomar diferentes vías de maduración y diferenciarse hacia distintos fenotipos linfoides. Existen diferentes factores de transcripción, siendo la expresión de cada uno característica de un subtipo concreto de linfocito Th o Tc (ver **Figura 5**): **T-bet**

(Th1/Tc1), GATA-3 (Th2/Tc2), PU.1 (Th9/Tc9), ROR- γ t (Th17/Tc17), AHR y/o FOXO4 (Th22) y Foxp3 (Tregs). (32,35)

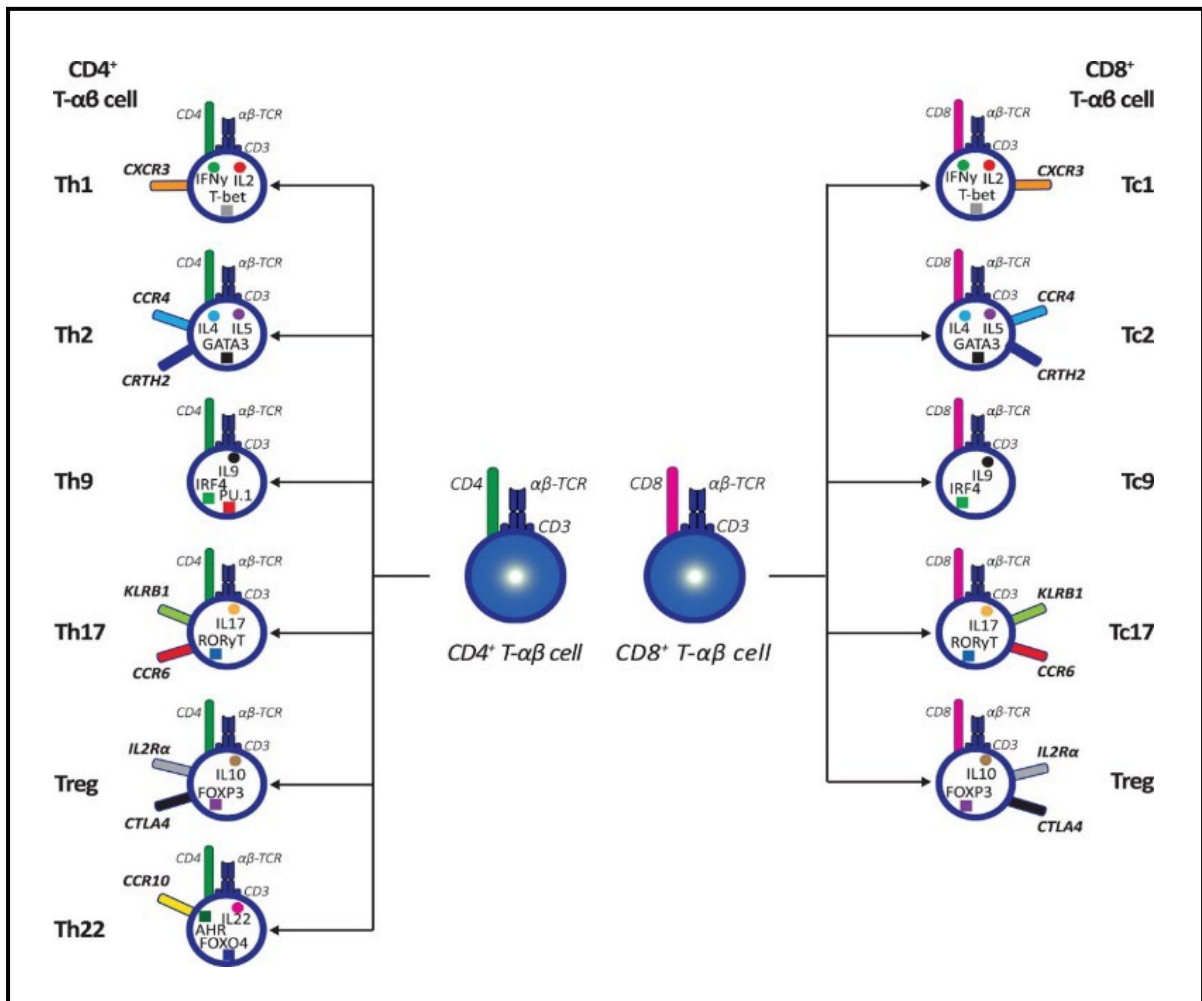


Figura 5. Diferenciación de los linfocitos T CD4 y CD8. Expresión de factores de transcripción, citocinas y marcadores de membrana característicos. Imagen extraída del artículo científico "Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry". (35)

Linfocitos T CD4.

Las funciones de estas células pueden ser muy variadas, llevando a cabo actividades efectoras, reguladoras o mediadoras del proceso inflamatorio. Estas funciones dependerán del fenotipo que desarrollen y de los estímulos que reciban de otras células o de las citocinas del ambiente. De este modo, los linfocitos CD4 pueden diferenciarse en linfocitos T reguladores (Treg) o en cualquiera de los subtipos de Th.

- **Linfocitos T reguladores (Tregs).**

Estas células, que se diferencian gracias a la presencia de **TGF- β** e **IL-2**, expresan grandes cantidades de CD25 en su membrana y bajas de CD127. Además, expresan **Foxp3** intracelular, un factor de transcripción que dota a estas células de su capacidad inhibitoria de la respuesta inmune. Los linfocitos Tregs desarrollan una de las funciones más importantes del proceso inflamatorio, ya que son las encargadas de poner fin a la respuesta inmunitaria, inhibiendo a los linfocitos T y otras células de la inmunidad innata. Por lo tanto, promueven la homeostasis, mantienen la tolerancia y controlan la respuesta inmunitaria. Esta función la pueden desarrollar mediante diversos mecanismos: la citólisis, la liberación de citocinas supresoras, la inhibición de las células dendríticas, o la competencia metabólica. Las citocinas principales liberadas por las Tregs son **IL-10, IL-35 y TGF- β** . La interleucina 10 es un potente inhibidor de los macrófagos y de las células T efectoras, siendo un buen inhibidor de la respuesta inmune frente a antígenos medioambientales en mucosas. La interleucina 35 fomenta la expansión y diferenciación a linfocitos T reguladores productores de IL-35. En cambio, TGF- β es esencial para la diferenciación de más células T reguladoras y es un potente inhibidor de células inflamatorias. Por otro lado, tanto IL-6 como IL-21 son capaces de inhibir la diferenciación de los Tregs y de promover el desarrollo de las Th17. De hecho, varios estudios han observado que existe cierta plasticidad de las células Tregs, que pueden cambiar su fenotipo a Th17. (36–38)

- **Linfocitos T cooperadores (Th).**

Las células Th cuentan con un amplio rango de diferenciación, siendo una de las poblaciones con más variabilidad del sistema inmunitario. Así mismo, dependiendo de su fenotipo, pueden desarrollar funciones muy heterogéneas. Los linfocitos Th pueden producir la mayoría de las citocinas que conocemos: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-24, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF. (34) Como hemos visto anteriormente, existen distintas subpoblaciones de linfocitos Th: Th0, Th1, Th2, Th9, Th17, Th17/Th1 y Th22.

- **Las Th0** o naïve son células T CD4⁺ que aún no han tenido contacto con un antígeno, se caracterizan por expresar CD45RA y CD127 en ausencia de CD25 y son las precursoras del resto de Th.
- **Las células Th1** se diferencian gracias a la presencia de **IL-12 e IFN- γ** y se encargan principalmente de la defensa frente a patógenos intracelulares, protozoos y bacterias. Además, son las responsables de la activación de los macrófagos a través de IFN- γ y regulan la producción de anticuerpos mediadores del proceso de opsonización y activación del complemento. Estas células también están relacionadas con enfermedades autoinmunes y se caracterizan por ser, principalmente, productoras de **IFN- γ , IL-2 y TNF- α** . (34)
- Por otro lado, **las células Th2** se diferencian gracias a la presencia de **IL-4 e IL-2** y son las encargadas de iniciar la inmunidad mediada por anticuerpos, activando la maduración de los linfocitos B para aumentar la producción de inmunoglobulinas. Además, son capaces de activar a los eosinófilos e inhibir a los macrófagos. Todo esto lo llevan a cabo mediante la liberación de un amplio repertorio de citocinas: **IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13**. Estas células están relacionadas con el desarrollo de enfermedades de origen alérgico, como el asma, y son una buena defensa contra parásitos extracelulares. (39) Varios estudios han indicado que las Th2 también tienen cierta plasticidad, pudiendo diferenciarse a Th9 en presencia de TGF- β e IL-4. (40)
- Las **Th9** están relacionadas con el desarrollo de enfermedades inflamatorias y de etiología atópica, promueven la inflamación y carecen de función inmunosupresora. Esta subpoblación produce, principalmente, **IL-9**, aunque también puede liberar otras moléculas como **IL-10 o IL-21**. La IL-9 regula las respuestas alérgicas y autoinmunes, y desarrolla, además, funciones antitumorales, antiparasitarias y de mantenimiento de la tolerancia inmunológica. (41,42)
- **Las células Th17** se diferencian gracias a la presencia de **TGF- β e IL-6** y juegan un papel muy importante en los procesos inflamatorios. Al igual que Th1, están directamente relacionadas con el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Son buenas defensoras frente a patógenos extracelulares y tienen cierta plasticidad, pudiendo cambiar hacia un fenotipo Th1 dependiendo de la

demanda inmunológica. Se caracterizan por ser buenas productoras de **IL-17A**, **IL-17E**, **IL-17F**, **IL-21** y **IL-22**. (43)

- Debido a esa plasticidad, recientemente se ha hallado una subpoblación de linfocitos Th positiva para **IL-17** e **IFN- γ** , llamada **Th17/Th1**. Estas células sobre todo se han encontrado en tejidos inflamados y enfermedades inflamatorias crónicas. Estas células logran diferenciarse en entornos con concentraciones altas de IL-12. (44)
- Por último, los linfocitos **Th22** se diferencian gracias a la presencia de **TNF- α** e **IL-6** y se caracterizan por ser principalmente productores de **IL-22** y no de IL-17, aunque también pueden liberar IL-13 y TNF- β . Estas células son más abundantes en tejidos que en sangre y expresan CCR4 (CD194) y CCR10 en su membrana, entre otras. Moderan a las células epiteliales y a los queratinocitos, y están relacionadas con la homeostasis y la inflamación en la piel y mucosas. (42,45)

El proceso de diferenciación, las citocinas involucradas y los marcadores de superficie de los linfocitos Th se resumen en la **Figura 6**.

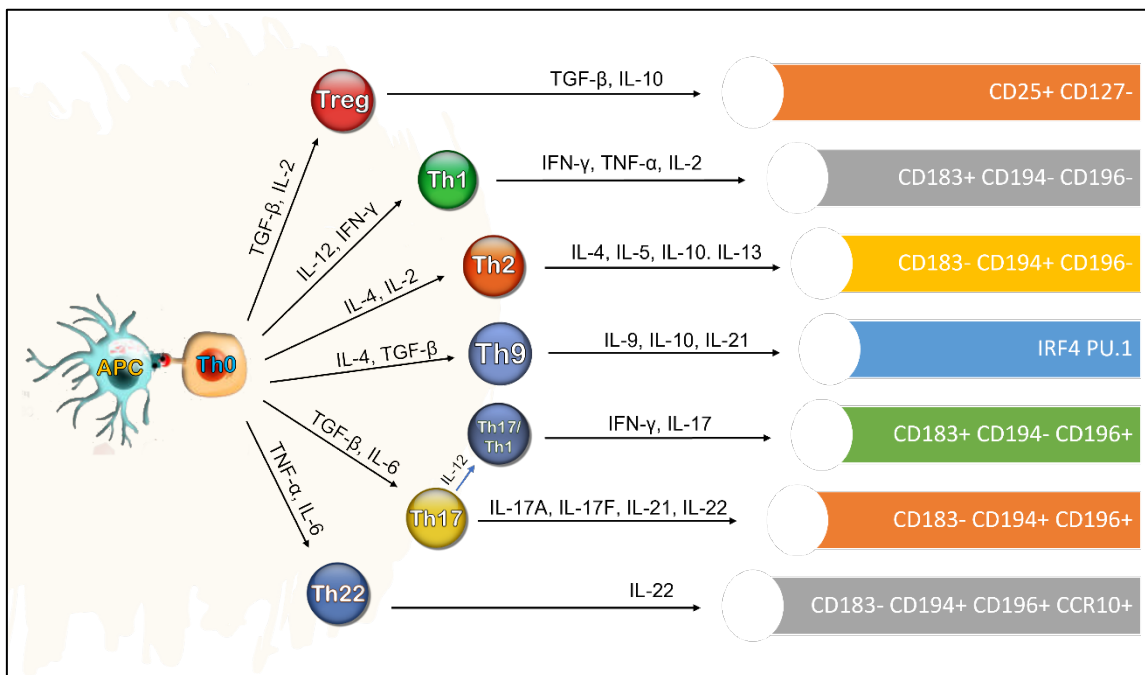


Figura 6. Diferenciación de las células CD4+ a linfocitos T reguladores o cooperadores a partir del contacto de una célula presentadora de antígeno y una célula T CD4+ virgen (Th0). En la parte izquierda pueden verse las citocinas que necesita Th0 para culminar la diferenciación y en la parte central, las citocinas que pueden producir una vez se han diferenciado. En la parte derecha podemos ver los marcadores celulares diferenciales para cada fenotipo.

Linfocitos T CD8.

Los linfocitos TCD8 juegan un papel importante en la defensa frente a patógenos intracelulares y tumores. Además, contribuyen a la regulación de los procesos patológicos como las enfermedades alérgicas o autoinmunes. Las células CD8 vírgenes se activan al reconocer el antígeno presentado por las APC en los órganos linfáticos. Como el receptor MHC de clase I que reconocen las células CD8 lo expresan la gran mayoría de células nucleadas, estas células pueden activarse con casi cualquier célula del cuerpo. La mayoría de los linfocitos CD8 mueren por apoptosis al finalizar la respuesta primaria, pero hay una pequeña proporción de ellas que se diferencian a linfocitos T CD8 memoria, con una gran capacidad proliferativa y efectora.(46)

Existen varios tipos de linfocitos T CD8 memoria o citotóxicos: Tc1, Tc2, Tc9, Tc17 y Treg.

- Los **linfocitos Tc1** son capaces de liberar moléculas citotóxicas como granzimas y perforinas, produciendo la muerte a células potencialmente dañinas, e **IFN- γ** y **TNF- α** que aceleran la respuesta inmune y adaptativa contra patógenos intracelulares. Las Tc1 llegan a este estado de diferenciación gracias a la presencia de IL-2 e IL-12.
- Los **linfocitos Tc2**, en cambio, necesitan IL-4 para llegar a este estado de maduración. Estas células, homologas de Th2, puede liberar **IL-4, IL-5 e IL-13** y están relacionadas con los procesos inflamatorios (alergia, artritis...), pudiendo llegar a exacerbar la enfermedad.
- Las células **Tc9** son productoras de **IL-9 e IL-10** y tienen función antitumoral y mediadora de la alergia. Necesitan tanto TGF- β como IL-4 para llegar a su estado de diferenciación.
- Por otro lado, los **linfocitos Tc17**, que se diferencian en presencia de IL-6 o IL-21 y TGF- β , son buenos productores de **IL-17 e IL-21**, y se encargan de la defensa antitumoral y contra las infecciones víricas.
- Por último, los **linfocitos CD8 Treg**, al igual que sus homólogos CD4, son buenos productores de TGF- β e IL-10. Estas células regulan las respuestas mediadas por linfocitos T.

Otra característica de los linfocitos T citotóxicos que se suma a la homología Th/Tc es la plasticidad de estas células que tienen la capacidad de adquirir cualidades de otros subtipos de Tc. (47)

Linfocitos NKT

Estas células, como su propio nombre indica, se caracterizan por coexpresar el receptor de los linfocitos T (TCR $\alpha\beta$) y de los NK (CD161). Estas células, aunque desempeñan funciones muy diversas pertenecen principalmente a la inmunidad innata, pudiendo liberar perforinas y granzimas. Las NKT, al contrario que las células T convencionales, reconocen moléculas presentadas por CD1d. Estas células pueden liberar una amplia gama de citocinas como: **IFN- γ o IL-4**. Dentro de las NKT encontramos el subtipo mNKT o MAIT ya mencionado anteriormente. También encontramos los $\gamma\delta$ NKT, otro subtipo celular característico de las mucosas que en sangre periférica se encuentra en torno al 5%, mientras que en las mucosas puede tener valores de hasta el 50%.

Entre las funciones de los linfocitos NKT está su poder inmunorregulador frente a las infecciones, tumores, la autoinmunidad o mantenimiento de la tolerancia. Además de las ya vistas, estas células pueden llegar a producir citocinas propias de las Th o Tregs como **IL-5, IL-10, IL-17, IL-22, TNF- α** . (48) Por último, recientemente se ha descubierto que los NKT están en contacto directo con la microbiota comensal y pueden mediar su actividad de un modo recíproco. (49)

2.2.4.2. LINFOCITOS ILC (INNATE LYMPHOID CELLS)

Estas células se caracterizan por pertenecer a la familia de los linfocitos, pero no tener marcador de linaje ni B ni T. Existen tres grupos de ILCs dependiendo del patrón de citocinas que producen: ILC1, ILC2 e ILC3. En este caso, como ocurre entre linfocitos Th y Tc, también existe cierta homología con los linfocitos T cooperadores. (50)

Las células ILC1 tiene función antibacteriana y son buenas productoras de **IFN- γ e IL-17**. En este grupo se encuentran los linfocitos NK, aunque algunos autores defienden que pertenecen a un grupo distinto de ILC homólogo a los linfocitos T CD8⁺.(51) Las ILC2 producen **IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13** y se asemejan funcionalmente a las Th2. En cambio, ILC3 se asemejan a las Th17, produciendo **IL-17A, IL-22, y TNF- α** .

Linfocitos NK. Entre las principales funciones de estos linfocitos están: la citotoxicidad frente a células infectadas no inmunizadas y tumores, la citotoxicidad mediada por anticuerpos y, la producción de citocinas y quimiocinas para la inmunidad innata y adaptativa. Los linfocitos NK se caracterizan por ser CD3-CD56+. Existen varios subtipos de linfocitos NK dependiendo de la expresión de CD56 y CD16 (ver **Figura 7**).

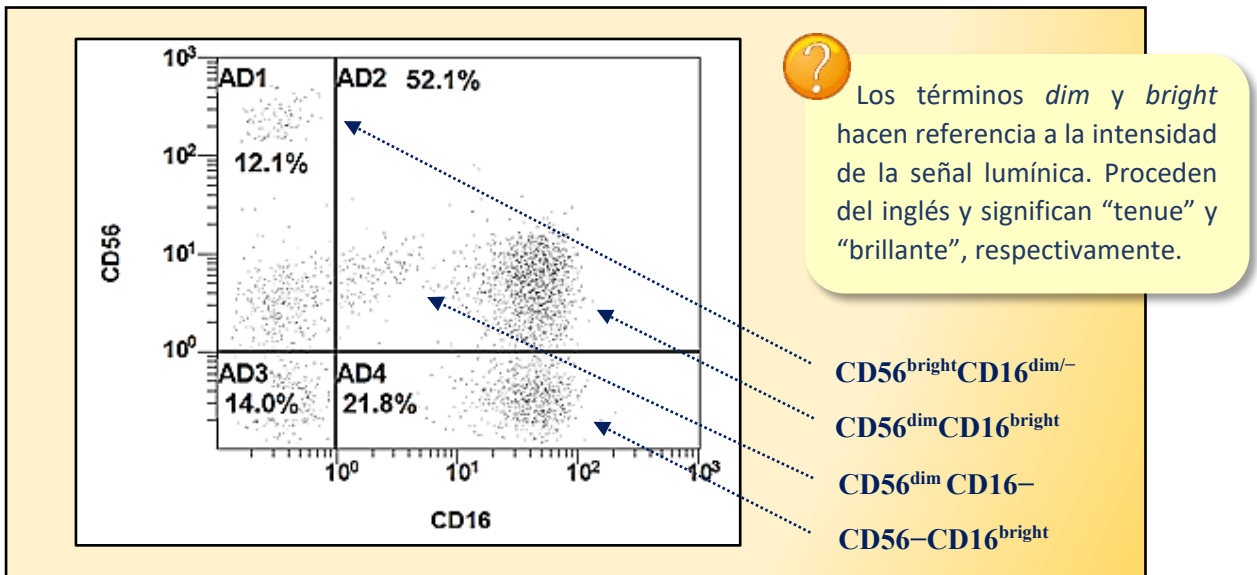


Figura 7. Subpoblaciones de NK (CD3-) que existen dependiendo de su expresión de CD56 y CD16.

En sangre periférica la población de linfocitos NK más abundante es la CD56^{dim}CD16^{bright}, que representa en torno al 90% de los NK, y tiene una mayor función citotóxica. Por otro lado, tenemos los NK CD56^{bright}CD16^{dim/-} caracterizados por ser buenos productores de citocinas y ser consideradas precursoras de las CD56^{dim}CD16^{bright}. Por último, en sangre periférica también pueden encontrarse linfocitos NK CD56^{dim}CD16⁻ y CD56⁻CD16^{bright}. (52)

2.2.4.3. LINFOCITOS B

Los linfocitos B se encargan principalmente de producir anticuerpos (inmunoglobulinas), que son la herramienta efectora principal de la inmunidad humoral adaptativa contra una ilimitada variedad de antígenos. Estas células necesitan interactuar con los linfocitos T (Th2) para activarse y poder diferenciarse. Pueden actuar como células productoras de inmunoglobulinas o presentadoras de antígeno. Los linfocitos B se caracterizan por expresar el correceptor CD19. Existen dos subtipos de células B atendiendo a la coexpresión de CD5: linfocitos B1 (CD5+) y linfocitos B2 (CD5-). Las

células B1 se encuentran en los folículos linfoides y son consideradas de la inmunidad innata ya que ejercen una respuesta rápida. Producen anticuerpos de baja afinidad (fundamentalmente IgM) y su activación es T-independiente, por lo que no cambian de clase ni generan memoria. En cambio, las células B2 se caracterizan por producir anticuerpos de gran afinidad y especificidad y activarse de manera T-dependiente. (53,54)

3. LA GLÁNDULA LACRIMAL

La importancia de la glándula lacrimal no se debe solamente a su capacidad de producir la capa acuosa de la lágrima. La glándula lacrimal, y por lo tanto la lágrima, es la principal fuente de IgA soluble, encargada de la defensa humoral de la superficie ocular.

Por lo tanto, el sistema inmunitario de la glándula lacrimal está formado principalmente por células plasmáticas productoras de IgA (en torno al 50%). El resto lo forman linfocitos T (mayoritariamente CD8), B y NK, monocitos, macrófagos y células dendríticas. La IgA polimérica y la cadena J es producida por las células plasmáticas, pero necesita atravesar la célula epitelial mediante transcitosis para que se forme y libere la IgA soluble dimérica. (55)

Por otro lado, las células acinares de la glándula lacrimal vierten a la lágrima grandes cantidades de lisozima y lactoferrina. El contenido molecular de la lágrima tiene diversos orígenes derivados de: las glándulas lacrimales y accesorias, los tejidos de la superficie ocular y las células proinflamatorias del sistema inmunitario tanto locales como reclutadas por diversos mecanismos biológicos. (56)

3.1. LA PELÍCULA LACRIMAL

La película lacrimal desarrolla funciones de vital importancia tanto en la defensa de frente a patógenos como en el mantenimiento de la integridad de la superficie ocular, su lubricación y conservación de las propiedades ópticas. Estas funciones dependen totalmente de la propia estructura y composición de la película lacrimal. Cualquier desequilibrio en la lágrima puede producir que ésta pierda la estabilidad, la tonicidad y, por lo tanto, su funcionalidad. La lágrima está formada por tres capas diferenciadas: Una **capa mucosa** producida por las células caliciformes y epiteliales, con función lubricante, y que está en contacto

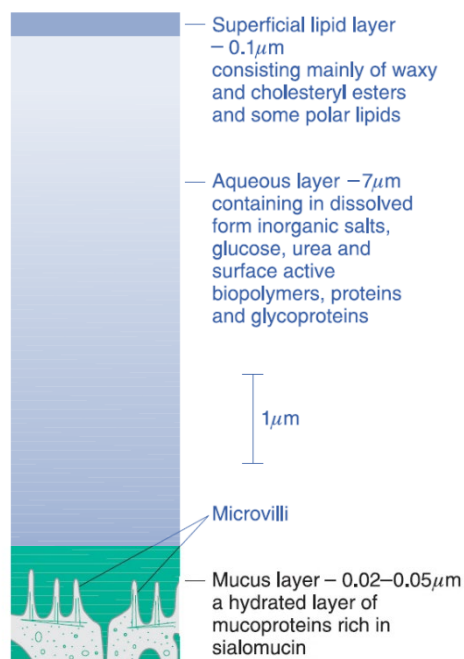


Figura 8. Modelo de 3 Capas de la película lacrimal. Imagen extraída de "The tear film: structure, function, and clinical examination". (57)

directo con la superficie epitelial. Una **capa central acuosa** abundante en factores solubles como inmunoglobulinas, lisozimas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, entre otras. Una **capa lipídica** (la más superficial) producida por las glándulas de meibomio y encargada de que la parte acuosa no se evapore fácilmente. (55)

Dentro de la capa acuosa se han identificado hasta 500 tipos de proteínas procedentes de las glándulas lacrimales y lacrimales accesorias: como la IgA, IgE, IgM, iones, lisozima, lactoferrina, peroxidasa, albúmina, péptidos y vitaminas; y otras procedentes principalmente de células de la superficie ocular (conjuntiva bulbar y tarsal mayormente): como desechos celulares, mucus, metabolitos, mediadores inflamatorios, citocinas y quimiocinas.

El primer modelo de la lágrima que surgió fue el modelo de 3 capas (**Figura 8**) pero actualmente se mantiene el modelo de 6 capas donde la capa acuosa se encuentra entre dos capas mucosas y tiene un espesor similar al resto. (57)

La producción de lágrima puede estar estimulada por varios factores: ambientales, infecciosos, hormonales o nerviosos y en cada caso, su composición molecular puede variar. La calidad de la lágrima puede disminuir por varios factores. La edad, una mayor osmolaridad o producción de grasa, deficiencias en el parpadeo o las glándulas lacrimales, enfermedades asociadas o la toma de medicamentos provocarán que la lágrima se evapore más rápido.

3.2. PRINCIPALES FACTORES SOLUBLES DE LA LÁGRIMA

3.2.1. CITOCINAS

Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares. Actúan principalmente como reguladoras de la respuesta inflamatoria e inmunitaria y son el puente de comunicación intercelular. Pueden actuar sobre las células de modo autocrino, retrocrino, paracrino o yuxtacrino. Abarcan numerosas funciones, pudiendo actuar como factores de crecimiento, diferenciación, atracción y muerte celular. Además, tienen la capacidad de inducir o inhibir la producción de más citocinas, promoviendo respuestas de tipo pro- o anti-inflamatorias. Dentro de las citocinas podemos encontrar varios tipos: **interleucinas, factores de necrosis tumoral, interferones y quimiocinas.** (ver **Figura 9**).

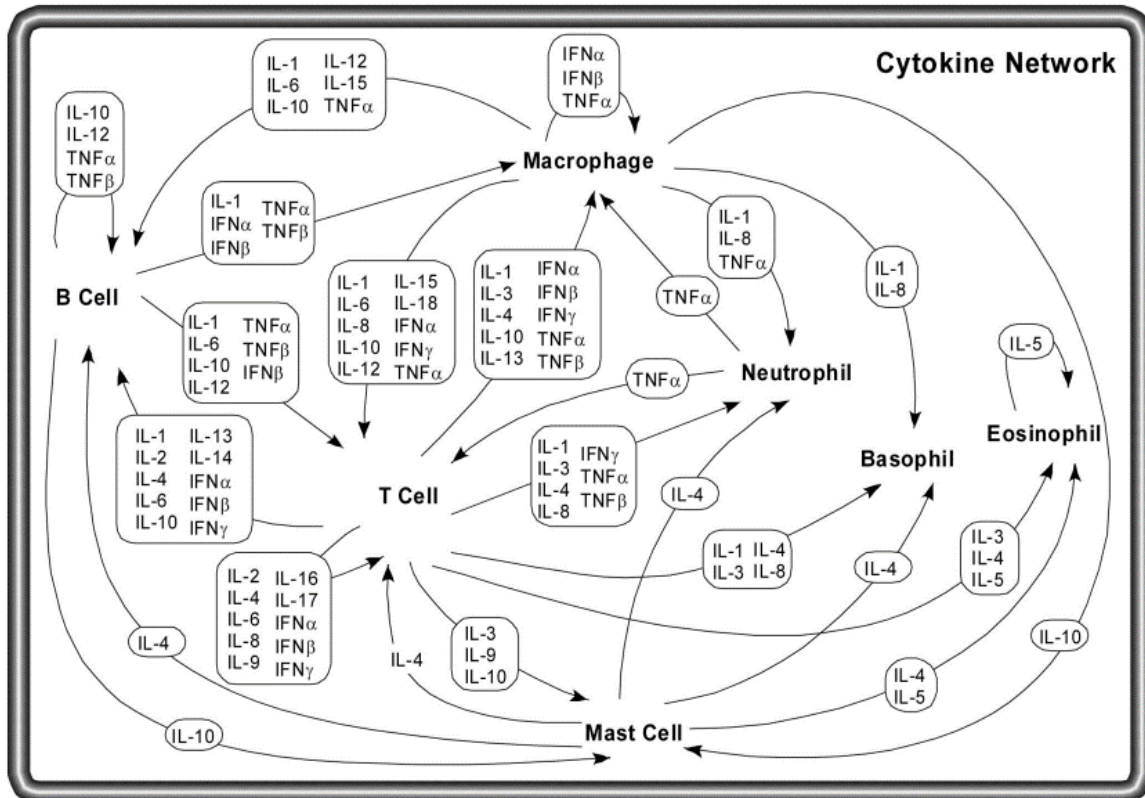


Figura 9. Red de citocinas: principales productores y receptores celulares. Imagen extraída del artículo “Cytokines, inflammation and pain”. (59). IL=interleucina, TNF=factor de necrosis tumoral, IFN=interferón.

3.2.1.1. Interleucinas (IL)

Las interleucinas son un conjunto de proteínas de bajo peso molecular y son el principal medio de comunicación de los linfocitos. Intervienen en la mayoría de los procesos celulares regulando y activando la diferenciación celular, la secreción de anticuerpos y la quimiotaxis.

- **Interleucina-1.** Cuenta con dos isoformas: la IL-1 α que actúa intracelularmente y la IL-1 β , la más abundante y que es producida principalmente por monocitos y macrófagos, aunque también pueden producirla fibroblastos y células endoteliales cuando existe una agresión. Su función es potencialmente proinflamatoria y es esencial para la defensa frente a infecciones y lesiones. (58,59)
- **Interleucina-2.** Es la encargada de promover la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, B y NK. También favorece la diferenciación de los monocitos a células dendríticas. Es capaz de inhibir el crecimiento de linfocitos T, programando su apoptosis. Además, es capaz de regular la función de los

linfocitos Treg, promoviendo la homeostasis y la auto-tolerancia. Es producida por linfocitos T (Th principalmente), NK, NKT, células dendríticas, mastocitos e incluso, células epiteliales. (60)

- **Interleucina-4.** Es producida principalmente por células T activadas, pero también por mastocitos, basófilos y eosinófilos. Es la citocina característica de los linfocitos Th2 y es capaz de regular la proliferación, apoptosis y expresión de genes en linfocitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales. (61) La función más importante de la IL-4 es la regulación de la producción de anticuerpos por parte de las células B, la hematopoyesis e inflamación y el desarrollo de respuestas de células T efectoras. La IL-4 está relacionada con el desarrollo de enfermedades atópicas como el asma o la dermatitis atópica. (62)
- **Interleucina-5.** La producen principalmente los linfocitos Th2 y mastocitos. Es una de las principales mediadoras de la inflamación en enfermedades principalmente, cuya defensa depende principalmente de los eosinófilos. La IL-5, además de regular a los linfocitos B, promueve el reclutamiento, la supervivencia, la maduración y diferenciación, la proliferación, la activación y la degranulación de los eosinófilos. Por lo que, la sobreexpresión de esta citocina puede tener efectos adversos y producir eosinofilia (niveles patológicos de eosinófilos) (63)
- **Interleucina-6.** Es secretada por macrófagos, linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos, y contribuye en la defensa del huésped estimulando la inflamación de la fase aguda, la hematopoyesis y las reacciones inmunológicas. Una sobreexpresión de IL-6 puede producir una inflamación crónica y alteraciones autoinmunes. Además, promueve la diferenciación de varios tipos celulares, estimulando la producción de anticuerpos, el desarrollo de linfocitos T efectoras, y el desarrollo y diferenciación de muchas células no-inmunitarias. La IL-6 es una de las moléculas que permite la diferenciación de las células Th17 e inhibe la diferenciación a célula Treg. (64)
- **Interleucina-8.** Es una citocina quimioatrayente de granulocitos, principalmente neutrófilos. Pertenece a la familia de las quimiocinas y también es llamada CXCL-8. Es secretada por fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y células dendríticas. (65)

- **Interleucina-9.** Pueden secretarla mastocitos, linfocitos NKT, Th2, Th17, Treg, ILC2 y Th9, siendo estas últimas las mayores productoras. Está estrechamente relacionadas con enfermedades respiratorias y alérgicas. Entre sus funciones destacan la activación y proliferación de mastocitos, eosinófilos y linfocitos Th17, la inducción de producción de mucus por parte de las células caliciformes, el incremento de producción de IgG1 e IgE por parte de las células B, y la inmunidad frente a parásitos y cáncer. (66)
- **Interleucina-10.** Es una citocina inhibidora y antiinflamatoria. Es producida por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos NK, B, T CD8 y T CD4, siendo las células Tregs las mayores productoras. Inhibe la actividad de Th1, NK y macrófagos, bloqueando la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α y quimiocinas como MCP-1, RANTES e IL-8. La interleucina-10 puede inhibir directamente la proliferación de las células T CD4 y la liberación de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 y TNF- α . (67)
- **Interleucina-12.** La producen macrófagos, monocitos, células dendríticas, granulocitos y linfocitos B. Las principales dianas para esta citocina son los linfocitos T y NK. En el caso de los linfocitos T, la IL-12 promueve la diferenciación de Th0 a Th1 e impide la diferenciación a Th2. Además, tiene propiedades proinflamatorias y es estimulante de la producción de IFN- γ y TNF- α . La IL-12 está compuesta por las subunidades p40 y p35 que al combinarse forman la IL-12p70 bioactivada (68).
- **Interleucina-13.** Lo producen los linfocitos T activados (principalmente Th2), NK, mastocitos, basófilos y células dendríticas. La IL-13 junto con la IL-4 tienen funciones inmunomoduladoras de macrófagos, NK, fibroblastos, eosinófilos y células endoteliales. Tienen actividad inmunosupresora y antiinflamatoria, bloqueando la liberación de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , eotaxina y RANTES. Además, estimula la diferenciación de los linfocitos B e inhibe a Th1. (69)
- **Interleucina-17.** La familia de citocinas IL-17 se compone de 6 miembros nombrados con letras de la A a la F. Están relacionadas con enfermedades

inflamatorias y autoinmunes. IL-17 es producida por linfocitos Th17, Tc17, linfocitos T $\gamma\delta$, NKT, e ILC3. La IL-17E (IL-25) es producida por Th17 y células presentadoras de antígeno, e induce la expresión de IL-4, IL-5, IL-13 y TSLP, asociadas con la inmunidad de tipo II. La IL-25 también promueve la secreción de mucus e inhibe la autoinmunidad mediada por las Th17. La IL-17F está relacionada con la defensa de las mucosas y contribuye en las respuestas inflamatorias. En cambio, la IL-17A tiene funciones protectoras y participa en los procesos de autoinmunidad e inflamación (70)

- **Interleucina-21.** La producen los linfocitos T CD4, principalmente Th foliculares y Th17, y también NKT y linfocitos T $\gamma\delta$. La IL-21 regula las respuestas inmunológicas y está asociada con la inflamación y la autoinmunidad. Juega un papel importante en la diferenciación de las células B, induciendo su proliferación y diferenciación a células plasmáticas o programando su apoptosis, dependiendo de las señales coestimuladoras que reciban del entorno. (71,72)
- **Interleucina-22.** Es producida por linfocitos T activados como T $\gamma\delta$, ILC, NK, NKT, Th1 y especialmente Th17 y Th22. Entre sus funciones destacan la moderación de la proliferación y supervivencia celular y la regeneración de heridas de la piel. También es capaz de inducir la producción de péptidos antibacterianos, de mantener la homeostasis de la microbiota, protegiéndola contra patógenos, y la integridad del epitelio intestinal. (73).

3.2.1.2. Factores de necrosis tumoral (TNF).

Son un grupo de citocinas que intervienen en la inflamación, necrosis y apoptosis, principalmente. Actualmente existen 19 miembros de la superfamilia de los TNF pero el más importante es el TNF- α .

- **TNF- α .** Es una citocina con gran importancia en la inmunidad innata ya que es la encargada de proveer una defensa inmediata frente a organismos invasores antes de activar a la inmunidad adaptativa. Lo producen principalmente macrófagos activados una vez han contactado con el antígeno. Es capaz de estimular la liberación de histamina de los mastocitos y de citocinas por parte de los linfocitos T. También produce quimioatracción de neutrófilos y eosinófilos y facilita la

infiltración de linfocitos, favoreciendo la expresión de moléculas de adhesión en las células epiteliales. (74)

3.2.1.3. Interferones (IFN)

Los interferones son un grupo de citocinas con una gran capacidad de protección ante las infecciones. Son capaces de activar diversas células del sistema inmunitario como las NK o los macrófagos. Pueden dividirse en 3 clases: tipo I, II y III. En este apartado hablaremos de los interferones de tipo II, en el que se encuentra el IFN- γ .

- **Interferón- γ (IFN- γ).** Es producida por linfocitos T CD4, CD8, NK, NKT, B y células presentadoras de antígeno. La síntesis y liberación de IFN- γ está inducida por IL-12 e IL-18. El interferón-gamma es el mayor productor de linfocitos Th1. También induce la producción de IL-12 por parte de los fagocitos e inhibe la secreción de IL-4 de las Th2. Regula la inmunidad innata y adaptativa ante infecciones víricas, y es capaz de activar e inhibir el crecimiento celular. (75)

3.2.1.4. Quimiocinas

Son moléculas de bajo peso molecular encargadas principalmente de activar, atraer y dirigir hacia lugares de lesión o infección a las células del sistema inmunitario. Se clasifican, en función de la secuencia de cisteínas, en 4 grandes grupos: CC o alfa, CXC o beta, C o gamma, y CX₃C o delta.

- **Eotaxina.** Es la quimiocina encargada del reclutamiento selectivo de los eosinófilos durante las reacciones alérgicas, aunque también puede reclutar linfocitos Th2, basófilos y timocitos. Sus funciones están relacionadas con una respuesta de tipo Th2. La eotaxina la pueden producir multitud de células como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, eosinófilos y linfocitos. EL TNF- α y la IL-4 son capaces de estimular la transcripción de la eotaxina. (76,77)
- **Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1 (MCP-1).** Es una quimiocina producida por células endoteliales y epiteliales, fibroblastos y monocitos, entre otras. Regula la migración e infiltración de monocitos, linfocitos T memoria y NK. (78)

- **RANTES (CCL5).** Es una quimiocina que induce la infiltración de leucocitos a zonas de inflamación. Puede actuar sobre linfocitos T, monocitos, basófilos, eosinófilos, NK, células dendríticas y mastocitos. Es producida principalmente por linfocitos T CD8+, células epiteliales, fibroblastos y plaquetas. Su presencia está asociada con numerosas enfermedades inflamatorias como asma, dermatitis atópica, artrosis y un largo etcétera. Además, cumple roles importantes en la respuesta inmune contra infecciones víricas. (79)

3.2.1.5. Otras citocinas

Linfopoyetina Estromal Tímica (TSLP). Es una citocina de la familia de la IL-2 capaz de estimular el desarrollo de los linfocitos T y B, y activar a células dendríticas, mastocitos y linfocitos T. Principalmente lo producen células endoteliales, queratinocitos y células estromales, aunque recientemente se ha demostrado que también puede sintetizarla las células dendríticas y los mastocitos. Linfocitos T CD4, CD8, B, NKT, mastocitos, granulocitos y células dendríticas son capaces de responder ante el estímulo de TSLP, la cual está relacionada con enfermedades inflamatorias como la dermatitis atópica o el asma. (80,81)

3.2.2. INMUNOGLOBULINAS

Inmunoglobulinas (Ig). Aunque todos los isotipos de Ig están presentes en las secreciones, las concentraciones de cada una pueden variar en comparación a los niveles encontrados en plasma sanguíneo. Las Ig pueden encontrarse en forma soluble o ancladas a la membrana de un linfocito B. Tanto IgA como IgM pueden formar polímeros cuando son secretadas. La IgA soluble (dimérica) es la isoforma más frecuente en tejidos mucosos, saliva y lágrima. La función de las inmunoglobulinas consiste, a grandes rasgos, en evitar la absorción de antígenos a través de la mucosa. Las Ig neutralizan la actividad biológica de antígenos como los virus y bacterias para su posterior eliminación. Las inmunoglobulinas también actúan como inductoras de la activación del complemento por la vía clásica. La IgE está involucrada de forma directa con las respuestas alérgicas y es capaz de activar la citólisis celular dependiente de anticuerpo e iniciar la inflamación mediada por basófilos y mastocitos. (82)

3.2.3. FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE (TGF)

Factor de Crecimiento Transformante (TGF- β). Es una molécula pleiotrópica producida por linfocitos Tregs y células epiteliales, principalmente. Desarrolla esencialmente funciones como inhibidor de linfocitos T y mediador en las señales y respuestas para la reparación de los tejidos. Tiene funciones tanto pro- como anti-inflamatorias y, además participa en control del crecimiento y desarrollo celular, y en la angiogénesis. Tiene tres isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. (83,84)

3.2.4. METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Metaloproteinasas de Matriz (MMP). Las metaloproteinasas se encargan de degradar todos los componentes de la matriz extracelular. Son enzimas implicadas en diversos procesos patológicos como el desarrollo de la inflamación, la angiogénesis, el cáncer y la cicatrización. Son sintetizadas principalmente por células del tejido conectivo, granulocitos y macrófagos. La **MMP-9** juega un papel importante en la migración de células inflamatorias a través de la membrana basal como los eosinófilos durante la inflamación alérgica. (85)

Tabla 1. Resumen de los factores solubles, sus principales productores y funciones. T, B, NK y NKT hacen referencia a los linfocitos. Mn=monocitos, Gr=granulocitos, Ms=mastocitos, Ep=Epiteliales, Fb, Fibroblastos, En=endoteliales y Ot=otras.

Resp.	Molécula	T	B	NK	NKT	Mn	Gr	Ms	Ep	Fb	En	Ot.	Funciones
Th1	IL-2	✓		✓	✓	✓		✓	✓				Diferenciación T, B, NK, Tc y monocitos.
	IFN - γ	✓	✓	✓	✓	✓							Promueve Th1, Inhibe Th2, activa macrófagos.
	TNF- α	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓				Quimioatracción, \uparrow liberación histamina y citocinas.
Th2	IL-4	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		Difer. Th2, B, endotelio, fibroblastos y \uparrow síntesis IgE.
	IL-5	✓		✓	✓		✓	✓					Difer. eosinófilos, proliferación B y \uparrow secreción IgA.
	IL-13	✓		✓			✓	✓					Activan B, \uparrow síntesis IgE. inhiben IL proinflamatorias.
Th9	IL-9	✓		✓	✓			✓					Activan mastocitos y T, \uparrow síntesis Ig y mucus.
Th17	IL-17	✓		✓	✓	✓							Inflamación, protección y \uparrow síntesis citocinas.
	IL-21	✓			✓								Diferenciación de B a células plasmáticas.
Th22	IL-22	✓		✓	✓								Regeneración y regulación de la microbiota.
Treg	IL-10	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓				Activan B, inhiben T e IL proinflamatorias.
	TGF- β	✓				✓	✓		✓			✓	Inhibe T, promueve la cicatrización, angiogénesis.
B	IgA		✓										Neutralización, inmunidad de la mucosa.
	IgE		✓										Neutralización, inflamación mediada por mastocitos.
CD8	RANTES	✓					✓		✓	✓		✓	Quimioatracción.
Mn., gr. y otras	IL-1 β					✓	✓			✓	✓		Activa T, B y \uparrow síntesis IL-4.
	IL-6	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		Diferenciación células Plasmáticas, \uparrow síntesis Ig.
	IL-8					✓	✓		✓	✓	✓		Quimioatracción de granulocitos.
	IL-12		✓			✓	✓						Estimula Th1 y síntesis de IFN- γ .
	MCP-1					✓			✓	✓	✓		Quimioatracción.
	MMP-9					✓	✓					✓	Degradación matriz, angiogénesis, cicatrización.
	Eotaxina						✓		✓	✓	✓		Reclutamiento eosinófilos y Th2.
TSLP					✓		✓	✓	✓	✓		Diferenciación T, B y monocitos.	

4. LA MICROBIOTA COMENSAL

Numerosos microorganismos residen en la superficie ocular, como hongos, bacterias, virus y parásitos. Muchas de estas especies están implicadas en patologías oculares como queratitis, uveítis o conjuntivitis, pero otras muchas, pertenecientes a la flora normal del ojo, ayudan a mantener la homeostasis y habitan en continua comunicación con el sistema inmunitario del huésped. (86) No obstante, se desconoce de qué modo la microbiota ocular es capaz de sobrevivir en un ambiente donde la lágrima, que además de estar en constante renovación, contiene altos niveles de moléculas microbicidas. (87)

La flora ocular, al estar más expuesta que otras mucosas, se caracteriza por incluir una gran diversidad microbiana, tanto bacteriana como fúngica. Principalmente, está colonizada por especies bacterianas encontradas comúnmente en el aire, como son los estafilococos (*Staphylococcus aureus*), corinebacterias (*Corynebacterium*) y *Propionibacterium*, y por especies fúngicas como *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.*, *Candida albicans* y *Malassezia sp.*

. Esto quiere decir que las características de la flora ocular dependerán directamente de las características ambientales, la zona regional y otros factores como: la higiene ocular, contaminación, humedad, pólenes, polvo, uso de lentillas...

Se ha demostrado que sobre todo las células de la inmunidad innata, como linfocitos NKT y TCR $\gamma\delta$, mantienen un contacto directo con la microbiota ocular. Esta comunicación es bidireccional, por lo que existe un intercambio constante de metabolitos entre microbiota y sistema inmunitario. Por ejemplo, en mucosa intestinal se ha demostrado que la presencia y función de la microbiota es fundamental para el desarrollo y diferenciación de los linfocitos Th17 y Treg. (88,89)

La capa superficial de epitelio es selectiva, lo que quiere decir que puede discriminar entre microorganismos patogénicos y no-patogénicos, desarrollando tolerancia para la microbiota comensal y respondiendo con citocinas proinflamatorias ante agentes dañinos. Esta tolerancia está regulada principalmente por el sistema inmunitario innato, que discrimina mediante receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) los patrones MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*) y PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) de la flora ocular.

La microbiota ocular también colabora en el mantenimiento de la homeostasis evitando la colonización de otras especies microbianas. Cualquier sobrecolonización o

disbiosis de la superficie ocular puede conducir a un estado proinflamatorio, por lo que es esencial mantener ese equilibrio. Se han relacionado numerosas enfermedades oculares con la sobrepoblación de ciertas especies de bacterias, sobre todo en usuarios de lentes de contacto. Por otro lado, muchos autores apuntan a que las infecciones fúngicas de la superficie ocular están relacionadas con el uso de antibióticos tópicos, sugiriendo que la flora bacteriana en colaboración con el sistema inmunitario es capaz de mantener a raya a los agentes patógenos y evitar las colonizaciones patológicas. (90)

Existe una asociación entre la disbiosis y la enfermedad alérgica. Esta relación ha sido observada en varias zonas de la anatomía humana (piel, nariz y garganta). Por ejemplo, la dermatitis atópica, rinoconjuntivitis, el asma o la conjuntivitis alérgica, en algunos estudios, lo han asociado con una disminución de la diversidad microbiana, y por lo tanto, una sobrecolonización de otras especies. (91)

Aunque la microbiota ocular está menos estudiada, sabemos que en otros órganos, como el intestino, cumplen funciones de vital importancia: funciones metabólicas, encargándose de metabolizar sustratos y residuos como los detritus celulares; funciones protectoras, formando una barrera frente a la colonización de otras bacterias; y funciones reguladoras, mediando el intercambio de metabolitos con el epitelio y células del sistema inmunitario. (92,93)

Existen infinidad de especies fúngicas y bacterianas conviviendo en nuestro entorno. Muchas de ellas se han descrito como parte de la **flora normal humana (ver Tabla 2)** en diferentes zonas anatómicas. Las zonas de mayor exposición al exterior, como la piel y las mucosas, son las que más diversidad microbiológica presentan. Esto puede resultar un arma de doble filo ya que, por una parte, puede dotar al huésped de ciertas ventajas, reforzando la microbiota comensal, e inconvenientes, pudiendo llegar a producir una infección. A continuación, se describirán algunas de las especies que se han observado con más frecuencia en la superficie ocular.

4.1. MICROBIOTA BACTERIANA: PRINCIPALES ESPECIES

- ***Kocuria sp.*** Las especies del género *Kocuria* son bacterias grampositivas de la familia *Micrococcaceae*. Forman parte de la microbiota de la piel y orofaríngea humana. También puede encontrarse en animales y en el suelo o el agua. (94) Se han descrito infecciones por *kocuria* en dermatitis atópicas y queratitis. (95,96)
- ***Propionibacterium acnes.*** Es una bacteria grampositiva comensal que habita en la piel, cavidad oral y tractos gastrointestinal y urinario humanos. También es responsable de numerosas infecciones en endoftalmitis y keratitis. Suelen colonizar glándulas sebáceas y folículos pilosos, sobre todo. (97)
- ***Staphylococcus aureus.*** Pertenecientes al grupo de bacterias grampositivas, están presentes en la mayoría de las mucosas y piel tanto de animales como humanos. Esta bacteria es frecuentemente responsable de numerosas infecciones. Tiene la capacidad, en caso de penetrar los tejidos, de infectar cualquiera de las partes del ojo: conducto lacrimal, conjuntiva, cornea... (98)

4.2. MICROBIOTA FÚNGICA: PRINCIPALES ESPECIES

- ***Alternaria Alternata.*** Es un hongo que se encuentra en el ambiente, sobre todo en climas cálidos, aunque también puede encontrarse en interiores, donde hay buena ventilación y humedad. Este hongo está muy relacionado con enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, como el asma. (99)
- ***Aureobasidium pullulans.*** Es un hongo que se encuentra comúnmente en plantas. Está asociado con el desarrollo de rinitis en infantes y sinusitis en adultos, más frecuentemente en ambientes de humedad. (100)
- ***Cladosporium herbarum.*** Al igual que la *Alternaria*, este hongo es ubicuo y se encuentra en cualquier tipo de ambiente, tanto exterior como interior. Sus concentraciones ambientales dependen del clima y pueden provocar diversas complicaciones en las vías respiratorias, como asma o rinitis. (101)
- ***Malassezia sp.*** Forma parte de la flora cutánea e incluye 14 especies distintas. *Furfur*, *obtusa*, *restricta* o *globosa* son las más comunes, estando las dos últimas asociadas a casos de dermatitis seborreica. Es común encontrarlas en la piel de los perros. (102)

Tabla 2. Principales especies de la flora normal humana: Bacterias (arriba) y hongos (abajo). ++: Muy común. +=Común +/-=Raro *=Patógeno potencial (103,104)

Bacteria	Piel	Conjuntiva	Nariz	Faringe	Boca	Intest.	Uretra	Vagina
<i>Actinomycetaceae</i>				+	+			
<i>Bacteroides sp.*</i>						++	+	+/-
<i>Bifidobacterium bifidum</i>						++		
<i>Clostridium tetani</i>						+/-		
<i>Clostridium sp.*</i>						+/-	++	
<i>Corynebacterineae</i>	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>Enterobacteriaceae*</i>		+/-	+/-	+/-	+	++	+	+
<i>Enterococcus faecalis*</i>				+/-	+	++	+	+
<i>Haemophilus influenzae*</i>		+/-	+	+	+			
<i>Kocuria sp.</i>	+			+	+			
<i>Lactobacillus sp.</i>				+	++	++		++
<i>Mycobacterium</i>	+		+/-	+/-		+	+	
<i>Mycoplasmatales</i>				+	+	+	+/-	+
<i>Neisseria meningitidis*</i>			+	++	+			+
<i>Neisseria sp.</i>		+	+	++	+		+	+
<i>Propionibacterium acnes</i>	+			+	+	+	+	
<i>Proteus sp.</i>		+/-	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa*</i>				+/-	+/-		+/-	
<i>Spirochaetes</i>				+	++	++		
<i>Staphylococcus aureus*</i>	+	+/-	+	+	+	++	+/-	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	+	++	++	++	+	++	++
<i>Streptococcus mitis</i>				+	++	+/-	+	+
<i>Streptococcus mutans*</i>				+	++			
<i>Streptococcus pneumoniae*</i>		+/-	+/-	+	+			+/-
<i>Streptococcus pyogenes*</i>	+/-	+/-		+	+	+/-		+/-
<i>Streptococcus salivarius</i>				++	++			

Especie fúngica	Interacción con el huésped	Habitat principal
<i>Aspergillus spp.</i>	Patógeno oportunista, comensal	Suelo, ubicuo en el medioambiente
<i>Aureobasidium spp.</i>	Patógeno oportunista, comensal	Suelo, plantas
<i>Candida albicans</i>	Patógeno oportunista, comensal	Tracto gastrointestinal, mucosa, piel
<i>Candida parapsilosis</i>	Patógeno oportunista, comensal	Tracto gastrointestinal, mucosa, piel, suelo
<i>Candida pseudotropicalis</i>	Comensal	Productos lácteos, frutas
<i>Candida tropicalis</i>	Patógeno oportunista, comensal	Tracto gastrointestinal, mucosa, piel, suelo
<i>Cladosporium spp.</i>	Comensal	Suelo, plantas
<i>Claviceps lusitaniae</i>	Patógeno oportunista, comensal	Tracto gastrointestinal, plantas
<i>Cryptococcus spp.</i>	Patógeno	Suelo
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	Comensal	Tracto gastrointestinal, alimentos
<i>Epicoccum spp.</i>	Comensal	Suelo, ubicuo en el medioambiente
<i>Fusarium spp.</i>	Patógeno oportunista, comensal	Suelo, plantas
<i>Malassezia furfur</i>	Patógeno oportunista, comensal	Piel sebácea
<i>Malassezia globosa</i>	Patógeno oportunista, comensal	Piel sebácea
<i>Malassezia restricta</i>	Patógeno oportunista, comensal	Piel sebácea
<i>Malassezia sympodialis</i>	Patógeno oportunista, comensal	Piel sebácea
<i>Mucor spp.</i>	Patógeno oportunista, comensal	Tracto gastrointestinal, suelo, plantas
<i>Penicillium spp.</i>	Comensal	Suelo, ubicuo en el medioambiente
<i>Pichia spp.</i>	Comensal	Tracto gastrointestinal, mucosa, piel, suelo, plantas
<i>Rhodotorula spp.</i>	Patógeno oportunista, comensal	Suelo, agua, tracto gastrointestinal
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Comensal	Tracto gastrointestinal, alimentos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comensal	Tracto gastrointestinal, alimentos
<i>Wallemia spp.</i>	Comensal	Suelo, polvo doméstico

5. LA INFLAMACIÓN DE LA CONJUNTIVA Y LA ALERGIA

La inflamación de la conjuntiva o conjuntivitis suele estar provocada por causas infecciosas (virus o bacterias) o no infecciosas (producidas por un alérgeno, sustancia irritativa o tóxica, o traumatismos). Además de por su etiología, como acabamos de ver, la conjuntivitis también puede clasificarse según su cronicidad (aguda o crónica), severidad (leve, moderada o severa) y extensión. La conjuntivitis, en cualquiera de sus variantes, es la primera causa de visita oftalmológica. Se estima que el 80% de los casos de conjuntivitis son diagnosticados por profesionales sanitarios no oftalmólogos. (105)

Se calcula que la alergia ocular afecta al 15-20% de la población, con una prevalencia de la conjuntivitis en poblaciones adultas de hasta el 40%. La conjuntivitis alérgica y la rinitis suelen ser patologías que aparecen juntas. El 80% de los casos de rinitis cursan con sintomatología ocular. (106)

Entre los factores de riesgo se incluyen: la predisposición genética, la accesibilidad al alérgeno, la calidad y polución del aire o la zona de residencial. No es lo mismo vivir en un pueblo cerca de la vegetación o animales, que en una ciudad con alta contaminación ambiental. Otro factor que influye es la higiene, aunque existe cierta controversia con esta teoría. Ser estrictos con la higiene puede evitar en gran medida las reacciones alérgicas oculares, pero un exceso de higiene en edades tempranas puede impedir la maduración completa del sistema inmune. Ocurre lo mismo con la toma de antibióticos en edades tempranas, donde el contacto de microorganismos infecciosos o comensales con la superficie ocular no se llega a producir, promoviendo la diátesis (predisposición a desarrollar enfermedad) alérgica. (106)

Existen varios tipos de conjuntivitis. Dentro de las conjuntivitis infecciosas tenemos las conjuntivitis bacterianas, generalmente producidas por infección de *staphylococcus aureus*; y las conjuntivitis víricas, producidas principalmente por adenovirus, aunque también se dan muchos casos de infección por herpes simple, zoster o enterovirus. (107)

Dentro del grupo de conjuntivitis alérgicas podemos encontrar 3 grandes categorías dependiendo de si la respuesta está mediada por IgE (hipersensibilidad de Tipo I o inmediata), no está mediada por IgE (hipersensibilidad de Tipo II, III y IV) o es una respuesta combinada. Entre las conjuntivitis **mediadas por IgE** tenemos: las originadas por una **enfermedad autoinmune** (por ejemplo, queratoconjuntivitis seca causada por el síndrome de Sjögren) y **las conjuntivitis alérgicas**: estacionales y perennes. Con

respuesta combinada: la **queratoconjuntivitis vernal** y la **queratoconjuntivitis atópica**. Y para respuestas **no mediadas por IgE**, la conjuntivitis **papilar gigante**, la **dermatoconjuntivitis de contacto** y las causadas por uso de fármacos, traumatismos u ojo seco evaporativo, entre otras (ver **Figura 10**). (107,108)

Las conjuntivitis alérgicas pueden afectar a cualquier parte de la topografía ocular, tanto a la conjuntiva, como a la córnea o al sistema palpebral. Pueden presentar muy diversa sintomatología: rojez, picor, hinchazón, quemazón, sensación de cuerpo extraño, secreción, lagrimeo o sequedad, entre otras.

Es importante conocer la etiología y sintomatología de las conjuntivitis para poder hacer un buen diagnóstico diferencial, ya que todas ellas suelen presentar similitudes. Tanto la historia clínica del paciente (saber los antecedentes familiares, alergias, uso de lentes de contacto, medicamentos o hábitos de vida) como una evaluación exhaustiva de la superficie ocular y palpebral serán de vital importancia para facilitar en gran medida el proceso de diagnóstico.

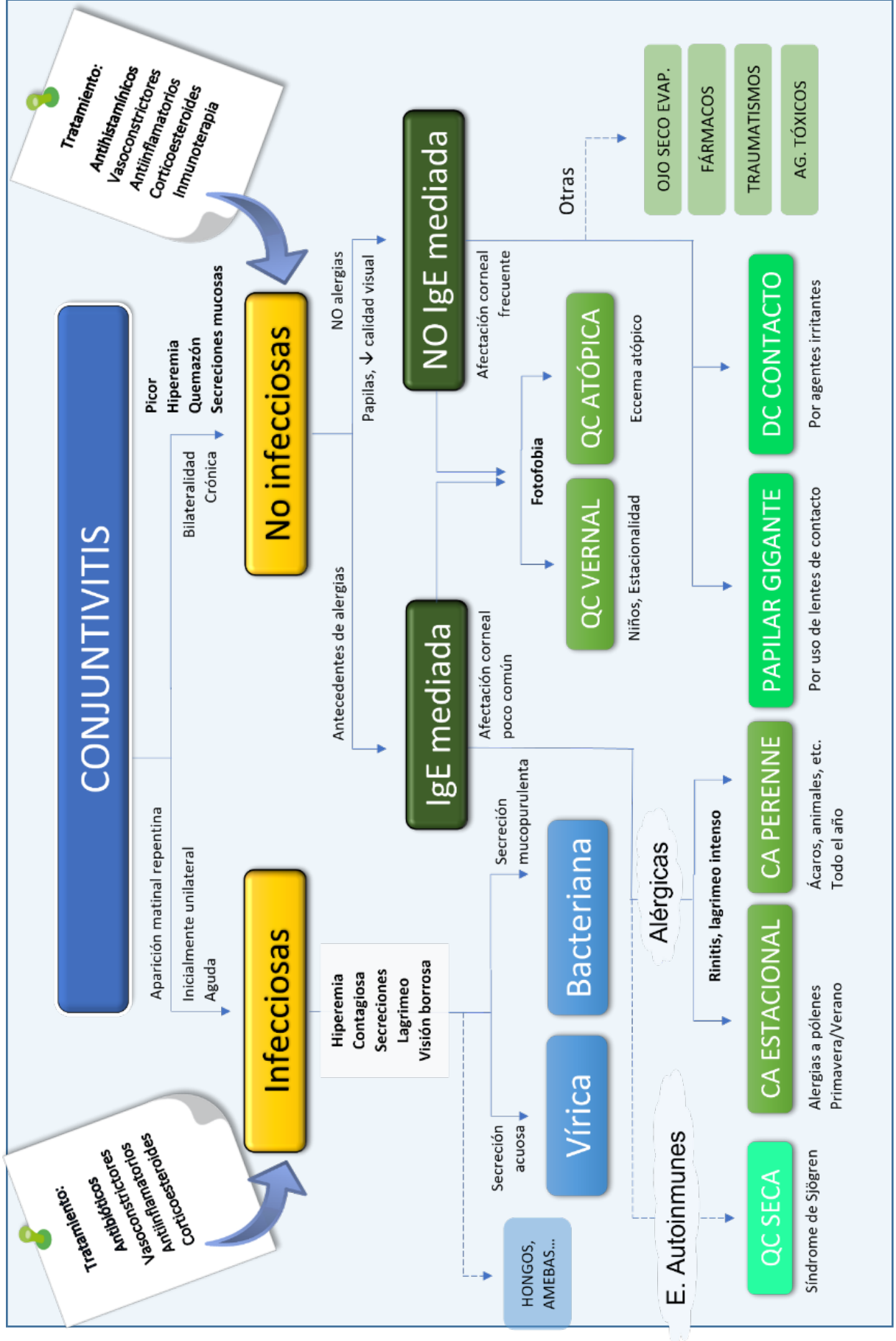


Figura 10. Clasificación de los distintos tipos de conjuntivitis, sintomatología diferencial y tratamiento

5.1. TIPOS DE CONJUNTIVITIS

Conjuntivitis alérgica estacional y perenne.

Son las formas más comunes de conjuntivitis alérgica, con una prevalencia de 15-20% de la población. Se caracteriza por desarrollar una hipersensibilidad mediada por IgE. Las conjuntivitis alérgicas **estacionales** ocurren principalmente en meses de primavera y verano, coincidiendo con la época de mayor concentración de pólenes en el ambiente. Suelen darse bilateralmente y de forma aguda. Las conjuntivitis alérgicas **perennes** pueden ocurrir en cualquier momento del año (Ácaros, polvo, pelo de animales...). También suelen darse bilateralmente y de forma crónica (ver **Figura 11**). Ambas etiologías suelen ir acompañadas de problemas respiratorios como la rinitis o el asma. (108,109)

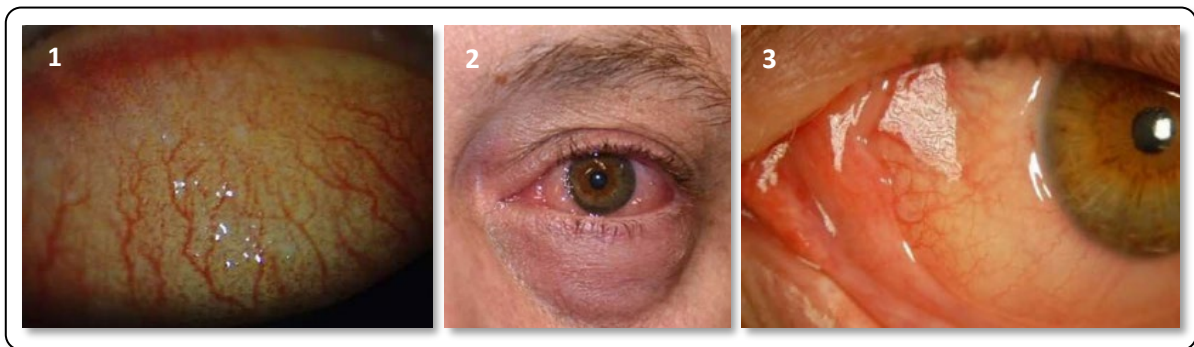


Figura 11. Conjuntivitis alérgica perenne crónica (1) y estacional aguda (2 y 3). Imágenes extraídas del artículo científico "A contemporary look at allergic conjunctivitis". (192)

Queratoconjuntivitis Vernal.

Se da con más frecuencia en zonas de climas cálidos y secos, en meses de primavera/verano y en varones jóvenes, aunque también afecta a adultos. La presencia de papilas suele ser el síntoma diferencial en este tipo de conjuntivitis, sumado a otros síntomas como lagrimeo, mucho picor y fotofobia (ver **Figura 12**). Existen dos formas clínicas: la limbal y la corneal. En esta variante de conjuntivitis suele observarse infiltración de granulocitos, mastocitos, linfocitos y macrófagos. De hecho, la lágrima de estos pacientes se caracteriza por tener altas concentraciones de mediadores inflamatorios como la histamina. (110)

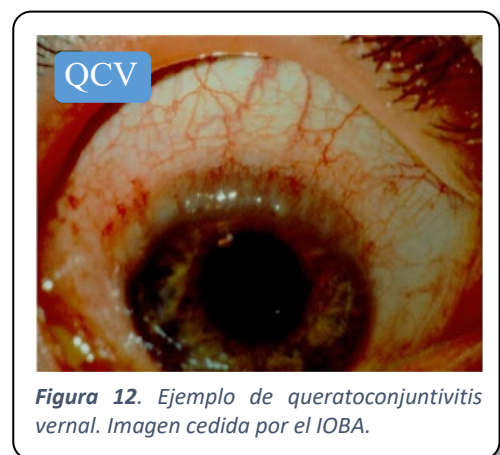


Figura 12. Ejemplo de queratoconjuntivitis vernal. Imagen cedida por el IOBA.

Queratoconjuntivitis Atópica.

Se desarrolla de manera crónica y bilateral. Suele presentarse en pacientes con antecedentes de atopía y a partir de la segunda década de vida. La sintomatología ocular en pacientes con dermatitis atópica no es muy común (en torno al 20%). Suele cursar con eczema palpebral, prurito, quemazón, sequedad y queratopatía superficial (ver **Figura 13**). (107)



Figura 13. Ejemplo de queratoconjuntivitis atópica. Imagen extraída de "A contemporary look at allergic conjunctivitis". (192)

Conjuntivitis Papilar Gigante.

Causada por el mal uso o uso prolongado de lentes de contacto, se caracteriza por la aparición de grandes papilas en conjuntiva tarsal. Si no se trata a tiempo, el roce de las papilas al parpadear puede producir graves lesiones corneales y producir fotofobia. Los síntomas pueden remitirse interrumpiendo el uso de lentillas. Histológicamente pueden encontrarse infiltraciones de mastocitos y eosinófilos en conjuntiva y grandes concentraciones de histamina en lágrima. (107)

5.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS CONJUNTIVITIS

Uno de los grandes problemas en la consulta clínica es discriminar qué tipo de conjuntivitis padece el paciente. Hemos podido observar que la sintomatología de esta enfermedad puede ser muy variada, pero a pesar de ello, los cuadros clínicos entre dos conjuntivitis etiológicamente diferentes pueden ser muy similares. Por esta razón se debe hacer un análisis detallado de todos los aspectos que puedan influir en el desarrollo de la enfermedad. Elaborar una adecuada historia clínica que recoja aspectos de la vida diaria: hábitos, antecedentes familiares, informes médicos, enfermedades asociadas, tratamientos médicos, etc.; puede ser el punto de inflexión entre un buen o un mal diagnóstico y tratamiento.

El primer paso a seguir será averiguar si nos encontramos frente a una conjuntivitis infecciosa o no infecciosa. En esta fase cobra gran importancia la historia clínica del paciente, conocer el cuándo y el cómo empezaron los síntomas.

No tener alergias diagnosticadas, ni síntomas de nariz (rinitis) o picor; pero sí una aparición repentina de los síntomas (al despertar) junto con secreciones acuosas o purulentas, serán indicios que apunten hacia una conjuntivitis de **origen infeccioso**.

En cambio, si existe picor, rinitis, alergia, bilateralidad (síntomas en ambos ojos), lagrimeo, secreción mucosa, enfermedades de la piel o autoinmunes asociadas y una aparición de los síntomas progresiva y duradera, o una estacionalidad, seguramente nos encontremos frente a una conjuntivitis de **origen no infeccioso**.

El problema surge cuando debemos discernir entre distintas conjuntivitis no infecciosas. La rojez, el lagrimeo, hinchazón/inflamación, quemosis, hiperemia o aparición de papilas suelen ser síntomas que aparecen con más o menos frecuencia en estos tipos de conjuntivitis. Nos encontraremos situaciones en las que el diagnóstico sea claro e inequívoco. Por ejemplo: para conjuntivitis alérgicas, cuando están diagnosticados de alergia al polen o animales; para queratoconjuntivitis vernal cuando el paciente es joven; para queratoconjuntivitis atópica, cuando el paciente tiene dermatitis; o conjuntivitis papilar gigante, cuando es usuario habitual de lentillas. Pero ¿qué ocurre cuando se omite información importante durante la anamnesis? O ¿si el paciente nunca ha sido diagnosticado de ninguna alergia o dermatitis? O ¿si el paciente sufre de más de un tipo de conjuntivitis? No hay que olvidar que todas las conjuntivitis pueden tener un factor fisiológico común y compartir sintomatología. Por lo tanto, es imprescindible encontrar características únicas para cada conjuntivitis que nos faciliten el diagnóstico diferencial. En este punto se encuentra la base de nuestro estudio, en el cual centraremos nuestro trabajo en la búsqueda de biomarcadores inflamatorios para el diagnóstico diferencial de las conjuntivitis alérgicas, y más concretamente, de las estacionales y perennes.

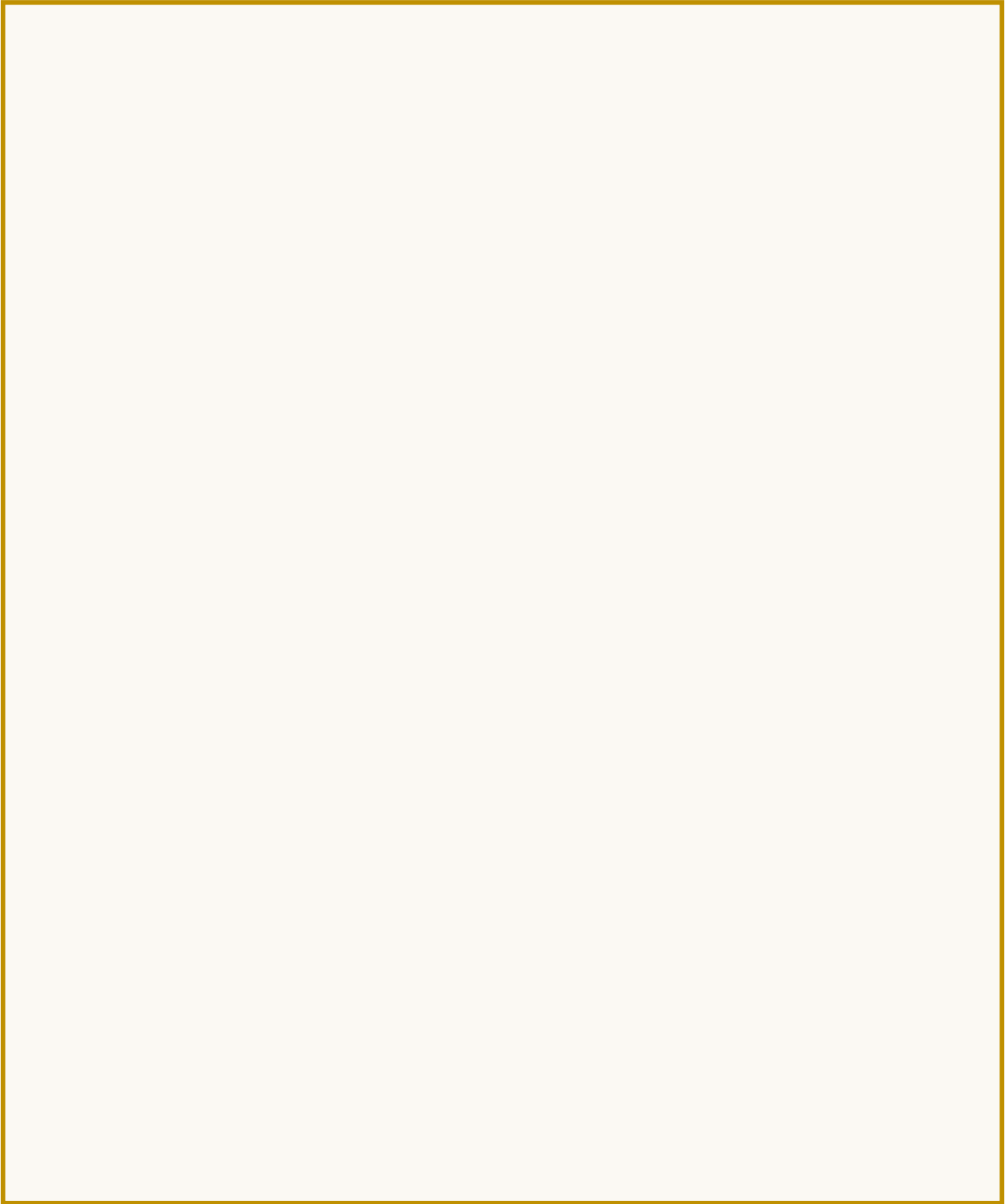
5.3. TRATAMIENTO Y CUIDADO DE LAS CONJUNTIVITIS

La primera opción y una de las más importantes para evitar las conjuntivitis es el aprendizaje de hábitos saludables y cotidianos. Una buena higiene ocular y de las manos es la mejor opción para no desarrollar una conjuntivitis infecciosa. En el caso de las no infecciosas y, en concreto, las conjuntivitis con componente alérgico, lo más importante es evitar, en la medida de lo posible, el contacto con el alérgeno. Purificar el aire de la vivienda y evitar el contacto con animales (en caso de alergias perennes); o protegerse en épocas de grandes concentraciones de polen con gafas y mascarilla (en caso de alergias estacionales) son estrategias efectivas para reducir la sintomatología. Por último, en el caso de la conjuntivitis papilar gigante, una buena limpieza y un uso moderado de las lentes de contacto es la mejor fórmula para prevenir la enfermedad. (111)

Entre los tratamientos farmacológicos más utilizados para las conjuntivitis se encuentran:

- **Antialérgicos:** tanto tópicos como sistémicos. Actúan bloqueando la histamina y suelen ser la primera opción de tratamiento para calmar los síntomas, como la hiperemia y el picor, de la conjuntivitis de origen alérgico. Para casos severos con mucha inflamación, los antialérgicos pueden combinarse con corticoesteroides. Los antihistamínicos más utilizados son el ketotifeno fumarato, levocabastina, olopatadina y epinastina, entre otros. (111,112)
- **Antiinflamatorios no esteroideos:** como el diclofenaco. Suelen ser buena opción para casos de tejidos muy inflamados.
- **Antibióticos:** como la tobramicina o la gentamicina. Son generalmente de uso tópico. Se utilizan para remitir la infección en conjuntivitis bacterianas. Si la sintomatología es severa pueden combinarse con corticoesteroides como betametasona, dexametasona o fluorometolona. (111)
- **Inmunosupresores:** como la ciclosporina o el tacrolimus. Pueden usarse para tratar la queratoconjuntivitis vernal. Estos actúan bloqueando la acción de las células del sistema inmune.
- **Inmunoterapia:** tradicionalmente llamadas vacunas, pueden ser inyectadas o sublinguales. De uso sistémico para el tratamiento de las alergias. (107)

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El diagnóstico de las conjuntivitis, y particularmente las no infecciosas, siguen siendo, por lo general, un tema que preocupa a oftalmólogos y demás personal sanitario. Cualquiera de las conjuntivitis de origen no infeccioso puede presentar cuadros clínicos y sintomatología similar, por lo que es necesaria una evaluación exhaustiva del paciente tanto del estado de su superficie ocular como de su historia clínica.

Con este trabajo queremos ampliar nuestro conocimiento sobre las conjuntivitis alérgicas estacionales y perennes, tanto a nivel celular como molecular. Queremos examinar las características singulares para cada grupo de estudio (control y alérgicos) y analizar sus diferencias y semejanzas con el fin comprender cuáles son los mecanismos inmunológicos que contribuyen al desarrollo de estas enfermedades e identificar posibles biomarcadores para el diagnóstico de la conjuntivitis alérgica.

Hipótesis

La hipótesis principal de este estudio es que: las proporciones de linfocitos intraepiteliales de la conjuntiva, el componente molecular de la lágrima y la microbiota comensal ocular de los grupos alérgicos seguirán un patrón diferente al del grupo control. Además, creemos que puede existir cierta correlación entre: los linfocitos de la sangre periférica y la conjuntiva, y los factores solubles del plasma y la lágrima.

Objetivos

1. Para el sistema inmunitario celular:

- **Caracterizar**, mediante citometría de flujo, las distintas poblaciones y subpoblaciones de linfocitos en sangre y conjuntiva, diferenciándolas fenotípicamente y calculando sus proporciones.
- **Analizar** los cambios inmunopatológicos celulares en pacientes con conjuntivitis alérgica estacional y perenne, y compararlo con lo obtenido en el grupo control, tanto en sangre como en conjuntiva.
- **Comparar y correlacionar** el fenotipo linfocitario sistémico (sangre periférica) con el regional (Conjuntiva).

2. Para el sistema inmunitario humoral:

- **Calcular**, mediante tecnología Xmap, las concentraciones de los principales factores solubles en plasma y lágrima.
- **Analizar** los cambios inmunopatológicos humorales en pacientes con conjuntivitis alérgica estacional y perenne, y compararlo con lo obtenido en el grupo control, tanto en plasma como en lágrima.
- **Comparar y correlacionar** las concentraciones de los factores solubles en plasma con las obtenidos en lágrima.

3. Para la microbiota ocular:

- **Caracterizar**, mediante secuenciación masiva, el genotipo de la microbiota conjuntival.
- **Analizar** los cambios inmunopatológicos de la microbiota ocular en pacientes con conjuntivitis alérgica estacional y perenne, y compararlo con lo obtenido en el grupo control.

4. **Encontrar**, entre todos los resultados obtenidos para linfocitos intraepiteliales, factores solubles y microbiota, posibles **biomarcadores** para el diagnóstico de la conjuntivitis alérgica.

¿Qué esperamos encontrar en este estudio?

Teniendo en cuenta los hallazgos que numerosos autores han encontrado en otras mucosas, se espera encontrar un fenotipo singular para la conjuntiva, caracterizado por un aumento de linfocitos Th2 y Th17 intraepiteliales en ambos grupos alérgicos, más acentuado en conjuntivitis estacionales. Para la parte de lágrima se espera observar un aumento significativo en las concentraciones de las citocinas proinflamatorias (de tipo Th2, principalmente) e IgE en los grupos alérgicos, siendo estas proporciones más acusadas en conjuntivitis alérgicas estacionales. Y, por último, para la parte de microbiota se espera encontrar un fenotipo microbiano característico y diferencial entre ambos grupos alérgicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describirán los recursos y materiales utilizados para la recogida de datos, la extracción y análisis de muestras, en el siguiente orden:

1. Diseño del estudio
 - 1.1. Criterios de inclusión y exclusión
 - 1.2. Sujetos del estudio
2. Métodos de extracción de muestra
 - 2.1. Citología por cepillado
 - 2.2. Recolección de lágrima por capilaridad
 - 2.3. Extracción de sangre periférica por venopunción
 - 2.4. Frotis para la extracción de microbiota
3. Métodos de análisis de las muestras
 - 3.1. Citometría de flujo
 - 3.2. Multiplexado de alto rendimiento
 - 3.3. Secuenciación de alto rendimiento
4. Análisis estadístico

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente estudio se realizó previa obtención del consentimiento informado según la Declaración de Helsinki, y previa aprobación de los Comités de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del Área de Salud de Valladolid Este y Oeste. Se necesitó la aprobación de los CEIC de las dos áreas de salud ya que el estudio se realizó en varios centros: IOBA, Hospital Clínico Universitario (HCUV) y Hospital Universitario Río Hortega (HURH).

Se trata de un estudio caso-control con 3 muestras poblacionales diferentes: una población de sujetos sanos, un grupo de sujetos diagnosticados de conjuntivitis alérgica estacional y un tercer grupo de sujetos diagnosticados de conjuntivitis alérgica perenne.

Se hicieron múltiples llamamientos para el reclutamiento de voluntarios. A través de la **Universidad de Valladolid**, se enviaron correos masivos para llegar a toda la comunidad universitaria. Y, para llegar al resto de comunidad no universitaria de la provincia de Valladolid, se publicó el estudio a través **de redes sociales** (Facebook, Twitter e Instagram) y del **Centro de Salud Pilarica-Circular**, que nos derivaba pacientes con sintomatología alérgico-ocular o sospecha de conjuntivitis.

Todos los voluntarios fueron citados en uno de los 3 centros colaboradores (IOBA, HURH o HCUV) para su participación en el estudio. Todas las pruebas del estudio se realizaban en una única cita con una duración media de una hora por voluntario. El estudio estaba estructurado en varias partes: recogida de datos, pruebas de superficie ocular y recogida de muestras. Las pruebas se realizaron en el orden que se describe a continuación (**ver Anexo III – cuaderno de recogida de datos**):

1. Lectura y firma del **consentimiento informado**.
2. **Cuestionario/anamnesis** sobre hábitos de vida (alcohol, tabaco, población), estado de salud general (medicación, alergias, enfermedades recientes), historia oftalmológica (enfermedades oculares, antecedentes familiares, cirugías, tratamientos, lentillas).
3. **Test OSDI** (*Ocular Surface Disease Index*), utilizado para descartar la presencia de ojo seco. Es una escala de 25 puntos donde el paciente deberá contestar en relación con la frecuencia en que nota sintomatología en ciertas

situaciones de la vida diaria durante los últimos 7 días. Valores menores a 13 puntos se consideraban normales (ver **Figura 14**).

4. Recogida de **lágrima** por capilaridad (8µL de cada ojo).
5. Prueba **TBUT** (*Tear Break-Up Time*) con fluoresceína. Para calcular el tiempo de rotura lacrimal, es decir, lo que tarda la película lacrimal en perder la continuidad. Valores mayores a 10 segundos se consideraban normales.
6. Evaluación de **la tinción con fluoresceína** de córnea y conjuntiva según la escala Oxford para descartar lesiones o defectos tisulares producidos por agentes externos, sequedad u otras afecciones. Valores equivalentes a un grado I o menor se consideraban normales.
7. Evaluación de las **papilas** de la conjuntiva tarsal superior para comprobar la existencia de inflamación o reacción hacia posibles agentes irritantes. Valores equivalentes a un grado I o menor se consideraban normales.

¿Ha experimentado alguna de las siguientes alteraciones durante la última semana?

A. SÍNTOMAS FÍSICOS	En todo momento	Casi en todo el tiempo	En el 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	
1.Sensibilidad a la luz	4	3	2	1	0	No sé
2.Sensación de arenilla en los ojos	4	3	2	1	0	No sé
3.Dolor de ojos	4	3	2	1	0	No sé
4.Visión borrosa	4	3	2	1	0	No sé
5. Mala visión.	4	3	2	1	0	No sé

¿Ha tenido problemas en los ojos que le han limitado o impedido realizar alguna de las siguientes acciones durante la última semana?

B. ACTIVIDADES DIARIAS	En todo momento	Casi en todo el tiempo	En el 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	
6. Leer	4	3	2	1	0	No sé
7. Conducir de noche	4	3	2	1	0	No sé
8. Trabajar con un ordenador o utilizar un cajero automático.	4	3	2	1	0	No sé
9. Ver la televisión.	4	3	2	1	0	No sé

¿Ha sentido incomodidad en los ojos en alguna de las siguientes situaciones durante la última semana?

C. FACTORES AMBIENTALES	En todo momento	Casi en todo el tiempo	En el 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	
10. Viento	4	3	2	1	0	No sé
11. Lugares con baja humedad (muy secos)	4	3	2	1	0	No sé
12. Zonas con aire acondicionado.	4	3	2	1	0	No sé

El valor de OSDI nos da una puntuación para valorar el nivel de sequedad ocular del paciente como:

$$\text{Puntuación} = \frac{(\text{suma puntuación A+B+C}) \times 25}{\text{n}^\circ \text{ respuestas sin incluir NS/NC}}$$

Normal OSDI: hasta 13
 OSDI leve a moderado: de 13 a 22
 OSDI moderado/grave: de 23 a 48

Figura 14. Test OSDI utilizado

8. **Lavado con suero fisiológico**, para lavar la superficie ocular y retirar los restos de fluoresceína que puedan contaminar la citología.
9. **Instilación de anestesia tópica** (Colircusi Anestésico Doble, 1 mg/mL Tetracaína hidrocloreto + 4 mg/mL Oxibuprocaina hidrocloreto). Dependiendo de la sensibilidad del paciente, la tolerancia hacia el medicamento y la molestia al realizar la citología, podían instilarse un máximo de 3 gotas directamente en la conjuntiva tarsal.
10. **Test de Schirmer**. Con tiras de papel para medir la producción de lágrima y descartar cualquier déficit en la calidad de la lágrima. Valores normales a partir de 5mm.
11. **Citología por cepillado** de la conjuntiva tarsal superior. Con el párpado evertido y anestesiado se realizaba una rotación completa del cepillo, repitiendo el proceso 3 veces para extraer el mayor número de células.
12. **Frotis de la conjuntiva bulbar inferior** para obtención de microbiota con una torunda de algodón.
13. **Extracción de sangre** por venopunción del antebrazo. Se extrajo un total de 3mL.

1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión:

- Participación voluntaria y consentida tras ser informados de las características del estudio y resueltas las dudas que pudieran surgir sobre cualquiera de sus aspectos.
- Para pacientes alérgicos: Estar diagnosticado de cualquier tipo de alergia de las incluidas como estacionales (pólenes) o perennes (polvo, ácaros, animales...) mediante prick test o IgE específica y padecer de conjuntivitis alérgica activa.
- Para controles: Normalidad en OSDI (<13 puntos), TBUT (≥ 10 segundos), fluoresceína (< grado II) y Schirmer (≥ 5 mm).

Criterios de exclusión comunes a casos y controles:

Fueron excluido pacientes que:

- Padeciesen patologías crónicas autoinmunes o autoinflamatorias, neoplasias hematológicas, trasplante de progenitores hematopoyéticos, radioterapia o quimioterapia,
- Hubiesen tenido tratamiento farmacológico inmunosupresor, inmunomodulador o antiinflamatorio sistémico o tópico en las 2 semanas previas (excepto antihistamínicos para el grupo alérgico).
- Hubiesen sufrido cuadros inflamatorios agudos de origen no-alérgico en las dos semanas previas.
- Se hubieran sometido a algún tipo de cirugía ocular previa.
- Fuesen usuarios habituales de lentes de contacto, para la obtención de microbiota, o uso reciente (durante la última semana), para el resto de los casos.

1.2. SUJETOS DEL ESTUDIO

Un total de 95 sujetos fueron incluidos en el estudio, de los cuales 35 eran sanos y 60 alérgicos. Los rangos de edad iban desde los 10 hasta los 76 años. De los 60 alérgicos, 28 fueron diagnosticados de **conjuntivitis alérgica estacional (CAE)** y 32 de **conjuntivitis alérgica perenne (CAP)**. El diagnóstico de la conjuntivitis fue realizado por un oftalmólogo/a profesional. Síntomas como picor rojez, lagrimeo, secreciones, papilas, inflamación, estornudos o síntomas nasales como la rinitis, fueron indicadores para diferenciar la conjuntivitis alérgica de la no-alérgica. Dentro de las conjuntivitis alérgicas estacionales encontramos alergias a pólenes: principalmente **gramíneas (71,4%), olivo (10,7%), ciprés (10,7%) heno (3,6%) y plátano de sombra (3,6%)**; y dentro de las perennes encontramos alergias al polvo/ácaros (**35,3%**) y animales: principalmente **gato (35,3%), perro (26,5%) y conejo (2,9%)**.

Finalmente, se obtuvieron un total de **80 muestras de sangre periférica y plasma, 73 citologías conjuntivales, 81 muestras de lágrima y 22 de microbiota**. La relación de muestras obtenidas puede verse en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Relación de pacientes con datos de sexo edad y tipo de muestra obtenida de cada uno. En las tablas del final puede observarse los promedios de edad de cada grupo y el número total de cada muestra obtenidas. CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne, C=control, H=hombre, M=mujer, SP=sangre periférica, CC=citología conjuntival, L=lágrima, Mi=microbiota.

Diag.	EDAD	SEXO	SP	CC	L	Mi	Diag.	EDAD	SEXO	SP	CC	L	Mi	Diag.	EDAD	SEXO	SP	CC	L	Mi			
CAE	10	M	X	X			CAP	13	H	X	X			C	19	M	X	X	X				
CAE	10	H		X			CAP	14	M	X	X	X			C	22	H	X	X	X			
CAE	11	H	X	X			CAP	19	M	X	X	X			C	24	H	X	X	X			
CAE	12	H	X	X	X		CAP	22	M	X	X	X			C	26	H	X	X	X	X		
CAE	12	H		X	X		CAP	22	M	X	X	X			C	27	H	X	X	X	X		
CAE	12	H			X		CAP	23	H	X	X	X	X			C	27	M	X		X		
CAE	15	M		X			CAP	23	M	X	X	X				C	27	H	X				
CAE	18	H	X	X	X		CAP	24	H	X	X	X	X			C	27	H	X				
CAE	19	H	X	X	X		CAP	24	H	X	X	X				C	28	H	X	X	X		
CAE	20	H	X	X	X	X	CAP	24	M	X		X				C	28	M	X	X	X		
CAE	20	H	X	X	X		CAP	26	H	X	X	X	X				C	29	M	X	X	X	
CAE	21	M	X	X	X		CAP	26	M	X	X	X	X				C	31	H	X	X	X	
CAE	23	H	X	X	X		CAP	26	M	X		X					C	35	H	X	X	X	
CAE	25	H			X	X	CAP	27	H	X	X	X	X				C	40	M			X	X
CAE	27	H	X		X	X	CAP	27	M	X		X	X				C	43	M	X	X	X	
CAE	31	H	X	X	X		CAP	27	H			X					C	43	M				X
CAE	32	H	X	X	X		CAP	30	M	X	X	X					C	45	H	X	X	X	
CAE	37	M	X	X	X	X	CAP	32	M	X	X	X					C	47	M	X	X	X	
CAE	40	M	X	X	X		CAP	32	H			X					C	52	H	X	X	X	
CAE	42	H	X	X	X	X	CAP	34	M	X	X						C	55	H	X	X	X	X
CAE	42	H	X	X	X		CAP	41	M	X	X	X					C	55	H	X	X	X	
CAE	43	M	X	X	X	X	CAP	41	M			X					C	56	M			X	X
CAE	52	H	X	X	X		CAP	44	H	X	X	X	X				C	56	M			X	
CAE	57	H	X	X	X		CAP	45	M	X	X	X	X				C	57	M	X	X	X	
CAE	58	M	X	X	X		CAP	50	M	X	X	X					C	58	M	X	X	X	
CAE	60	M	X				CAP	50	M	X	X	X					C	58	M	X		X	
CAE	64	M	X	X	X		CAP	52	H	X	X	X					C	59	H	X	X	X	
CAE	66	M			X		CAP	54	M	X	X	X					C	60	M	X	X	X	
							CAP	56	M	X	X	X					C	60	H	X		X	
							CAP	58	M	X	X	X					C	60	H			X	
							CAP	63	M	X	X	X					C	63	M	X	X	X	
							CAP	67	M	X	X	X					C	65	M				X
																	C	69	M	X	X		
																	C	73	M	X	X		
																	C	76	H	X	X	X	

CAE	EDAD	H:M	SP	CC	L	Mi	CAP	EDAD	H:M	SP	CC	L	Mi	C	EDAD	H:M	SP	CC	L	Mi
n: 28	31,4	18:10	22	23	23	6	n: 32	34,9	10:22	29	26	29	9	n: 35	45,7	17:18	29	24	29	7

2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE MUESTRA

Las muestras celulares de conjuntiva tarsal (zona de mayor infiltración linfoide) se recogieron mediante **citología por cepillado** (ver **Figura 15**). Esta técnica ha sido probada anteriormente por el grupo de superficie ocular del IOBA y ha demostrado ser una técnica mínimamente invasiva, además de efectiva, ya que puede obtenerse una gran cantidad de células vivas. (113,114)

Previa instilación de anestesia tópica (Colircusi Anestésico Doble, 1 mg/mL Tetracaína hidrocloreuro + 4 mg/mL Oxibuprocaina hidrocloreuro) directamente sobre el parpado superior evertido se procedió a la rotación completa del cepillo sobre la conjuntiva.

Una vez extraídas las células, el cepillo se rotaba durante 30 segundos en un eppendorf con 1,2mL de una solución de mantenimiento (medio RPMI-1640 suplementado con 10% FBS, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina). Este proceso **se repetía tres veces** para obtener un mayor número de células. Las muestras celulares se almacenaban a 4°C hasta su análisis dentro de las primeras 24h desde su obtención.



Figura 15. Técnica de cepillado conjuntival (imagen superior) y rotación sobre la solución de mantenimiento (imagen inferior).



Figura 16. Capilares Drummond Microcaps 4 µL

Para la toma de **muestra lagrimal** usamos capilares de 4 µL (Drummond Microcaps 4 µL), dos para cada ojo (ver **Figura 16**), hasta obtener 8 µL de cada uno. El capilar se dejaba reposar en menisco temporal inferior con precaución de no tocar en ningún momento la superficie ocular para evitar la producción de lágrima refleja. Para una mejor toma de muestra se sentaba al voluntario en la silla del gabinete, en una postura semi-reclinada y con la cabeza apoyada en el respaldo. Los capilares se almacenaron en hielo por separado (ojo izquierdo y ojo derecho) en tubos roscados. Todas las muestras de lágrima recogidas se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su posterior análisis.

La muestra de **sangre periférica** se obtuvo mediante venopunción por el personal enfermero cualificado del IOBA, preferentemente de una vena de la parte interior del codo o del dorso de la mano. La muestra se conservó en un tubo estéril de 4mL con

anticoagulante EDTA (ver **Figura 17**). De la muestra de sangre, 250 μ L se usaban para analizar en el citómetro mientras que el resto se utilizaba para extraer el plasma que posteriormente sería congelado a -80°C hasta su análisis.



Por último, la muestra de **microbiota** se extrajo de la conjuntiva bulbar y fondo de saco inferior mediante la rotación completa de una torunda de algodón. A continuación, ésta se sumergía y giraba suavemente en el interior de un tubo con gel de mantenimiento durante 30 segundos y se enviaba inmediatamente al laboratorio BiomeMarkers de Valladolid. El kit para la extracción y mantenimiento de la muestra era proporcionado este laboratorio previamente.

Figura 17. Tubo Vacuette de tapón morado

3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

3.1. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una de las técnicas más utilizadas para la caracterización y fenotipaje celular. El principio básico de la citometría se basa en la emisión y recogida de señales luminosas para analizar las características de una muestra celular previamente tratada. Las muestras se analizan en un citómetro de flujo, que está formado por varios componentes:

Un **sistema de flujo** que se encarga de la toma, transporte y desagüe de la muestra a través de un sistema hidráulico. Un **sistema óptico**, formado por láseres de distintas longitudes de onda, filtros y espejos dicróicos que se encargan de dispersar y dividir la luz en diferentes longitudes de onda; y fotodetectores que recogen la señal luminosa y la transforman en una señal eléctrica. Un **sistema informático** de análisis y software para la visualización gráfica de los resultados obtenidos (ver **Figura 18**).

Aunque el citómetro puede medir automáticamente el tamaño y la complejidad celular, es necesaria la tinción de la muestra (siempre y cuando la muestra no tenga fluorescencia propia) con fluorocromos que emitan señales luminosas. Siguiendo el principio de la citometría de flujo, podemos hacer un fenotipado detallado de una muestra celular añadiendo fluorocromos conjugados con anticuerpos monoclonales que permitan unirse a marcadores de membrana celulares específicos para un subtipo celular.

Los fluorocromos son moléculas que al ser excitadas con un haz de luz a una cierta longitud de onda pueden emitir, en respuesta, una señal luminosa con una longitud de onda distinta. Existe una gran variedad de fluorocromos que pueden emitir luz a una longitud de onda determinada. Los más comunes son la **Fluoresceína (FITC, verde)**, la **Ficoeritrina (PE, naranja)**, el **R Phycoerythrin-Texas Red®-X (ECD, rojo)**, **Aloficocianina (APC, azul)**, **Alexa Fluor 750 (APC- Alexa Fluor 750, Violeta)**.

Una vez tratadas las muestras pueden analizarse en el citómetro, que se encargará de generar un flujo continuo de células. El flujo celular es irradiado con un haz de luz láser que excita a los fluorocromos para que puedan emitir la señal luminosa, que será recogida por cada fotodetector. A cada célula o molécula detectada se le asocian medidas sobre su tamaño, complejidad y luminiscencia. Con todos estos datos el citómetro puede crear distintos tipos de gráficas que nos ayudarán a la comprensión de los resultados obtenidos: histogramas, dispersión de puntos, entre otras.

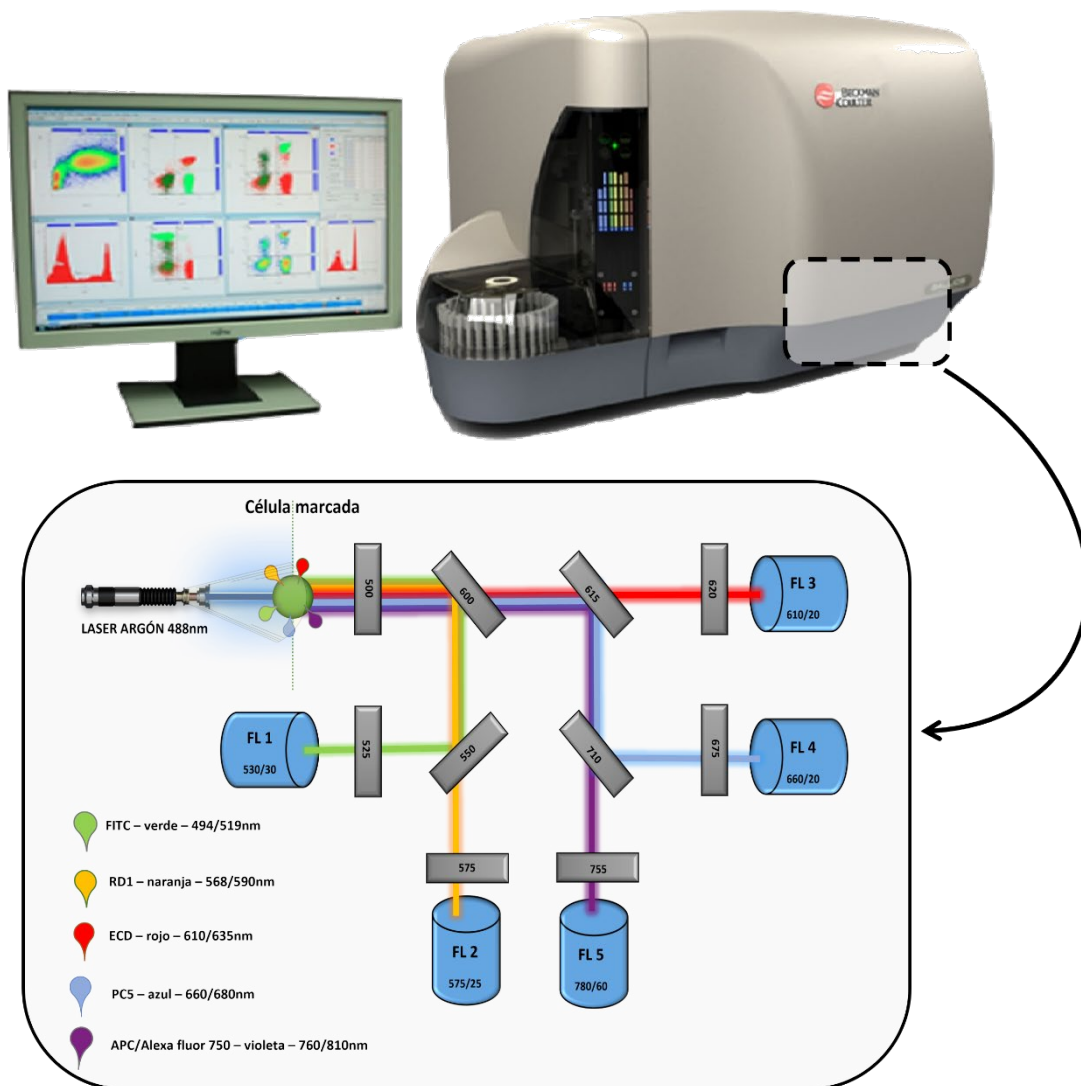


Figura 18. Partes de un citómetro y detalle del sistema de filtros (rectángulos) y fotodetectores (FL). Cada fotodetector tiene un ancho de banda que define el rango de longitud de onda que reconoce. En nuestro caso, el citómetro que hemos usado (FC500) tiene un láser auxiliar de 633nm. Cada dicroico filtra a una cierta longitud de onda, dejando pasar las longitudes de onda que están mayores y reflejando las que están por debajo.

Para este estudio hemos utilizado el citómetro de flujo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, alojado en los laboratorios del departamento de inmunología. Este citómetro es el modelo FC-500 de Beckman Coulter, formado por dos láseres (**Argón 488nm** y **Neón 633nm**) y 5 fotodetectores, y que utilizaremos con el objetivo de analizar las principales poblaciones linfoides en sangre periférica y en conjuntiva. Para llevar a cabo nuestro estudio se diseñó un panel de anticuerpos a medida para nuestro citómetro.

En nuestro caso, el modelo FC-500 detecta las longitudes de onda para los colores verde, naranja, rojo, azul y violeta. Cada fotodetector tiene un ancho de banda, es decir, un rango de longitudes de onda que puede detectar (**Figura 19**): **FL1 (530/30)**, **FL2**

(575/25), FL3 (610/20), FL4 (660/20), FL5 (780/60). Cada color será reconocido por uno de los fotodetectores. De este modo, se puede averiguar con facilidad qué fluorocromos deberemos elegir atendiendo a las características de nuestro citómetro. Además, es de vital importancia saber a qué longitud de onda se estimula cada fluorocromo. Por ejemplo, las **ficoeritrinas** se excitan con el láser de Argón 488nm, mientras que las **aloficocianinas** lo hacen con el láser de neón 633nm. Por lo tanto, dependiendo de que láser utilicemos para estimular los fluorocromos, se podrá evitar en gran medida solapamiento de ondas y la contaminación de fluorescencia.

Para evitar estos posibles handicaps existen herramientas que podemos utilizar para tener una visión más detallada de nuestro ensayo y ver el comportamiento de los fluorocromos seleccionados. Una de las herramientas más completas es el **Spectra Analyzer de BioLegend**.

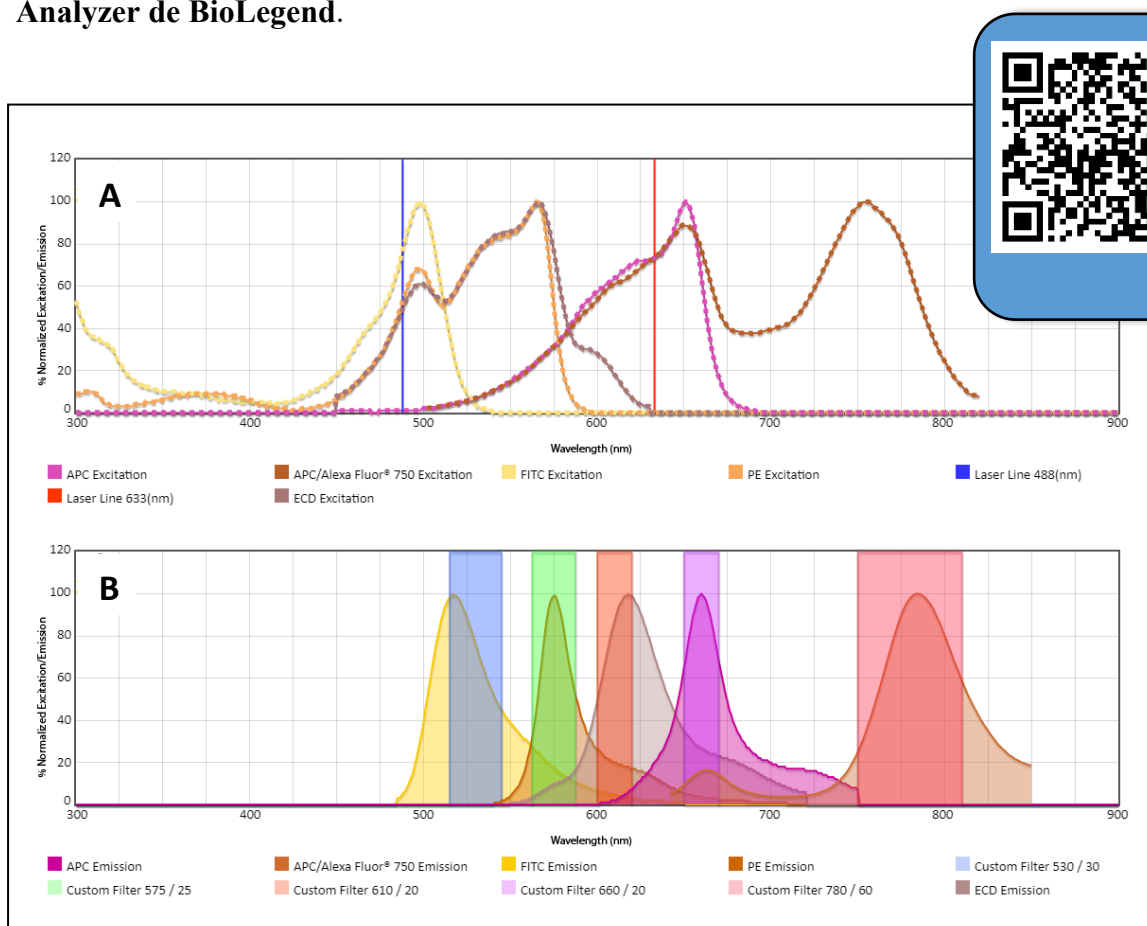


Figura 19. Bandas de detección de un citómetro. (A) Espectros de excitación de los fluorocromos seleccionados y longitudes de onda de los láseres (líneas verticales). (B) Espectros de emisión de los mismos fluorocromos y anchos de banda de detección de nuestros fotodetectores (franjas verticales).

Como se observa en la **Figura 19**, los valores máximos de fluorescencia se encuentran lo suficientemente separados entre sí, evitando el solapamiento excesivo de ondas. A pesar de ello, siempre puede producirse cierta contaminación de la señal, y será necesario

configurar una matriz de compensación en el citómetro para tratar de eliminar las señales residuales.

Una vez concluida la elección de fluorocromos, y conocidas las poblaciones celulares que queremos incluir en nuestro ensayo, continuaremos con la configuración del panel de anticuerpos. Al disponer de solamente 5 fotodetectores será necesario ajustar debidamente los cócteles de anticuerpos que se usarán para cada tubo de muestra.

En nuestro caso, la configuración de los paneles quedó como muestra la **Tabla 4**:

Tabla 4. Diseño del panel de anticuerpos y distribución de los distintos monoclonales en los 5 tubos usados para la citometría de flujo. TUBO 1: analizaremos linfocitos CD4+ y CD8+, tanto memoria como vírgenes. TUBO 2: subtipos de linfocitos T cooperadores: Th1, Th2, Th17/th1, Th17 y Th22. TUBO 3: linfocitos T CD4 reguladores. TUBO 4; linfocitos NK y sus subtipos. TUBO 5: linfocitos B1 y B2, y linfocitos TCR $\gamma\delta$ +. Ac= anticuerpo, C= clon, I= isotipo, cc= casa comercial. Todos los anticuerpos monoclonales utilizados son de ratón.

	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5	
FL1	Ac	CD45RA - FITC	CD183 - FITC	CD127 - FITC	CD16 - FITC	CD19 - FITC
	C	L48	G025H7	R34.34	3G8	4G7
	I	IgG1, K	IgG1, K	IgG1	IgG1	IgG1, K
	cc	Becton Dickinson	BioLegend	Beckman Coulter	Immunostep	Becton Dickinson
FL2	Ac	CD45R0 - PE	CD196 - PE	CD25 - PE	CD8 - PE	TCR pan γ/δ - PE
	C	UCHL1	G034E3	BC96	3B5	IMMU510
	I	IgG2a, K	IgG2b, K	IgG1, K	IgG2a	IgG1
	cc	Becton Dickinson	BioLegend	BioLegend	Caltag	Beckman Coulter
FL3	Ac	CD8 - ECD	CD4 - ECD	CD45 - ECD	CD45 - ECD	CD45 - ECD
	C	SFCI21Thy2D3	SFCI12T4D11	J33	J33	J33
	I	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
	cc	Beckman Coulter	Beckman Coulter	Beckman Coulter	Beckman Coulter	Beckman Coulter
FL4	Ac	CD4 - APC	CCR10 - APC	CD4 - APC	CD56 - APC	CD5 - APC
	C	13B8.2	6588-5	13B8.2	MEM-188	L17F12
	I	IgG1	IgG	IgG1	IgG2a, K	IgG2a
	cc	Beckman Coulter	BioLegend	Beckman Coulter	Immunostep	Immunostep
FL5	Ac	CD3 - APC - Alexa 750	CD194 - PE/Cy7	CD3 - APC - Alexa 750	CD3 - APC - Alexa 750	CD3 - APC - Alexa 750
	C	UCHT1	L291H4	UCHT1	UCHT1	UCHT1
	I	IgG1, K	IgG1, K	IgG1, K	IgG1, K	IgG1, K
	cc	Beckman Coulter	BioLegend	Beckman Coulter	Beckman Coulter	Beckman Coulter

Tomando como punto de partida la gráfica que relaciona los datos del “side scatter” (complejidad celular) con la expresión del marcador de membrana CD45, CD3 o CD4, podremos identificar la población linfoide y diferenciarla del resto de poblaciones leucocitarias. De este modo se podrán seleccionar exclusivamente los linfocitos para el análisis fenotípico.

Para nuestro estudio calcularemos los porcentajes de las siguientes poblaciones (ver **Figura 20**):

Linfocitos T totales (CD3⁺), así como sus subtipos: células MAIT doble negativas (CD3⁺CD8⁻CD4⁻), linfocitos TCRγδ⁺ (CD3⁺ TCRγδ⁺), linfocitos T CD4 totales (CD3⁺CD4⁺), T CD4 vírgenes (CD3⁺CD4⁺ CD45RA⁺) y memoria (CD3⁺CD4⁺ CD45R0⁺), linfocitos T reguladores (CD3⁺CD4⁺ CD25^{hi}CD127^{lo}), linfocitos Th1 (CD4⁺ CD183⁺CD194⁻CD196⁻CCR10⁻), Th2 (CD4⁺ CD183⁻CD194⁺CD196⁻CCR10⁻), Th17/Th1 (CD4⁺ CD183⁺CD194⁻CD196⁺CCR10⁻), Th17 (CD4⁺ CD183⁻CD194⁺CD196⁺CCR10⁻), Th22 (CD4⁺ CD183⁻CD194⁺CD196⁺ CCR10⁺), linfocitos T CD8 (CD3⁺ CD8⁺), linfocitos T CD8 vírgenes (CD3⁺CD8⁺ CD45RA⁺) y memoria (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺), linfocitos NKT CD8⁺ (CD56^{+/-}CD16^{+/-}). Linfocitos NK (CD3⁻CD56^{+/-}CD16^{+/-}), linfocitos B (CD19⁺), B1 (CD19⁺CD5⁺) y B2 (CD19⁺CD5⁻).

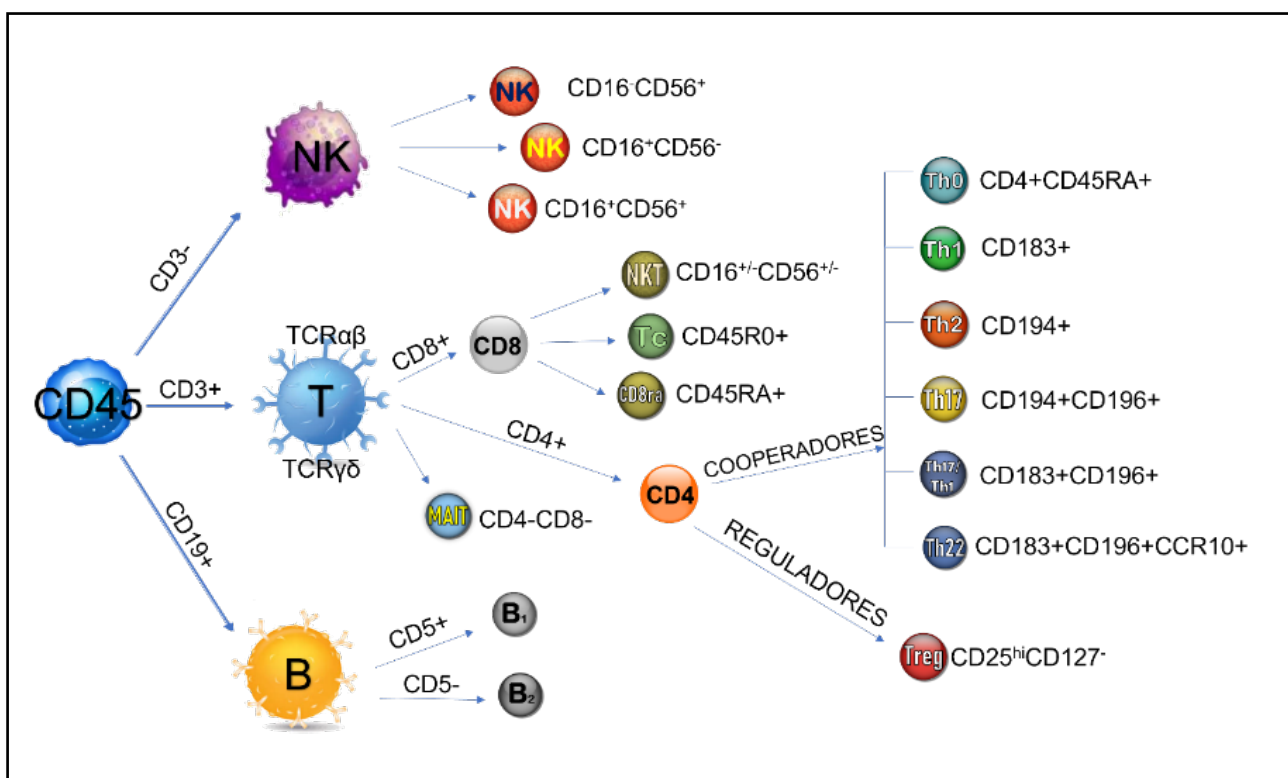


Figura 20. Poblaciones y subpoblaciones linfoides que serán objeto de estudio y marcadores de superficie característicos de cada uno.

PROTOCOLO DE TRATAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

1. Homogeneizamos las muestras para conseguir una distribución uniforme de las células.



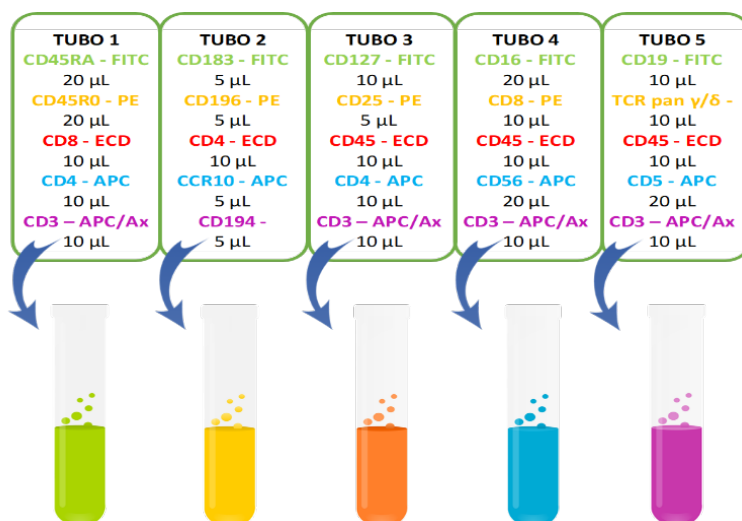
Volteamos suavemente para mezclar la sangre



Agitamos en el vórtex nuestras células conjuntivales

2. Alicuotamos las muestras en 5 tubos (50 μ l para sangre y 200 μ l para células conjuntivales). A continuación, lavamos las células conjuntivales con 2 mL de Cell Wash Solution y centrifugamos durante 5 minutos a 1.200 r.p.m. a 4°C.

3. Añadimos los siguientes anticuerpos a cada tubo (**la mitad para las células conjuntivales**)



4. Agitamos e incubamos 15 minutos en oscuridad a T^a Ambiente y añadimos 0,5 ml de FACS-LYSING 1X (Becton Dickinson 349202).
5. Por último, agitamos e incubamos 15 minutos en oscuridad a T^a Ambiente y realizamos la lectura en el citómetro.

Figura 21. Protocolo utilizado para el análisis celular de las muestras de sangre periférica y conjuntiva. Únicamente la muestra de células conjuntivales es la que se lava, la muestra de sangre periférica no necesita lavados.

3.2. LUMINEX® xMAP™ – MULTIPLEXADO DE ALTO RENDIMIENTO

Esta tecnología, muy similar al principio de citometría, permite hacer análisis masivos en un periodo reducido de tiempo. Al igual que el citómetro de flujo, detecta y registra señales lumínicas procedentes de una muestra biológica. Utilizando placas de 96 pocillos se pueden analizar hasta 100 analitos por pocillo/muestra. La técnica se fundamenta en lo que se conoce como sándwich Elisa, donde las microesferas magnéticas (*beads*) se unen al analito que queremos cuantificar. Posteriormente, con la adición de anticuerpos (Ac) que unen al otro extremo del analito, y la Estreptavidina-Ficoeritrina (Strep/PE), que se une al anticuerpo, se forma complejo **Bead-analito-Ac-Strep/PE**. Este complejo al ser irradiado con un haz de luz emitirá una señal luminosa en respuesta que será recogida por el analizador Luminex (ver **Figura 22**).



Figura 22. Esquema del complejo de unión de todos los reactivos que conforman el ensayo para el Luminex (izquierda). Fotografía del analizador Luminex IS-100 usado para analizar las citocinas de nuestro estudio.

Un mismo kit comercial puede contener microesferas para el análisis de una gran variedad de analitos, cada uno de ellos con una fluorescencia diferente. La tecnología Luminex es capaz de discriminar y registrar todas las señales emitidas, pudiendo realizar lecturas simultáneas de un gran número de analitos en un tiempo muy reducido.

Los kits comerciales para el análisis de moléculas solubles utilizadas, junto con las concentraciones mínimas detectables, se muestran en la **Tabla 5**.

PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE FACTORES SOLUBLES MEDIANTE TECNOLOGÍA LUMINEX

Kits comerciales utilizados:

Tabla 5. Referencias de los kits comerciales utilizados y moléculas analizadas en cada uno. Entre paréntesis, la concentración mínima detectable en pg/mL. *La molécula de RANTES se analizó por separado en plasma sanguíneo ya que necesitaba una dilución distinta a las demás. **Para el ensayo con TGF- β es necesario acidificar previamente nuestras muestras con 2.0 μ L de 1.0 N de ácido hidrocloreídrico por cada 25 μ L de muestra.

<i>Referencia</i>	<i>Analitos</i>
<i>HCYTOMAG-60K</i>	Eotaxina (3.08), IFN- γ (0.86), IL- 1b (0.52), IL-2 (0.28), IL-4 (0.20), IL-5 (0.17), IL-6 (0.14), IL-8 (0.52), IL-9 (2.20), IL-10 (0.91), IL-12p40 (3.24), IL-12p70 (0.88), IL-13 (2.58), IL-17A (0.71), IL-17E (6.00), IL-17F (28.63), IL-21 (2.00), IL-22 (12.68), MCP-1 (3.05), RANTES (1.58) *, TNF-a (5.39)
<i>HMMP2MAG-55K</i>	MMP-9 (2.00)
<i>TGFBMAG-64K-03**</i>	TGF- β 1 (6.00), TGF- β 2 (6.60), TGF- β 3 (2.20)
<i>HCYP2MAG-62K</i>	TSLP (3.1)
<i>HGAMMAG-301K</i>	IgA (400)
<i>HGAMMAG-303E</i>	IgE (400)

1. Lavar los pocillos de la placa con **200 μ L solución de lavado** y mantener en **agitación 10min** a temperatura ambiente. Después, decantar invirtiendo la placa.
2. Añadir **25 μ L de cada Standard, controles y controles negativos**.
3. Añadir **25 μ L del diluyente** apropiado para cada pocillo (*Assay Buffer* para muestras y *Serum Matrix* para el resto).
4. Añadir **25 μ L de plasma o 10 μ L 1:10 de lágrima** a los correspondientes pocillos.
5. Añadir **25 μ L de la solución de Beads** premezcladas.
6. **Incubar 2h** a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación.
7. **Lavar** dos veces con 200 μ L de solución de lavado con ayuda de un imán para placas.
8. Añadir **25 μ L de los anticuerpos** e incubar durante una hora a T^a ambiente.
9. Añadir **25 μ L de la solución de Estreptavidina-Ficoeritrina** a cada pocillo.
10. **Incubar** durante 30 minutos a T^a ambiente y en agitación.
11. **Decantar** el contenido con ayuda del imán y **lavar** con 200 μ L de solución de lavado.
12. Añadir **150 μ L de la solución para el Luminex y leer**.

Figura 23. Protocolo para la cuantificación de factores solubles en plasma y lágrima. Hay que tener en cuenta que los tiempos de incubación entre los distintos kits pueden variar dependiendo de las instrucciones del fabricante.

3.3. SECUENCIACIÓN DE ALTO RENDIMIENTO

Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento y de próxima generación (HT-NGS, *High-Throughput Next-Generation Sequencing*) son actualmente el tema más novedoso en el campo de la investigación genómica humana y animal. Son capaces de producir datos 100 veces más que los secuenciadores convencionales. Con el desarrollo continuo de las máquinas de secuenciación de alto rendimiento y el avance de las herramientas bioinformáticas modernas, esta técnica tiene cada vez un coste más bajo. El principio de la HT-NGS consiste en la secuenciación de moléculas de ADN de forma masiva y paralela en una celda de flujo. La secuenciación puede llevarse a cabo en un proceso repetitivo por etapas o de forma continua en tiempo real. Cada patrón clonal o molécula individual es secuenciada "individualmente" y puede contarse entre el total de secuencias generadas. La mejora en el rendimiento, calidad y cantidad de la información de la secuencia generada ha permitido realizar análisis avanzados del genoma que antes eran técnicamente imposibles o tenían un coste muy elevado. (115)

Una vez recogidas, las muestras de microbiota de conjuntiva bulbar inferior se enviaron inmediatamente para su análisis molecular al laboratorio **Biome Makers en Valladolid (Figura 24)**.



Figura 24. Fotografía del analizador MiSeq™ System – Illumina (izquierda). Acceso a la web de Biome Makers Valladolid (derecha)

Para nuestro estudio, la extracción de ADN se realizó con el kit DNeasy PowerLyzer PowerSoil de Qiagen. Para caracterizar las comunidades microbianas, tanto bacterianas como fúngicas, asociadas a las muestras, se seleccionaron las regiones marcadoras del ARNr 16S y del espaciador transcrito interno (ITS). Las bibliotecas se prepararon siguiendo el protocolo Illumina de PCR en dos pasos, utilizando cebadores personalizados que amplifican la región V4 del ARNr 16S y la región ITS1. La secuenciación se llevó a cabo en un instrumento Illumina MiSeq utilizando la secuenciación por pares (2×300 bp). **Se analizaron un total de 538 especies de bacterias y 648 de hongos.**

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el software IBM SPSS (versión 24.0.0.2 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Todos los datos obtenidos representados en tablas están representados en forma de **media ± desviación estándar**. Las gráficas de barras están representadas en forma de **media + error típico** positivo de la media.

Para contrastar la hipótesis de normalidad de las variables se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk, y para el estudio de la igualdad de varianzas se utilizó el contraste de Levene.

Para las comparaciones por pares realizadas entre muestras, patologías u otras agrupaciones como la edad o el sexo, se utilizó la prueba t-Student o el contraste no paramétrico **U de Mann-Whitney** aplicando la corrección de Bonferroni cuando no pudiera asumirse la normalidad de la variable dependiente.

Para el estudio de correlación entre distintas muestras (celulares y moleculares) se utilizó la prueba de **correlación de Spearman**. Por último, para las pruebas en microbiota se utilizó la prueba no paramétrica **ANOVA de Kruskal-Wallis** para comparar los 3 grupos de estudio. Además, se analizaron las diferencias de edad y sexo para descartar cualquier influencia estadística existente.

Los análisis estadísticos de los datos de la microbiota se realizaron principalmente utilizando los paquetes R phyloseq y microbiome. Los análisis del microbioma se llevaron a cabo utilizando la programación R. La diversidad alfa se calculó basándose en el índice de Shannon para las lecturas enrarecidas de 16S e ITS. El análisis de varianza de las categorías de patología por sexo se determinó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. La diversidad beta se calculó sobre los datos de composición utilizando el análisis de coordenadas principales (PCoA) del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y la matriz de distancia de Bray-Curtis.

Cuando los valores de $p \leq 0,05$ son considerados estadísticamente significativos, representándose las distintas escalas de significación como sigue: * para valores de $p < 0,05$, ** para valores de $p < 0,01$ y *** para valores de $p < 0,001$.

ANEXO I - TÉCNICAS DE *GATING*

ANEXO I - TÉCNICAS DE *GATING*

- **TUBO 1** – Linfocitos T CD4 y CD8 y su estado de maduración
- **TUBO 2** – Linfocitos Th y sus subtipos
- **TUBO 3** – Linfocitos T reguladores
- **TUBO 4** – Subpoblaciones de linfocitos NK y NKT
- **TUBO 5** – Linfocitos TCR $\gamma\delta$ y subpoblaciones de B

TUBO 1 – Linfocitos T CD4 y CD8 y su estado de maduración

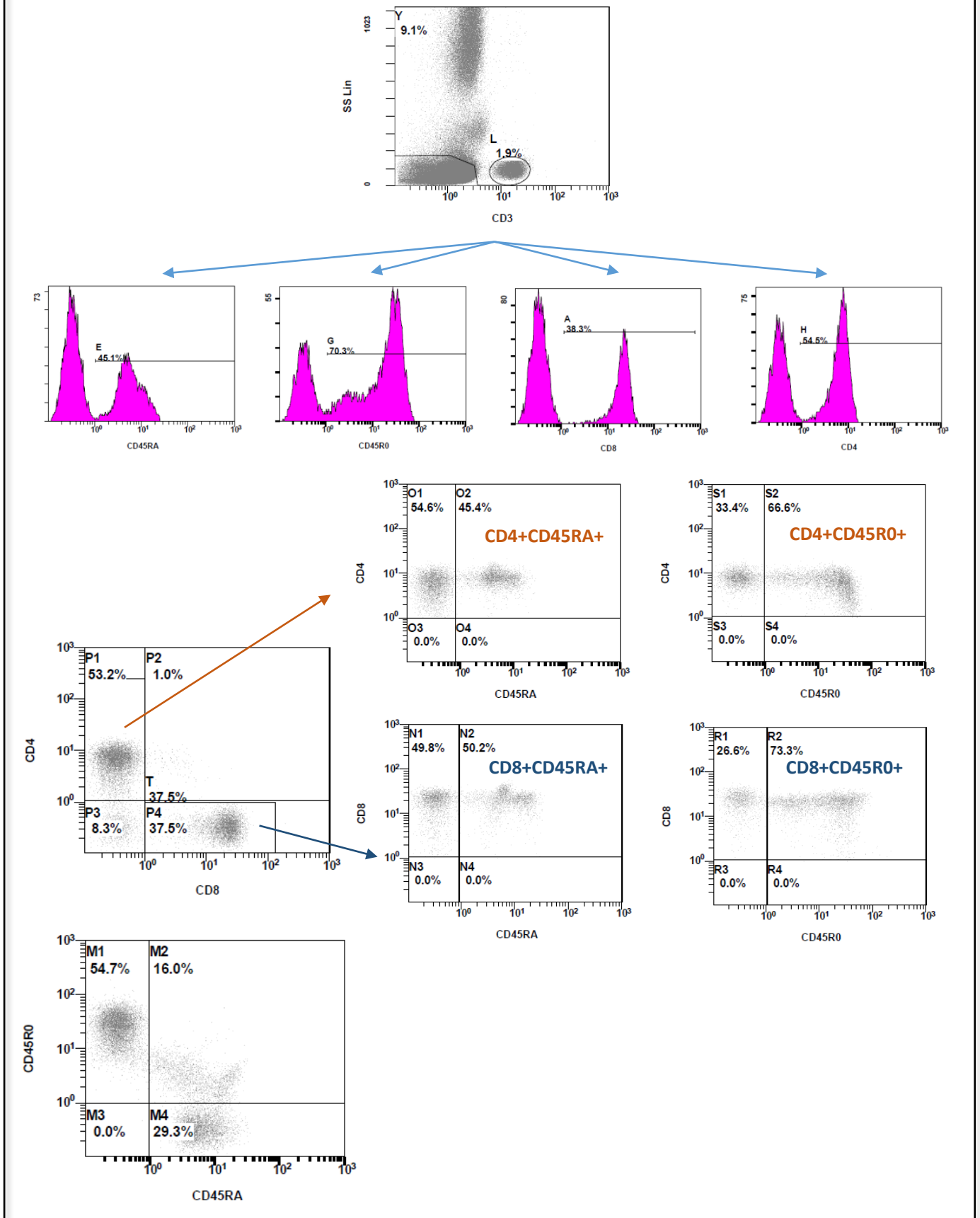
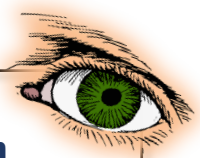


Figura 25. Diagramas de citometría correspondientes al TUBO 1 para la muestra de sangre periférica, utilizados para calcular las proporciones de las distintas poblaciones de linfocitos CD4 y CD8 vírgenes y memoria.



TUBO 1 – Linfocitos T CD4 y CD8 y su estado de maduración

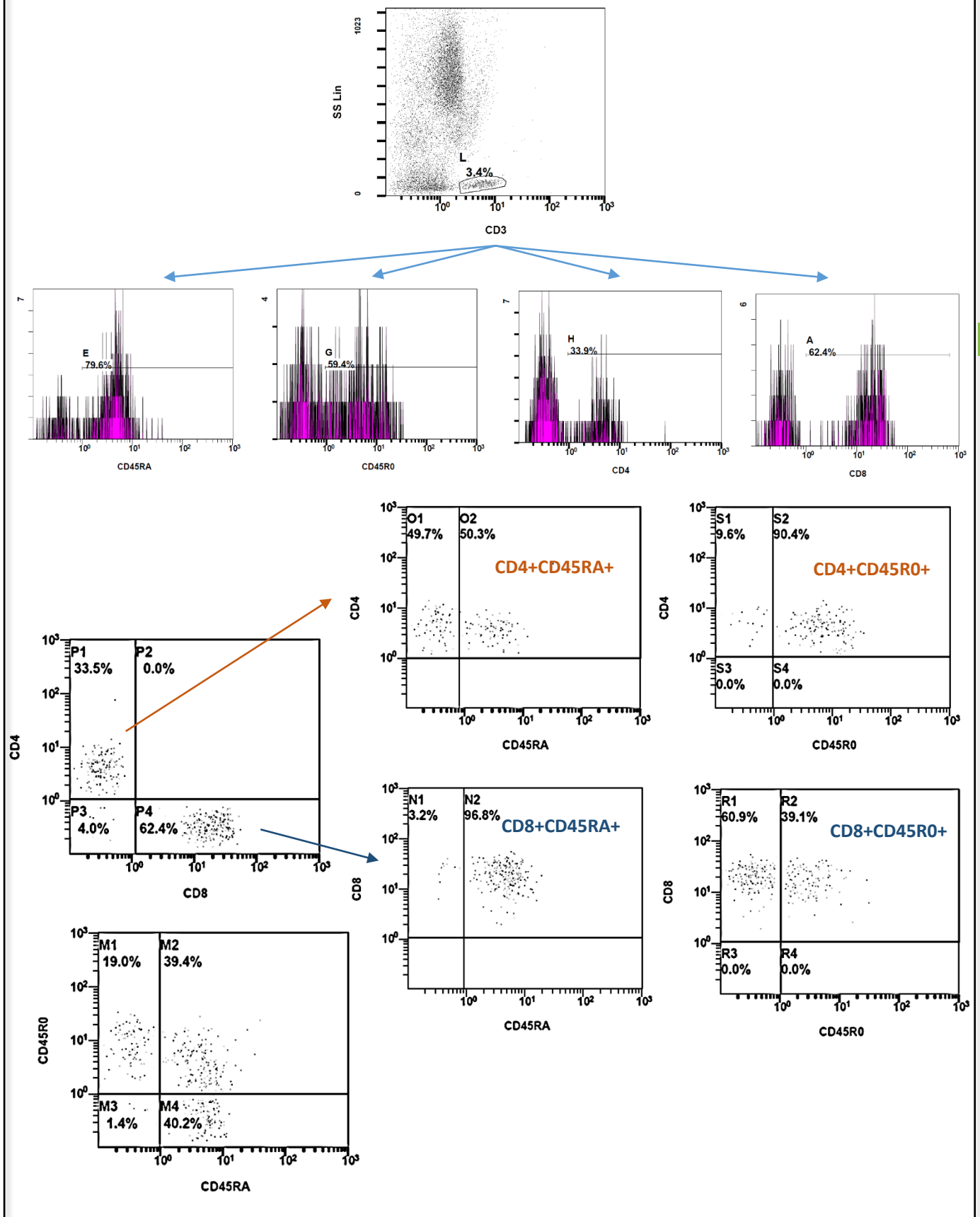


Figura 26. Diagramas de citometría correspondientes al TUBO 1 para la muestra de células conjuntivales, utilizados para calcular las proporciones de las distintas poblaciones de linfocitos CD4 y CD8 vírgenes y memoria.

TUBO 2 – Linfocitos Th y sus subtipos

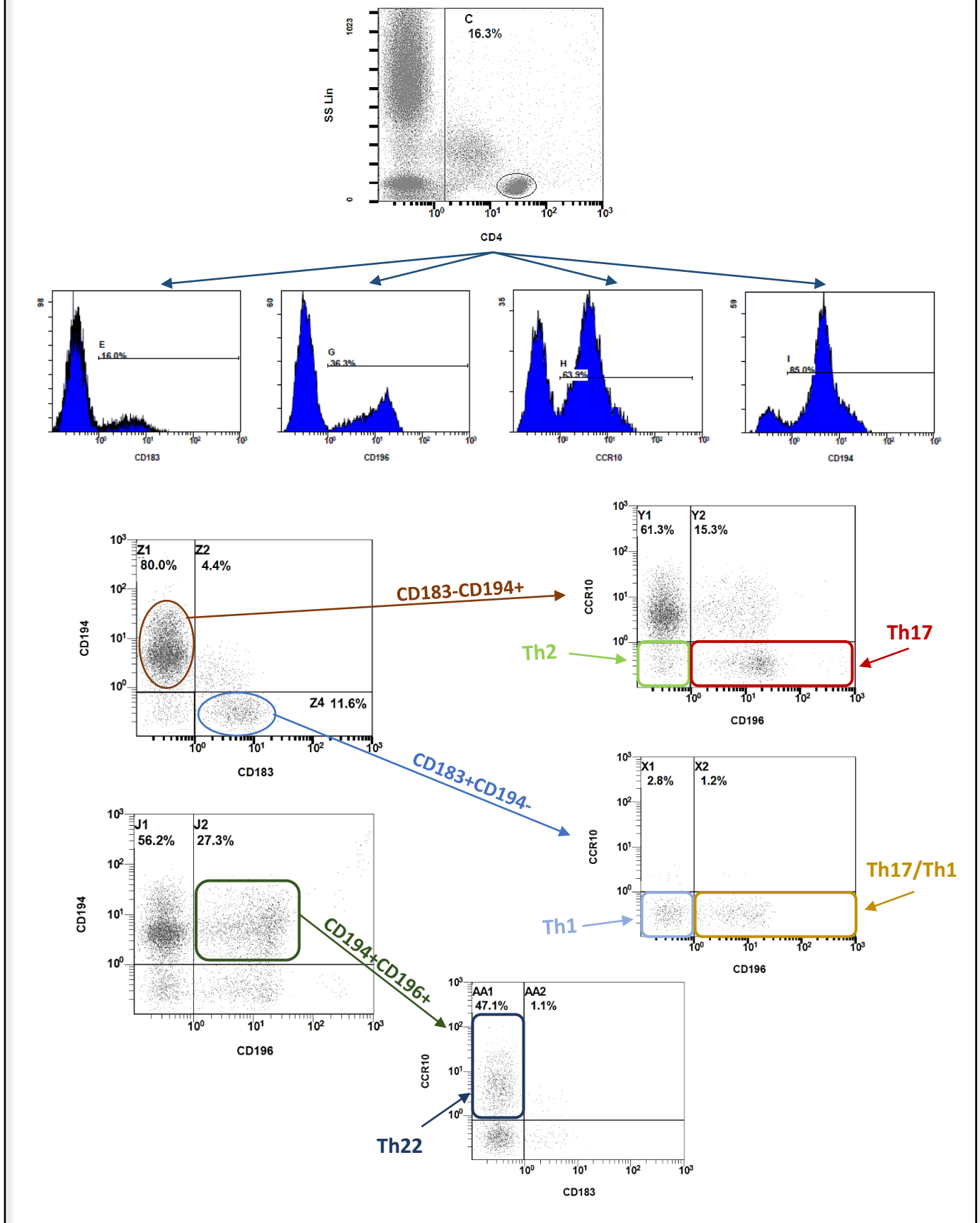
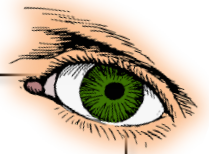


Figura 27. Diagramas de citometría correspondientes al TUBO 2 para la muestra de sangre periférica, utilizados para calcular las proporciones de las distintas poblaciones de linfocitos Th: Th1, Th2, Th17/Th1 y Th22.



TUBO 2 – Linfocitos Th y sus subtipos

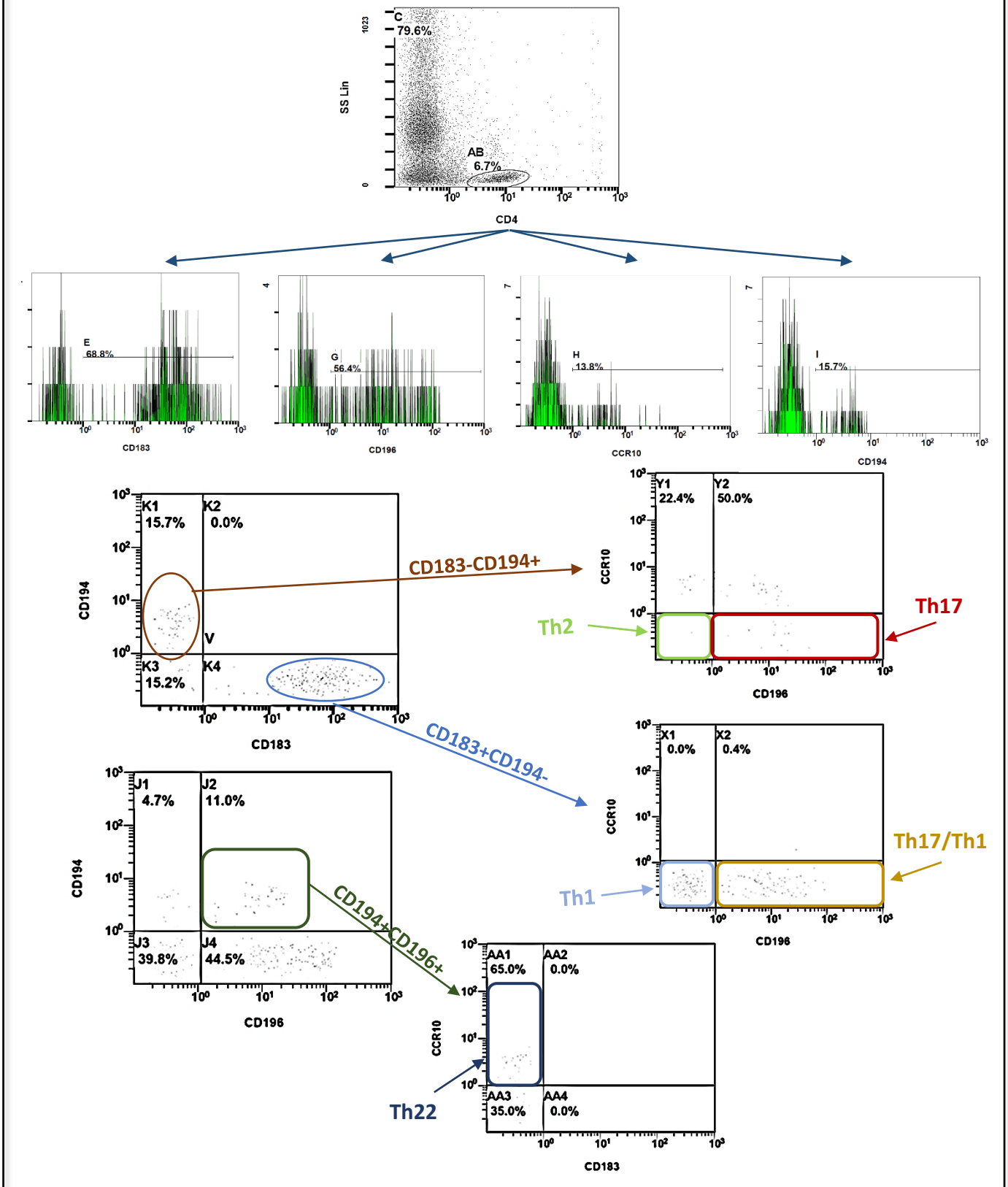


Figura 28. Diagramas de citometría correspondientes al TUBO 2 para la muestra de células conjuntivales, utilizados para calcular las proporciones de las distintas poblaciones de linfocitos Th: Th1, Th2, Th17/Th1 y Th22.

TUBO 3 – Linfocitos T reguladores

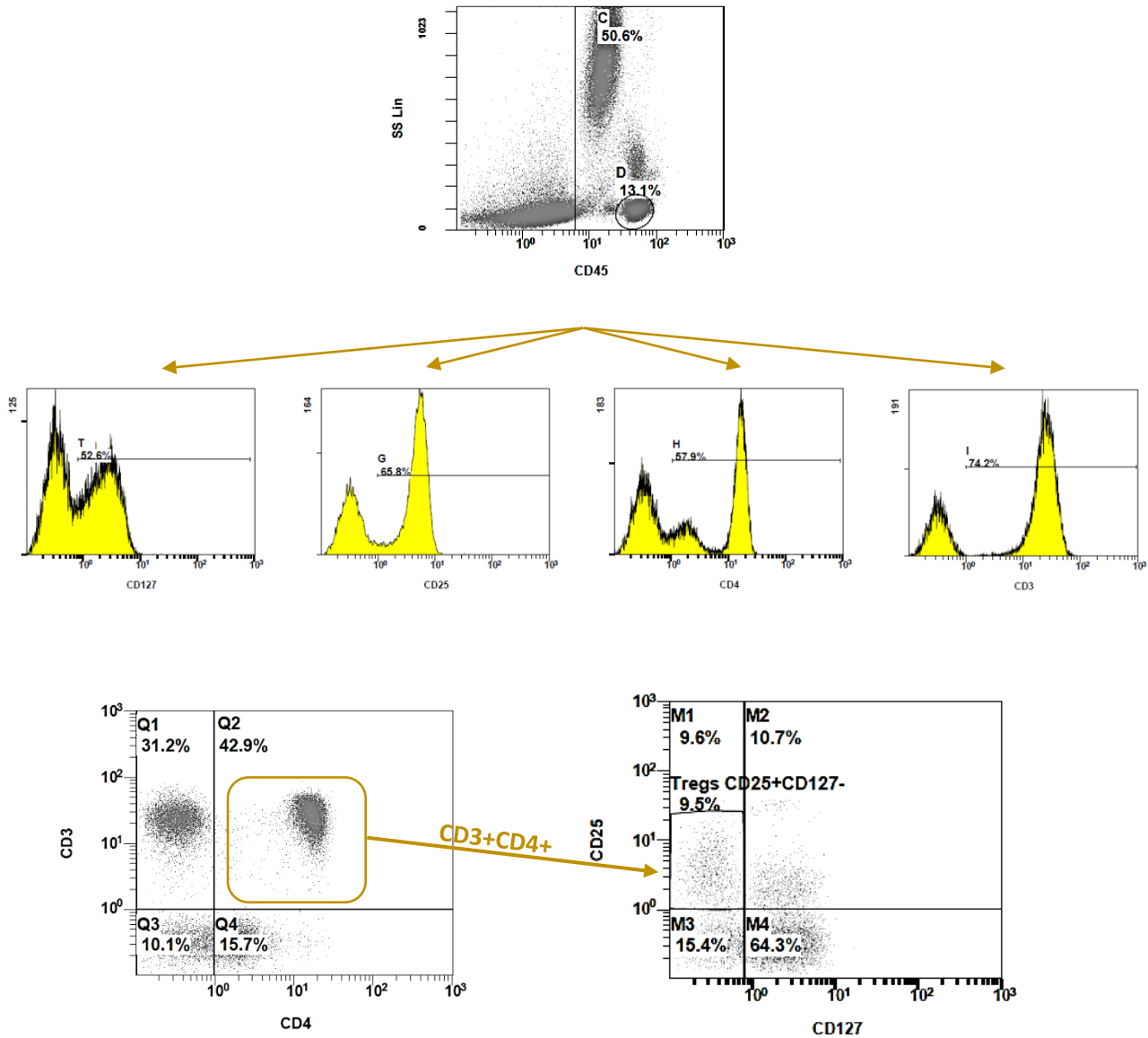
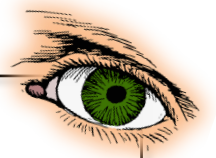


Figura 29. Diagramas de citometría correspondientes al TUBO 3 para la muestra de sangre periférica, utilizados para calcular las proporciones de linfocitos T reguladores.



TUBO 3 – Linfocitos T reguladores

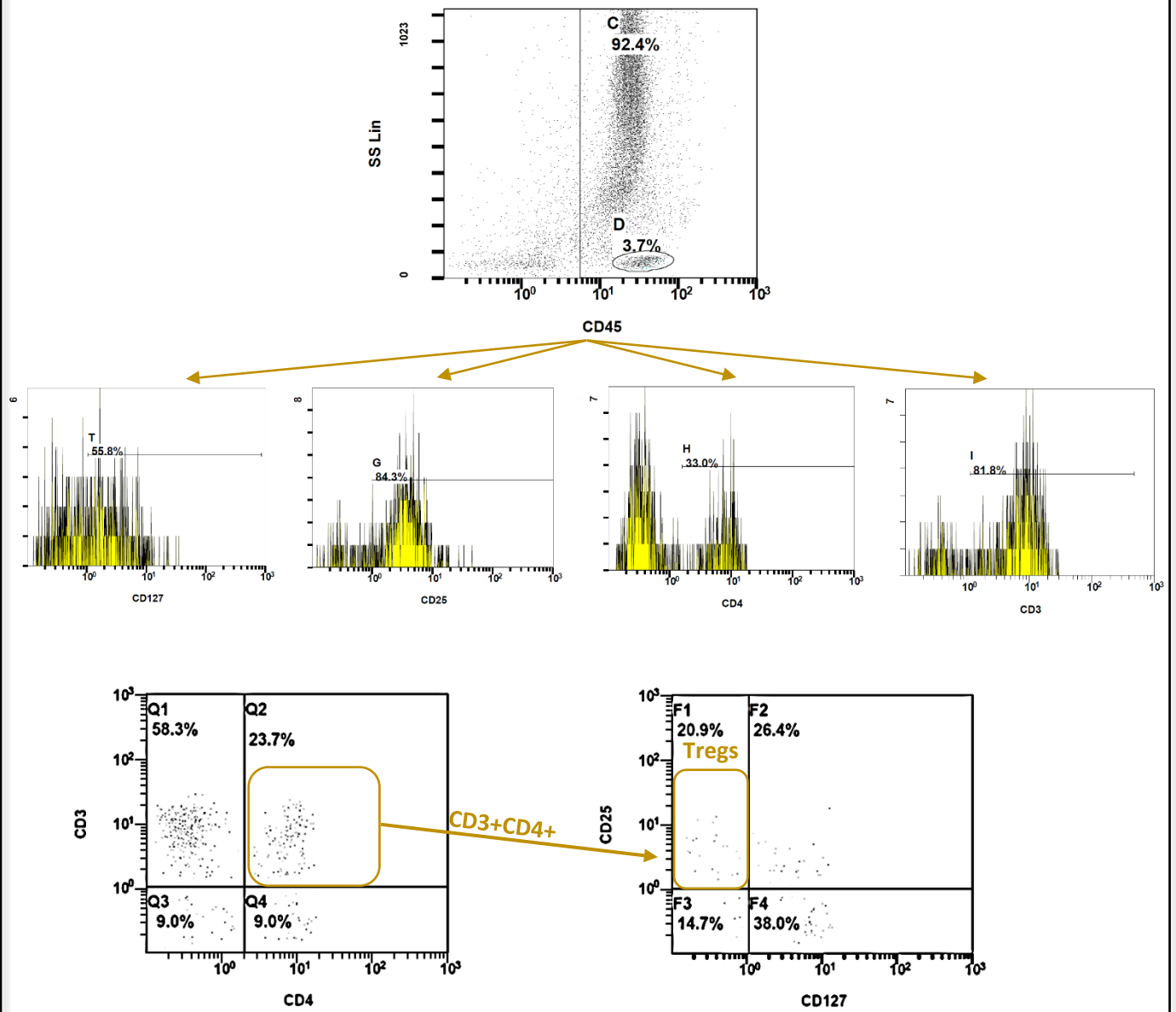


Figura 30. Diagramas de citometría correspondientes al TUBO 3 para la muestra de células conjuntivales, utilizados para calcular las proporciones de linfocitos T reguladores.

TUBO 4 – Subpoblaciones de linfocitos NK y NKT

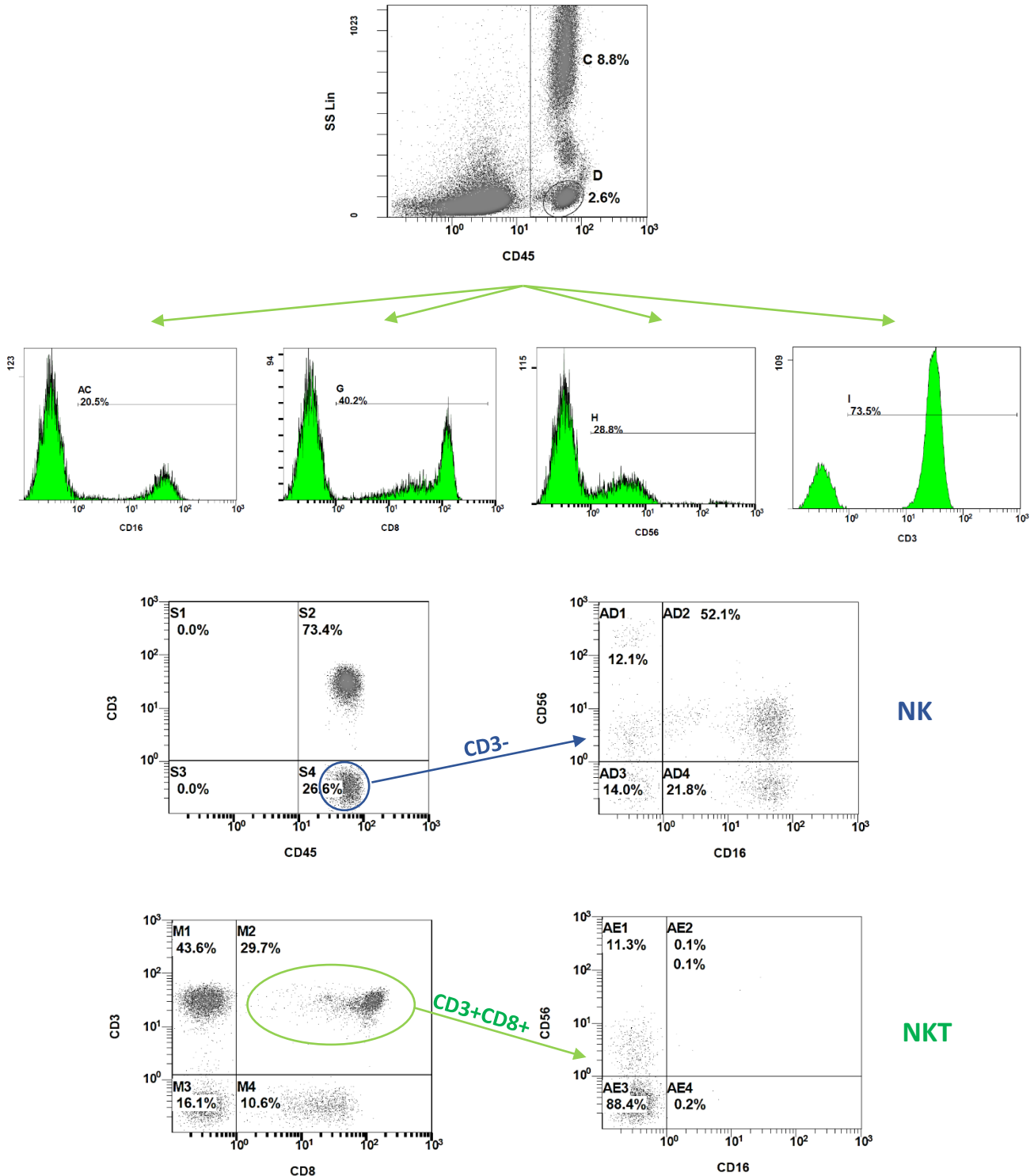
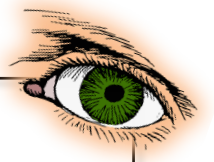


Figura 31. Diagramas de citometría correspondientes al TUBO 4 para la muestra de sangre periférica, utilizados para calcular las proporciones de linfocitos NK, NKT y sus subtipos CD16+/- y CD56+/-.



TUBO 4 – Subpoblaciones de linfocitos NK y NKT

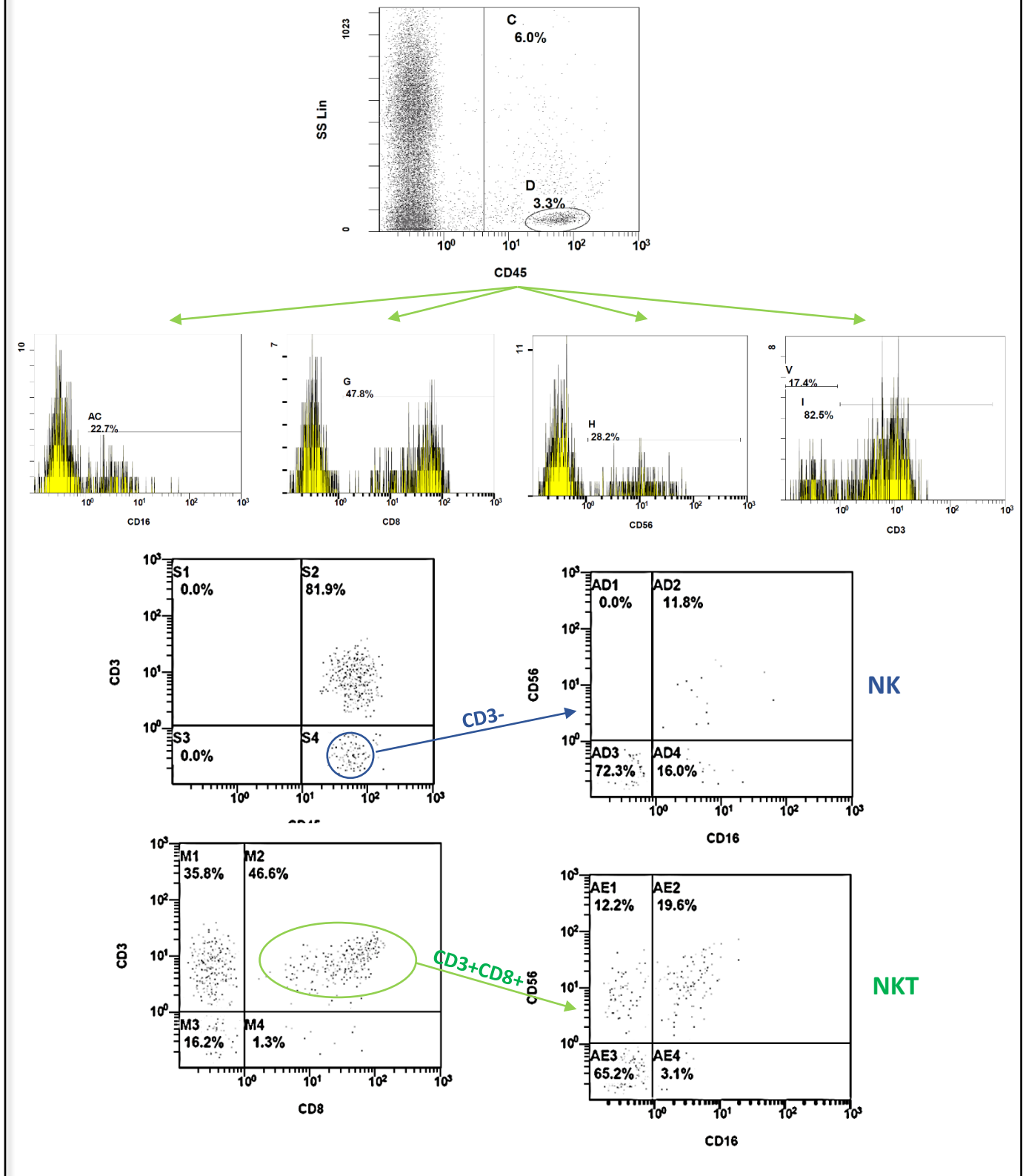


Figura 32. Diagramas de citometría correspondientes al TUBO 4 para la muestra de células conjuntivas, utilizados para calcular las proporciones de linfocitos NK, NKT y sus subtipos CD16+/- y CD56+/-.

TUBO 5 – Linfocitos TCR $\gamma\delta$ y subpoblaciones de B

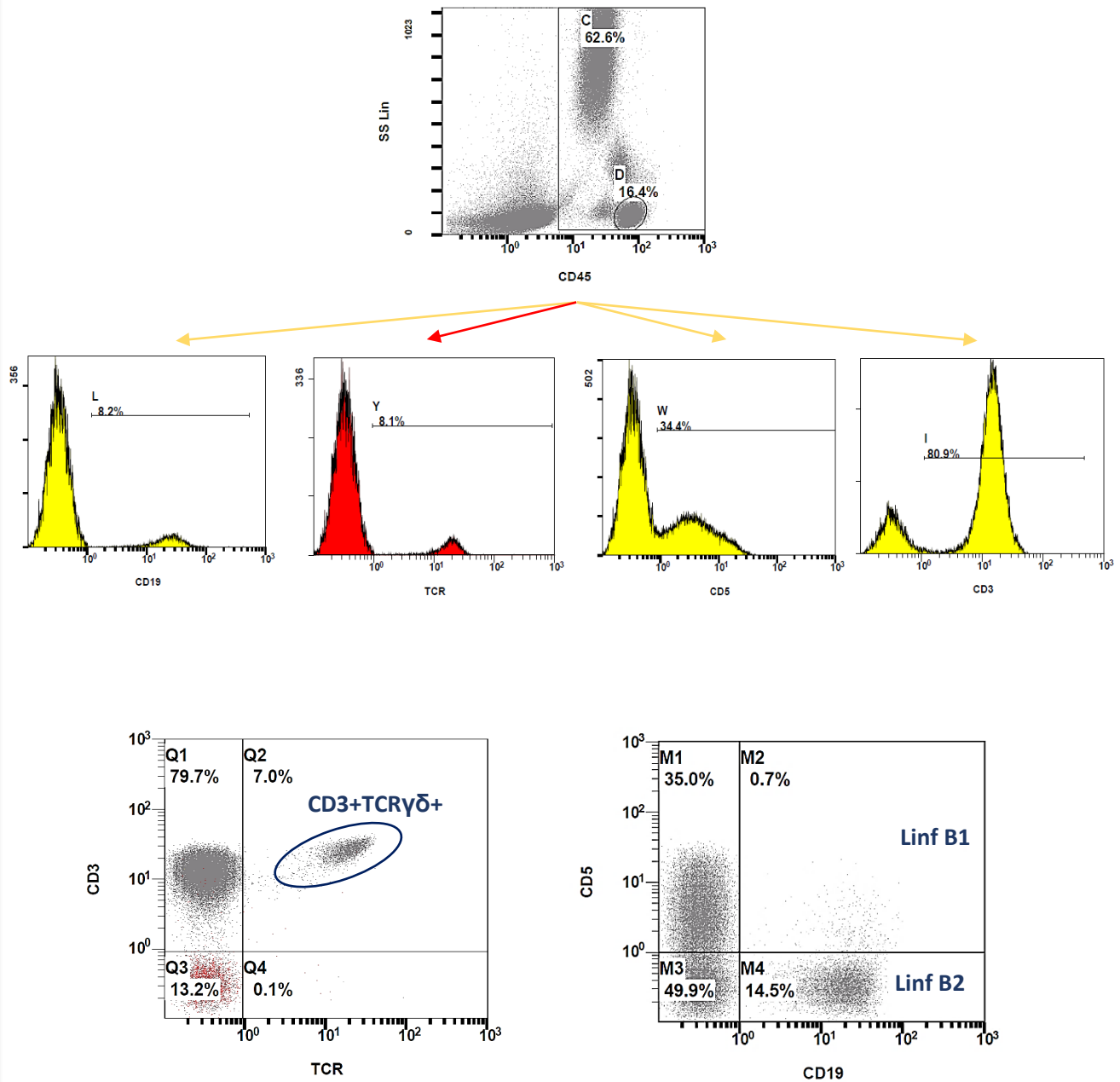
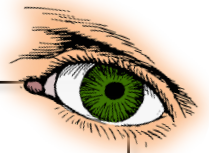


Figura 33. Diagramas de citometría correspondientes al TUBO 5 para la muestra de sangre periférica, utilizados para calcular las proporciones de linfocitos B1, B2 y TCR $\gamma\delta$.



TUBO 5 – Linfocitos TCR $\gamma\delta$ y subpoblaciones de B

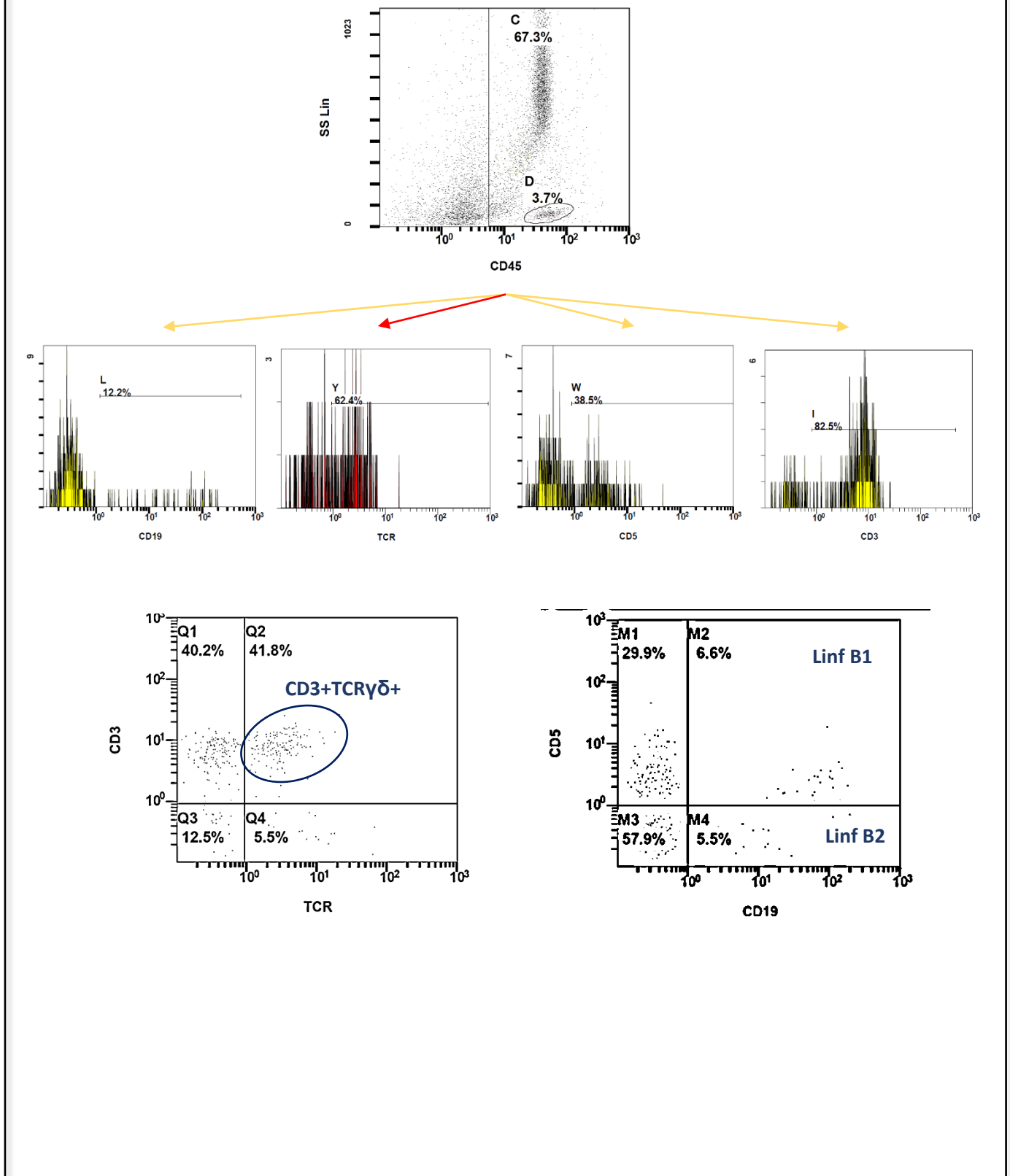


Figura 34. Diagramas de citometría correspondientes al TUBO 5 para la muestra de células conjuntivas, utilizados para calcular las proporciones de linfocitos B1, B2 y TCR $\gamma\delta$ +

En este apartado se presentarán todos los resultados obtenidos en el siguiente orden de contenidos:

1. Descriptivo de la muestra
2. Análisis de las concentraciones de polen y toma de muestras
3. Sistema inmunitario celular
 - 3.1. Diferencias asociadas a la patología en sangre
 - 3.2. Diferencias asociadas a la patología en conjuntiva
 - 3.3. Diferencias asociadas a la edad y el género en conjuntiva
 - 3.4. Diferencias entre sangre y conjuntiva
 - 3.5. Análisis de la correlación entre sangre y conjuntiva
4. Sistema inmunitario humoral
 - 4.1. Diferencias asociadas a la patología en plasma
 - 4.2. Diferencias asociadas a la patología en lágrima
 - 4.3. Diferencias entre plasma y lágrima
5. Microbiota ocular
 - 5.1. Diferencias asociadas a la patología en bacterias
 - 5.2. Diferencias asociadas a la patología en hongos
6. Propuesta de posibles biomarcadores para el diagnóstico de la conjuntivitis alérgica

RESULTADOS

1. DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

Los resultados estadísticos obtenidos del cuestionario, anamnesis, test y pruebas de superficie ocular se resumen en la **Tabla 6**:

Tabla 6. Datos descriptivos de la muestra. Número de muestras obtenidas por cada grupo de estudio, datos sobre la edad y el sexo, hábitos de la vida diaria, enfermedades, medicación y resultados de las pruebas de superficie ocular. CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne.

RESULTADOS CUESTIONARIO Y PRUEBAS DE SUPERFICIE OCULAR

	CAE	CAP	CONTROL
nº total de voluntarios	28	32	35
nº muestras de sangre periférica	22	29	29
nº muestras de citología conjuntival	23	26	24
nº muestras de lágrima	23	29	29
nº muestras de microbiota	6	9	7
Media de edad	31.39 ± 18.15	34.87 ± 14.79	45.71 ± 16.57
Rango de edad	De 10 a 66	De 13 a 67	De 19 a 76
Sexo (Hombre: Mujer)	18:10	10:22	17:18
Residencia habitual (urbana o rural)	93% urbana	90% urbana	57% urbana
Hábitos de la vida diaria			
Toma de alcohol (al menos 1 vez por semana)	46%	70%	77%
Fumador	11%	21%	14%
Actividad física (de 2 a 4 veces por semana)	93%	65%	66%
Horas de sueño (menos de 8 horas)	68%	78%	77%
Toma de suplementos alimenticios	7%	25%	14%
Historial de enfermedades			
Asma	28%	25%	0%
Rinitis	39%	34%	14%
Dermatitis atópica	39%	37%	6%
Bronquitis	11%	16%	6%
Conjuntivitis	75%	3%	17%
En los últimos tres meses			
Uso de antihistamínicos orales	39%	16%	3%
Uso de antihistamínicos oculares	28%	28%	8%
Uso de lágrimas artificiales	14%	6%	26%
Uso de lentes de contacto	25%	4%	6%
Test Oculares			
Puntuación media OSDI	5	4	4
TBUT	>10	>10	>10
Papilas conj. Tarsal superior (Grado I)	28%	37%	28%
Papilas conj. Tarsal superior (Grado II)	21%	19%	6%
Tinción con fluoresceína (Grado I)	14%	40%	26%
SCHIRMER	12mm	14mm	13mm

2. ANÁLISIS DE LAS CONCENTRACIONES DE POLEN Y TOMA DE MUESTRAS

Las citas con los pacientes y toma de muestras se realizaron durante el periodo de 2016 a 2019, principalmente en los meses de primavera/verano, donde los pacientes alérgicos reportaban más síntomas. Dependiendo del año, la aparición del polen de algunas especies podía adelantarse o retrasarse, pudiendo abarcar algún mes del otoño o el invierno. Concretamente en Valladolid, los pólenes de gramíneas, ciprés, plátano de sombra y encina fueron los que presentaron concentraciones más altas durante esos 4 años.

Las fluctuaciones en las concentraciones de polen en la provincia de Valladolid junto con el número de pacientes citados durante el desarrollo de este estudio (de 2016 a 2019) se detallan en la **Figura 35**.

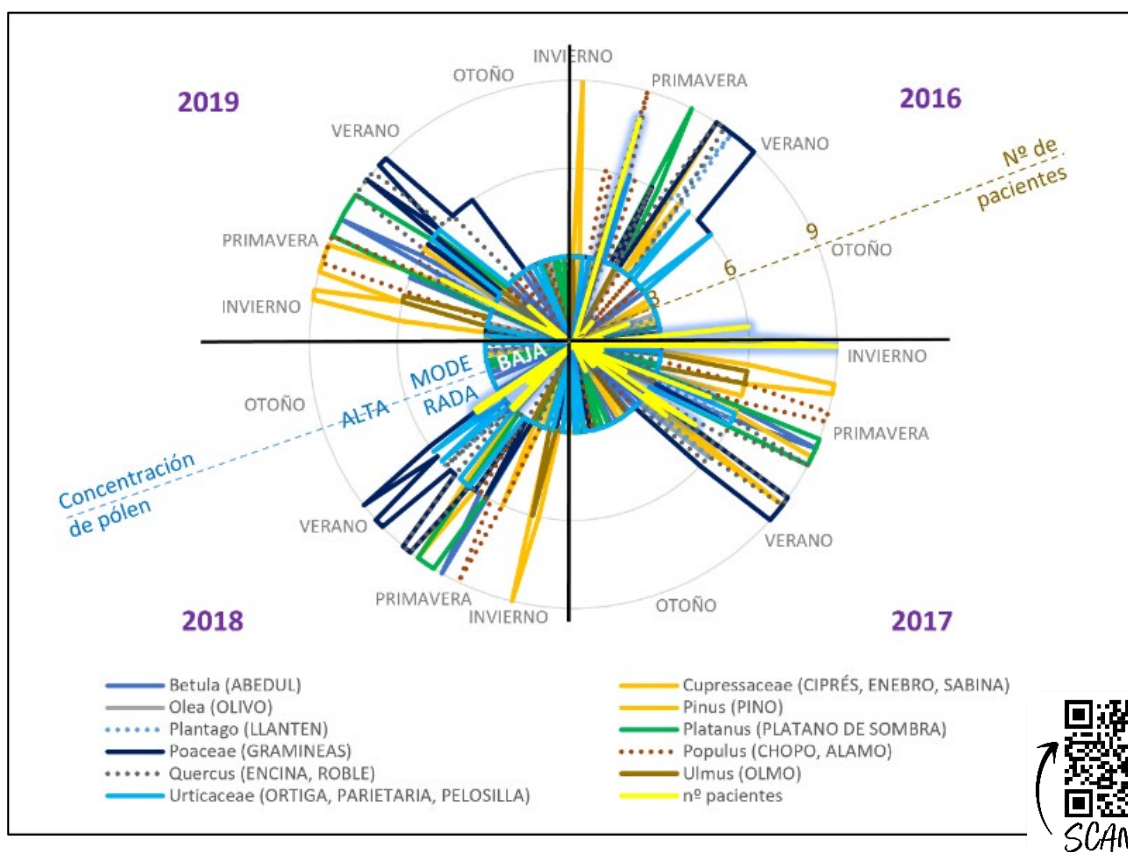


Figura 35. Cambios en las concentraciones de polen (baja, moderada o alta) a lo largo de los cuatro años de recogida de muestra. Datos obtenidos de la Junta de Castilla y León para la provincia de Valladolid, del año 2016 al 2019 (<https:// analisis.datosabiertos.jcyl.es/explore/dataset/informacion-polinica-historica/export/>). En amarillo se ha añadido el nº de pacientes de los que obtuvimos alguna de las muestras. Podemos observar en la gráfica las fluctuaciones y de polen, donde las concentraciones más altas corresponden a Ciprés, Plátano de sombra, Gramíneas y Encina.

3. SISTEMA INMUNITARIO CELULAR

3.1. DIFERENCIAS ASOCIADAS A LA PATOLOGÍA EN SANGRE PERIFÉRICA

Analizando los datos obtenidos de la citometría de flujo hemos podido observar diferencias significativas entre los subtipos de linfocitos T CD4 y B.

Dentro de los linfocitos T cooperadores (Th) las diferencias más claras provienen de la conjuntivitis alérgica estacional (CAE), donde **Th1** (C: $8,75 \pm 7,49\%$ vs CAE: $4,38 \pm 3,12\%$ vs CAP: $6,51 \pm 3,95\%$) y **Th17/Th1** (C: $4,51 \pm 2,58\%$ vs CAE: $2,96 \pm 2,52\%$ vs CAP: $5,52 \pm 4,67\%$) **disminuyen** comparado con el grupo de sanos y conjuntivitis alérgica perenne (CAP), mientras que **Th17** (C: $2,79 \pm 2,43\%$ vs CAE: $4,16 \pm 2,54\%$) y **Th22** (C: $1,32 \pm 1,6$ vs CAE: $2,22 \pm 1,55\%$) tienen proporciones mayores que el grupo control (ver **Figura 36**).

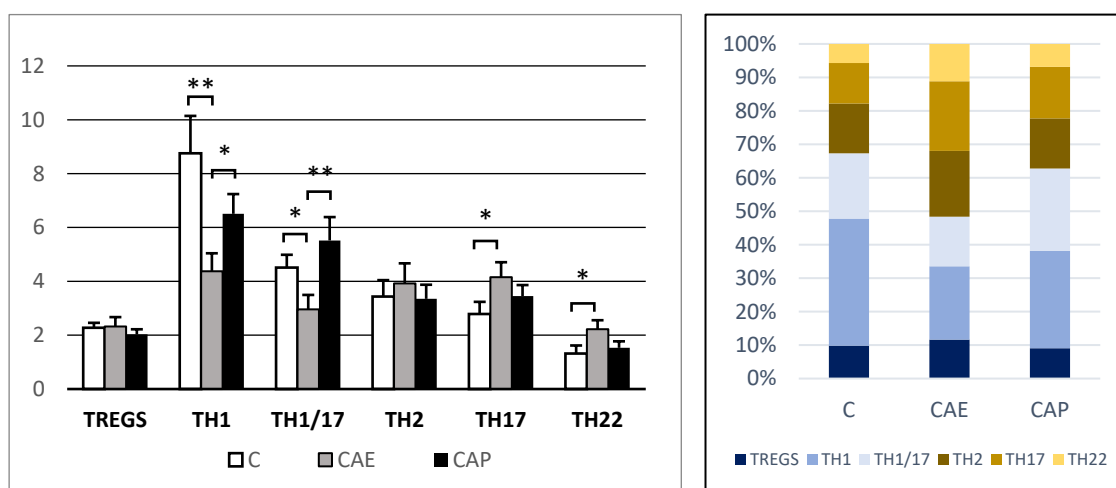


Figura 36. Diferencias en sangre periférica entre los 3 grupos de estudio para los linfocitos T CD4+ (gráfica de la izquierda). Y porcentaje que representa cada subpoblación (gráfica de la derecha). * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$. C=control, CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne.

Cabe destacar, como se muestra en la figura anterior, que para alérgicos estacionales el fenotipo Th proinflamatorio (Th2, Th17 y Th22) supera al fenotipo más inmunomodulador (Treg, Th1, Th17/Th1), al contrario de lo que ocurre en el grupo de CAP.

Por otro lado, hemos encontrado diferencias significativas ($p < 0,05$) en **los linfocitos T CD4+ de memoria** (CD4+CD45R0+), pudiendo observar un incremento de esta población en el grupo de alergias perennes con respecto a estacionales (C: $25,72 \pm 8,57\%$ vs CAE: $23,97 \pm 9,27\%$ vs CAP: $29,45 \pm 10,29\%$).

Aunque cabría esperar que para el grupo de conjuntivitis alérgicas estacionales los linfocitos T CD4⁺ de memoria estuvieran aumentados, no ha sido así. En cambio, esto sí que ocurre en el grupo de conjuntivitis alérgica perenne, donde vemos que las células memoria superan a las vírgenes perennes (ver **Figura 37**, derecha).

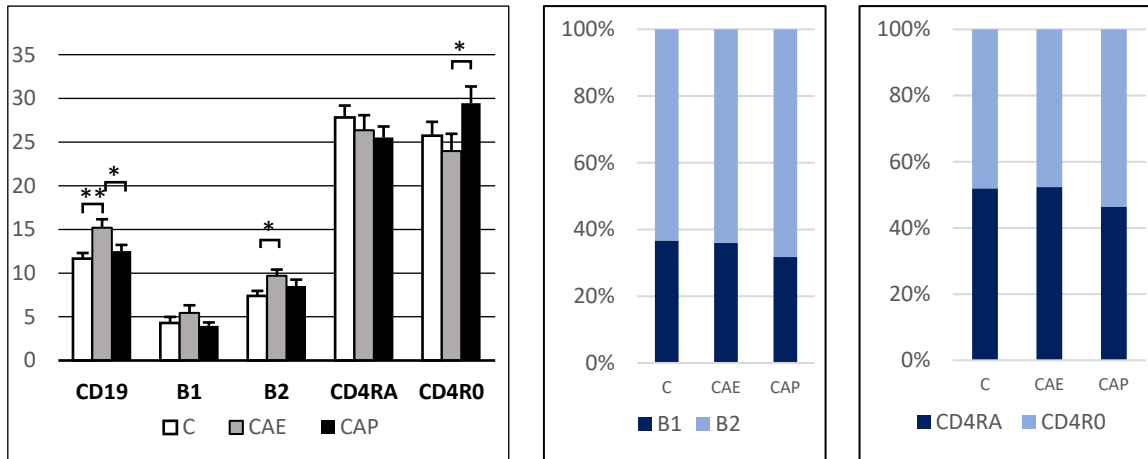
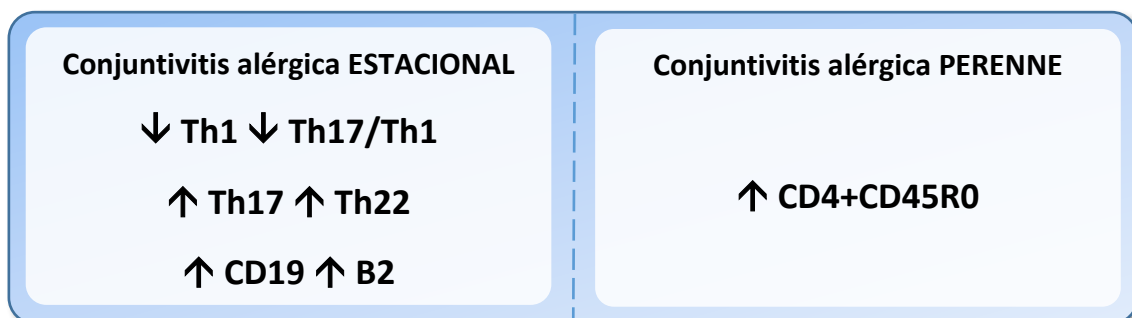


Figura 37. Diferencias en sangre periférica en los subtipos de linfocitos B y CD4 vírgenes y memoria en los 3 grupos de estudio (gráfica de la izquierda). Podemos observar cómo en todos los casos los linfocitos B2 tienen proporciones mayores que los B1 (gráfica central) y que, únicamente en CAP, los linfocitos T CD4 memoria superan a los CD4 vírgenes (gráfica de la derecha). * $p > 0,05$. C=control, CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne.

Por último, dentro de los linfocitos B hemos encontrado diferencias significativas para conjuntivitis alérgicas estacionales donde se observa un **aumento de linfocitos CD19 totales** (C: $11,65 \pm 3,52\%$ vs CAE: $15,19 \pm 4,56\%$ vs CAP: $12,53 \pm 3,78\%$) marcado por el incremento de los **linfocitos B2** (C: $7,4 \pm 3,07\%$ vs $9,69 \pm 3,34\%$ vs $8,52 \pm 3,92\%$). Aunque las diferencias se han encontrado en el grupo de CAE debemos remarcar, como se muestra en la **Figura 37** (central), que el cociente B1/B2 es menor en ambos grupos de conjuntivitis alérgica.

Resumen



Resumen de resultados 1. Diferencias entre los grupos de conjuntivitis alérgica estacional y perenne en las poblaciones de linfocitos de sangre periférica.

3.2. DIFERENCIAS ASOCIADAS A LA PATOLOGÍA EN CONJUNTIVA

Analizando los linfocitos intraepiteliales de la conjuntiva se han encontrado diferencias significativas en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y en linfocitos de la inmunidad innata como son: MAIT, NKT y TCR $\gamma\delta$.

Dentro de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 conjuntivales se han observado ciertas homologías con sangre periférica. Por ejemplo, las proporciones de linfocitos Th1, Th17 y Th22 en ambos tejidos parecen seguir el mismo patrón: una disminución de los linfocitos Th1 mientras que Th17 y Th22 aumentan en los grupos de conjuntivitis alérgica. Como podemos ver en la **Figura 38**, las células **Th1** presentan valores más bajos en los grupos de conjuntivitis alérgica (C: $3,78 \pm 3,25\%$ vs CAE: $1,87 \pm 2,21\%$ vs CAP: $2,56 \pm 1,58\%$) mientras que las **Th2** aparecen incrementadas, siendo ese aumento más pronunciado en alergias perennes (C: $1,46 \pm 1,76\%$ vs CAE: $2,1 \pm 2,81\%$ vs CAP: $3,8 \pm 4,51\%$).

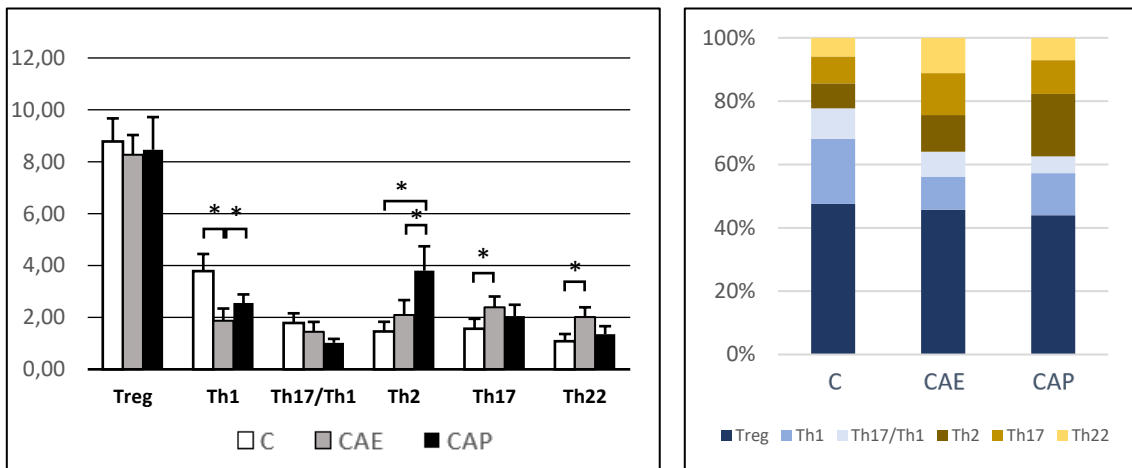


Figura 38. Comparación de los distintos subtipos de linfocitos T CD4+ en conjuntiva entre los 3 grupos de estudio (gráfica de la izquierda). Y porcentaje que representa cada subpoblación (gráfica de la derecha). * $p > 0,05$. C=control, CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne.

Por otro lado, **Th17** (C: $1,56 \pm 1,87\%$ vs CAE: $2,39 \pm 2,03\%$) y **Th22** (C: $1,08 \pm 1,36\%$ vs CAE: $2,02 \pm 1,84\%$) tienen proporciones mayores en el grupo de conjuntivitis alérgicas comparado con el grupo control. Cabe destacar que en los grupos de conjuntivitis alérgica las proporciones de linfocitos Th2 eran superiores a las de Th1, mientras que en el grupo control eran los linfocitos Th1 los que superaban con creces a las Th2.

Como hemos mencionado anteriormente, en conjuntiva las proporciones de los linfocitos Treg son mayores que en sangre. Por esta razón, los linfocitos con funciones

inmunomoduladoras (Treg, Th1 y Th17/Th1) predominan sobre los linfocitos con funciones proinflamatorias (Th2, Th17 y Th22) en los tres grupos de estudio. No obstante, en los dos grupos de conjuntivitis existe un notable crecimiento de los linfocitos Th proinflamatorios. (**Figura 38, derecha**)

Dentro de las subpoblaciones de linfocitos con funciones propias de la inmunidad innata hemos encontrado un **incremento de los linfocitos NKT CD8+** (C: $12,46 \pm 8,76\%$ vs CAE: $14,98 \pm 11,53\%$ vs $20,42 \pm 12,16\%$) y en especial los **CD56+CD16+** (C: $6,17 \pm 6,32\%$ vs CAE: $7,51 \pm 9,74\%$ vs CAP: $12,13 \pm 10,15\%$) en el grupo de conjuntivitis alérgica perenne. En cambio, ocurre lo contrario con los linfocitos **TCR $\gamma\delta$ +** (C: $33,89 \pm 14,22\%$ vs CAE: $34,88 \pm 12,7\%$ vs CAP: $25,1 \pm 15,36\%$) y **MAIT** (C: $16,33 \pm 9,82\%$ vs CAE: $18,29 \pm 12,30\%$ vs CAP: $9,77 \pm 7,39\%$), que **están disminuidas en CAP**, lo cual es sorprendente, ya que también cabría esperar un incremento de las células MAIT, que recordemos son consideradas un subtipo de NKT (ver **Figura 39**).

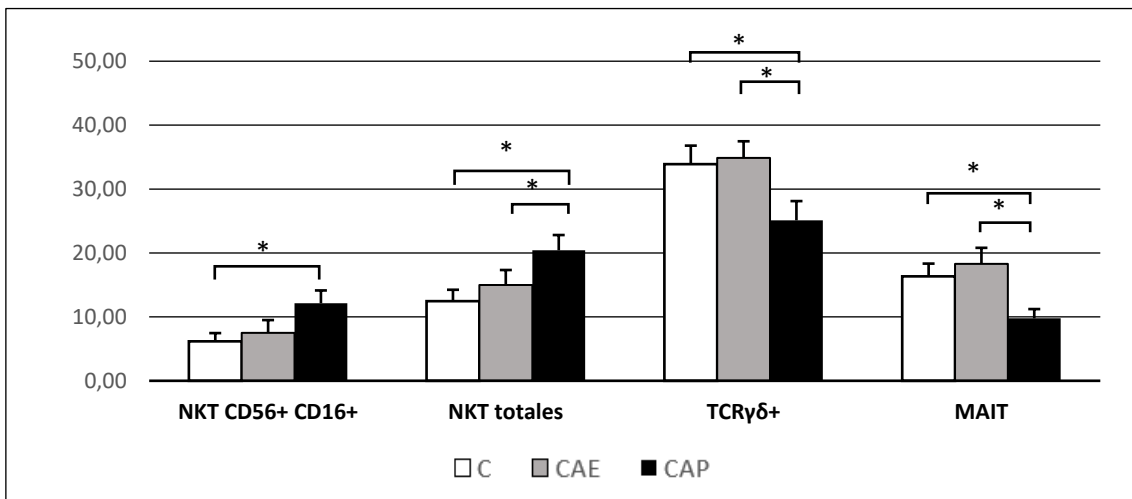
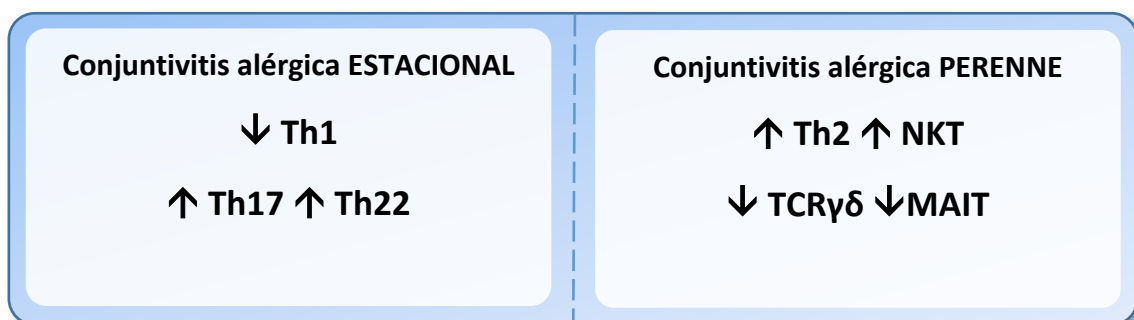


Figura 39. Diferencias en las poblaciones de NKT, TCR $\gamma\delta$ y MAIT. * $p > 0,05$. C=control, CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne.

Resumen



Resumen de resultados 2. Diferencias entre los grupos de conjuntivitis alérgica estacional y perenne en las poblaciones de linfocitos de la conjuntiva.

Observando los porcentajes de linfocitos Th en sangre periférica y en conjuntiva (**Figuras 36 y 38**), podemos observar cierta homología en los subtipos **Th1**, **Th17** y **Th22**, cuyas diferencias fueron estadísticamente significativas en ambos tejidos para el grupo de conjuntivitis alérgicas estacionales. Realizando el análisis de correlación entre sangre periférica y conjuntiva para esos subtipos de linfocitos Th se observa que existe correlación estadísticamente significativa para Th17 y Th22, no así para Th1, en el grupo de conjuntivitis alérgicas estacionales (**Figura 40**).

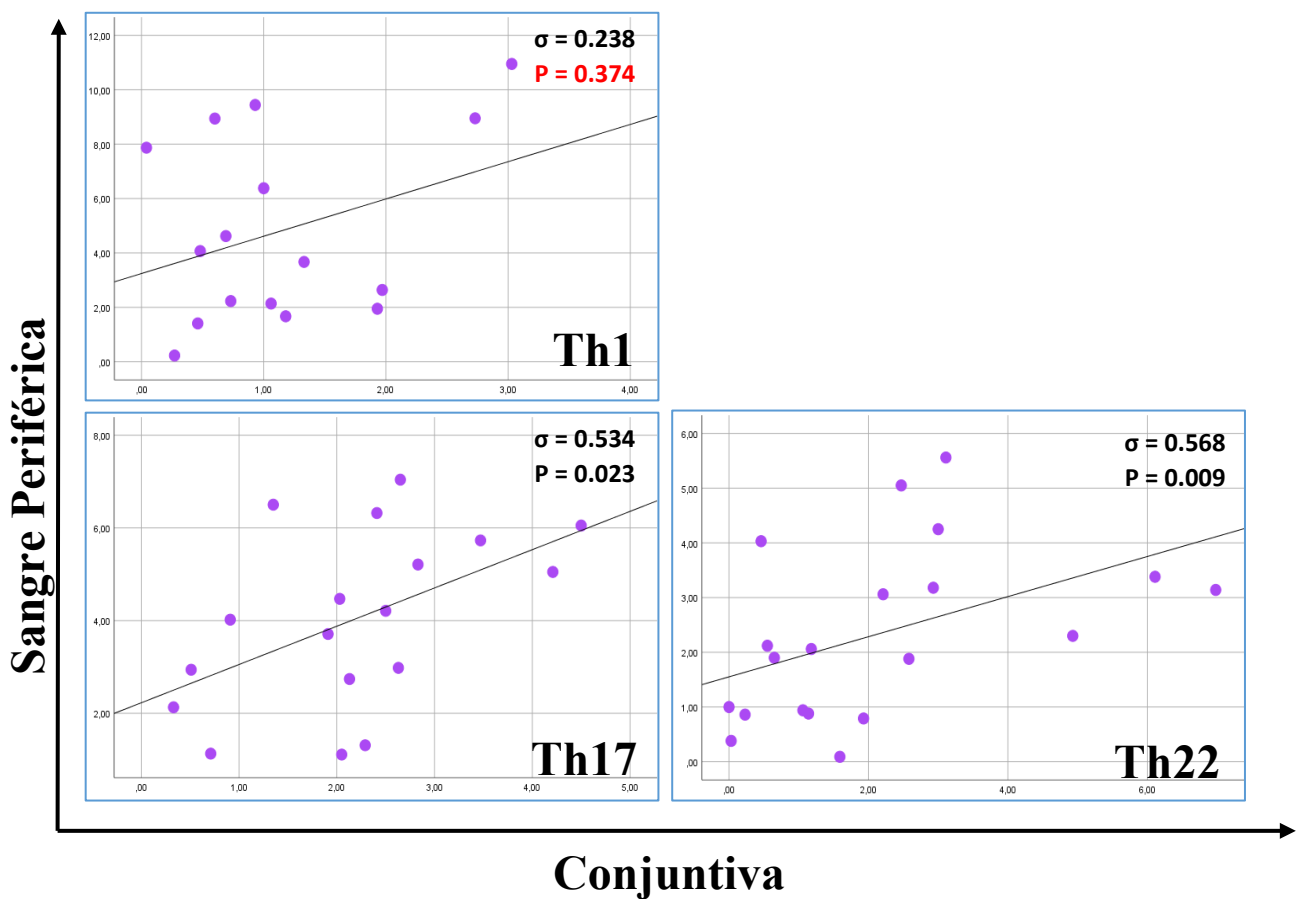


Figura 40. Correlación entre los valores obtenidos en sangre periférica (eje de ordenadas) y conjuntiva (eje de abscisas) para los subtipos Th1, Th17 y Th2 dentro del grupo de conjuntivitis alérgicas estacionales. En la parte superior derecha de cada gráfica puede verse el coeficiente de correlación de Spearman y el p valor.

3.3. DIFERENCIAS ASOCIADAS A LA EDAD Y EL GÉNERO EN CONJUNTIVA

Con el objetivo de analizar la influencia de la edad y el género se subdividió la población muestral en dos grupos: menores y mayores de 50 años para la edad; y hombres y mujeres para las diferencias de género. El punto de corte para los grupos de edad se estableció en 50 años, edad de inicio del deterioro inmunitario.

Los análisis se realizaron en los tres grupos de estudio por separado para evitar la influencia de la patología. Aunque se han analizado los efectos de la edad y el género en todos los grupos, tanto en sangre como en conjuntiva, resulta más apropiado hablar únicamente de los resultados obtenidos en conjuntivas sanas. Observando de manera global todos los resultados obtenidos podemos afirmar que ambos tejidos son totalmente independientes. No se han encontrado similitudes entre ambos tejidos, lo que indica que el efecto de la edad o el género no les afecta del mismo modo.

Entre las diferencias encontradas en los grupos de edad hemos encontrado que en grupos mayores de 50 existe una disminución estadísticamente significativa de linfocitos **T citotóxicos CD3+CD8+** (<50: $43,96 \pm 8,34\%$ vs >50: $26,85 \pm 14,76\%$, $p=0,005$), linfocitos **T CD8 memoria** (<50: $29,92 \pm 11,48\%$ vs >50: $18,99 \pm 11,31\%$, $p=0,041$) y linfocitos **Th1** (<50: $4,94 \pm 3,65\%$ vs >50: $2,41 \pm 2,12\%$, $p=0,041$), mientras que **Th17** (<50: $0,83 \pm 1,12\%$ vs >50: $2,43 \pm 2,24\%$, $p=0,011$), **Th22** (<50: $0,49 \pm 0,60\%$ vs >50: $1,78 \pm 1,69\%$, $p=0,035$) y **MAIT** (<50: $12,36 \pm 4,79\%$ vs >50: $21,01 \pm 12,24\%$, $p=0,041$) se ven aumentadas.

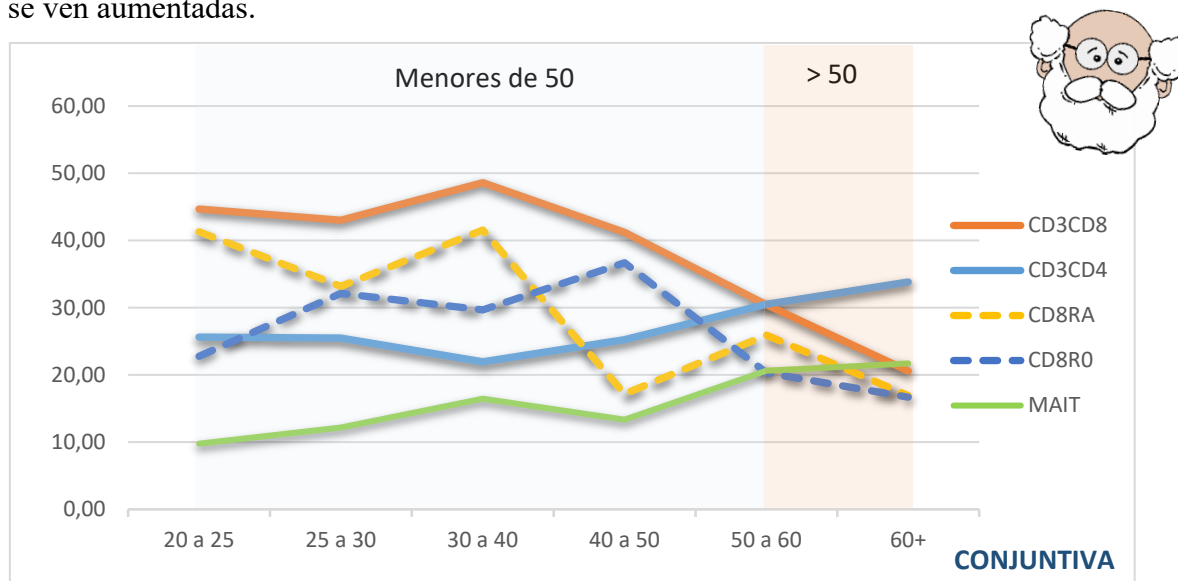


Figura 41. Evolución de las distintas subpoblaciones linfoides en conjuntiva, distribuido por tramos de edad. Se observa como los linfocitos CD8 totales (CD3CD8) y de memoria (CD8RO) tienden a disminuir en edades avanzadas.

Como se puede apreciar en la **Figura 41** los linfocitos Tc comienzan a disminuir significativamente a partir de los 30 años, mientras las células MAIT van aumentando hasta igualar niveles con Tc (CD3CD8). La disminución de los Tc es tan marcada que a partir de los 50 puede observarse como los linfocitos T CD4+ superan a los CD8+.

Por otro lado, dentro de los subtipos de CD4+ se observa un crecimiento de las células Treg, Th17 y Th22 a partir de los 30-40 años. Lo contrario ocurre con los linfocitos Th1, comienzan su declive a partir de los 30 años. Por último, las células Th2 comienzan a crecer a partir de 30 años, disminuyendo a partir de los 50 (ver **Figura 42**).

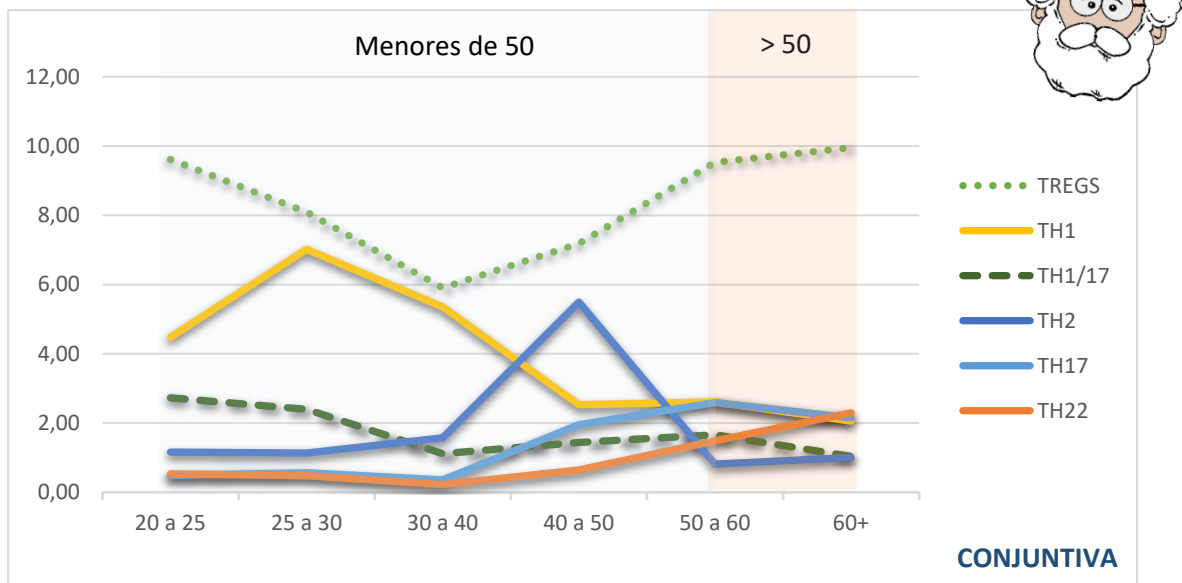


Figura 42. Evolución, por tramos de edad, de los subtipos de linfocitos T CD4 en conjuntiva dónde puede observarse que los valores de linfocitos Th convergen en edades más avanzadas.

En cuanto a las diferencias de género, se ha observado que en mujeres existe una disminución de los linfocitos T CD3+ (♂ : $83,54 \pm 7,57\%$ vs ♀ : $76,87 \pm 8,48\%$, $p= 0,041$) y TCR $\gamma\delta$ + (♂ : $39,73 \pm 10,65\%$ vs ♀ : $26,99 \pm 15,23\%$, $p= 0,047$) mientras que las células NK totales (♂ : $7,83 \pm 6,35\%$ vs ♀ : $18,16 \pm 10,77\%$, $p= 0,002$), y particularmente las CD56+CD16- (♂ : $2,64 \pm 5,97\%$ vs ♀ : $5,83 \pm 5,76\%$, $p= 0,015$) y CD56-CD16+ (♂ : $4,12 \pm 3,63\%$ vs ♀ : $10,56 \pm 11,57\%$, $p= 0,018$), tienen porcentajes más altos que los encontrados en hombres.

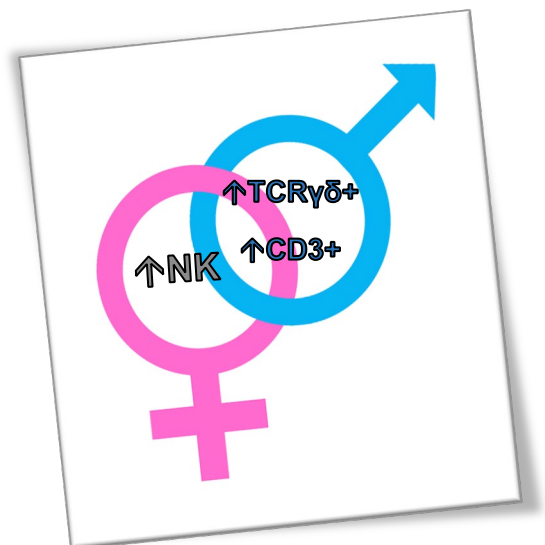


Figura 43. Resumen de los hallazgos por género.

3.4. DIFERENCIAS EN EL COMPONENTE CELULAR ENTRE SANGRE Y CONJUNTIVA

Una vez analizadas y calculadas las poblaciones linfocitarias comparar ambos tejidos para ver las diferencias entre el sistema inmunitario circulante (sangre periférica) y el regional (conjuntiva) para cada grupo de estudio. **Las diferencias entre ambos tejidos que se detallan a continuación se observaron en los tres grupos de estudio, lo que quiere decir que son características intrínsecas de la conjuntiva e independientes de la patología.**

En primer lugar, observando las tres grandes poblaciones de linfocitos (T, B y NK), vemos que los **linfocitos B** abarcan porcentajes más bajos en conjuntiva mientras que las poblaciones T y NK permanecen con proporciones similares en ambos tejidos. Esta disminución de linfocitos B en conjuntiva se debe en gran parte al subtipo B2, que son los que están disminuidos. La diferencia es tan notable que **los linfocitos B2 se ven superados por los B1**, que son los predominantes en conjuntiva, al contrario que ocurre en sangre periférica (ver **Figura 44**).

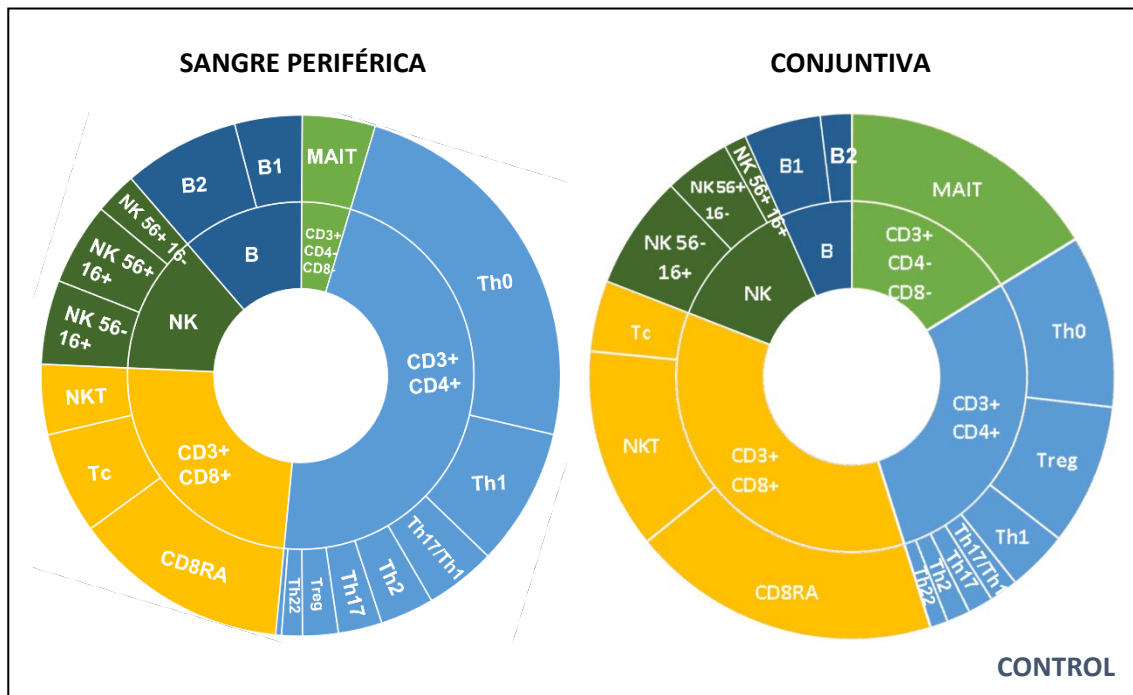


Figura 44. Proporciones de los subtipos linfocitos del sistema inmunitario en sangre periférica (izquierda) y conjuntiva (derecha) dentro del grupo control. Aunque se expone de ejemplo el grupo control, las diferencias de proporciones mencionadas en el texto se cumplen en los 3 grupos de estudio.

Entre las subpoblaciones de linfocitos T podemos observar varias diferencias interesantes. En conjuntiva, como ocurre en otras mucosas, existe un **predominio de células T CD8 frente a las CD4**, donde la mayoría de los linfocitos T CD8 activados son

NKT. Además, cabe destacar que en conjuntiva existen subtipos de NKT positivos para CD16 que no se han podido observar en sangre o se han visto en muy bajas proporciones. En cuanto a la población de linfocitos T CD4+, hemos encontrado un **predominio del subtipo Treg** en conjuntiva, mientras que era Th1 el subtipo predominante en sangre. Por otro lado, los linfocitos T CD4 vírgenes tienen menores proporciones en conjuntiva mientras que los CD4+CD45R0+ mantienen sus valores en ambos tejidos. Este hecho resulta muy interesante ya que, en conjuntiva, **2/3 de los linfocitos CD4 están activados** mientras que en sangre periférica representaban un 50-50. Por último, siguiendo en la línea de los linfocitos T, se ha observado que tanto **MAIT** como **TCR $\gamma\delta$** tienen valores mucho más altos en conjuntiva. **Los porcentajes de todas estas poblaciones en sangre periférica y conjuntiva se resumen en la Tabla 7.**

Por lo tanto, podemos concluir que la conjuntiva está formada principalmente por una defensa propia de la inmunidad innata: inespecífica, rápida y efectiva; complementada con una parte importante de la inmunidad adaptativa con un alto porcentaje de activación, extra regulada, y que cuenta con una gran capacidad efectora.

Resumen

CARACTERÍSTICAS DE LA CONJUNTIVA

CD8>CD4 CD4R0>CD4RA

↑ Treg ↓ Th1

↑↑ MAIT ↑↑ NKT ↑↑ TCR $\gamma\delta$

↓CD19 ↓B2 B1>B2

Resumen de resultados 3. Diferencias en las proporciones de linfocitos intraepiteliales de la conjuntiva con respecto a la sangre periférica.

Tabla 7. Proporciones de las poblaciones linfocitarias en conjuntiva y sangre periférica en los 3 grupos de estudio. Datos expresados en porcentaje: media \pm desviación estándar de la media. Los porcentajes están calculados en base a la expresión de CD45 y considerando la suma de T, B y NK como el 100%. C=control, CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne.

DIAGNOSTICO	Marcadores de superficie	SANGRE PERIFÉRICA			CONJUNTIVA		
		C	CAE	CAP	C	CAE	CAP
Linfocitos T	CD3+	76,63 \pm 4,95	75,55 \pm 4,99	76,82 \pm 5,77	80,48 \pm 8,53	78,07 \pm 7,69	78,21 \pm 11,22
MAIT doble negativas	CD3+CD8-CD4-	4,65 \pm 5,66	4,94 \pm 4,59	4,36 \pm 4,00	16,33 \pm 9,82	18,29 \pm 12,3	9,77 \pm 7,39
Linfocitos TCR γ δ +	CD3+TCR γ δ +	2,11 \pm 1,62	2,34 \pm 1,22	2,31 \pm 2,00	33,89 \pm 14,22	34,88 \pm 12,7	25,10 \pm 15,36
Linfocitos T CD4+	CD3+CD4+	47,26 \pm 8,69	43,85 \pm 6,38	46,67 \pm 7,65	28,03 \pm 9,98	28,56 \pm 8,84	31,28 \pm 8,91
Linf. T CD4+ vírgenes (Th0)	CD3+CD4+CD45RA+	27,82 \pm 7,29	26,34 \pm 8,12	25,53 \pm 6,74	13,87 \pm 7,48	11,37 \pm 6,55	11,30 \pm 8,25
Linfocitos T CD4+ memoria	CD3+CD4+CD45RO+	25,72 \pm 8,57	23,97 \pm 9,27	29,45 \pm 10,29	22,48 \pm 9,33	23,92 \pm 9,82	23,13 \pm 10,85
Linfocitos T reguladores	CD3+CD4+CD25hiCD127lo	2,27 \pm 1,00	2,32 \pm 1,63	2,03 \pm 1,02	8,78 \pm 4,37	8,27 \pm 3,74	8,46 \pm 6,42
Linfocitos Th1	CD4+ CD183+CD194-CD196-CCR10-	8,75 \pm 7,49	4,38 \pm 3,12	6,51 \pm 3,95	3,78 \pm 3,25	1,87 \pm 2,21	2,56 \pm 1,58
Linfocitos Th17/Th1	CD4+ CD183+CD194-CD196+CCR10-	4,51 \pm 2,58	2,96 \pm 2,52	5,52 \pm 4,67	1,78 \pm 1,84	1,45 \pm 1,86	1,02 \pm 0,77
Linfocitos Th2	CD4+ CD183-CD194+CD196-CCR10-	3,43 \pm 3,28	3,92 \pm 3,51	3,35 \pm 2,82	1,46 \pm 1,76	2,10 \pm 2,81	3,80 \pm 4,51
Linfocitos Th17	CD4+ CD183-CD194+CD196+CCR10-	2,79 \pm 2,43	4,16 \pm 2,54	3,45 \pm 2,21	1,56 \pm 1,87	2,39 \pm 2,03	2,05 \pm 2,24
Linfocitos Th22	CD4+ CD183-CD194+CD196+CCR10+	1,32 \pm 1,6	2,22 \pm 1,55	1,53 \pm 1,30	1,08 \pm 1,36	2,02 \pm 1,84	1,36 \pm 1,57
Linfocitos T CD8+	CD3+CD8+	24,72 \pm 9,02	26,75 \pm 7,23	25,79 \pm 8,05	36,12 \pm 14,39	31,21 \pm 14,36	37,15 \pm 14,08
Linfocitos T CD8+ vírgenes	CD3+CD8+ CD45RA+	17,25 \pm 8,18	19,21 \pm 6,97	17,10 \pm 8,05	28,40 \pm 14,32	20,16 \pm 11,38	25,43 \pm 12,86
Linfocitos T CD8+ memoria	CD3+CD8+ CD45RO+	13,72 \pm 6,79	17,62 \pm 8,56	14,40 \pm 6,98	24,91 \pm 12,46	24,70 \pm 11,86	26,17 \pm 12,85
NKT CD8+ CD56+CD16-	CD3+CD8+ CD56+CD16-	4,38 \pm 7,05	5,51 \pm 8,74	7,75 \pm 8,96	5,33 \pm 5,83	4,45 \pm 6,97	6,24 \pm 6,84
NKT CD8+ CD56+CD16+	CD3+CD8+ CD56+CD16+	0,08 \pm 0,07	0,13 \pm 0,13	0,20 \pm 0,39	6,17 \pm 6,32	7,51 \pm 9,74	12,13 \pm 10,15
NKT CD8+ CD56-CD16+	CD3+CD8+ CD56- CD16+	-	-	-	0,96 \pm 1,15	3,02 \pm 3,91	2,05 \pm 3,03
Total NKT CD8+		4,46 \pm 7,08	5,64 \pm 8,78	7,95 \pm 8,97	12,46 \pm 8,76	14,98 \pm 11,53	20,42 \pm 12,16
NK CD56+CD16-	CD3- CD56+CD16-	2,69 \pm 2,86	3,16 \pm 3,67	4,21 \pm 4,84	4,10 \pm 5,97	5,49 \pm 6,57	4,86 \pm 6,82
NK CD56+CD16+	CD3- CD56+CD16+	5,23 \pm 3,74	4,46 \pm 3,62	5,09 \pm 3,04	1,39 \pm 1,91	1,40 \pm 1,72	1,69 \pm 2,86
NK CD56-CD16+	CD3- CD56-CD16+	5,35 \pm 3,37	4,78 \pm 3,68	4,65 \pm 5,16	7,07 \pm 8,71	6,74 \pm 5,36	6,30 \pm 7,22
Total NK		13,27 \pm 4,78	12,40 \pm 5,37	13,96 \pm 5,95	12,56 \pm 9,96	13,63 \pm 7,93	12,84 \pm 10,02
Linfocitos B	CD19+	11,65 \pm 3,52	15,19 \pm 4,56	12,53 \pm 3,78	6,71 \pm 4,51	9,30 \pm 6,77	9,18 \pm 8,77
Linfocitos B1	CD19+ CD5+	4,29 \pm 3,78	5,45 \pm 4,06	3,97 \pm 2,09	4,76 \pm 3,35	5,53 \pm 3,39	5,41 \pm 3,20
Linfocitos B2	CD19+ CD5-	7,40 \pm 3,07	9,69 \pm 3,34	8,52 \pm 3,92	1,95 \pm 2,48	3,76 \pm 5,88	3,76 \pm 7,02

3.5. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE EL COMPONENTE CELULAR CIRCULANTE Y EL REGIONAL

Para esta parte del estudio se utilizó el estadístico de correlación bivariado de Spearman para analizar la existencia de correlación entre los linfocitos de la sangre y los conjuntivales.

Pudimos observar, como se muestra en la **Figura 45**, que existe una correlación moderada entre varias subpoblaciones linfoides: **Th22**, **NKT totales**, **linfocitos T CD8 vírgenes (CD8+CD45RA+)** y **memoria (CD8+CD45R0+)**. Esto indica que existe cierta relación entre el sistema inmunitario periférico y el regional, lo que significa que un aumento o disminución de cualquiera de estos subtipos de linfocitos en sangre periférica derivará en un aumento o disminución de esa población en conjuntiva.

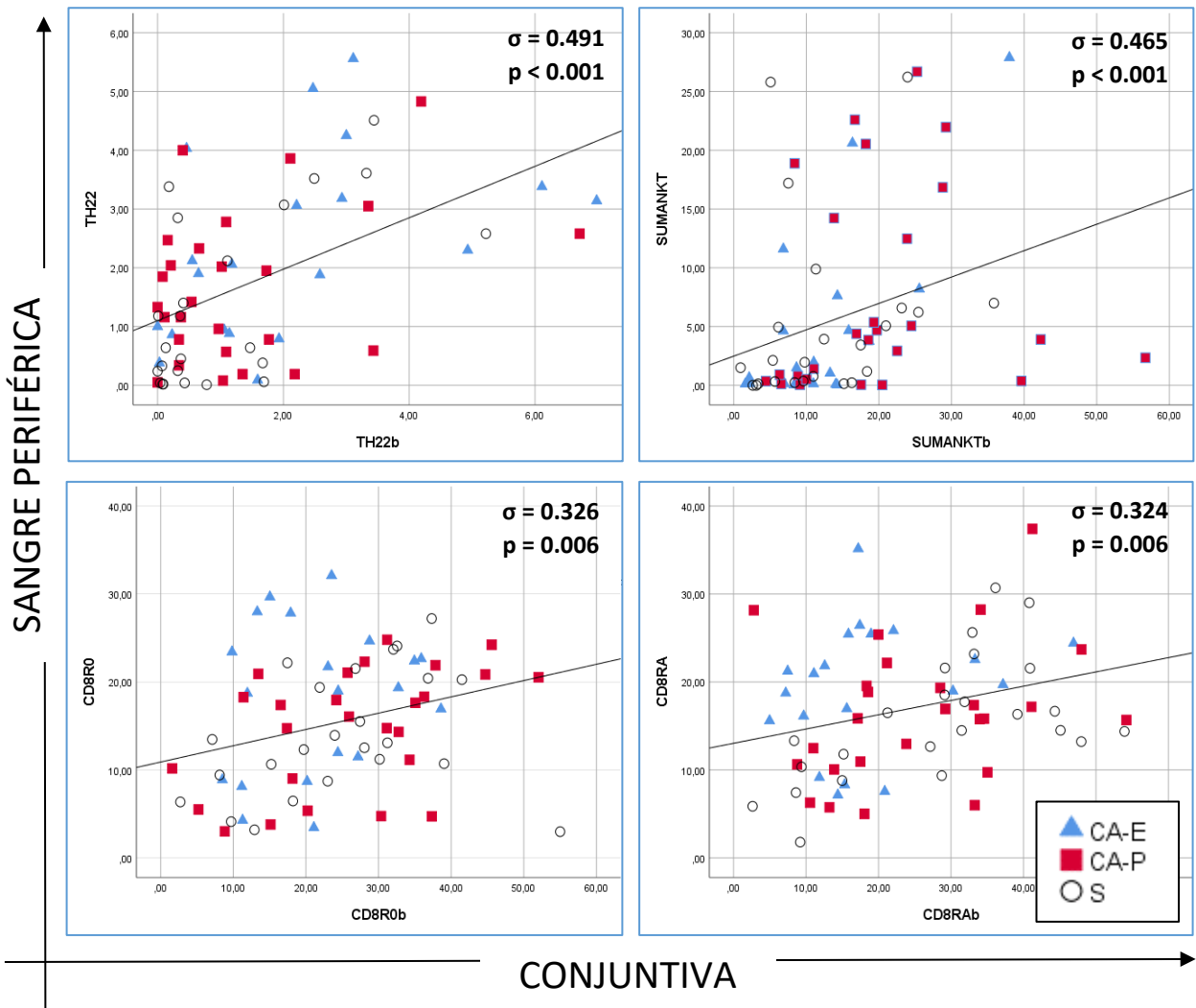


Figura 45. Correlación entre los valores obtenidos en sangre periférica (eje de ordenadas) y conjuntiva (eje de abscisas) para los subtipos Th22, NKT totales, CD8R0 y CD8RA. En la parte superior derecha de cada gráfica puede verse el coeficiente de correlación de Spearman y el p valor

4. SISTEMA INMUNITARIO HUMORAL

4.1. DIFERENCIAS ASOCIADAS A LA PATOLOGÍA EN PLASMA SANGUINEO

Al analizar las citocinas del plasma sanguíneo encontramos varias diferencias significativas para IgE, IL-5, IL-8, IL-9 y RANTES (ver **Figura 46**). Como era de esperar, tanto en conjuntivitis alérgicas estacionales como perennes se han observado un **incremento en las concentraciones de IgE** comparado con el grupo control (C: $612,67 \pm 788,41$ ng/mL vs CAE: $1497,62 \pm 3128,03$ ng/mL vs CAP: $1210,91 \pm 1672,29$ ng/mL).

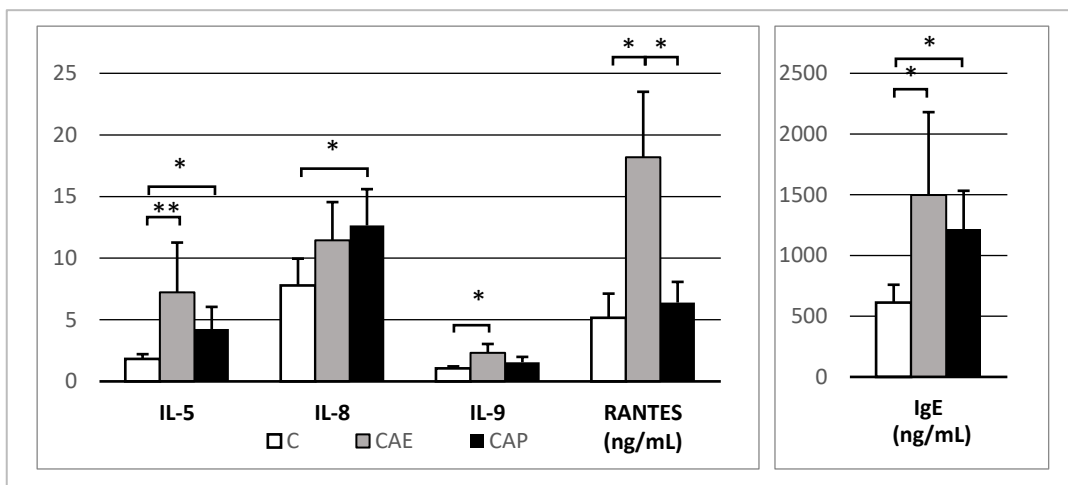


Figura 46. Diferencias más relevantes en algunas citocinas e IgE por grupo de estudio en plasma sanguíneo. Preste especial atención al cambio de escala entre ambas gráficas y las unidades de medida de cada molécula. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. C=control, CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne.

Dentro del grupo de las interleucinas, hemos observado un **aumento de la concentración de IL-5** en ambos grupos de alergia (C: $1,83 \pm 2,05$ pg/mL vs CAE: $7,23 \pm 12,76$ pg/mL vs CAP: $4,25 \pm 7,17$ pg/mL), de **IL-8 en conjuntivitis alérgicas perennes** (C: $7,79 \pm 11,7$ pg/mL vs CAP: $12,65 \pm 15,61$ pg/mL) e **IL-9** (C: $1,06 \pm 0,86$ pg/mL vs CAE: $2,32 \pm 2,78$ pg/mL) y **RANTES** (C: $5,16 \pm 10,38$ ng/mL vs CAE: $18,19 \pm 23,72$ ng/mL vs CAP: $6,39 \pm 8,72$ ng/mL) **en conjuntivitis alérgicas estacionales**.

Resumen

Conjuntivitis alérgica ESTACIONAL	Conjuntivitis alérgica PERENNE
↑ IgE ↑ IL-5	↑ IgE ↑ IL-5
↑ IL-9 ↑ RANTES	↑ IL-8

Resumen de resultados 4. Diferencias entre los grupos de conjuntivitis alérgica estacional y perenne en las moléculas de la lágrima.

4.2. DIFERENCIAS ASOCIADAS A LA PATOLOGÍA EN LÁGRIMA

En el análisis molecular de la lágrima, a diferencia de lo que ocurría en sangre periférica, hemos encontrado numerosas diferencias entre sanos y alérgicos, sobre todo en conjuntivitis alérgicas perennes donde la gran mayoría de citocinas aparecen aumentadas. En cambio, los resultados obtenidos para conjuntivitis alérgicas estacionales se asemejan más al grupo control, con ligeras diferencias.

Se ha encontrado, como era de esperar, una **disminución de las concentraciones de TGF- β 2** (C: $9,53 \pm 4,66$ ng/mL vs CAE: $6,43 \pm 2,99$ ng/mL vs CAP: $5,55 \pm 3,48$ ng/mL) y un **aumento de IgE** (C: $82,75 \pm 80,46$ ng/mL vs CAE: $134,51 \pm 107,47$ ng/mL vs CAP: $191,80 \pm 163,11$ ng/mL) en ambos grupos de conjuntivitis. Por otro lado, las concentraciones de **IL-2, IL-5, IL-17E, IFN- γ , IL-1 β y TSLP** estaban aumentadas en CAP con respecto a los grupos de control y CAE. Además, **IL-4, IL-13, IL-17F, IL-21 e IL-22** estaban aumentadas en CAP con respecto al grupo control, únicamente (ver **Figura 47**).

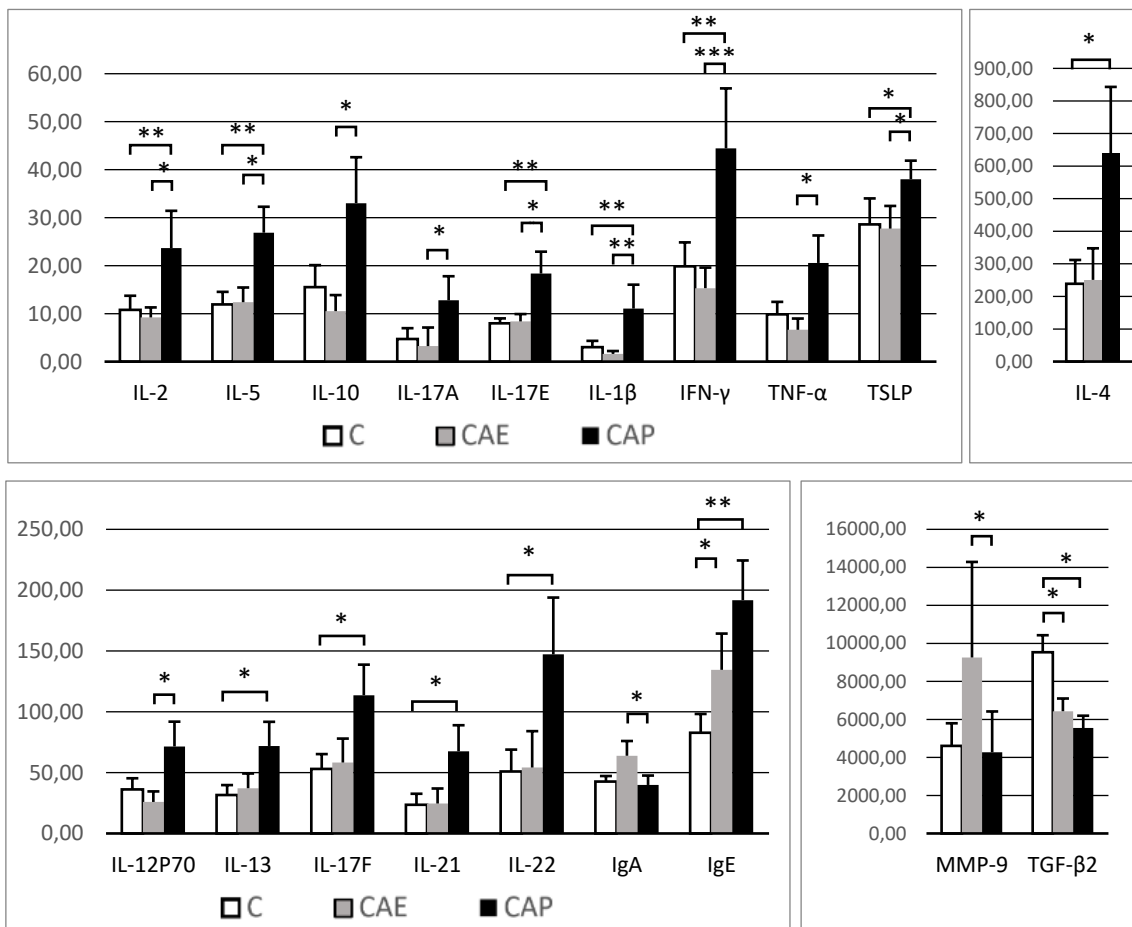


Figura 47. Diferencias más relevantes en algunas citocinas, MMP-9 y TGF- β 2 por grupo de estudio en lágrima. Preste especial atención a las escalas de cada gráfica. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. C=control, CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne.

Por último, se observó que las concentraciones de **IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, RANTES y TNF- α** en CAP y las concentraciones de **IgA y MMP-9** en CAE estaban también **aumentadas** al comparar ambos grupos alérgicos entre sí. Todos los valores promedios obtenidos para los tres grupos de estudio se recogen en la **Tabla 8**.

Si agrupamos las principales citocinas que producen las células del sistema inmunitario podemos ver qué tipo de respuesta prevalece en cada grupo de estudio. Tal y como recoge la **Figura 48** podemos observar que, en los grupos de conjuntivitis, **las respuestas de tipo Th17 y Th2** (en CAP representan casi el 80%) **están aumentadas** con respecto al grupo control y que, a su vez, las citocinas tipo APC (célula presentadora de antígeno) se reducen drásticamente.

Podemos observar que dentro de cada grupo de citocinas existe un tipo que predomina frente al resto. Para el grupo APC es la IL-8, que disminuye en los grupos alérgicos, sobre todo en CAP. IL-4 e IL-22 son las que tiene mayores proporciones y aumenta en los grupos alérgicos dentro del grupo Th2 y Th17 respectivamente, mientras que IL-13 también aparece aumentada en CAE.

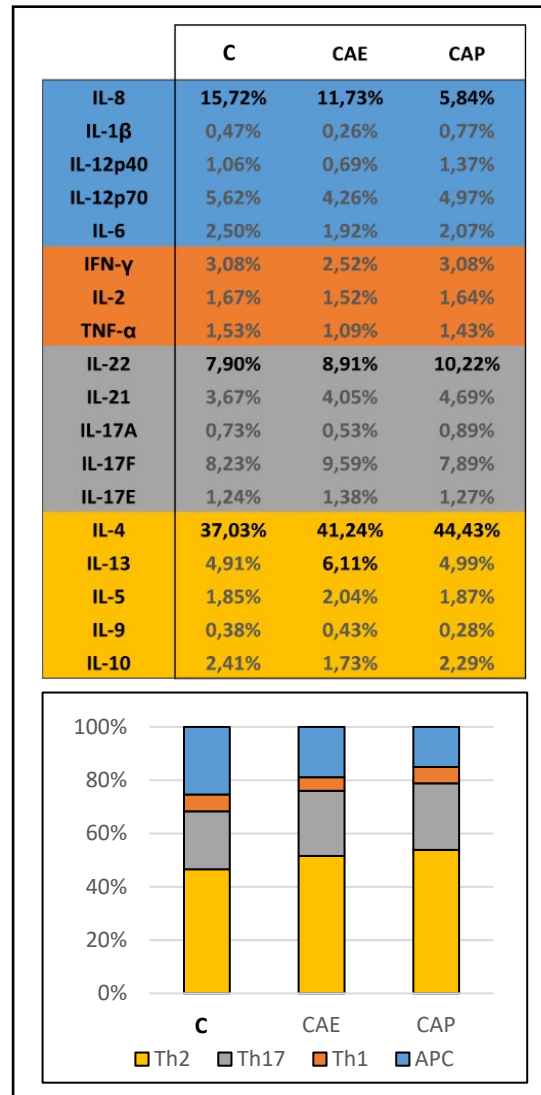


Figura 48. Porcentajes de las citocinas en lágrima, por tipo de respuesta celular.

Resumen

Conjuntivitis alérgica ESTACIONAL	Conjuntivitis alérgica PERENNE
<p>↑ IgA ↑ MMP-9</p> <p>↑ IgE ↓ TGF-β2</p>	<p>↑ IFN-γ, ↑ IL-1β, ↑ IL-2, ↑ IL-4, ↑ IL-5, ↑ IL-13, ↑ IL-17E, ↑ IL-17F, ↑ IL-21, ↑ IL-22, ↑ TSLP.</p> <p>↑↑ IgE ↓↓ TGF-β2</p>

Resumen de resultados 5. Diferencias entre los grupos de conjuntivitis alérgica estacional y perenne en las concentraciones de factores solubles de la lágrima.

Tabla 8. Concentraciones de los distintos factores solubles analizados en lágrima y plasma para los 3 grupos de estudio. Datos expresados en porcentaje: media \pm desviación estándar de la media. Nótese que algunos de los datos están expresados en ng/mL y el resto en pg/mL. IgA=immunoglobulina A, Ige=immunoglobulina E, MMP-9=metaloproteínasa de matriz 9, TGF= Factor de crecimiento transformante, IL=interleucina, MCP-1= proteína quimiotáctica de monocitos, TSLP=linfopoyetina estromal tímica, APC=célula presentadora de antígeno. IFN=interferón, TNF= Factor de necrosis tumoral. C=control, CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne.

	PLASMA			LÁGRIMA		
	C	CAE	CAP	C	CAE	CAP
Eotaxina	150,15 \pm 66,99	128,53 \pm 54,89	128,09 \pm 62,47	6,82 \pm 4,89	6,67 \pm 4,26	22,21 \pm 50,73
IFN- γ	23,36 \pm 24,20	30,16 \pm 57,41	21,34 \pm 25,19	19,87 \pm 25,89	15,31 \pm 19,19	44,44 \pm 62,53
IgA (ng/mL)	3396,98 \pm 3166,08	3555,04 \pm 2402,61	4672,25 \pm 6289,20	42,64 \pm 23,17	63,88 \pm 54,20	39,88 \pm 40,24
IgE (ng/mL)	612,67 \pm 788,41	1497,62 \pm 3128,03	1210,91 \pm 1672,29	82,75 \pm 80,46	134,51 \pm 107,47	191,80 \pm 163,11
IL-1 β	3,76 \pm 5,01	4,02 \pm 6,71	3,77 \pm 3,62	3,03 \pm 6,77	1,61 \pm 2,71	11,05 \pm 25,42
IL-2	8,58 \pm 27,03	8,70 \pm 28,60	9,52 \pm 28,50	10,77 \pm 15,37	9,22 \pm 9,32	23,67 \pm 41,79
IL-4	97,01 \pm 98,87	149,32 \pm 193,46	104,54 \pm 94,59	238,72 \pm 380,28	250,77 \pm 349,60	640,06 \pm 994,80
IL-5	1,83 \pm 2,05	7,23 \pm 12,76	4,25 \pm 7,17	11,91 \pm 13,67	12,39 \pm 11,05	26,87 \pm 31,27
IL-6	3,61 \pm 3,37	4,86 \pm 9,16	3,36 \pm 4,51	16,09 \pm 18,96	11,68 \pm 15,58	29,75 \pm 38,28
IL-8	7,79 \pm 11,70	11,45 \pm 14,19	12,65 \pm 15,61	101,37 \pm 124,41	71,31 \pm 105,56	84,17 \pm 132,18
IL-9	1,06 \pm 0,86	2,32 \pm 2,78	1,55 \pm 2,01	2,44 \pm 1,82	2,64 \pm 2,24	4,10 \pm 5,12
IL-10	4,52 \pm 4,60	4,35 \pm 3,96	9,30 \pm 22,27	15,51 \pm 23,01	10,52 \pm 14,98	33,02 \pm 50,69
IL-12p40	3,15 \pm 2,50	6,71 \pm 11,23	3,39 \pm 1,84	6,82 \pm 1,6	4,17 \pm 10,32	19,79 \pm 42,61
IL-12p70	7,68 \pm 9,57	27,78 \pm 95	16,13 \pm 51	36,23 \pm 47,5	25,91 \pm 38,73	71,53 \pm 109,77
IL-13	27,72 \pm 62,67	34,18 \pm 51,30	29,53 \pm 65,12	31,67 \pm 42,09	37,18 \pm 38,32	71,93 \pm 95,22
IL-17A	5,61 \pm 9,59	6,31 \pm 12,54	6,03 \pm 8,33	4,71 \pm 11,77	3,24 \pm 10,48	12,78 \pm 26,55
IL-17E	5,46 \pm 4,72	6,45 \pm 3,88	5,99 \pm 2,94	8,00 \pm 5,26	8,38 \pm 5,32	18,36 \pm 25,14
IL-17F	11,95 \pm 13,69	11,51 \pm 13,05	10,40 \pm 9,67	53,08 \pm 63,18	58,32 \pm 65,25	113,64 \pm 142,93
IL-21	2,63 \pm 5,37	2,46 \pm 4,03	1,94 \pm 2,74	23,64 \pm 46,77	24,61 \pm 40,94	67,55 \pm 107,11
IL-22	32,71 \pm 31,69	36,03 \pm 35,82	34,62 \pm 46,64	50,93 \pm 93,54	54,21 \pm 99,14	147,21 \pm 262,62
MCP-1	152,40 \pm 46,72	171,43 \pm 69,47	141,13 \pm 62,57	576,35 \pm 831,06	362,39 \pm 303,33	308,12 \pm 310,65
MMP-9 (ng/mL)	80,09 \pm 36,02	100,21 \pm 60,45	68,38 \pm 27,34	4,61 \pm 6,18	9,26 \pm 21,91	4,27 \pm 11,37
RANTES	5,16 \pm 10,38	18,19 \pm 23,72	6,39 \pm 8,72	71,93 \pm 69,46	54,52 \pm 56,35	118,66 \pm 130,17
TGF- β 1	18035,38 \pm 19484,10	21697,14 \pm 16588,40	16488,89 \pm 14587,96	8,81 \pm 1,21	8,57 \pm 1,26	8,54 \pm 0,72
TGF- β 2	1392,17 \pm 1001,99	1547,14 \pm 950,06	1250,56 \pm 820,22	9532,22 \pm 4663,8	6430,5 \pm 2995,12	5548,88 \pm 3480,88
TGF- β 3	610,14 \pm 1274,57	31,54 \pm 5,22	381,87 \pm 1020,42	10,11 \pm 3,76	9,92 \pm 5,65	8,83 \pm 1,37
TNF- α	2,97 \pm 2,32	3,25 \pm 1,86	3,21 \pm 2,27	9,87 \pm 13,46	6,64 \pm 10,22	20,57 \pm 29,74
TSLP	59,16 \pm 107,62	39,86 \pm 58,56	57,41 \pm 142,02	28,59 \pm 27,12	27,72 \pm 17,68	38,01 \pm 16,43

4.3. DIFERENCIAS EN EL COMPONENTE HUMORAL ENTRE PLASMA Y LÁGRIMA

Comparando las citocinas de plasma y lágrima podemos afirmar que existen bastantes diferencias entre ambas. Si clasificamos las principales citocinas que producen las células del sistema inmunitario en Th1, Th2, Th17 o APC y las consideramos como un “todo” podemos ver qué tipo de respuesta es la predominante cuales son las citocinas que tienen mayor peso en el proceso inflamatorio tanto en plasma como en lágrima.

Hemos podido observar que el plasma sanguíneo y la lágrima poseen diferencias y similitudes en su composición. A simple vista podemos decir que en lágrima hay mayor concentración de citocinas propias de las células presentadoras de antígeno (P: 10,34% vs L: 25,37%), una **fuerte disminución de la respuesta Th1** (P: 13,89% vs L: 6,28%) y **una leve disminución de Th2** (P: 52,56% vs L: 46,58%) y **Th17** (P: 23,21% vs L: 21,77%). Esto concuerda con lo encontrado en la comparación del componente celular entre sangre y conjuntiva: Th1 muy disminuidas y Th2 y Th17 ligeramente disminuidas (Ver **Figura 49**).

Dentro de las **citocinas tipo Th2**, vemos que las proporciones de **IL-4** (P: 38,59% vs L: 37,03%) se mantienen similares, siendo **IL-13** (P: 11,03% vs L: 4,91%) la que se reduce considerablemente en lágrima. De las **citocinas tipo Th17**, observamos una disminución de la **IL-22** (P: 13,01% vs L: 7,90%) y un incremento de la **IL-17F** (P: 4,75% vs L: 8,23%) en lágrima. Por otro lado, la disminución de las **citocinas tipo Th1** en lágrima se debe completamente a la disminución de **IFN- γ** (P: 9,29% vs L: 3,08%). Por último, **IL-8** es la citocina que más varía, teniendo valores mucho más altos que en plasma (P: 3,10% vs L: 15,72%) y siendo ésta la responsable del incremento de las citocinas de **tipo APC** en lágrima.

Por otro lado, cabe destacar varias diferencias entre el resto de las moléculas analizadas. En primer lugar, dentro de las inmunoglobulinas hemos encontrado que en sangre **IgA tiene mayores concentraciones que IgE**, contrario a lo que ocurre en plasma. Dentro de la familia de los TGF- β , observamos que el isotipo más abundante en sangre es TGF- β 1, mientras que en lágrima es **TGF- β 2**. También encontramos una disminución en las proporciones de MMP-9 y RANTES en lágrima, mientras que el MCP-1 aumenta.

Podemos concluir que la lágrima tiene características totalmente distintas al plasma sanguíneo. Todas estas diferencias apuntan a que la lágrima es una parte imprescindible de la defensa de la superficie ocular, caracterizada por un predominio de moléculas pertenecientes a la inmunidad innata: IgE, TGF- β 2, MCP-1 e IL-8. Estas características proporcionan a la lágrima funciones tanto pro- (protección frente patógenos, quimiotaxis...) como anti- inflamatorias (inmunorregulación, regeneración celular...).

Resumen

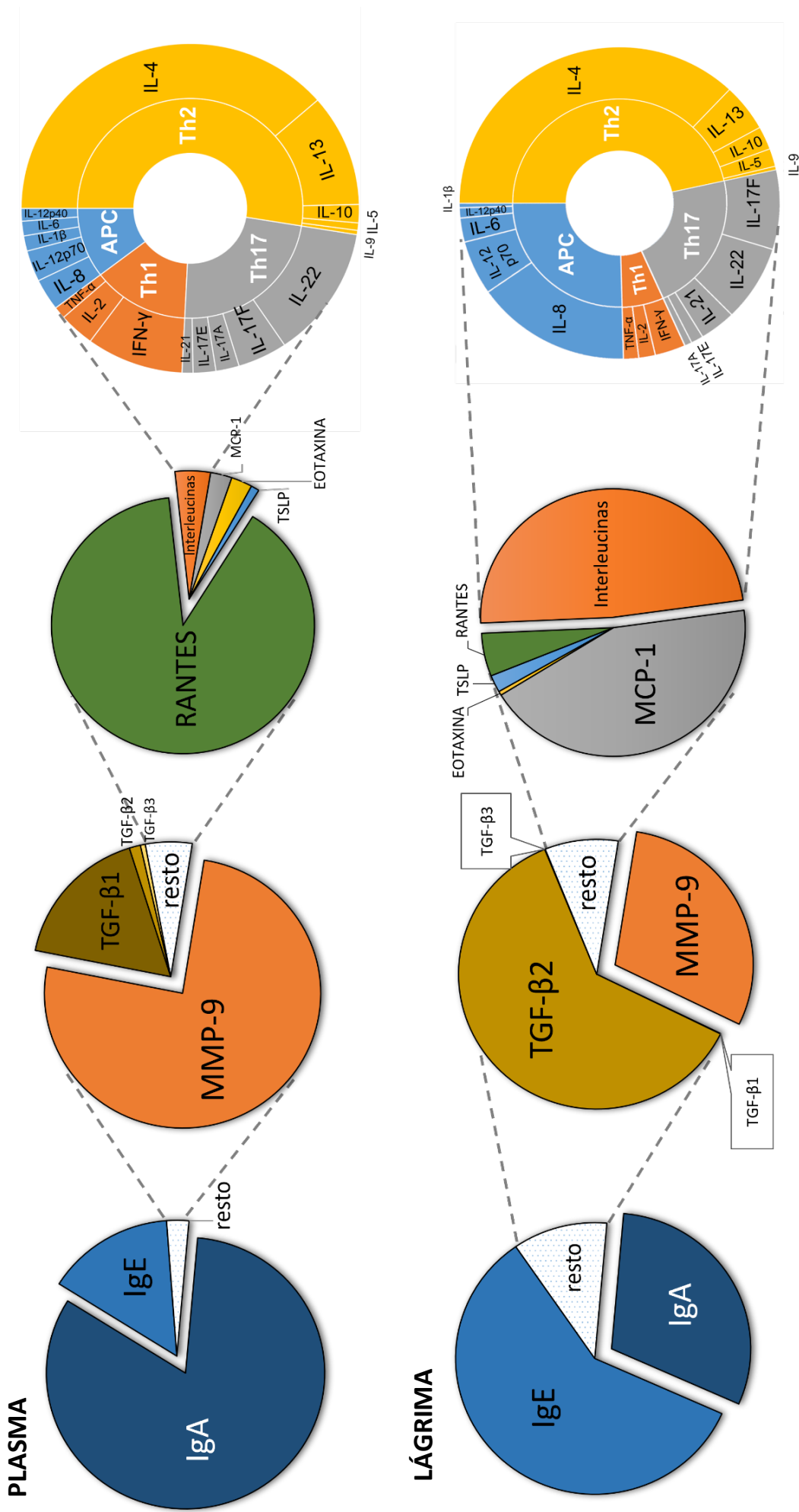
CARACTERÍSTICAS DE LA LÁGRIMA

IgE > IgA TGF- β 2 > TGF- β 1

↑ MCP-1 ↑ IL-8 ↑ IL-17F ↑ IL-21

↓ MMP-9 ↓ RANTES ↓ IFN- γ ↓ IL-13 ↓ IL-22

Resumen de resultados 6. Diferencias en las concentraciones de los factores solubles de la lágrima con respecto del plasma sanguíneo.



GRUPO CONTROL

Figura 49. Moléculas solubles analizadas en plasma y lágrima, de mayor a menor concentración. IgA=immunoglobulina A, Ige=immunoglobulina E, MMP-9=metaloproteínasa de matriz 9, TGF= Factor de crecimiento transformante, IL=interleucina, MCP-1= proteína quimiotáctica de monocitos, TSLP=linfopoyetina estromal tímica, APC=célula presentadora de antígeno. IFN=interferón, TNF= Factor de necrosis tumoral.

5. MICROBIOTA OCULAR

5.1. DIFERENCIAS ASOCIADAS A LA PATOLOGÍA EN BACTERIAS

En el análisis de la microbiota extraída de la conjuntiva bulbar inferior hemos encontrado resultados realmente novedosos. Para esta parte, se analizaron muestras de 22 voluntarios: 7 controles, 9 conjuntivitis alérgicas perennes y 6 estacionales. Se analizaron un total de 538 especies de bacterias y 648 de hongos mediante la secuenciación de ADN de alto rendimiento a través del laboratorio BiomeMakers de Valladolid.

Se calcularon las medias de todas las especies analizadas para cada grupo. Las especies bacterianas con un promedio menor al 1% fueron incluidos en el grupo “otros” (ver **Figura 50**).

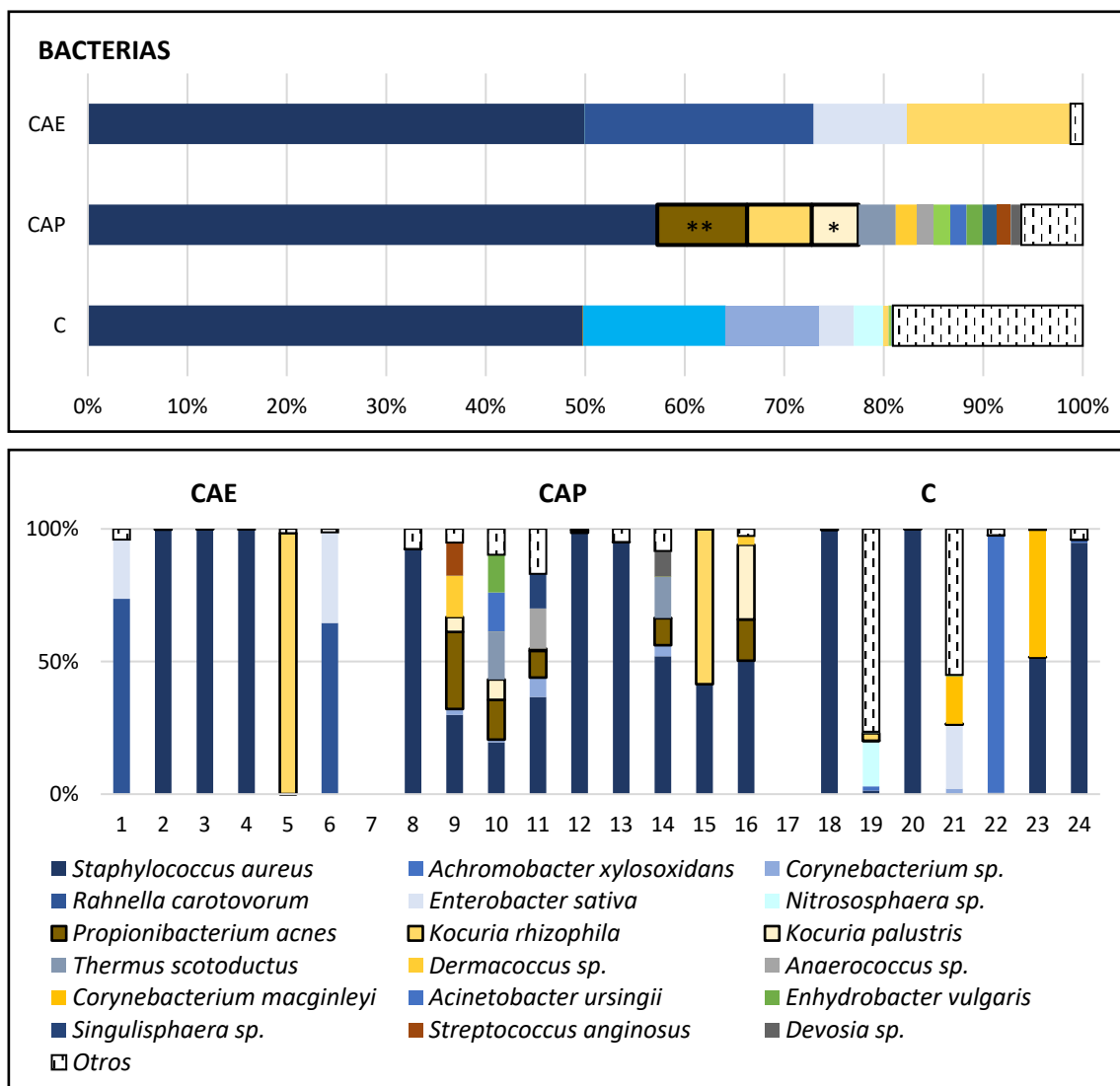


Figura 50. Proporciones obtenidas para las poblaciones de BACTERIAS. Arriba, los porcentajes medios totales. Abajo, los porcentajes individuales para cada paciente. * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$. CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne, C=control.

Pudimos observar que, dentro del microbioma bacteriano, al menos el 50% del ADN analizado pertenecía a *Staphylococcus aureus* tanto en el grupo control como en los grupos de alergia (C: $49,73 \pm 48,73\%$ vs CAE: $49,91 \pm 54,60\%$ vs CAP: $57,23 \pm 30,17\%$). Además de *S. aureus*, otras especies, como *Rahnella carotovorum* (CAE: $23,00 \pm 35,75\%$), *Enterobacter sativa* (CAE: $9,41 \pm 15,05\%$) y *Kocuria rhizophila* (CAE: $16,40 \pm 40,16\%$) tenían los porcentajes más altos en CAE, aunque estas tres poblaciones sólo se encontraron en un tercio de las muestras. La misma condición se observó en los individuos sanos: *Acromobacter xylosoxidans* (C: $14,32 \pm 36,51\%$), *Corynebacterium macginleyi* (CAE: $9,40 \pm 18,25\%$) y *Enterobacter sativa* (CAE: $3,47 \pm 9,16\%$) tenían porcentajes elevados, pero las dos últimas sólo se encontraron en un tercio de las muestras sanas. Esto se debe a que se han encontrado en un porcentaje muy elevado en unos pocos pacientes.

Todas las muestras de CAP fueron positivas para alguna de las especies de *Kocuria* (*rhizophila*: $6,49 \pm 19,46\%$; *palustris*: $4,71 \pm 9,26\%$) y *Propionibacterium acnes* ($9,01 \pm 9,93\%$).

Además, el grupo CAP, demostró tener una rica diversidad bacteriana comparado al resto. Entre estas especies, que se encontraron únicamente en CAP, están *Thermus scotoductus* ($3,73 \pm 7,43\%$), *Dermacoccus sp.* ($2,11 \pm 5,19\%$), *Anaerococcus sp.* ($1,69 \pm 5,06\%$), *Corynebacterium sp.* ($1,69 \pm 2,51\%$), *Acinetobacter ursingii* ($1,64 \pm 4,90\%$), *Enhydrobacter vulgaris* ($1,61 \pm 7,74\%$), *Singulisphaera sp.* ($1,45 \pm 4,36\%$), *Streptococcus anginosus* ($1,38 \pm 4,15\%$), y *Devosia sp* ($1,06 \pm 3,17\%$).

5.2. DIFERENCIAS ASOCIADAS A LA PATOLOGÍA EN HONGOS

Para las comunidades fúngicas, ya que obtuvimos más variedad, las especies con un valor promedio menor del 1% o una frecuencia <30% fueron incluidos en el grupo “otros”.

Se detectó el ADN de especies de *Malassezia* en todas las muestras de CAP, siendo la variedad restringida la más abundante (*M. restricta*: $21,71 \pm 18,54\%$, *Malassezia sp* $17,07 \pm 24,29\%$, y *M. globosa*: $1,33 \pm 1,54\%$). En conjunto, las tres poblaciones de *Malassezia* comprendían el 40,05% de la microbiota en CAP (ver **Figura 51**).

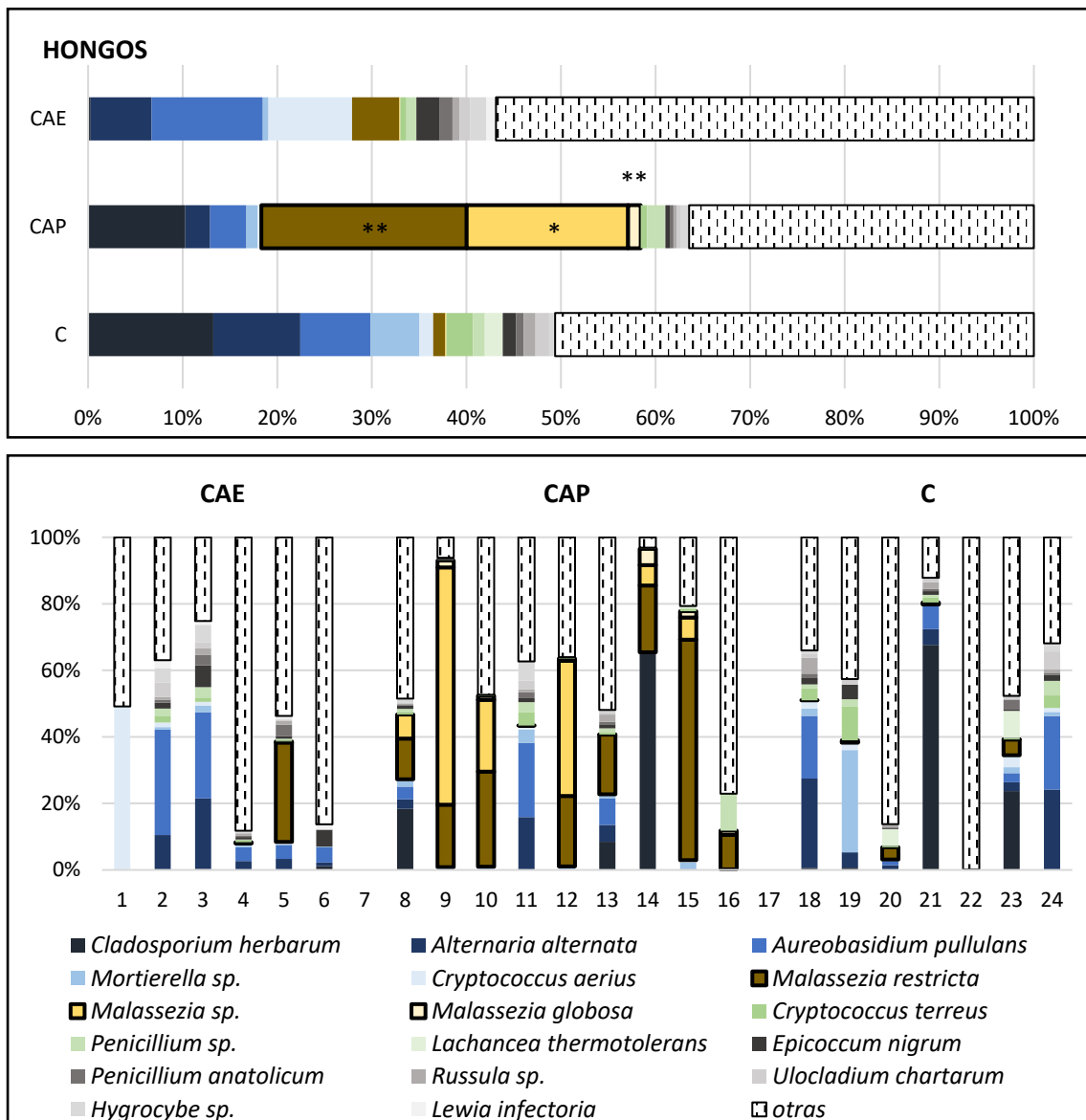


Figura 51. Proporciones obtenidas para las poblaciones de HONGOS. Arriba, los porcentajes medios totales. Abajo, los porcentajes individuales para cada paciente. * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$. CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne, C=control.

Otras poblaciones fúngicas, como *Cladosporium herbarum* (C: 13,24 ± 25,52% vs CAE: 0,27 ± 0,46 vs CAP: 10,28 ± 21,54%), *Alternaria alternata* (C: 9,20 ± 11,27% vs CAE: 6,44 ± 8,14% vs CAP: 2,63 ± 5,23%), *Aureobasidium pullulans* (C: 7,41 ± 9,27% vs CAE: 11,76 ± 13,38% vs CAP: 3,83 ± 7,45%), especies de *Mortierella* (C: 5,19 ± 11,30% vs CAE: 0,59 ± 0,78% vs CAP: 1,18 ± 1,23%) o *Cryptococcus aerius* (C: 1,45 ± 1,35% vs CAE: 8,84 ± 19,71% vs CAP: 0,41 ± 0,39%), estaban presentes tanto en los individuos sanos como en los alérgicos en proporciones altas.

También se encontraron especies con medias entre el 1-3% en al menos un tercio de las muestras en alguno de los grupos de estudio. Cabe mencionar especies como: *Cryptococcus terreus*, *Penicillium sp.*, *Lachancea thermotolerans*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium anaticum*, *Russula sp.*, *Ulocladium chartarum*, *Hygrocybe sp.* y *Lewia infectoria*. Sus proporciones y las de las especies incluidas en el grupo “OTROS” se muestran en la **Tabla 9**:

Tabla 9. Porcentajes de las especies de hongos con medias bajas (entre el 1-3%) que están representados en la figura 51, y de las especies catalogadas como “OTROS”. CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne, C=control.

Medias 1-3%				OTROS			
	CAE	CAP	C		CAE	CAP	C
<i>Epicoccum nigrum</i>	2,48	0,52	1,43	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0,00	5,87	0,12
<i>Hygrocybe sp.</i>	1,71	0,78	0,49	<i>Schizophyllum commune</i>	0,26	4,79	0,00
<i>Penicillium anaticum</i>	1,34	0,33	0,77	<i>Botrytis cinerea</i>	0,14	4,24	4,46
<i>Ulocladium chartarum</i>	1,12	0,42	1,44	<i>Chaetosphaeronema sp.</i>	0,01	3,51	0,00
<i>Penicillium sp.</i>	1,04	1,88	1,27	<i>Byssochlamys zollerniae</i>	0,00	3,48	0,00
<i>Lewia infectoria</i>	1,04	0,08	0,13	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,00	2,64	0,00
<i>Russula sp.</i>	0,74	0,37	1,27	<i>Sarcinomyces sp.</i>	0,00	1,37	0,00
<i>Cryptococcus terreus</i>	0,66	0,68	2,81	<i>Cryptococcus magnus</i>	0,95	0,66	0,63
<i>Lachancea thermotolerans</i>	0,00	0,06	1,89	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1,28	0,17	0,00

OTROS				OTROS			
	CAE	CAP	C		CAE	CAP	C
<i>Cryptococcus dimennae</i>	1,43	0,05	0,00	<i>Penicillium polonicum</i>	0,00	0,00	2,69
<i>Sporobolomyces sp.</i>	5,60	0,02	0,00	<i>Erysiphe betae</i>	13,72	0,00	0,00
<i>Candida stellata</i>	0,12	0,01	9,30	<i>Cryptosporiopsis actinidiae</i>	5,35	0,00	0,00
<i>Candida zeylanoides</i>	1,86	0,01	0,00	<i>Cladosporium exasperatum</i>	1,84	0,00	0,00
<i>Tetracladium maxilliforme</i>	2,77	0,00	0,00	<i>Leptosphaeria rubefaciens</i>	1,33	0,00	0,00
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1,18	0,00	0,03				
<i>Cladophialophora sp.</i>	0,00	0,00	5,08				
<i>Fomes fomentarius</i>	0,00	0,00	5,80				
<i>Crocicreas cyathoides</i>	0,00	0,00	4,94				

5.3. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA

Se comparó el índice de diversidad alfa para los marcadores 16S e ITS, no encontrándose ninguna diferencia significativa entre patologías, aunque el grupo CAP tendía a mostrar una mayor diversidad para ambos marcadores. Por el contrario, la ordenación de la composición del microbioma para ambos reveló que las muestras de CAP se independiza del resto de los grupos de estudio (ver **Figura 52**).

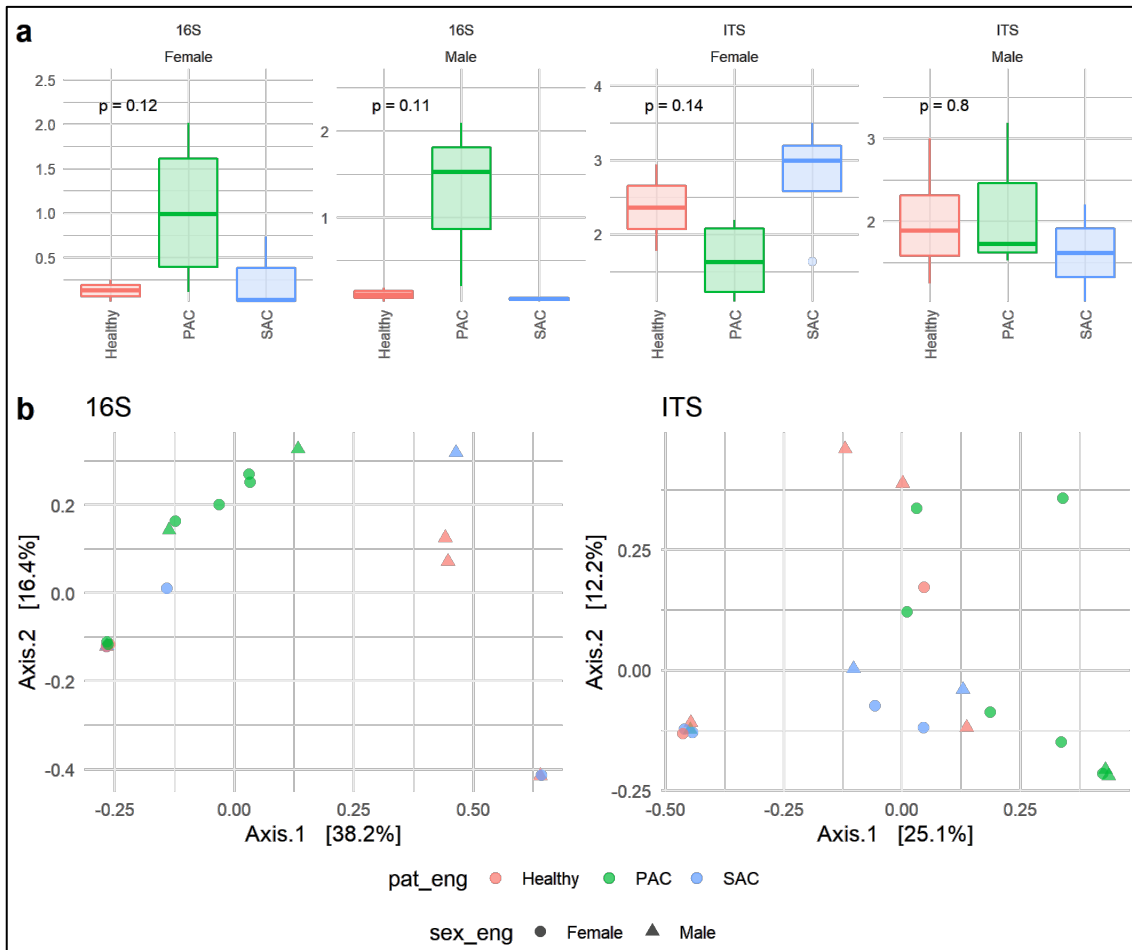


Figura 52. Diversidad alfa determinada con el índice de Shannon para comunidades procariontas (16S) y fúngicas (ITS) subdivididas por sexo y categorizadas por patología. Los valores *p* resultantes de la prueba Kruskal-Wallis se muestran en la parte superior (A). Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la microbiota basado en la matriz de distancia de Bray-Curtis de los pacientes anotados por categorías de sexo (forma) y patología (color) (B).

Esto sugiere que las diferencias observadas entre los grupos son causadas meramente por la enfermedad alérgica, lo que dota una mayor fuerza a nuestros resultados y demuestra una asociación directa entre la microbiota comensal, el desarrollo de la conjuntivitis alérgica perenne y su sintomatología.

6. PROPUESTA DE POSIBLES BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA CONJUNTIVITIS ALÉRGICA

Gracias a este estudio hemos podido observar diferencias muy claras entre los grupos de estudio, tanto en conjuntiva, como sangre/plasma, lágrima y microbiota. Uno de los propósitos finales de este estudio es ayudar al diagnóstico diferencial de la conjuntivitis alérgica. Observando qué diferencias y similitudes existen entre las muestras y conociendo cuáles son los patrones de comportamiento del sistema inmunitario local y regional, podemos discriminar qué método de análisis es el más indicado para el diagnóstico.

Nuestras investigaciones arrojan datos muy interesantes que pueden ayudarnos en la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico de la conjuntivitis alérgica dependiendo del tipo de muestra que vayamos a analizar.

Cabe recordar que únicamente se han encontrado correlaciones entre sangre y conjuntiva para ciertas subpoblaciones de linfocitos: Th22, NKT, CD8 memoria y CD8 vírgenes sin distinguir entre grupos y; Th1, Th17 y Th22 en el grupo de conjuntivitis estacionales. Esto puede ser indicador de que los linfocitos de la conjuntiva y los de la sangre siguen un mismo patrón y que en ambos tejidos podemos encontrar proporciones celulares similares. Al igual que existen similitudes, también hemos encontrado diferencias notorias entre sangre y conjuntiva (p.ej.: la mayor proporción de Treg, MAIT, NKT o TCR $\gamma\delta$); entre plasma y lágrima (p.ej.: la mayor concentración de IgE, TGF- β 2, IL-8, etc.); o entre grupos de conjuntivitis alérgicas estacionales y perennes, que nos servirán para encontrar los distintos biomarcadores. Por lo tanto, recopilando todos los resultados obtenidos, tal y como se resumen en la **Figura 53**, podemos concluir que:

Un aumento de las subpoblaciones Th17 y Th22 y una disminución de Th1 en sangre o conjuntiva; combinado con un aumento de la IL-9 y RANTES en plasma o **IgA y MMP-9 en lágrima**; podría considerarse biomarcador para el diagnóstico de la **conjuntivitis alérgica estacional**.

Y, **un aumento de las subpoblaciones de Th2**, y disminución de **MAIT y TCR $\gamma\delta$ en conjuntiva**; combinado con un aumento de las concentraciones de las citocinas principalmente de **tipo Th17 o Th2 en lagrima**; y una sobrecolonización de especies de ***Kocuria, prop. acnes* o *Malassezia***; podría considerarse biomarcador para el diagnóstico de la **conjuntivitis alérgica perenne**.

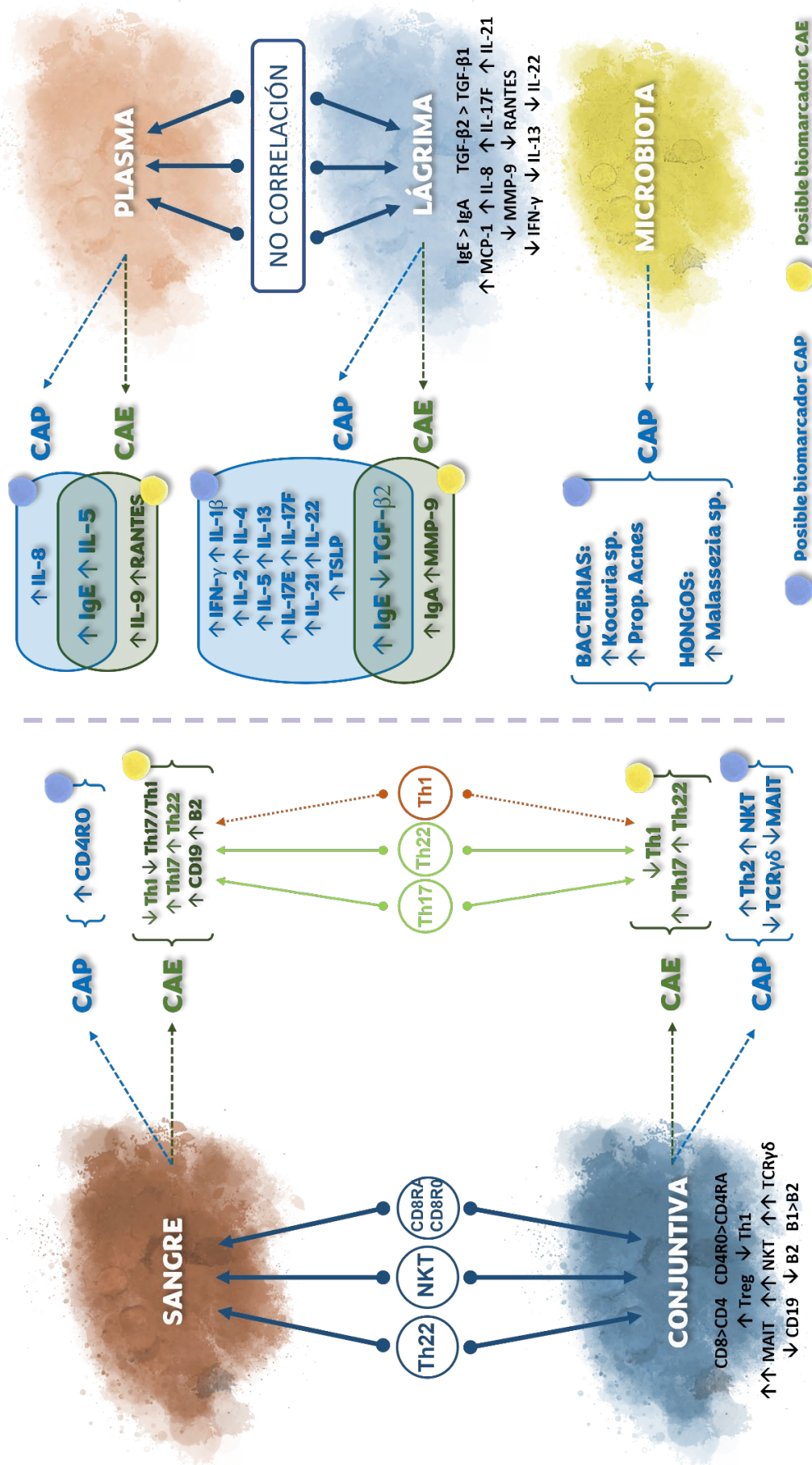


Figura 53. Posibles biomarcadores para el diagnóstico de las conjuntivitis alérgicas estudiadas. CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne, C=control. IgA=inmunoglobulina A, Ige=inmunoglobulina E, MMP-9=metaloproteína de matriz 9, TGF= Factor de crecimiento transformante, IL=interleucina, MCP-1= proteína quimiotáctica de monocitos, TSLP=linfopoyetina estromal tímica, APC=célula presentadora de antígeno. IFN=interferón, TNF= Factor de necrosis tumoral.

ANEXO II – ESPECIES ANALIZADAS

ANEXO II – ESPECIES ANALIZADAS

Como ya hemos mencionado anteriormente, hemos analizado un total de **538 especies de bacterias** y **648 especies de hongos**.

A continuación, se mostrarán dos gráficas (**Figuras 54 y 55**) que resumen el porcentaje y la frecuencia para cada especie analizada distribuido por grupos de estudio: Control (C), Conjuntivitis alérgica perenne (P) y Conjuntivitis alérgica estacional (E).

El **promedio** (\bar{X}) para cada grupo se ha calculado sumando los porcentajes obtenidos y dividiendo entre el número de muestras.

Y la **frecuencia** (**f**) es el número de muestras en las que se ha encontrado ADN de cada especie expresado en porcentaje.

Cada color representa un rango de porcentaje, siendo las gamas de rojo los porcentajes más bajos, amarillos y naranjas valores medios, y azules los porcentajes más altos.

BACTERIAS

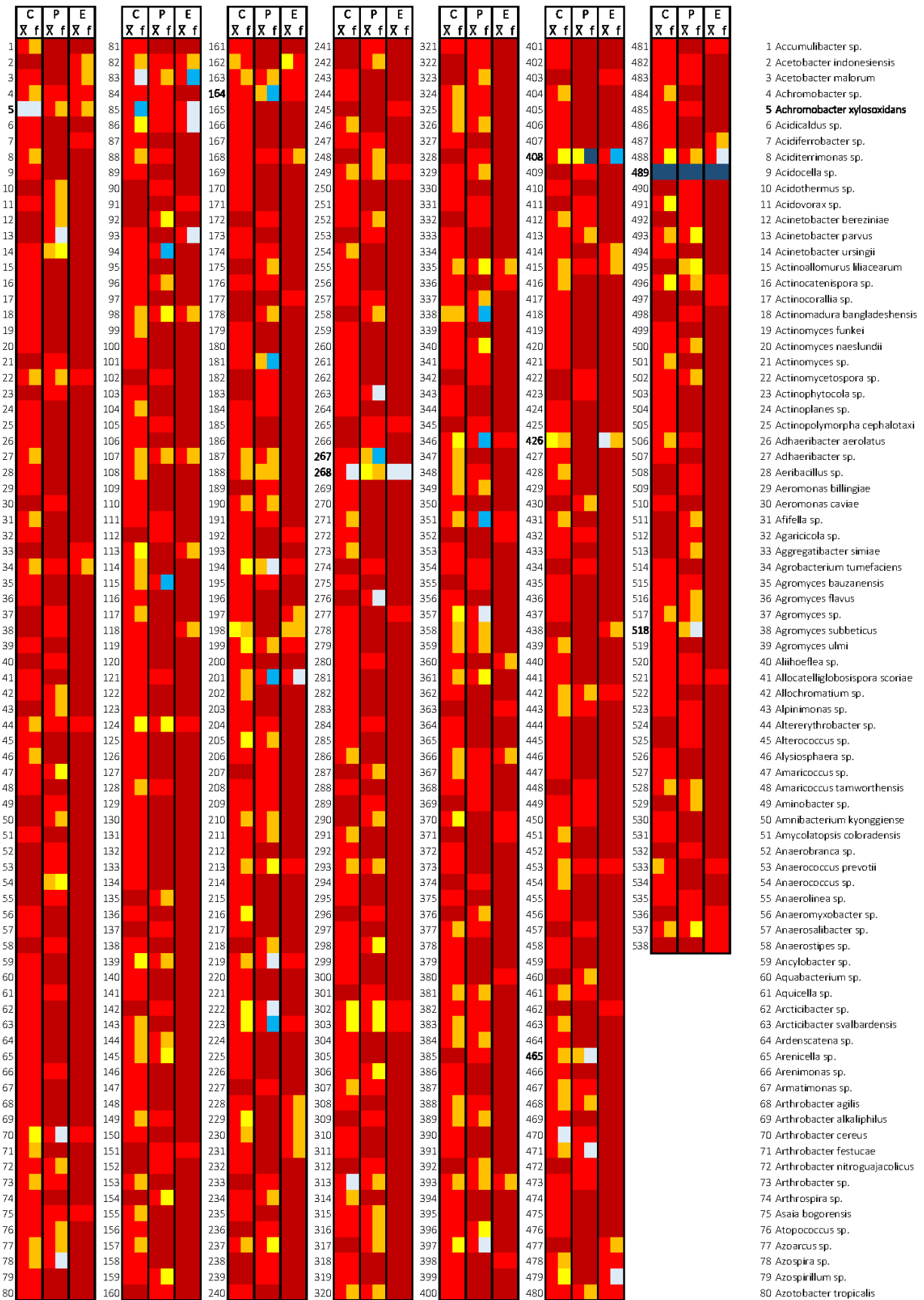


Figura 54. Especies de bacterias analizadas. Se representan 3 columnas diferenciadas, una para cada grupo de estudio (Control, Perenne y Estacional). Cada columna se subdivide en dos: Frecuencia (f) y promedio (X) por gamas de colores tal y como se indica en la leyenda de la derecha.

- 81 Azovibrio sp.
82 Bacillus aeris
83 Bacillus aerophilus
84 Bacillus alkalitelluris
85 Bacillus aryabhatai
86 Bacillus circulans
87 Bacillus coagulans
88 Bacillus coahuilensis
89 Bacillus decolorationis
90 Bacillus firmus
91 Bacillus foraminis
92 Bacillus funicululus
93 Bacillus halodurans
94 Bacillus sp.
95 Balneimonas sp.
96 Bauldia sp.
97 Bdellovibrio sp.
98 Blastocatella sp.
99 Blastococcus sp.
100 Blastomonas sp.
101 Blastopirellula sp.
102 Blautia sp.
103 Bosea enee
104 Bosea sp.
105 Brachyobacterium conglomeratum
106 Brachyomonas denitrificans
107 Bradyrhizobium elkanii
108 Bradyrhizobium sp.
109 Brenneria quercina
110 Brevibacterium sp.
111 Brevibacterium aureum
112 Brevibacterium sp.
113 Brevundimonas sp.
114 Brevundimonas subvibrioides
115 Bryobacter sp.
116 Burkholderia ambifaria
117 Burkholderia bryophila
118 Burkholderia gladioli
119 Byssovorax cruenta
120 Byssovorax sp.
121 Bythopirellula sp.
122 Caenimonas sp.
123 Caldalkalibacillus sp.
124 Caldilinea sp.
125 Carsonella ruddii
126 Catellatospora citrea
127 Catellatospora sp.
128 Catelliglobospora sp.
129 Caulobacter ginsengisoli
130 Caulobacter sp.
131 Cellulomonas composti
132 Cellulomonas fimi
133 Cellulomonas xylanilytica
134 Cellulosilyticum sp.
135 Cellulosimicrobium cellulans
136 Cellvibrio sp.
137 Cetobacterium somerae
138 Chelatooccus sp.
139 Chitinophaga sp.
140 Chloroflexus sp.
141 Chloronema sp.
142 Chryseobacterium formosense
143 Chryseobacterium sp.
144 Chryseolinea sp.
145 Chthoniobacter sp.
146 Chthonomonas sp.
147 Clostridium bowmanii
148 Clostridium intestinale
149 Clostridium sp.
150 Cohnella arctica
151 Cohnella laevisbosi
152 Collinsella aerofaciens
153 Comamonas sp.
154 Competibacter sp.
155 Conexibacter sp.
156 Constrictibacter sp.
157 Coprococcus sp.
158 Coprothermobacter sp.
159 Corynebacterium fermentans
160 Corynebacterium amycolatum
161 Corynebacterium aurimucosum
162 Corynebacterium magcinleyi
163 Corynebacterium mastitidis
164 Corynebacterium sp.
165 Coviella sp.
166 Craurococcus sp.
167 Crinalium magnum
168 Cronobacter mallotivora
169 Crossiella sp.
170 Cruoricaptor ignavus
171 Cupriavidus basilensis
172 Cytophaga sp.
173 Dechloromonas sp.
174 Defluviococcus sp.
175 Desulfimonas sp.
176 Deinococcus sp.
177 Deinococcus yunweiensis
178 Delftia tsuruhatensis
179 Demequina sp.
180 Denitratissoma sp.
181 Dermacoccus sp.
182 Desulfurcalculus sp.
183 Desulfobacca sp.
184 Desulfocapsa sp.
185 Desulfosporosinus meridiei
186 Desulfovibrio sp.
187 Devosia insulae
188 Devosia sp.
189 Dietzia cercidiphylli
190 Dokdonella sp.
191 Dongia sp.
192 Dyadobacter sp.
193 Edaphobacter modestum
194 Enhydrobacter vulgaris
195 Ensifer adhaerens
196 Ensifer meliloti
197 Enterobacter pulveris
198 Enterobacter sativa
199 Enterobacter sp.
200 Enterotheonella sp.
201 Escherichia sp.
202 Euzephya sp.
203 Exiguobacterium profundum
204 Exiguobacterium sibiricum
205 Ferruginibacter sp.
206 Fibrella sp.
207 Fictibacillus barbaricus
208 Filimonas sp.
209 Fimbriimonas sp.
210 Finegoldia sp.
211 Flavithiobacter sp.
212 Flavisolibacter ginsengisoli
213 Flavisolibacter sp.
214 Flavobacterium sp.
215 Frateuria aurantia
216 Fructobacillus mesenteroides
217 Fusibacter sp.
218 Fusobacterium nucleatum
219 Gaiella sp.
220 Gemella sp.
221 Geminicoccus sp.
222 Gemmata sp.
223 Gemmatimonas sp.
224 Geobacillus sp.
225 Geobacter humireducens
226 Geodermatophilus sp.
227 Georgia sp.
228 Gluconacetobacter saccharivora
229 Gluconobacter albidus
230 Gluconobacter cerinus
231 Gluconobacter oxydans
232 Glycomyces harbinensis
233 Gordonia polyisoprenivorans
234 Granulicella sp.
235 Granulococcus sp.
236 Gryllotalpica koreensis
237 Halangium sp.
238 Haliscomenobacter sp.
239 Haloactinopolyspora sp.
240 Halocella sp.
241 Haloferula sp.
242 Halomonas aidingensis
243 Hamadaea yuxiensis
244 Herbaspirillum rubrisubalbicans
245 Herminiimonas fonticola
246 Herpetosiphon sp.
247 Hirschia sp.
248 Hydrogenophaga sp.
249 Hymenobacter sp.
250 Hymenobacter tibetensis
251 Hymenobacter xinjiangensis
252 Hyphomicrobium sp.
253 Hyphomicrobium zavarzinii
254 Iamia sp.
255 Ignavibacterium sp.
256 Ilumatobacter fluminis
257 Ilumatobacter sp.
258 Intrasporangium sp.
259 Isosphera sp.
260 Janthinobacterium lividum
261 Janthinobacterium sp.
262 Janthinobacterium zoogloeoides
263 Kaistobacter sp.
264 Kiloniella sp.
265 Kineococcus radiotolerans
266 Kineospora sp.
267 Kocuria palustris
268 Kocuria rhizophila
269 Koniobacter sp.
270 Kouleothrix sp.
271 Kribbella sp.
272 Ktedonobacter sp.
273 Labrys sp.
274 Lactobacillus iners
275 Lactobacillus kunkeei
276 Lactobacillus nagelii
277 Lactobacillus sp.
278 Lactococcus lactis
279 Larkniella sp.
280 Lautropia sp.
281 Leadbetterella sp.
282 Leeia sp.
283 Legionella adelaidensis
284 Legionella sp.
285 Leptolyngbya frigida
286 Leptothrix sp.
287 Leptotrichia sp.
288 Leuconostoc citreum
289 Leuconostoc sp.
290 Lewinella sp.
291 Liberibacter sp.
292 Litorilinea aerophila
293 Litorilinea sp.
294 Longilinea sp.
295 Longispora sp.
296 Luteolibacter sp.
297 Lysinibacillus sp.
298 Lysobacter sp.
299 Marinicella sp.
300 Marinobacter sp.
301 Mariprofundus sp.
302 Marmoricola sp.
303 Massilia sp.
304 Massilia timonae
305 Mesorhizobium cicerei
306 Mesorhizobium sp.
307 Mesorhizobium tianshanense
308 Metachlamydia elodeae
309 Methylobacillus sp.
310 Methylobacterium adhaesivum
311 Methylobacterium extorquens
312 Methylobacterium komagatae
313 Methylobacterium sp.
314 Methylocella sp.
315 Methylothera mobilis
316 Methylothera sp.
317 Microbacterium arthrospiraerae
318 Microbacterium oxydans
319 Microbispota sp.
320 Micrococcus luteus
321 Microcoleus sp.
322 Micromonospora hermanusense
323 Microthrix parvicella
324 Microthrix sp.
325 Microvirga sp.
326 Mucilaginibacter sp.
327 Mycobacterium lentiflavum
328 Mycobacterium salmoniphilum
329 Mycobacterium sp.
330 Nakamuraella sp.
331 Nannocystis sp.
332 Nevskia sp.
333 Niastella sp.
334 Nitrolancea sp.
335 Nitrosococcus sp.
336 Nitrosomonas sp.
337 Nitrososphaera gargensis
338 Nitrososphaera sp.
339 Nitrospira defluvii
340 Nitrospira sp.
341 Nocardia coubleae
342 Nocardia neocaledoniensis
343 Nocardia rhamnosphila
344 Nocardioides albus
345 Nocardioides humi
346 Nocardioides sp.
347 Nonomurea sp.
348 Nordella sp.
349 Novitherbaspirillum sp.
350 Novosphingobium nitrogenifer
351 Novosphingobium sp.
352 Oceanobacillus indicireducens
353 Oceanobacillus massiliensis
354 Oceanobacillus sp.
355 Ochrobactrum anthropi
356 Odysseella sp.
357 Oenococcus oeni
358 Ohtaekwangia sp.
359 Opiritus sp.
360 Orbus sp.
361 Ornatilinea sp.
362 Oryzium leptocrescens
363 Owenweckia sp.
364 Paenibacillus aestivum
365 Paenibacillus edaphicus
366 Paenibacillus humicus
367 Paenibacillus pectinilyticus
368 Paenibacillus sp.
369 Paenibacillus taihuensis
370 Pantoea sp.
371 Paracoccus aminovorans
372 Paracoccus carotinifaciens
373 Paracoccus chinensis
374 Parasegetibacter sp.
375 Parvimonas micra
376 Parvularcula sp.
377 Patulibacter sp.
378 Paucisalibacillus sp.
379 Pedobacter boryungensis
380 Pedobacter roseus
381 Pedobacter sp.
382 Pedomicrobium sp.
383 Pedosphaera parvula
384 Pedosphaera sp.
385 Peptoniphilus gorbachii
386 Peredibacter sp.
387 Phaeospirillum fulvum
388 Phaselocystis sp.
389 Phenylbacterium sp.
390 Phormidium sp.
391 Phycococcus aromatorum
392 Phycococcus sp.
393 Phycisphaera sp.
394 Phytohabitans sp.
395 Pilmelia sp.
396 Pirellula sp.
397 Planctomyces sp.
398 Planifilum sp.
399 Planomonospora parontospora
400 Plantibacter elymi
401 Polaromonas sp.
402 Polydardomyces sp.
403 Pontibacter actinarum
404 Pontibacter sp.
405 Porphyromonas gingivalis
406 Porphyromonas sp.
407 Promicromonospora sukumoe
408 Propionibacterium acnes
409 Propionibacterium sp.
410 Protochlamydia sp.
411 Pseudoclavibacter bifida
412 Pseudolabrys sp.
413 Pseudomonas azotoformans
414 Pseudomonas graminis
415 Pseudomonas sp.
416 Pseudonocardia halophobica
417 Pseudonocardia sp.
418 Pseudospirillum sp.
419 Pseudoxanthomonas dokdonensis
420 Pseudoxanthomonas mexicana
421 Pseudoxanthomonas sp.
422 Pullulanibacillus sp.
423 Pusillimonas sp.
424 Quadrisphaera gen.
425 Quadrisphaera sp.
426 Rahnella carotovorum
427 Ralstonia pickettii
428 Reyranelia sp.
429 Rheinheimeria sp.
430 Rhizobacter globosum
431 Rhizobium alkalisi
432 Rhizobium etli
433 Rhizomicrobium sp.
434 Rhodobacter sp.
435 Rhodobium sp.
436 Rhodococcus equi
437 Rhodococcus erythropolis
438 Rhodococcus fascians
439 Rhodocytophaga sp.
440 Rhodomicrobium sp.
441 Rhodopirellula sp.
442 Rhodoplanes sp.
443 Roseiflexus sp.
444 Roseimicrobium sp.
445 Roseococcus sp.
446 Roseomonas aerolata
447 Roseomonas frigidaquae
448 Roseomonas gilardii
449 Roseomonas sp.
450 Rothia sp.
451 Rubellimicrobium sp.
452 Rubritepidia sp.
453 Rubrobacter sp.
454 Ruminococcus sp.
455 Saccharimonas sp.
456 Saccharothrix sp.
457 Salana sp.
458 Sandaracinus sp.
459 Sandarakinorhabdus sp.
460 Sediminibacterium sp.
461 Segetibacter sp.
462 Shewanella putrefaciens
463 Shimazuella sp.
464 Singulisphaera acidiphila
465 Singulisphaera sp.
466 Siphonobacter sp.
467 Skermanella sp.
468 Smithella sp.
469 Sodalis sp.
470 Solibacter sp.
471 Solirubrobacter sp.
472 Solitalea canadensis
473 Sorangium sp.
474 Sphaerisporangium sp.
475 Sphaerobacter sp.
476 Sphingobium sp.
477 Sphingobium yanoikuyae
478 Sphingomonas asaccharolytica
479 Sphingomonas dokdonensis
480 Sphingomonas sp.
481 Sphingomonas wittichii
482 Sphingopyxis alaskensis
483 Sphingopyxis sp.
484 Spirosoma rigui
485 Spirosoma sp.
486 Sporocytophaga sp.
487 Sporosarcina sp.
488 Staphylococcus agnetis
489 Staphylococcus aureus
490 Staphylococcus sp.
491 Stenotrophomonas maltophilia
492 Stenotrophomonas sp.
493 Steroidobacter sp.
494 Stigmatella aurantiaca
495 Streptococcus anginosus
496 Streptococcus infantis
497 Streptococcus salivarius
498 Streptococcus sp.
499 Streptomyces albobrisesolus
500 Streptomyces sp.
501 Streptosporangium roseum
502 Sulfilabacter sp.
503 Sulfuritalea sp.
504 Syntrophococcus sp.
505 Taibaella sp.
506 Telmatobacter sp.
507 Telmatospirillum sp.
508 Tepidicella sp.
509 Tepidimicrobium sp.
510 Terrabacter sp.
511 Terrimonas sp.
512 Tetrasphaera sp.
513 Thauera sp.
514 Thermincola sp.
515 Thermoactinomyces sp.
516 Thermomonas fusca
517 Thermomonas sp.
518 Thermus sootoductus
519 Thiobacillus sp.
520 Truepera sp.
521 Tumebacillus sp.
522 Turicibacter sp.
523 Turmerella parva
524 Uliginosibacterium sp.
525 Undibacterium sp.
526 Variovorax paradoxus
527 Variovorax quadricarinatus
528 Variovorax sp.
529 Veillonella atypica
530 Verrucimicrobium sp.
531 Virgisporangium ochraceum
532 Vogesella sp.
533 Weissella cibaria
534 Williamsia faeni
535 Woodsholea sp.
536 Xanthomonas sp.
537 Xiphinematobacter sp.
538 Zymobacter palmae

LEYENDA promedio (X)

0 %
< 1 %
1 - 5 %
5 - 10 %
10 - 20 %
20 - 30 %
> 30 %

LEYENDA frecuencia (f)

0 %
1 - 20 %
20 - 40 %
40 - 50 %
50 - 60 %
60 - 80 %
80 - 100 %

C: CONTROL
P: C.A. PERENNE
E: C.A. ESTACIONAL

HONGOS

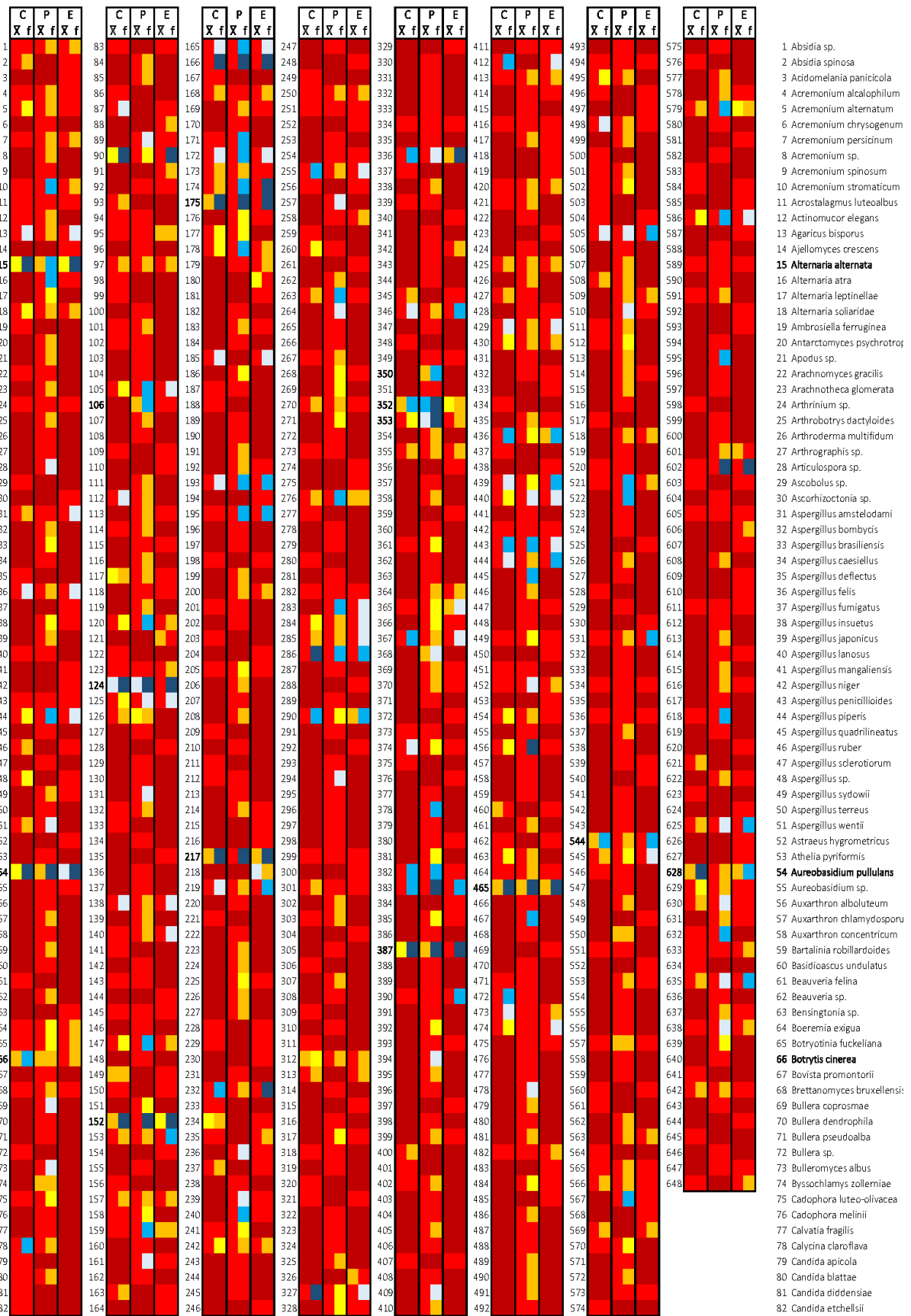
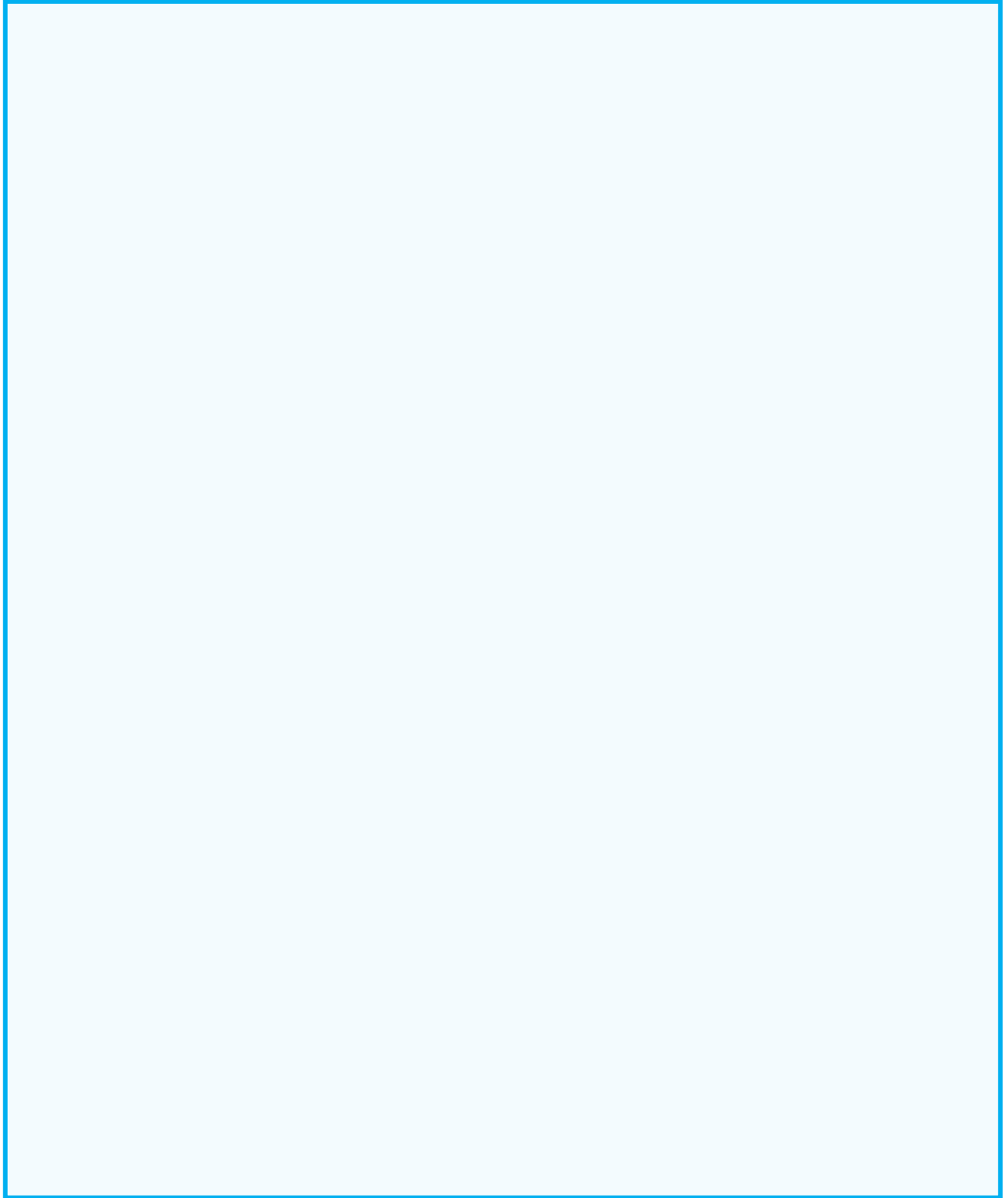


Figura 55. Especies de hongos analizadas. Se representan 3 columnas diferenciadas, una para cada grupo de estudio (Control, Perenne y Estacional). Cada columna se subdivide en dos: Frecuencia (f) y promedio (X) por gamas de colores tal y como se indica en la leyenda de la página anterior.

- 83 *Candida ethanolic* 165 *Cryptococcus laurentii* 247 *Ganoderma lucidum* 329 *Leptosphaerulina australis* 411 *Neurospora terricola* 493 *Phoma paspali* 575 *Sporobolomyces lactosus*
- 84 *Candida friedrichii* 166 *Cryptococcus magnus* 248 *Gastrum indicum* 330 *Leptosphaerulina trifolii* 412 *Nidulariopsis iowensis* 494 *Phoma plurivora* 576 *Sporobolomyces nylandii*
- 85 *Candida glabrosa* 167 *Cryptococcus nemorosus* 249 *Geastrumia polystigmatis* 331 *Leptospora rubella* 413 *Nigrospora sp.* 495 *Phoma saxea* 577 *Sporobolomyces poonsooki*
- 86 *Candida intermedia* 168 *Cryptococcus oerensis* 250 *Geminibasidium sp.* 332 *Letendraea sp.* 414 *Ocultifur sp.* 496 *Phoma sp.* 578 *Sporobolomyces ruberrimus*
- 87 *Candida membranifaciens* 169 *Cryptococcus paraflavus* 251 *Geomyces asperulatus* 333 *Leucoagaricus ionidicolor* 415 *Oculimacula yallundae* 497 *Phomopsis columnaris* 579 *Sporobolomyces sp.*
- 88 *Candida quercitrusa* 170 *Cryptococcus peneaus* 252 *Geomyces sp.* 334 *Leucoagaricus leucothites* 416 *Oidiodendron cereale* 498 *Pichia fermentans* 580 *Sporobolomyces subbrunne*
- 89 *Candida sp.* 171 *Cryptococcus phenolicus* 253 *Geopyxis sp.* 335 *Leucosporidium fellii* 417 *Oidiodendron chlamydospo* 499 *Pichia kluyveri* 581 *Sporopachydermia sp.*
- 90 *Candida stellata* 172 *Cryptococcus podzolicus* 254 *Geotrichum klebahnii* 336 *Lewia insectoria* 418 *Oidiodendron rhodogenum* 500 *Pichia manshurica* 582 *Sporothrix inflata*
- 91 *Candida stellimalicola* 173 *Cryptococcus saitoi* 255 *Gibberella intricans* 337 *Lindneria sp.* 419 *Oidiodendron sp.* 501 *Pichia membranifaciens* 583 *Stachybotrys chartarum*
- 92 *Candida subshahii* 174 *Cryptococcus sp.* 256 *Gibberella zeae* 338 *Lipomyces chichibuensis* 420 *Oliveonia pauxilla* 502 *Pilidium concavum* 584 *Stachybotrys sp.*
- 93 *Candida tropicalis* 175 **Cryptococcus terreus** 257 *Gibellulopsis sp.* 339 *Lipomyces lipofer* 421 *Olpidium brassicae* 503 *Pisolithus sp.* 585 *Stagonospora sp.*
- 94 *Candida vini* 176 *Cryptococcus terricola* 258 *Glaera lozoyensis* 340 *Lipomyces sp.* 422 *Paecilomyces marquandii* 504 *Pleospora betae* 586 *Stagonosporopsis dorenbos*
- 95 *Candida zeylanoides* 177 *Cryptococcus uzbekistanen* 259 *Gloeoporus pannocinctus* 341 *Lophiostoma compressum* 505 *Paecilomyces niveus* 587 *Steccherinum fimbriatum*
- 96 *Cantharellus albidolutescens* 178 *Cryptococcus victoriae* 260 *Glomerella tucumanensis* 342 *Lophiostoma sp.* 424 *Paecilomyces sp.* 506 *Podospora communis* 588 *Stephanonectria sp.*
- 97 *Capronia sp.* 179 *Cryptococcus wieringae* 261 *Glomus sp.* 343 *Luellia recondita* 425 *Panaeolus sphinctrinus* 507 *Podospora dimorpha* 589 *Stereum hirsutum*
- 98 *Carestiella socia* 180 *Cystosporiopsis actinidiiae* 262 *Glutinoglossum glutinosum* 344 *Lycopodon pyriforme* 426 *Paraconiothyrium brasiliense* 508 *Podospora multipilosa* 590 *Stilbella byssidea*
- 99 *Catenulifera sp.* 181 *Cryptotrichosporon anacardi* 263 *Guehomyces pullulans* 345 *Macrophomina phaseolina* 427 *Paraconiothyrium variabile* 509 *Podospora sp.* 591 *Stropharia coronilla*
- 100 *Cephalophora sp.* 182 *Curreya austroafricana* 264 *Gymnopus alkalivirens* 346 *Macroventuria anomochaeta* 428 *Paraglomus sp.* 510 *Polytolypa hystricis* 592 *Sullus pseudobrevipes*
- 101 *Cephalosporium serrae* 183 *Curvibasidium cygneicollum* 265 *Gymnopus ioccephalus* 347 *Madurella sp.* 429 *Paraphaeosphaeria sp.* 511 *Preussia sp.* 593 *Sydowia sp.*
- 102 *Cephalotheca sulfurea* 184 *Curvularia gladioli* 266 *Gymnostellatospora frigida* 348 *Magnaporthe grisea* 430 *Paraphoma sp.* 512 *Preussia sp.* 594 *Talaromyces barcinensis*
- 103 *Cercophora sp.* 185 *Curvularia hawaiiensis* 267 *Haematonectria haematoc* 349 *Malassezia cuniculi* 431 *Parasola auricoma* 513 *Psathyrella candolleana* 595 *Talaromyces purpurogenus*
- 104 *Chaetomella raphigera* 186 *Curvularia inaequalis* 268 *Hannaella luteola* 350 **Malassezia globosa** 432 *Parasola kuehneri* 514 *Pseudallescheria fimeti* 596 *Talaromyces ruber*
- 105 *Chaetomium sp.* 187 *Curvularia sp.* 269 *Hannaella oryzae* 433 *Parastagonospora avenae* 515 *Pseudurotium hygrophilum* 597 *Talaromyces rugulosus*
- 106 **Chaetosphaerionema sp.** 188 *Cyberlindnera jadinii* 270 *Hannaella sinensis* 434 *Paillus ammoniavirescens* 516 *Psilachnum chrysostrigium* 598 *Talaromyces stollii*
- 107 *Chalara sp.* 189 *Cylindrodadiella cymbiform* 271 *Hannaella sp.* 435 *Penicillium adametzioides* 517 *Punctelia jeckeri* 599 *Teratosphaeria capensis*
- 108 *Chalara vaccinii* 190 *Cyphellophora sp.* 272 *Hannaella surugaensis* 436 *Penicillium anatolicum* 518 *Purpureocillium laurulentum* 600 *Terfezia sp.*
- 109 *Chalastospora ellipsoidea* 191 *Cystoflobasidium capitatum* 273 *Hannaella zeae* 437 *Penicillium angulare* 519 *Pycnidiothpora aurantiaca* 601 *Tetracladium maxilliforme*
- 110 *Chalastospora obclavata* 192 *Cystoflobasidium infirmum* 274 *Hanseniaspora osmophila* 438 *Penicillium bialowiezense* 520 *Pyrenochaeta lycopersici* 602 *Tetracladium sp.*
- 111 *Chloridium sp.* 193 *Cystoflobasidium maceratum* 275 *Hanseniaspora thalilandica* 439 *Penicillium bilaiae* 521 *Pyrenochaeta sp.* 603 *Thamnostylum lucknowensis*
- 112 *Chrysosporium lobatum* 194 *Cyrtospora sp.* 276 *Hanseniaspora uvarum* 440 *Penicillium brevicompactum* 522 *Pyrenochaetopsis leptospora* 604 *Tomentella sp.*
- 113 *Chrysosporium pilosum* 195 *Dactyloctenaria alcaerensis* 277 *Hansfordia sp.* 441 *Penicillium camemberti* 523 *Pyrenochaetopsis sp.* 605 *Tomentella sublacina*
- 114 *Chrysosporium sp.* 196 *Dactyloctenaria vitis* 278 *Hemimyces ochrogaleata* 442 *Penicillium canariense* 524 *Pyrenophora lolii* 606 *Torulaspora delbrueckii*
- 115 *Cinereomyces lindbladii* 197 *Devriesia aphidis* 279 *Hirsutella aphidis* 443 *Penicillium chrysogenum* 525 *Rachicladosporium luculiae* 607 *Trametes versicolor*
- 116 *Cistella sp.* 198 *Devriesia sp.* 280 *Hirsutella minnesotensis* 444 *Penicillium citrinum* 526 *Ramariopsis sp.* 608 *Trechispora sp.*
- 117 *Cladophialophora sp.* 199 *Didymella exigua* 281 *Hirsutella rhosiliensis* 445 *Penicillium corylophilum* 527 *Rasamsonia sp.* 609 *Tremella encephala*
- 118 *Cladorrhinum sp.* 200 *Didymella sp.* 282 *Hispidoconidioma sp.* 446 *Penicillium cyclopium* 528 *Resinicium saccharicola* 610 *Tremella phaeophysciae*
- 119 *Cladosporium adianticola* 201 *Didymella urticicola* 283 *Holtermannia corniformis* 447 *Penicillium decumbens* 529 *Retroconis fusiformis* 611 *Tremella sp.*
- 120 *Cladosporium cladosporioid* 202 *Dioszegia buhagianii* 284 *Holwaya sp.* 448 *Penicillium digitatum* 530 *Rhexocerosporidium pane* 612 *Trichoderma asperillum*
- 121 *Cladosporium exasperatum* 203 *Dioszegia catarinonii* 285 *Hormonema sp.* 449 *Penicillium expansum* 531 *Rhodosporeidium babjvae* 613 *Trichoderma sp.*
- 122 *Cladosporium fusiforme* 204 *Dioszegia frisingensis* 286 *Humicola grisea* 450 *Penicillium glabrum* 532 *Rhodosporeidium kratochvil* 614 *Tricholoma terreum*
- 123 *Cladosporium halotolerans* 205 *Dioszegia hungarica* 287 *Humicola sp.* 451 *Penicillium inflatum* 533 *Rhodosporeidium toruloides* 615 *Trichosporon asahii*
- 124 **Cladosporium herbarum** 206 *Dioszegia sp.* 288 *Hyalopeziza sp.* 370 *Microdiplodia sp.* 452 *Penicillium lapidosum* 534 *Rhodotorula aurantiaca* 616 *Trichosporon dehoogii*
- 125 *Cladosporium ramotenellum* 207 *Dioszegia takashimae* 289 *Hyaloscypha sp.* 371 *Modicella reniformis* 453 *Penicillium madriti* 535 *Rhodotorula crocea* 617 *Trichosporon dulciturum*
- 126 *Cladosporium sphaerosper* 208 *Dioszegia zsoltii* 290 *Hygrocybe sp.* 372 *Mollisia cinerea* 454 *Penicillium menonorum* 536 *Rhodotorula graminis* 618 *Trichosporon moniliiforme*
- 127 *Claroideoglossum sp.* 209 *Diplodia seriata* 291 *Hymenoscyphus sp.* 373 *Monodilium indicum* 455 *Penicillium mongsalena* 537 *Rhodotorula ingeniosa* 619 *Trichosporon mycotykinov*
- 128 *Clavaria californica* 210 *Dioszegia ornata* 292 *Hyphodontiella subulata* 374 *Monographella cucumerina* 456 *Penicillium nodosatum* 538 *Rhodotorula mudlaginosa* 620 *Truncatella laurocerasi*
- 129 *Clavaria sp.* 211 *Drechslera phlei* 293 *Hypocrea aeruginosa* 375 *Monographella nivialis* 457 *Penicillium ochrochloron* 539 *Rhodotorula nothofagi* 621 *Tubaria conspersa*
- 130 *Claviceps purpurea* 212 *Drechslera sp.* 294 *Hypocrea virescens* 376 *Morchella importuna* 458 *Penicillium oxalicum* 540 *Rhodotorula sp.* 622 *Tuber sp.*
- 131 *Clohesyomyces sp.* 213 *Elaphomyces compleximur* 295 *Hysterangium sp.* 377 *Mortierella alpina* 459 *Penicillium paneum* 541 *Rosellinia thelena* 623 *Tuber whetstonense*
- 132 *Clonostachys rosea* 214 *Endoconidioma populi* 296 *Idriella rara* 378 *Mortierella ambigua* 460 *Penicillium polonicum* 542 *Rotiferophthora angustisp* 624 *Tumularia sp.*
- 133 *Cochliobolus intermedium* 215 *Entoloma graphitipes* 297 *Ilyonectria europaea* 379 *Mortierella amoeboides* 461 *Penicillium quercetorum* 543 *Roussouella neopustulans* 625 *Typhula sp.*
- 134 *Collophora paarla* 216 *Entoloma platyphyloides* 298 *Ilyonectria lirioidendri* 380 *Mortierella camargensis* 462 *Penicillium reticulatum* 544 **Russula sp.** 626 *Udeniomyces pannonicus*
- 135 *Collophora sp.* 217 **Epicothium nigrum** 299 *Immersidisocia eucalypti* 381 *Mortierella capitata* 463 *Penicillium roseopurpureum* 545 *Saccharomyces cerevisiae* 627 *Udeniomyces pyricularis*
- 136 *Coniolaria hispida* 218 *Erysiphe betae* 300 *Inocybe lanuginosa* 382 *Mortierella donocystis* 464 *Penicillium sizovae* 546 *Saccharomyces kudriavzevi* 628 **Ulocladium chartarum**
- 137 *Coniosporium apollinis* 219 *Erythrobasidium hasegawii* 301 *Inocybe sp.* 383 *Mortierella elongata* 465 **Penicillium sp.** 547 *Sagenomella diversispora* 629 *Umbelopsis dimorpha*
- 138 *Coniothyrium carteri* 220 *Eucosphaeria capensis* 302 *Isaria catenianulata* 384 *Mortierella exigua* 466 *Penicillium spathulatum* 548 *Sagenomella sp.* 630 *Umbelopsis sp.*
- 139 *Coniothyrium sidae* 221 *Eutypa lata* 303 *Issatchenka orientalis* 385 *Mortierella humilis* 467 *Penicillium sublateralium* 549 *Sarcinomyces crustaceus* 631 *Uncinula necator*
- 140 *Coniothyrium sp.* 222 *Eutypella microtheca* 304 *Issatchenka terricola* 386 *Mortierella lignicola* 468 *Penicillium terrigenum* 550 *Sarcinomyces sp.* 632 *Uncobasidium sp.*
- 141 *Conocybe tetrasporoides* 223 *Exidia truncata* 305 *Itersonilia perplexans* 387 **Mortierella sp.** 469 *Peniophora aurantiaca* 551 *Sarocladium glaucum* 633 *Venturia hystricoides*
- 142 *Coprinellus bisporus* 224 *Exophiala alcalophila* 306 *Kazachstania telluris* 388 *Mrakia frigida* 470 *Peniophora sp.* 552 *Sarocladium sp.* 634 *Veronicaopsis simplex*
- 143 *Coprinellus radians* 225 *Exophiala equina* 307 *Kernia pachypleura* 389 *Mucor brunneogriseus* 471 *Periconia prolifica* 553 *Sarocladium strictum* 635 *Verticillium dahliae*
- 144 *Coprinellus sabulicola* 226 *Exophiala opportunistica* 308 *Kluyveromyces lactis* 390 *Mucor circinelloides* 472 *Periconia sp.* 554 *Sarocladium zeae* 636 *Verticillium sp.*
- 145 *Coprinellus sp.* 227 *Exophiala pisciphila* 309 *Kluyveromyces marxianus* 391 *Mucor hiemalis* 473 *Pestalotiopsis sp.* 555 *Scedosporium dehoogii* 637 *Wallemia muriae*
- 146 *Coprinopsis phlyctidiospora* 228 *Exophiala sp.* 310 *Knufia epidermidis* 392 *Musciellum theobromae* 474 *Peyronellaea calorpreferens* 556 *Scedosporium prolificans* 638 *Wallemia sebi*
- 147 *Cortinari sp.* 229 *Exophiala xenobiotica* 311 *Kodamaea ohmeri* 393 *Mycena sp.* 475 *Peziza sp.* 557 *Schizophyllum commune* 639 *Wardomyces humicola*
- 148 *Crepidatus variabilis* 230 *Fibulobasidium inconspicu* 312 *Lachancea thermotolerans* 394 *Mycocarthris corallina* 476 *Peziza subcitrina* 558 *Schizothecium carpnicola* 640 *Wardomyces inflatus*
- 149 *Crocicreas cyathoidesum* 231 *Filobasidium capsuligenum* 313 *Laetisaria arvalis* 395 *Mycoleptodiscus sp.* 477 *Phacidium lacurum* 559 *Schizothecium curvisporum* 641 *Westerdykella sp.*
- 150 *Crocicreas sp.* 232 *Filobasidium floriforme* 314 *Lasiobolium nidulum* 396 *Mycosphaerella sp.* 478 *Phaeoacremonium alvesii* 560 *Sclerotostagonospora sp.* 642 *Wickerhamomyces anomali*
- 151 *Cryptococcus adeliensis* 233 *Fimetariella rabenhorstii* 315 *Lecanicillium psalliotae* 397 *Mycothermus thermophilus* 479 *Phaeoacremonium griseorum* 561 *Sclerotinia sclerotiorum* 643 *Williopsis californica*
- 152 **Cryptococcus aerius** 234 *Fomes fomentarius* 316 *Lectera longa* 398 *Myrothecium inundatum* 480 *Phaeoacremonium iraniana* 562 *Scolecobasidium constrictum* 644 *Yarrowia lipolytica*
- 153 *Cryptococcus albidus* 235 *Fomitiporia mediterranea* 317 *Lecythophora sp.* 399 *Myrothecium sp.* 481 *Phaeoacremonium sicilianum* 563 *Scolecobasidium sp.* 645 *Zasmidium xenoparkii*
- 154 *Cryptococcus arrabidenis* 236 *Fusarium acuminatum* 318 *Lechomicola minima* 400 *Nakazawaea enobii* 482 *Phaeoconium chlamydospo* 564 *Scytalidium circinatum* 646 *Zopfiella marina*
- 155 *Cryptococcus aureus* 237 *Fusarium bactridoides* 319 *Lepidosphaeria nicotiae* 401 *Nakazawaea ishiwadae* 483 *Phaeoconium sp.* 565 *Scytalidium sp.* 647 *Zopfiella sp.*
- 156 *Cryptococcus bhutanensis* 238 *Fusarium boothii* 320 *Lepiota besseyi* 402 *Nectria ramulariae* 484 *Phaeosphaeria sp.* 566 *Sebacia sp.* 648 *Zygoascus meyeriae*
- 157 *Cryptococcus chemovii* 239 *Fusarium delphinoideis* 321 *Lepiota brunneoincarnata* 403 *Nectria ventricosa* 485 *Phaeothecoidea sp.* 567 *Seimatosporium vitis*
- 158 *Cryptococcus diffusus* 240 *Fusarium equiseti* 322 *Lepiota lilacea* 404 *Neobulgaria sp.* 486 *Phallus impudicus* 568 *Selenophoma mahoniae*
- 159 *Cryptococcus dimenae* 241 *Fusarium keratoplasticum* 323 *Lepiota sp.* 405 *Neonectria sp.* 487 *Phialemonium globosum* 569 *Serendipita sp.*
- 160 *Cryptococcus flavus* 242 *Fusarium oxysporum* 324 *Lepiota subincarnata* 406 *Neopestalotiopsis foedans* 488 *Phialocephala humicola* 570 *Setophaeosphaeria sp.*
- 161 *Cryptococcus friedmannii* 243 *Fusarium pseudensiforme* 325 *Lepidotiscella sp.* 407 *Neopentelopsis sp.* 489 *Phialophora geniculata* 571 *Spenceriomyces plurivora*
- 162 *Cryptococcus gastricus* 244 *Fusarium sp.* 326 *Leptosphaeria rubefaciens* 408 *Neosartorya sp.* 490 *Phialophora hyalina* 572 *Spiromastix princeps*
- 163 *Cryptococcus heimaeyensis* 245 *Fusarium sublunatum* 327 *Leptosphaeria sacchari* 409 *Neosetophoma sp.* 491 *Phialosimplex caninus* 573 *Spiromastix warcupii*
- 164 *Cryptococcus huempfi* 246 *Fusidium griseum* 328 *Leptosphaeria sp.* 410 *Neostagonospora carcis* 492 *Phialotubus microsporus* 574 *Sporobolomyces gracilis*



DISCUSIÓN

Desde unas pocas décadas atrás hasta la actualidad, la idea que se tenía de la conjuntiva y del sistema inmunitario de la superficie ocular era muy diferente al concepto de tejido linfoide asociado a la conjuntiva, tal y como lo conocemos hoy en día. Hasta hace relativamente poco (década de los 80) era descabellado pensar que un tejido sano pudiera contener células del sistema inmunitario. Años más tarde, se produjo cierta controversia entre autores que defendían la presencia de un tejido linfoide organizado asociado a la conjuntiva y los que defendían justamente lo contrario. No fue hasta 1994 cuando comenzó a resolverse esta disputa. Se pasó de la teoría de la no existencia de un tejido linfoide asociado a la conjuntiva sana a la teoría de “el CALT no nace, se hace”, sugiriendo que el tejido linfoide de la conjuntiva sana se va adquiriendo a lo largo de la vida. (116) Aunque seguía habiendo investigadores reacios a pensar que la conjuntiva se comportaba del mismo modo que el resto de las mucosas, fue a partir de 1997 cuando se empezó a normalizar el CALT como componente de la conjuntiva sana con sus formas foliculares y difusa (ver **Figura 56**). (117)

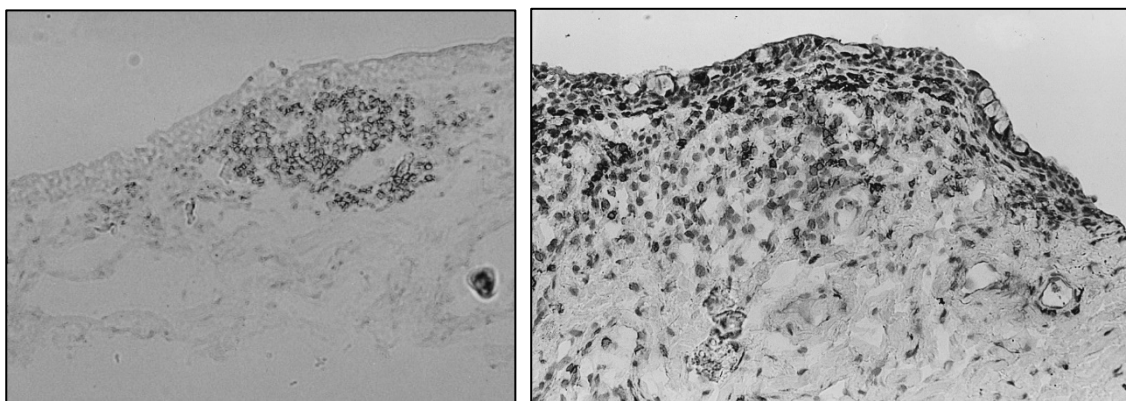


Figura 56. Organización folicular (figura de la izquierda) e infiltración epitelial de los linfocitos (figura de la derecha) en conjuntiva sana. imágenes extraídas del artículo científico: "Characterisation of the Normal Conjunctival Leukocyte Population" de 1997.

De hecho, en ese mismo estudio se encontraron otras características interesantes de la conjuntiva que en años posteriores se fueron desarrollando. Por ejemplo, las diferencias del fenotipo linfoide en las distintas zonas topográficas de la conjuntiva, la predominancia de los linfocitos CD8 frente a CD4, o el hecho de que no concordasen los cálculos cuando la suma de CD4 y CD8 no era igual al porcentaje de CD3, surgiendo así el fenotipo CD3+CD8-CD4-.

Con la llegada de nuevas técnicas de citología mínimamente invasivas como la citología de impresión o por cepillado como alternativa a las biopsias, se impulsó el

estudio citológico de la superficie ocular. Aunque estas técnicas ya llevaban tiempo implantadas, no fue hasta 1990 que se aplicó la citología por cepillado a la conjuntiva, demostrando ser una técnica relativamente no-invasiva y que no causaba más irritación que un frotis con torunda de algodón. (118)

Actualmente, tanto la citología por impresión como el cepillado conjuntival son las dos técnicas más utilizadas para analizar el componente celular de la superficie ocular. De hecho, existe cierta lucha por decidir qué técnica es la que tiene más ventajas, tanto para el paciente como para la investigación. Teniendo en cuenta los buenos resultados que hemos obtenido con la citología por cepillado en estudio previos, creemos que es la técnica adecuada para obtener un gran número de células en suspensión, con una alta viabilidad y mínima molestia al paciente. (113,114,119,120)

Además de los métodos de extracción de muestra celular; las técnicas de citometría por inmunofluorescencia, los inmunoensayos y la secuenciación de ADN también han ido evolucionando y mejorando en estos últimos años. Hoy en día somos capaces de analizar infinidad de moléculas simultáneamente en un periodo de tiempo cada vez más reducido.

Con este estudio hemos podido analizar las características de los tres vértices principales involucrados en la defensa de la superficie ocular (IELs/lágrima/microbiota) y el papel que desempeña cada uno en la respuesta inmunitaria. Hemos podido caracterizar el fenotipo de los IEL conjuntivales, calcular las concentraciones de los factores solubles lacrimales y analizar las variaciones en las comunidades microbianas comensales tanto en individuos sanos como en pacientes alérgicos. El análisis de resultados y su contraste con otros estudios se resumen en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Resumen de los resultados y su relación con lo hallado por otros autores. En fondo verde se señalan los resultados que consideramos que están dentro de la normalidad según lo observado por otros autores. En fondo rojo, los resultados que, a priori, carecen de cierta coherencia con el resto de resultados* o no se ajustan a los patrones del proceso alérgico observado por otros autores. Por ejemplo, esperábamos ver una proporción de células y moléculas proinflamatorias en alergias estacionales igual o mayor a las observadas en perennes.

DIAGNOSTICO	Circulante		Regional		Contraste con otros estudios previos		
	CAE	CAP	CAE	CAP	Similitud	Patología	Ref.
MAIT dn	-	-	-	↓*	—	Asma	(121)
Linfocitos TCRγδ+	-	-	-	↓	—	Asma	(122)
T CD4+ memoria	-	↑	-	-	—	Alergia a alimentos	(123)
Linfocitos Th1	↓	-	↓	-	—	Asma	(124)
Linfocitos Th17/Th1	↓	-	-	-			
Linfocitos Th2	-	-	-	↑	✓	Conjuntivitis alérgica	(125)
Linfocitos Th17	↑	-	↑	-	—	Asma	(124)
Linfocitos Th22	↑	-	↑	-	—	Espondilitis, artritis reumatoide	(126)
Total NKT CD8+	-	-	-	↑	—	Asma	(122)
Linfocitos B	↑	-	-	-	—	Asma	(127)
Linfocitos B2	↑	-	-	-	—	Asma	(127)
IFN-γ	-	-	-	↑	✓	Conjuntivitis alérgica	(125)
IgA	-	-	↑	-	—	Dermatitis atópica	(128)
IgE	↑	↑	↑	↑	✓	Asma, Conj. alérgica estacional	(129,130)
IL-1β	-	-	-	↑	✓	Queratoconjuntivitis vernal	(131)
IL-2	-	-	-	↑	✓	Conjuntivitis alérgica	(125)
IL-4	-	-	-	↑	—	Ojo seco	(132)
IL-5	↑	↑	-	↑	✓	Asma, Conjuntivitis alérgica	(129,133)
IL-6	-	↑	-	-	—	Asma	(129)
IL-9	↑	-	-	-	—	Dermatitis atópica	(134)
IL-13	-	-	-	↑	✓	Conjuntivitis alérgica perenne	(133)
IL-17E	-	-	-	↑	—	Ojo seco	(135)
IL-17F	-	-	-	↑	—	Queratocono	(136)
IL-21	-	-	-	↑	—	Ojo seco	(137)
IL-22	-	-	-	↑	—	Ojo seco	(138)
MMP-9 (ng/mL)	-	-	↑	-	✓	Queratoconjuntivitis vernal	(139)
RANTES	↑	-	-	-	—	Rinitis alérgica	(140)
TGF-β2	-	-	↓	↓	—	Uveitis	(141)
TSLP	-	-	-	↑	✓	Conjuntivitis alérgica Perenne	(133)
<i>Kocuria sp</i>			-	↑	✗		
<i>Prop. acnes</i>			-	↑	—	Sarcoidosis ocular	(142)
<i>Malassezia</i>			-	↑	—	Dermatitis atópica	(143)

*Teniendo en cuenta que las células MAIT son un tipo de linfocito NKT y éstas están aumentadas en CAP era de esperar que las MAIT estuvieran aumentadas también. ✓= coincidencia con otros estudios, —= coincidencia parcial (mismos resultados en condiciones patológicas diferentes), ✗= similitudes no encontradas.

1. La conjuntiva como tejido al amparo de la inmunidad innata.

Con el fenotipado de las poblaciones linfoides en conjuntiva y sangre periférica hemos podido observar que el sistema inmunitario circulante es muy distinto al local o regional. Hemos encontrado que los linfocitos con función inmunitaria innata (**MAIT, linfocitos T CD8+, NKT, CD3+TCRγδ+ y B1**) tienen proporciones más altas en conjuntiva en comparación con los linfocitos de la sangre periférica. Esto nos sugiere que la defensa

ocular contra los patógenos es ejecutada principalmente por la inmunidad innata, por lo que será una respuesta rápida, inespecífica y de gran intensidad.

También hemos podido observar en conjuntiva una de las principales características del tejido linfoide asociado a las mucosas: **el predominio de linfocitos T CD8 frente a CD4**. Esta característica no es ninguna novedad, ya que se lleva observando muchos años en conjuntiva (114,120). En cambio, el resto de los hallazgos son totalmente novedosos ya que no existen estudios previos que hayan caracterizado tan detalladamente los IELs de la conjuntiva.

Según numerosos autores, los linfocitos T CD8, así como las células MAIT y NKT, desempeñan un papel importante en la defensa de la mucosa. Estas células se caracterizan por su gran versatilidad: desde una función citotóxica, generando una gran variedad de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-17 e IL-22) hasta funciones inmunorreguladoras, sirviendo de puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. (48,144,145)

Se ha demostrado que las **células MAIT** se encuentran más frecuentemente en zonas en las que existe contacto directo con el ambiente y la microbiota comensal como la mucosa oral (146), intestinal (147) o respiratoria. (148–150) Estas células son, en parte, responsables de mantener la homeostasis de las mucosas, siendo capaces de reconocer la riboflavina liberada por la microbiota comensal y modificando su función reguladora a efectora dependiendo de los cambios en las concentraciones de riboflavina. Además. Las células MAIT interactúan con una gran cantidad de células inmunitarias y no-inmunitarias, lo que confiere a estas células de gran versatilidad, permitiendo estar involucradas en numerosos procesos celulares (ver **Figura 57**). (151)

Ocurre lo mismo con los **linfocitos NKT**. La activación de estas células por parte de las presentadoras de antígenos contribuye directamente en la defensa de las mucosas contra bacterias, ya sean ajenas o comensales. (48) En el hígado e intestino de ratones los porcentajes de células NKT están entre el 10-40% y el 4-10% respectivamente, mientras que en sangre representan menos del 1%. (152–154)

Los linfocitos T con el receptor **TCR $\gamma\delta$** también se encuentran en mayores proporciones en otras mucosas. Por ejemplo, en el intestino llegan a tener proporciones de hasta el 50% mientras que en sangre constituyen un 1-5%. (155) En nuestro caso hemos obtenido unos valores entre el 25-35% del total de linfocitos y entre el 32 – 45% de los linfocitos T.

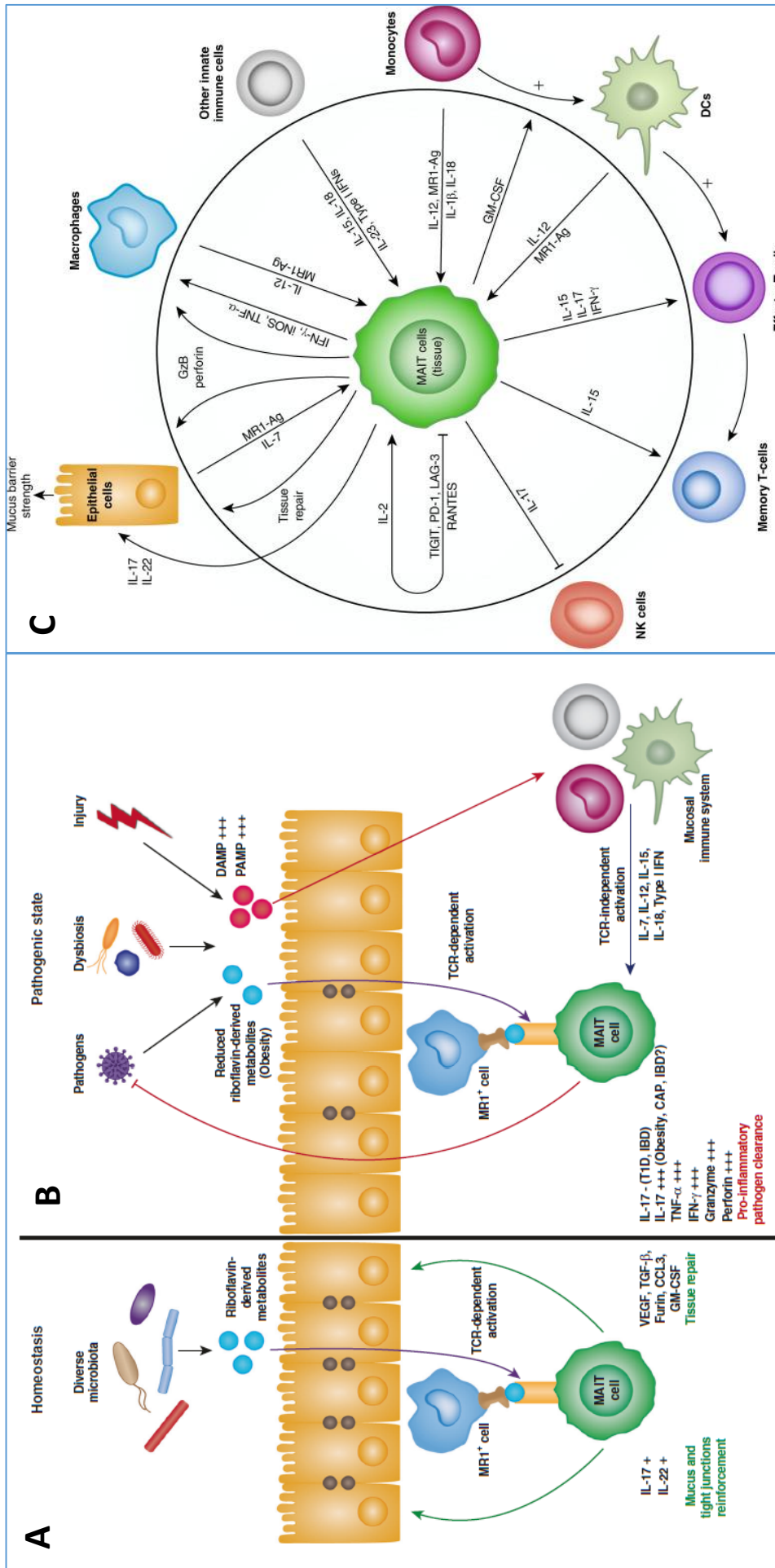


Figura 57. Esquema del modelo de “doble señal” propuesto por Isabelle Nel et al. (126) donde se puede ver la acción de las MAIT dependiente de los estímulos de riboflavina de la microbiota y del sistema inmunitario local para ejecutar una respuesta: reguladora (A), manteniendo la homeostasis gracias a la producción de IL-17 e IL-22; o efectora (B), donde las MAIT producen altos niveles de citocinas proinflamatorias y mediadores citotóxicos que contribuyen a la eliminación de patógenos. En la imagen de la derecha (C) puede observarse todas las interacciones de las MAIT con las distintas células del sistema inmunitario.

Como complemento de esta inmunidad innata, existe una población centinela CD4+ con una fuerte función efectora, preparada para posibles infecciones. Nuestro análisis inmunofenotípico demostró que **aproximadamente dos tercios de las células T CD4 estaban activadas (CD45R0+)** en la conjuntiva. Lo cual resulta razonable si consideramos que las mucosas, y en este caso la conjuntiva, está en contacto directo con el ambiente y expuesta a las agresiones constantes de los patógenos, por lo que necesita mantener un alto porcentaje de activación de sus células.

Dentro del grupo de linfocitos T CD4 activados tenemos que en torno al 50% son linfocitos T reguladores (Treg), lo que sugiere que la conjuntiva tiene una **mayor capacidad reguladora** ante un posible descontrol de las células Th. Esto es una parte fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de la superficie ocular, controlando la respuesta inmune y previniendo la autoinmunidad. (36) Pudimos observar que las proporciones de Treg se mantenían constantes independientemente de la conjuntivitis alérgica, mientras que los subtipos Th eran los que podían variar en número con el desarrollo de la enfermedad alérgica. Esta circunstancia nos hace descartar a las Tregs como uno de los posibles responsables de que proceso alérgico se descontrola, apuntando hacia los linfocitos Th como posibles causantes.

Por otro lado, la predominancia del subtipo **B1** frente a B2 es algo que no se había estudiado aún en conjuntiva. Sabemos que los linfocitos B1 contribuyen a la inmunidad innata de la superficie ocular produciendo grandes cantidades de IgA (molécula fundamental en la defensa de las mucosas) sin necesidad de estímulo y son una parte esencial en de la homeostasis. Además, aunque carecen de memoria, las células B1 pueden actuar como presentadoras de antígeno para los linfocitos T e inducir la diferenciación hacia el subtipo Th17. (54)

Utilizando todos los valores obtenidos por citometría de flujo podemos obtener una visión general de las proporciones de cada subpoblación de IEL en individuos sanos tal y como se muestra en la **Figura 58**.



Figura 58. Representación gráfica de la conjuntiva tarsal superior de un sujeto sano. Cada esfera representa un tipo de linfocito y equivale a un porcentaje del 1%.

2. El papel de los IELs y las citocinas durante el proceso alérgico

De acuerdo con los resultados obtenidos, hemos podido concluir que existe una clara diferencia en las proporciones de los distintos **subtipos de IELs** de la conjuntiva entre los sujetos sanos y los alérgicos. El grupo de CAP se caracteriza por una sobreexpresión de células Th2 y NKT y una disminución de los subtipos TCR $\gamma\delta$ y MAIT. Mientras que el grupo de CAE se caracteriza por una disminución marcada de las células Th1 y un aumento de los linfocitos Th17 y Th22.

Sabemos que una vez se inicia el proceso alérgico, el CALT se activa, adaptando su fenotipo según el estímulo recibido y aumentando la infiltración epitelial. En consecuencia, los IELs, junto con el resto de las células del sistema inmunitario, las células caliciformes y las células epiteliales, entre otras, liberarán moléculas proinflamatorias hacia la película lacrimal, iniciando así la fase inflamatoria de la superficie ocular.

Además de los linfocitos propios de la inmunidad innata, como son los NKT, las células T helper desempeñan un papel importante en las enfermedades alérgicas. Nuestros resultados han revelado que, en casos de conjuntivitis alérgica, se produce una polarización de los T helper hacia el fenotipo proinflamatorio (**Th2, Th17 y Th22**) en detrimento de un fenotipo más inmunomodulador (**Th1 y Th17/Th1**). Estas mismas variaciones se han podido encontrar en otros tejidos o indirectamente en conjuntiva, generalmente analizando las concentraciones de citocinas en lágrima. Aunque en la superficie ocular no hemos encontrado ningún estudio que haga una caracterización detallada de las principales subpoblaciones de Th en conjuntiva sí que existen numerosos estudios donde se pudo observar que las citocinas propias de estos linfocitos estaban aumentadas en casos de alergia ocular. (125,156)

Nuestros datos sobre las células NKT, TCR $\gamma\delta$ y MAIT en la conjuntiva son totalmente novedosos, y no se han podido encontrar datos de referencia en otros estudios. En los últimos años, estas tres poblaciones de linfocitos han ganado protagonismo en la defensa de las mucosas. En un estudio donde se usaba un modelo de conjuntivitis alérgica en ratón se demostró que las células NKT eran necesarias para la máxima expresión de la conjuntivitis alérgica (157), lo que sugiere que estas células desempeñan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. Lo mismo ocurre con los linfocitos MAIT y TCR $\gamma\delta^+$, considerados como el puente de comunicación entre la microbiota comensal

y el sistema inmunitario asociado a la mucosa (151,158). Sorprendentemente, son estos dos subtipos linfoides los que hemos encontrado en menor proporción en el grupo de conjuntivitis alérgicas perennes, siendo éste el grupo en el que más biodiversidad microbiana hemos encontrado. Creemos firmemente que la disminución de las MAIT y las células $TCR\gamma\delta^+$ puede estar íntimamente relacionada con la disbiosis en CAP, lo que aún no conocemos es si esa disbiosis es la causa o el efecto de la disminución de estos linfocitos. Pensamos que la sobrecolonización de la superficie ocular por parte de microorganismos “no comensales” puede mermar el desarrollo de estas células en la conjuntiva. No obstante, la codependencia entre las células MAIT y la microbiota sigue siendo motivo de estudio. (159)

Por otro lado, los linfocitos Th2 están estrechamente relacionados con las reacciones alérgicas, ya que son los responsables de activar las células B e iniciar la respuesta mediada por IgE. En cambio, el papel de las células Th17 en la conjuntivitis es menos conocido. Se sabe que las células Th17 desempeñan un rol proinflamatorio, pudiendo agravar la respuesta inflamatoria de las células Th2 en casos de conjuntivitis alérgica. (160) Además, son numerosos los estudios que han demostrado la influencia de las Th17 y la IL-17 en otras enfermedades oculares inflamatorias como la uveítis, escleritis, la retinopatía diabética o el ojo seco, (161–165) lo que consolida la teoría de que las células Th17 pueden tener una gran participación en las respuestas iniciadas por Th2 en conjuntivitis alérgicas.

Además, sabemos que las células Th22 tienen una doble función al participar en el proceso inflamatorio alérgico y promover la regeneración epitelial. (166) Se ha demostrado que estas células están relacionadas con las enfermedades de la piel y pueden estar aumentadas en condiciones de atopia (dermatitis y psoriasis). (167) De hecho, en varios estudios realizados en casos de enfermedad alérgica se ha observado un aumento de los niveles de Th22, tanto en sangre de pacientes con rinitis alérgica, (168) como en la piel de pacientes con dermatitis atópica. (169–171)

En cuanto al **componente lagrimal**, hemos encontrado un entorno predominantemente Th2 tanto en los pacientes sanos como en los alérgicos, liderado por la IL-4 y la IL-13, seguido de una respuesta de tipo Th17, liderada por la IL-17F y la IL-22. Estas cuatro citocinas representan entre el 50-60% de las interleucinas en lágrima.

También hemos podido observar que tanto CAP como CAE se caracterizan por un aumento de la IgE y una disminución del isotipo TGF- β 2. El aumento de la concentración de IgE se observa habitualmente en la lágrima de pacientes con conjuntivitis alérgica (130). En cambio, la disminución del TGF- β 2 está algo menos estudiada, aunque se ha observado la misma disminución en casos de ojo seco. (172)

Además, hemos encontrado que la conjuntivitis perenne, en comparación con los individuos sanos, se caracteriza por el aumento de las concentraciones de algunas moléculas proinflamatorias de tipo Th1 (IFN- γ e IL-2), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) y Th17 (IL-17A, IL-17E, IL-17F, IL-21 e IL-22), así como la IL- β 1 y la TSLP. Varios estudios han asociado el aumento de ciertas concentraciones de factores solubles en la lágrima con el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias. En diferentes estudios se han observado aumentos de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 o IL- β 1 en CAE (173); de TSLP tanto en CAP como en CAE (24); y de IL-17, IL-21 e IL-22 en ojo seco. (137,174)

Por otro lado, hemos observado que la conjuntivitis estacional difiere de la perenne en cuanto a las mayores concentraciones de IgA y MMP-9. Algunos estudios han informado de un aumento de las concentraciones de IgA en formas agudas de diferentes conjuntivitis. (175,176) Sin embargo, otros estudios recientes han referido una disminución de IgA. (177) En cuanto a la MMP-9, existen algunos estudios que han encontrado un aumento de la concentración en lágrima en sujetos con queratoconjuntivitis vernal (85) y ojo seco. (178)

El perfil molecular de la lágrima en la conjuntivitis estacional dista mucho de lo esperado, teniendo en cuenta los estudios anteriores que han analizado las lágrimas en este tipo de alergias oculares. Como se ha observado en otros estudios, se esperaba que las concentraciones de citocinas fueran similares, o incluso superiores, a las obtenidas en la conjuntivitis perenne. Esto podría significar que los pacientes con CAE se encontraban en una fase postinflamatoria o de recuperación, lo que explicaría la menor sintomatología en el momento del examen, a pesar de la presencia de inflamación conjuntival.

Por otro lado, al observar las proporciones de las subpoblaciones de Th intraepiteliales en CAE, esperaríamos encontrar un aumento de las concentraciones de citocinas de tipo Th17 y Th22 en lágrima, pero en cambio, sólo encontramos un aumento significativo de IgA, IgE y MMP-9. Sin embargo, en CAP, encontramos cierta concordancia entre el aumento de los linfocitos Th2 en conjuntiva y el aumento de IL-4, IL-5 e IL-13 en las

lágrimas. El resto de las citocinas que aparecen aumentadas en CAP como la IL-17, la IL-22 y el IFN- γ , puede estar asociado con el aumento de las células NKT y su amplio repertorio de citocinas.

Hemos comparado la concentración de los factores solubles de lágrima de este estudio con los encontrados por otros autores en estudios previos y hemos podido observar que existen grandes diferencias en las concentraciones de algunas moléculas, como la **eotaxina**, **IgA**, **IL-9**, **IL-17F** e **IL-22**, mientras que, para el resto de moléculas, nuestros resultados se mantienen dentro de los rangos observados por otros autores. (**Tabla 11**).

Tabla 11. Comparación de nuestros resultados en lágrima con otros estudios. Datos expresados en porcentaje: media \pm desviación estándar de la media. IgA=inmunoglobulina A, Ige=inmunoglobulina E, MMP-9= metaloproteinasas de matriz 9, TGF= Factor de crecimiento transformante, IL=interleucina, MCP-1= proteína quimiotáctica de monocitos, TSLP=linfopoyetina estromal tímica, IFN=interferón, TNF= Factor de necrosis tumoral. CAE=conjuntivitis alérgica estacional, CAP=conjuntivitis alérgica perenne CA=conjuntivitis alérgica, DA=dermatitis atópica, QCV= queratoconjuntivitis vernal, OS=ojo seco, Cat=catarata, QC=queratocono, Uv=uveítis, NE=no encontrado.

	CAE	CAP	Otros autores	Ref.
Eotaxina	6,67 \pm 4,26 pg/mL	22,21 \pm 50,73 pg/mL	CAE: 852 \pm 218 pg/mL	(179)
IFN - γ	15,31 \pm 19,19 pg/mL	44,44 \pm 62,53 pg/mL	CA: 101 \pm 137 pg/mL	(125)
IgA	63,88 \pm 54,2 ng/mL	39,88 \pm 40,23 ng/mL	DA: 896,3 \pm 316,6 ug/ml	(128)
IgE	134,51 \pm 107,47 ng/mL	191,8 \pm 163,11 ng/mL	QCV: 322,2 \pm 45,7 ng/ml CAE: 194,7 \pm 21,7 ng/ml CAP: 134,8 \pm 23,1 ng/ml	(130)
IL-1β	1,61 \pm 2,71 pg/mL	11,05 \pm 25,42 pg/mL	QCV: 15 \pm 37 pg/mL	(131)
IL-2	9,22 \pm 9,32 pg/mL	23,67 \pm 41,79 pg/mL	CA: 75,7 \pm 122 pg/mL	(125)
IL-4	250,77 \pm 349,6 pg/mL	640,06 \pm 994,8 pg/mL	OS: 420 \pm 70,90 pg/mL CA: 73,9 \pm 57,2 pg/mL	(132) (125)
IL-5	12,39 \pm 11,05 pg/mL	26,87 \pm 31,27 pg/mL	QCV: 10,88 \pm 1,82 pg/mL CAE: 5,10 \pm 1,33 pg/mL CAP: 2,43 \pm 1,28 pg/mL	(133)
IL-6	11,68 \pm 15,58 pg/mL	29,75 \pm 38,28 pg/mL	QCV: 42 \pm 113 pg/mL	(131)
IL-8	71,31 \pm 105,56 pg/mL	84,17 \pm 132,18 pg/mL	OS: de 122,32 a 344,90 pg/mL	(180)
IL-9	2,64 \pm 2,24 pg/mL	4,1 \pm 5,12 pg/mL	QCV: 102,8 \pm 8 pg/mL	(181)
IL-10	10,52 \pm 14,98 pg/mL	33,02 \pm 50,69 pg/mL	OS: de 2,98 \pm 37,6 a 67,5 pg/mL	(182,183)
IL-12p40	4,17 \pm 10,32 pg/mL	19,79 \pm 42,61 pg/mL	OS: de 10 a 25 pg/mL	(184)
IL-12p70	25,91 \pm 38,73 pg/mL	71,53 \pm 109,77 pg/mL	Cat: de 27,9 a 64,0 pg/mL QCV: 34,28 \pm 8,42 pg/mL	(135)
IL-13	37,18 \pm 38,32 pg/mL	71,93 \pm 95,22 pg/mL	CAE: 23,77 \pm 6,29 pg/mL CAP: 17,67 \pm 4,28 pg/mL	(133)
IL-17A	3,24 \pm 10,48 pg/mL	12,78 \pm 26,55 pg/mL	Cat: de 12,0 a 22,3 pg/mL	(135)
IL-17E	8,38 \pm 5,32 pg/mL	18,36 \pm 25,14 pg/mL	OS: de 0 a 50 pg/mL	(185)
IL-17F	58,32 \pm 65,25 pg/mL	113,64 \pm 142,93 pg/mL	QC: 1047 \pm 209 pg/mL	(136)
IL-21	24,61 \pm 40,94 pg/mL	67,55 \pm 107,11 pg/mL	OS: 14,2 \pm 4,6 pg/mL	(137)
IL-22	54,21 \pm 99,14 pg/mL	147,21 \pm 262,62 pg/mL	OS: de 8 a 23 pg/mL	(138)
MCP-1	362,39 \pm 303,33 pg/mL	308,12 \pm 310,65 pg/mL	OS: de 347,60 a 609,14 pg/mL OS: de 2,43 a 381,24 \pm 142,83 ng/mL	(180,183) (186)
MMP-9	9,26 \pm 21,91 ng/mL	4,27 \pm 11,37 ng/mL	DA: 132,33 pg/mL QCV: 253 \pm 186 ng/mL	(139) (85)
RANTES	54,52 \pm 56,35 pg/mL	118,66 \pm 130,17 pg/mL	OS: de 42,2 a 456,12 \pm 92,82 pg/mL	(180,183)
TGF-β1	8,57 \pm 1,26 pg/mL	8,54 \pm 0,72 pg/mL	QCV: 19 \pm 70 pg/mL	(131)
TGF-β2	6430,5 \pm 2995,12 pg/mL	5548,88 \pm 3480,88 pg/mL	Uv: 64884,06 \pm 3461,27 pg/mL	(141)
TGF-β3	9,92 \pm 5,65 pg/mL	8,83 \pm 1,37 pg/mL	NE	
TNF-α	6,64 \pm 10,22 pg/mL	20,57 \pm 29,74 pg/mL	QCV: 35 \pm 103 pg/mL	(131)
TSLP	27,72 \pm 17,68 pg/mL	38,01 \pm 16,43 pg/mL	QCV: 48,91 \pm 7,45 pg/mL CAP: 21,56 \pm 2,72 pg/mL CAE: 24,63 \pm 2,43 pg/mL	(133)

Debemos tener en cuenta que la metodología utilizada para el análisis de moléculas lacrimales varía de un estudio a otro. Aunque la gran mayoría de ensayos utilizaron un analizador Luminex, factores como la severidad y sintomatología, el tipo de patología, o el método de extracción de la lágrima influye mucho en la composición de la lágrima.

Por ejemplo, la recogida de lágrima mediante capilaridad causa mucha menos irritación que las tiras Schirmer; la severidad y sintomatología de una queratoconjuntivitis vernal generalmente va a ser mayor que una conjuntivitis alérgica; un síndrome de ojo seco etiológicamente difiere mucho de una uveítis, una catarata o una conjuntivitis.

No obstante, a pesar de que la lágrima es un fluido muy sensible a cualquier cambio o estímulo, se han podido encontrar estudios con valores muy similares a los nuestros y unas diferencias entre grupo de estudio que se asemeja en gran medida con lo que hemos encontrado.

3. La contribución de la microbiota a la conjuntivitis alérgica

Nuestros datos demuestran que la microbiota ocular del paciente con conjuntivitis alérgica tiene unas características especiales. Hemos podido observar que en conjuntivitis alérgicas perennes las colonias de bacterias y hongos presentan proporciones variables en comparación con los grupos de CAE y de control. Resulta interesante recalcar que el ADN de las especies *Kocuria*, *P. acnes* y *Malassezia* se detectó en todas las muestras del grupo CAP, pero no en los otros dos grupos.

Es importante añadir que las muestras de microbiota se recogieron durante los meses de primavera y verano del 2018 y 2019, y que las fechas de recogida fueron revisadas para descartar que las diferencias observadas entre grupos estuvieran afectadas por la estacionalidad o el año de extracción.

Numerosos estudios han demostrado una estrecha relación entre la disbiosis y el desarrollo de la enfermedad alérgica en diferentes zonas anatómicas (91). En particular, varios estudios han relacionado las enfermedades de la piel, como la psoriasis y la dermatitis atópica, con la abundancia de determinadas especies fúngicas y bacterianas, como *Kocuria* y *Malassezia*. (187–189)

Además, se sabe que existe una co-regulación cruzada entre los linfocitos de la mucosa y la microbiota comensal en diversas enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, la

microbiota comensal desempeña un papel importante en la regulación de las células NKT en los pulmones e intestino (49). Otros estudios han demostrado que la microbiota también es capaz de regular el balance Th17/Treg en la lámina propia de la mucosa intestinal, afectando al desarrollo de la enfermedad inflamatoria. (88)

Analizando los hallazgos obtenidos en conjuntiva, lágrima y microbiota, todo parece apuntar a que la sobrecolonización de la mucosa por especies bacterianas y fúngicas específicas produce un desequilibrio en la homeostasis de la superficie ocular y, en consecuencia, una respuesta inflamatoria más pronunciada. Un ejemplo de esto se ve claramente en la conjuntivitis alérgica perenne, donde existe una sobrepoblación de las especies *Kocuria*, *P. acnes* y *Malassezia*. De hecho, este crecimiento podría estar relacionado con la polarización de las células T helper a Th2 y de las células T CD8 a NKT, resultando en una mayor producción de citocinas de tipo Th2 y Th17; y con la reducción de linfocitos TCR $\gamma\delta$ y MAIT en CAP. Sin embargo, aún no sabemos cuál es causa y cuál el efecto. Si estos cambios en las poblaciones linfoides, que podrían ser fisiológicos, permiten la colonización de otras especies microbianas, o esta sobrepoblación microbiana es la razón de estos cambios celulares.

Además, desconocemos el origen de estas especies "invasoras". Las colonias observadas en CAP (*Kocuria*, *Malassezia* y *P. acnes*) son especies que se encuentran comúnmente en las membranas mucosas humanas y en la piel, pero también pueden localizarse en suelos, en la piel de los animales o en el medio ambiente. (102,190) **Por ello, proponemos dos posibles teorías sobre el origen de esta invasión: una endógena y otra exógena.**

Diferentes estudios han demostrado que estas especies están relacionadas con enfermedades de la piel como la dermatitis, (95,96) donde se ha encontrado una sobrecolonización de estas, especialmente en zonas donde hay numerosas glándulas sebáceas (como ocurre en los párpados). (97,191) Dentro de los grupos alérgicos, un número considerable de sujetos refirió haber sufrido dermatitis en algún momento de su vida, por lo que es razonable pensar que siguieran teniendo trastornos cutáneos activos o blefaritis, haciendo de la superficie ocular un lugar apropiado para la migración y expansión de estas especies.

La otra teoría, menos probable en nuestra opinión, es la existencia de una cierta **estacionalidad**. Estas colonias, en particular las especies de *kocuria*, podrían encontrarse

en el entorno durante los períodos de siega o de alta concentración de polen. Pero en ese caso, si la teoría fuese cierta, hubiéramos encontrado estas especies también en el resto de los grupos estudiados. Por lo tanto, es posible que en los grupos control y CAE, en los que los valores de MAIT y TCR $\gamma\delta$ no estaban disminuidos, las especies invasoras fuesen eliminadas mientras que el déficit de estos linfocitos en CAP permitió la disbiosis.

Parece claro que existe un perfil microbiano diferente y distintivo de la conjuntivitis alérgica perenne, que podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la alergia, su prevalencia y su sintomatología. Sin embargo, es necesario seguir investigando para responder a todas las preguntas que surgen. Por ejemplo, tomar muestras de microbiota ocular en diferentes estaciones para confirmar la ausencia de estacionalidad, mientras se realiza un estudio microbiológico del entorno; o tomar muestras de microbiota en otras zonas anatómicas del paciente en busca de un perfil similar; o el estudio de la infiltración de neutrófilos en conjuntiva y su posible papel en la regulación de la microbiota ocular.

En resumen, encontramos varias diferencias interesantes en los grupos de conjuntivitis alérgica, especialmente en CAP. Si tenemos en cuenta que los pacientes con CAE están en una fase post-alérgica o de recuperación y que los pacientes con CAP están en una fase avanzada de la respuesta alérgica, los resultados parecen aún más interesantes y cobran más sentido. Siguiendo esta hipótesis, en condiciones normales encontraríamos altos niveles de células Th1, MAIT y TCR $\gamma\delta$, junto con otras células innatas, siendo éstas las encargadas de iniciar la respuesta proinflamatoria. A medida que esta respuesta madura, las células innatas se van reduciendo, permitiendo el crecimiento de las células más especializadas como Th2 y NKT y la liberación de grandes cantidades de citocinas en lágrima. Cuando el alérgeno es eliminado por completo, el estímulo alérgico cesa y la superficie ocular entra en fase de recuperación. Esta fase, como hemos observado en CAE, se caracteriza por un aumento de las células Th17 y Th22, IgA y MMP-9, mientras que las proporciones de células NKT, MAIT y TCR $\gamma\delta$, IgE y TGF- β 2 vuelven gradualmente a los niveles basales. Los linfocitos Th17 y Th22 y la MMP-9 son los responsables de la regeneración epitelial y, junto con la IgA, serán los que promuevan el retorno a la homeostasis de la mucosa.

En las **Figuras 59 y 60** discutimos las 2 fases (**fase inflamatoria y fase de recuperación**) por las que pasaría el proceso inflamatorio, con sus distintas subfases:

1. Contacto con el alérgeno-APC; 2. Diferenciación celular; 3. Migración al epitelio y liberación de citocinas proinflamatorias; 4. Punto de inflexión y cambio de la fase inflamatoria a fase de recuperación; 5. Segunda diferenciación a un fenotipo más regulador; 6. Recuperación de la homeostasis, función celular y niveles basales.



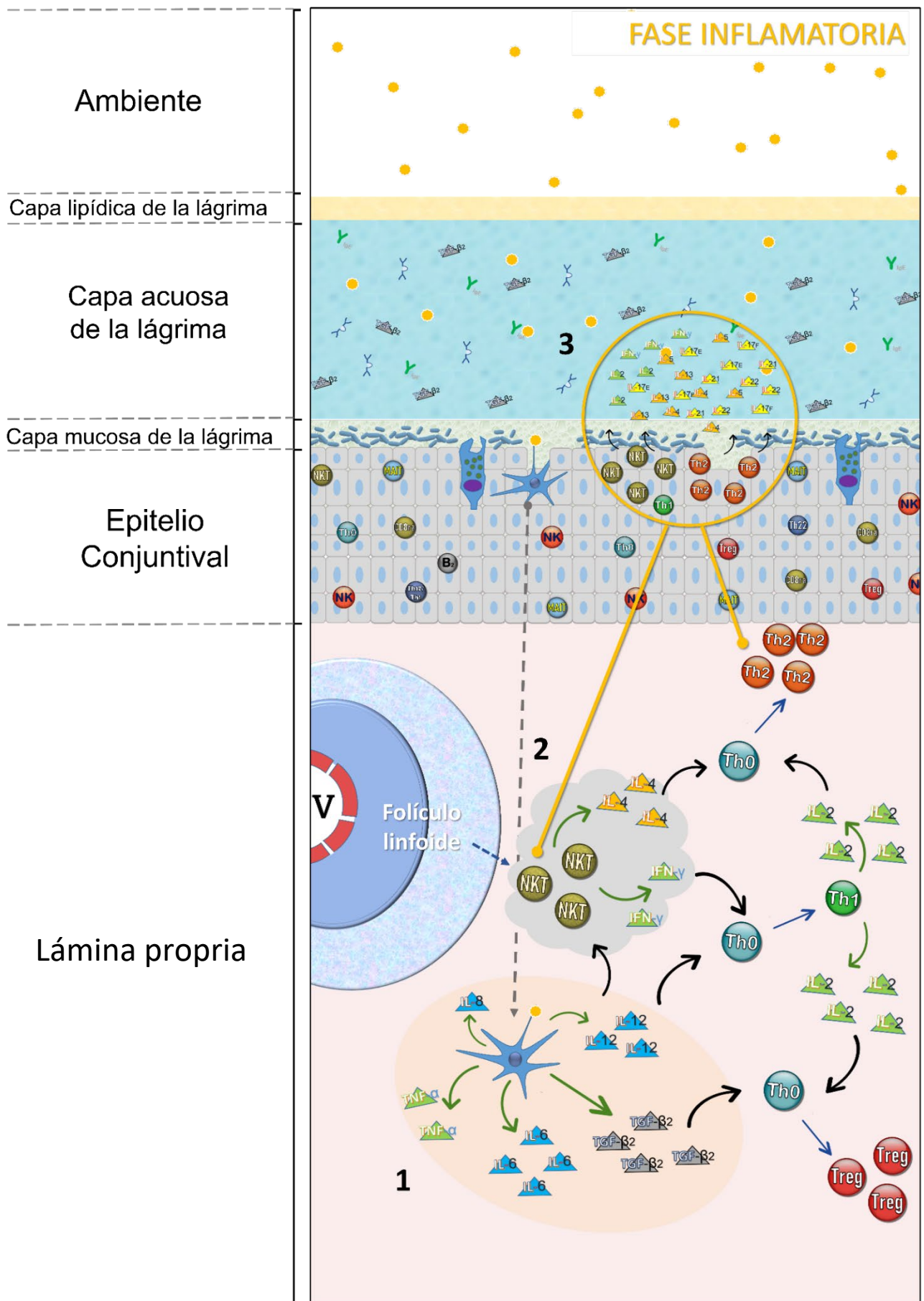


Figura 59. Teoría de las fases del proceso alérgico por las que pasa la conjuntiva. FASE INFLAMATORIA: que comienza con la erosión del epitelio y la captación de los alérgenos por parte de las células presentadoras de antígeno (1), pasando por la diferenciación de los linfocitos th a th1 y th2 (2) y la migración de éstas al epitelio y liberación de citocinas a la lágrima (3).

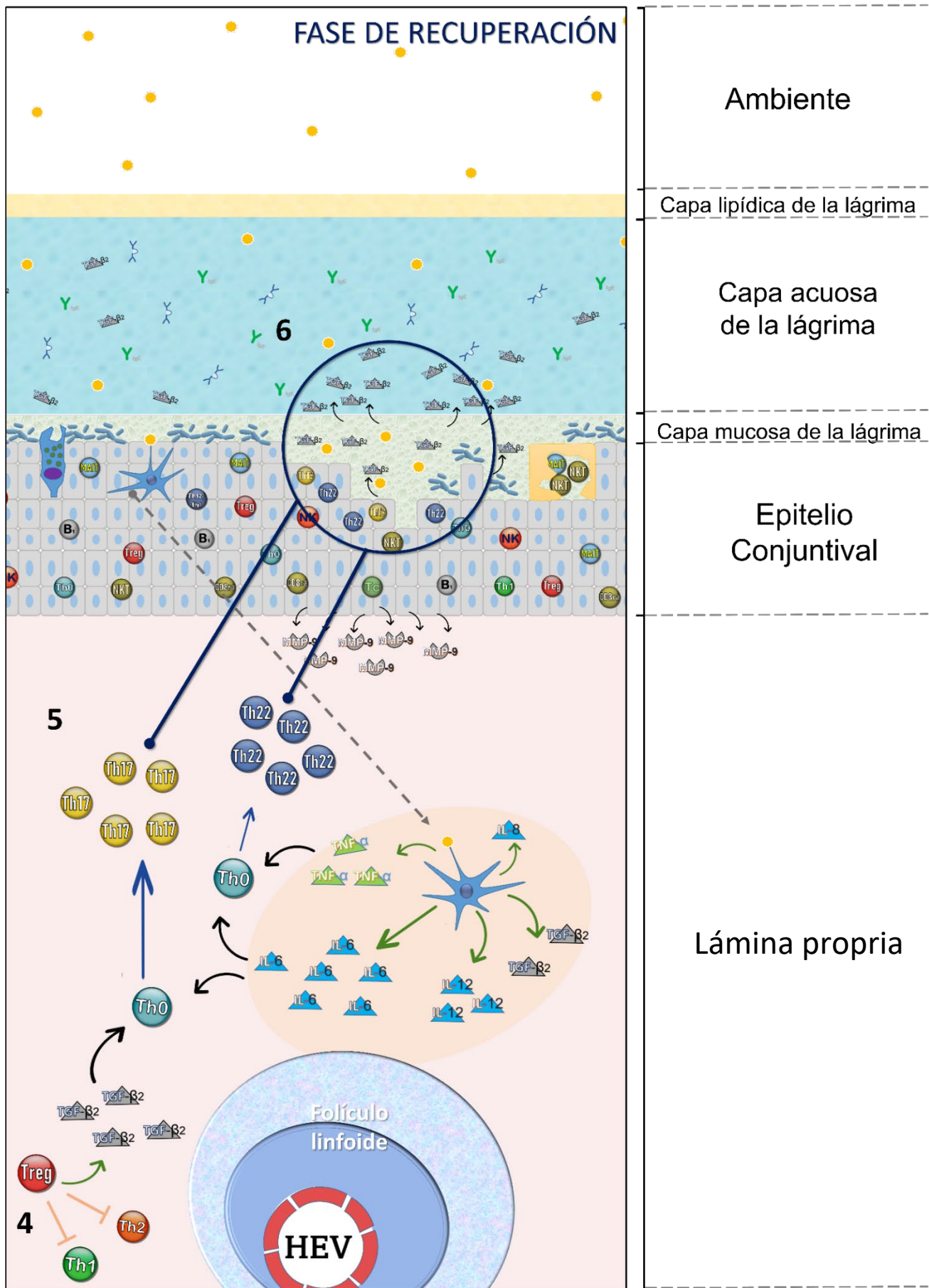


Figura 60. Teoría de las fases del proceso alérgico por las que pasa la conjuntiva. FASE DE RECUPERACIÓN: que comienza con la inhibición de th1 y th2 (4) y el cambio de fenotipo th hacia th17 y th22 (5), y finalizando con la liberación de moléculas activadoras y reguladoras del proceso de cicatrización y la homeostasis (6).

4. Un modelo representativo del proceso alérgico en la superficie ocular.

Si relacionamos todas las ideas planteadas anteriormente podemos recrear, de un modo general, cómo serían los distintos procesos biológicos que ocurren en la superficie ocular durante un periodo de estímulo alérgico, tal y como se muestra en la **Figura 61**. En una conjuntiva sana, donde los niveles de células MAIT intraepiteliales son normales, se lleva a cabo un intercambio constante de metabolitos entre la microbiota comensal y las diferentes células del huésped, tanto estructurales (células epiteliales, por ejemplo) como inmunitarias. Cuando se produce un desequilibrio en las proporciones de las especies que componen la microbiota, la comunicación entre ésta y sistema inmunitario se intensifica, produciéndose un mayor número de señales bioquímicas y resultando en una mayor producción de IgA por parte de las células plasmáticas. Esta respuesta del sistema inmunitario es capaz de mantener una **diversidad controlada de la microbiota** y devolver a la superficie ocular a un estado de homeostasis. **(A)**

Cuando uno de los eslabones de este proceso de mantenimiento del equilibrio falla puede llegar a producirse un sobrecrecimiento de bacterias y hongos no simbióticas. Sabemos que uno de los principales mediadores de la comunicación entre microbiota y el sistema inmunitario son las **células MAIT**. Esta población linfocítica se ha encontrado significativamente reducida en casos de conjuntivitis alérgicas perennes, donde hemos podido observar que presentaban una **mayor diversidad en la microbiota comensal**. **(B)**

Por otro lado, cuando un alérgeno llega a la superficie ocular de un individuo sano, no se producirá una sobreactivación del sistema inmunitario ni un proceso inflamatorio. En cambio, en una conjuntiva alérgica, el alérgeno será tratado como un agente potencialmente nocivo, produciendo una hiperreactividad y sobreactivación del sistema inmunitario. Esto provocará que la superficie ocular, inflamada, sea más propensa a sufrir lesiones, facilitando la entrada en masa del alérgeno y otros microorganismos. Las lesiones epiteliales ocasionarán la **liberación de una cascada de citocinas** quimioatrayentes originadas por las células lesionadas y proximales. **(C)**

Citocinas como **MCP-1, eotaxina, GM-CSF, IL-8, RANTES o TSLP** son liberadas hacia la matriz extracelular, originando la quimiotaxis, proliferación e infiltración epitelial de las células del sistema inmunitario hacia la zona afectada. De este modo la unión del alérgeno a las células presentadoras de antígeno se realiza de un modo más

rápido y eficaz, lo que permite que los linfocitos puedan comenzar el proceso de diferenciación celular a través de 2 vías:

1. Por un lado, **en los folículos linfoides**. Los linfocitos T foliculares activados por una célula presentadora de antígeno (APC) iniciarán la diferenciación de los linfocitos B foliculares a células plasmáticas productoras de Ig. La IgE producida por estas células se unirá a la superficie de los **mastocitos**, produciendo la liberación de grandes cantidades de **histamina**, aumentando la **permeabilidad** de los vasos sanguíneos y permitiendo la entrada de más células del sistema inmunitario (como los linfocitos NKT) hacia la lámina propia. **(D)**
2. Por otro lado, a través del sistema circulatorio sanguíneo y linfático, los linfocitos T CD4⁺ se diferenciarán en **Th1, Th2, Th17, Th22 y Treg**. En una primera **fase proinflamatoria (E)** predominará el fenotipo Th2, encargado de favorecer la proliferación de los eosinófilos y de aumentar la productividad de mucus por parte de las células caliciformes. **(F)**

Por lo tanto, durante esta fase vamos a encontrar una mayor proporción de linfocitos **NKT, Th2 y linfocitos B productores de IgE**, resultando en una mayor concentración en lágrima de citocinas **como IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-21 e IL-22; e IgE. (G)**

Finalmente, una vez el alérgeno se va eliminando de la superficie ocular, la respuesta inflamatoria va disminuyendo paulatinamente y la superficie ocular pasa a una **fase de recuperación (H)**. La polarización de los linfocitos T CD4 hacia el fenotipo Th1 y Th2 va decreciendo para diferenciarse a linfocitos con una mayor capacidad reguladora: **Treg, Th17 y Th22**. Las Treg inhiben la acción de los linfocitos Th1, Th2, macrófagos y células dendríticas, mientras que Th17 y Th22 junto con las células MAIT se encargan de promover la **reparación de los tejidos**. En esta fase se lleva a cabo la degradación de la matriz extracelular y se inicia el proceso de cicatrización fomentado, en parte, por la liberación de **MMP-9** por parte de los macrófagos, neutrófilos, células epiteliales y fibroblastos, entre otras. **(I)**

Por último, la **IgA** en lágrima y células MAIT van recuperando sus niveles basales y regulando la diversidad la microbiota comensal, **regresando a un estado de homeostasis. (J)**

Immune system of the ocular conjunctiva: a histological overview

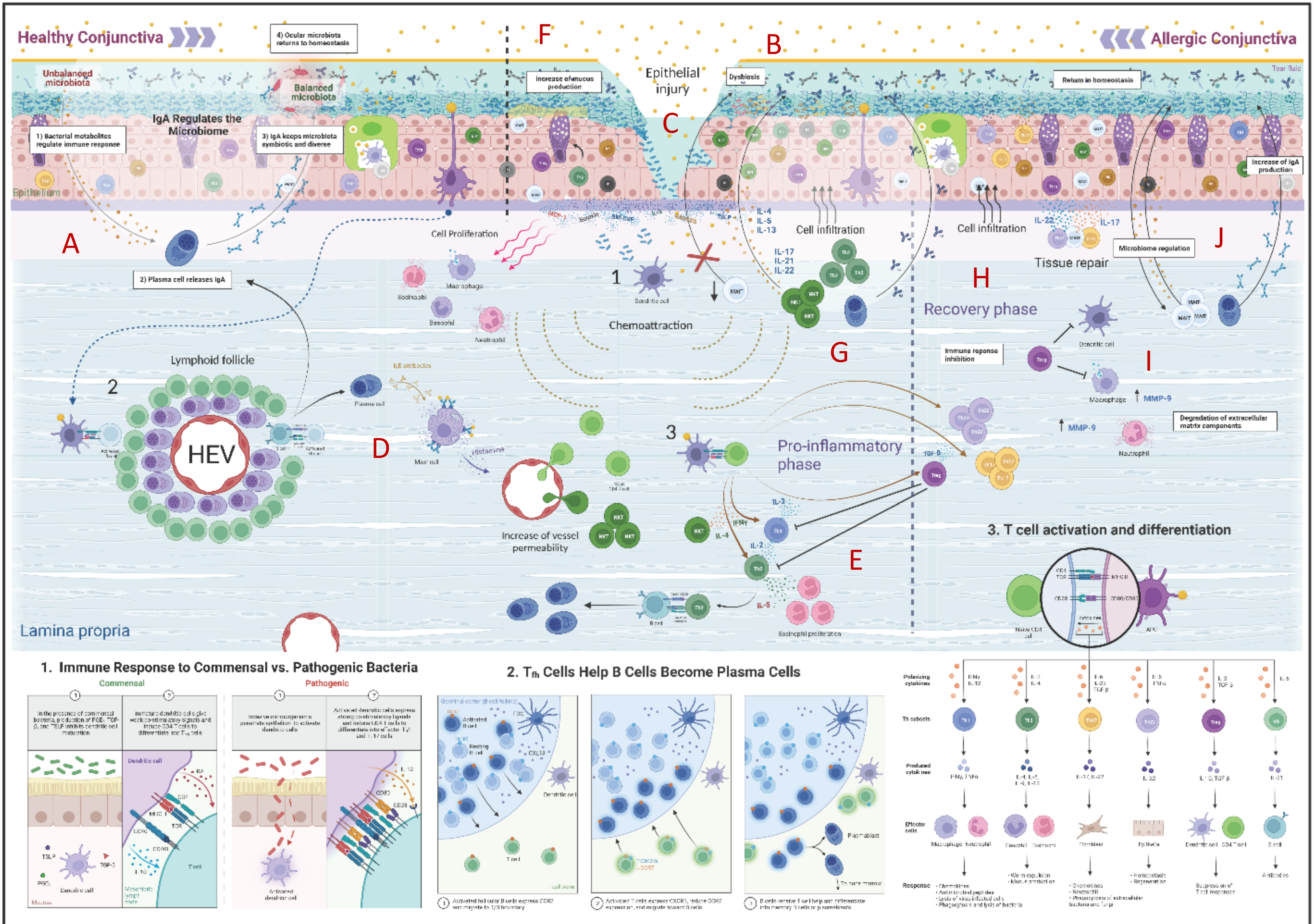


Figura 61. Esquema global de cómo sería el proceso inflamatorio en la conjuntiva y el papel que desempeña cada estructura celular y molecular.

5. POSIBLES LIMITACIONES Y VISTAS AL FUTURO

Este estudio abre la puerta a nuevas investigaciones e introducir nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas para la conjuntivitis alérgica y aclara quiénes son los principales actores que intervienen en el proceso inflamatorio alérgico. No obstante, es necesario proseguir con nuestras investigaciones en esta dirección para resolver las dudas que han ido surgiendo durante este estudio. Por ejemplo, en futuras investigaciones sería interesante analizar las proporciones de otras células del sistema inmunitario como los monocitos y granulocitos conjuntivales.

También sería muy interesante seguir investigando la microbiota ocular: 1) Recoger muestras en diferentes estaciones del año y ver si existen diferencias cuando analizamos la microbiota en momentos de altas concentraciones de polen o gran sintomatología; y en momentos de reposo inmunológico; 2) Tomar muestras de microbiota en diferentes zonas anatómicas, como la piel u otras mucosas cercanas al ojo para observar si existe cierta invasión/migración de las especies microbianas; o 3) Hacer un estudio del microbioma de los suelos (ya sean de cultivo o no) y del aire en épocas de siega y en épocas frías, tendría un gran interés científico.

Controlar en la mayor medida posible factores como el uso de lentillas, la presencia de animales en el hogar, antecedentes de dermatitis, blefaritis u otras enfermedades de la piel, sería de vital importancia para futuras investigaciones.

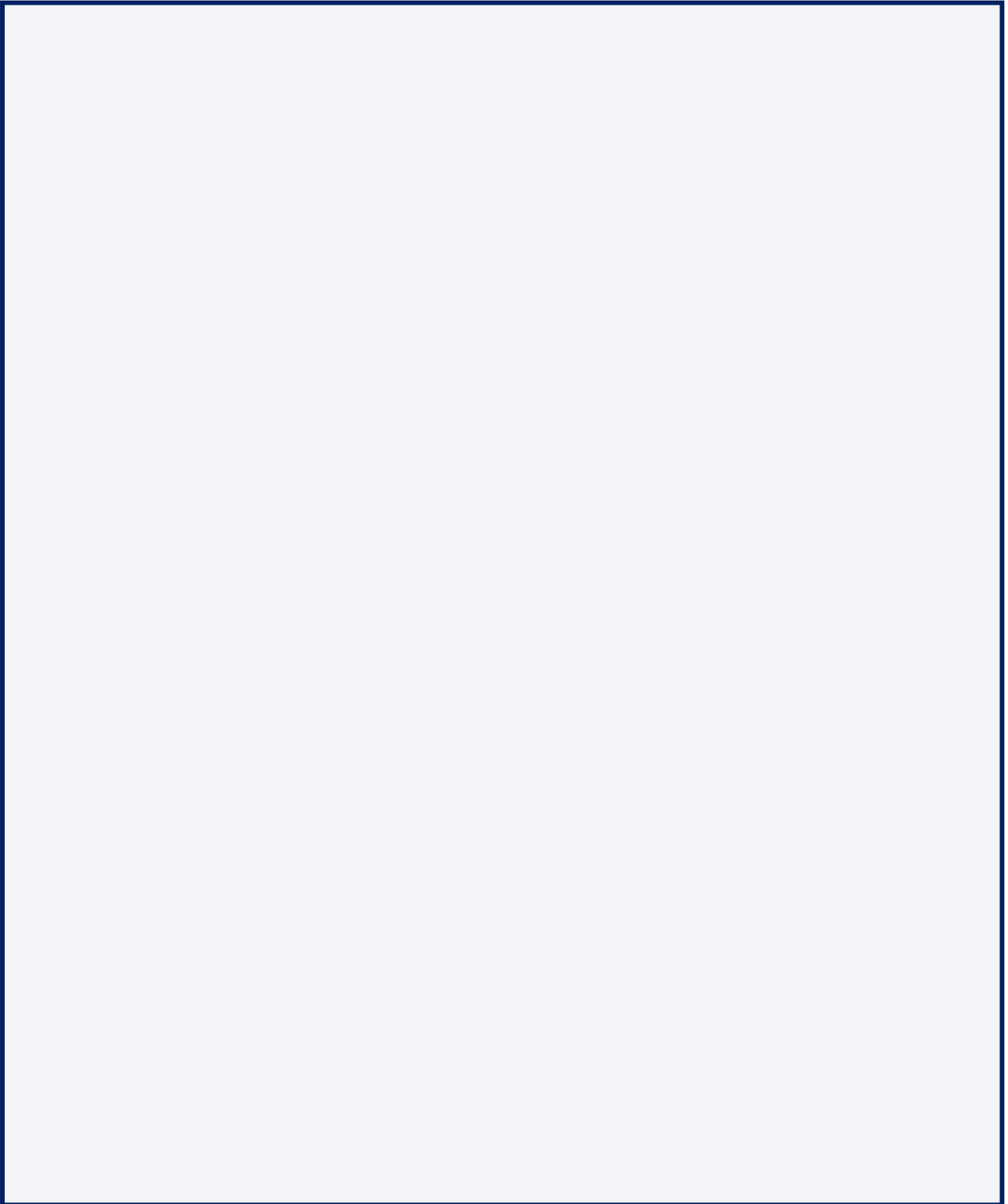
A modo de autocrítica, debemos ser conscientes de que quizás existan técnicas analíticas más comunes. Por ejemplo, una de las cuestiones que nos indicaban los revisores del artículo científico era: ¿por qué usábamos marcadores de membrana para analizar el fenotipo de los linfocitos Th y no medíamos las citocinas intracelulares? Desde un inicio, el estudio se confeccionó para que el análisis de marcadores de membrana fuese el método para diferenciar las subpoblaciones linfoides mediante citometría de flujo. Éramos conscientes de que la citología por cepillado comprometía la viabilidad de las células. Por esta razón, era inviable permeabilizar las células para hacer este tipo de técnicas.

Por otro lado, el citómetro de flujo que se utilizó, actualmente, está obsoleto y descatalogado. A pesar de haber hecho verdaderas virguerías con él y haber resultado de gran ayuda, con un citómetro de flujo más moderno podríamos haber analizado un mayor número de marcadores de membrana en un mismo tubo de muestra. De este modo, no

hubiéramos necesitado dividir la muestra en 5 tubos, evitando al máximo cualquier problema de escasez de células.

Como punto a nuestro favor, incluir el análisis de la microbiota a esta investigación ha resultado ser una decisión totalmente acertada, ya que hemos podido comprobar que la microbiota ocular tiene una gran importancia en el proceso alérgico y es de gran interés para la comunidad científica.

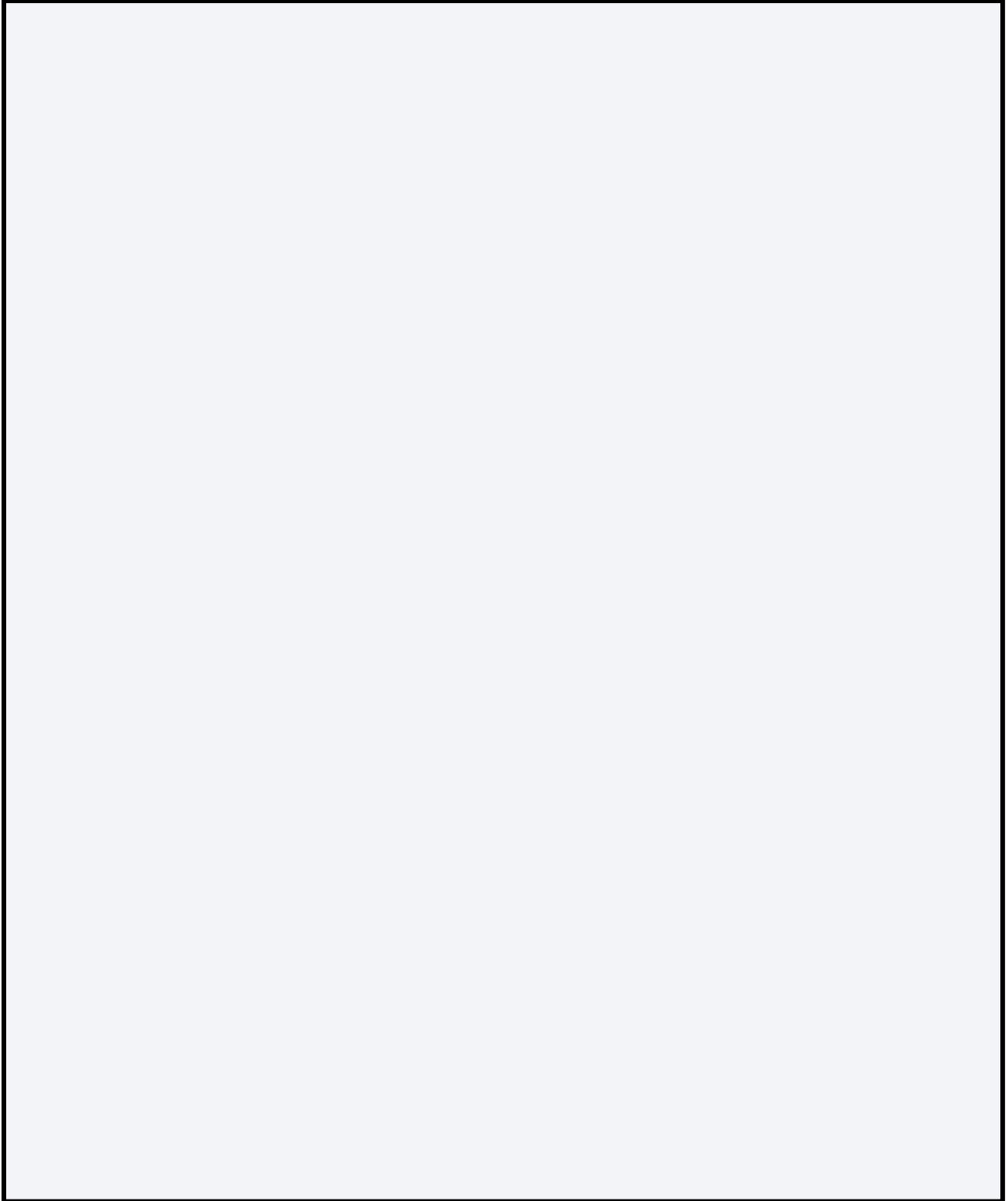
CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Por medio de la citometría de flujo hemos sido capaces de realizar una caracterización detallada de la conjuntiva tarsal superior, encontrando sólidas diferencias entre los grupos control y de alergia. Se han observado diferencias y similitudes entre el fenotipo linfoide regional y el circulante, confirmando la existencia de correlación entre ambos tejidos para algunas de las poblaciones linfoides.
2. Mediante la tecnología Luminex hemos sido capaces de calcular las concentraciones de los principales factores solubles de la lágrima, encontrando diferencias significativas para la gran mayoría de citocinas al comparar entre el grupo control y grupos de alergia. Por otro lado, hemos encontrado que las concentraciones de los principales factores solubles involucradas en el proceso inflamatorio en plasma poco tienen que ver con las observadas en lágrima. Por lo tanto, podemos afirmar que no existe correlación entre ambos tejidos.
3. Por medio de la secuenciación masiva hemos sido capaces de caracterizar la microbiota ocular, observando una clara disbiosis bacteriana y fúngica en el grupo de conjuntivitis alérgica perennes.
4. Se ha encontrado un posible biomarcador diferencial de la conjuntivitis alérgica perenne que incluiría la combinación de las siguientes condiciones:
 1. Un mayor número de células Th2 frente a Th1, combinado con un aumento de las células NKT y una disminución de las células TCR $\gamma\delta$ + y MAIT, en la conjuntiva.
 2. Altas concentraciones de IgE y citocinas de perfil Th2 o Th17, junto con bajas concentraciones de TGF- β 2 en lagrime.
 3. Una sobrepoblación de especies de *Kocuria*, *P. acnes* o *Malassezia* en la microbiota ocular.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. Vol. 206, *J. Anat.* 2005.
2. Nichols BA. Conjunctiva. *Microsc Res Tech.* 1996 Mar 1;33(4):296–319.
3. Knop E, Knop N. Conjunctiva Immune Surveillance. In: *Encyclopedia of the Eye.* Elsevier; 2010. p. 356–68.
4. Wotherspoon AC, Hardman-Lea S, Isaacson PG. MUCOSA-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE (MALT) IN THE HUMAN CONJUNCTIVA. Vol. 174, *JOURNAL OF PATHOLOGY.* 1994.
5. Dua HS, Gomes JAP, Donos0 LA, Laibson PR. THE OCULAR SURFACE AS PART OF THE MUCOSAL IMMUNE SYSTEM: CONJUNCTIVAL MUCOSA-SPECIFIC LYMPHOCYTES IN OCULAR SURFACE PATHOLOGY Mucosal tissues of the body have certain unique immunological features that distinguish them from the systemic immune system. *Epithelial and lym.* 1995.
6. Chodosh J, Kennedy RC. Immunology/Ocular Inflammation The Conjunctival Lymphoid Follicle in Mucosal Immunology. Vol. 21, *DNA AND CELL BIOLOGY.* 2002.
7. Knop N, Knop E. Ultrastructural anatomy of CALT follicles in the rabbit reveals characteristics of M-cells, germinal centres and high endothelial venules [Internet]. Vol. 207, *J. Anat.* 2005. Available from: www.arvo.org
8. Eberl G. Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway? *Nat Rev Immunol.* 2005 May 20;5(5):413–20.
9. Gipson IK. Goblet cells of the conjunctiva: A review of recent findings. *Prog Retin Eye Res.* 2016 Sep;54:49–63.
10. Alam J, de Paiva CS, Pflugfelder SC. Immune - Goblet cell interaction in the conjunctiva: Goblet Cell immunomodulatory properties. Vol. 18, *Ocular Surface.* Elsevier Inc.; 2020. p. 326–34.
11. Baudouin C, Rolando M, Benitez Del Castillo JM, Messmer EM, Figueiredo FC, Irkeç M, et al. Reconsidering the central role of mucins in dry eye and ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2019 Jul;71:68–87.
12. Gilger BC. Immunology of the Ocular Surface. Vol. 38, *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice.* 2008. p. 223–31.
13. Barbosa F, Xiao Y, Bian F, Coursey T, Ko B, Clevers H, et al. Goblet Cells Contribute to Ocular Surface Immune Tolerance—Implications for Dry Eye Disease. *Int J Mol Sci.* 2017 May 5;18(5):978.
14. Irkeç M, Bozkurt B. Epithelial cells in ocular allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2003 Aug;3(4):352–7.
15. HINGORANI M, CALDER VL, BUCKLEY RJ, LIGHTMAN SL. The Role of Conjunctival Epithelial Cells in Chronic Ocular Allergic Disease. *Exp Eye Res.* 1998 Nov;67(5):491–500.

16. Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, et al. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *Journal of Clinical Investigation*. 1997 Apr 1;99(7):1767–73.
17. Raeburn D, Webber SE. Proinflammatory potential of the airway epithelium in bronchial asthma. *European Respiratory Journal*. 1994 Dec 1;7(12):2226–33.
18. Eckmann L, Jung HC, Schürer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: Regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology*. 1993 Dec;105(6):1689–97.
19. Levine SJ. Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. *J Investig Med*. 1995 Jun;43(3):241–9.
20. Gerritsma JSJ, Hiemstra PS, Gerritsen AF, Prodjosudjadi W, Verweij CL, van Es LA, et al. Regulation and production of IL-8 by human proximal tubular epithelial cells *in vitro*. *Clin Exp Immunol*. 2003 Oct 29;103(2):289–94.
21. Nadif R, Zerimech F, Bouzigon E, Matran R. The role of eosinophils and basophils in allergic diseases considering genetic findings. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013 Oct;13(5):507–13.
22. Dillon A, Lo DD. M cells: Intelligent engineering of mucosal immune surveillance. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
23. Xi X, McMillan DH, Lehmann GM, Sime PJ, Libby RT, Huxlin KR, et al. Ocular Fibroblast Diversity: Implications for Inflammation and Ocular Wound Healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011 Jun 30;52(7):4859.
24. Mun Y, Hwang JS, Shin YJ. Role of Neutrophils on the Ocular Surface. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 27;22(19):10386.
25. Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, Odai T, Adachi M, Kunkel S. Neutrophil-Derived Cytokines: Potential Therapeutic Targets in Inflammation. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*. 2005 Jun 1;4(3):273–9.
26. Srivastava A, Sur S, Trocmé SD. The Role of Eosinophils in Ocular Allergy. *Int Ophthalmol Clin*. 2003;43(1):9–25.
27. Smithgall MD, Comeau MR, Park Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK Cells. *Int Immunol*. 2008 Jun 12;20(8):1019–30.
28. Ueta M, Kinoshita S. Ocular Surface Inflammation Mediated by Innate Immunity. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*. 2010 Sep;36(5):269–81.
29. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018 Sep;233(9):6425–40.
30. Iwasaki A. Mucosal Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2007 Apr 1;25(1):381–418.
31. Irani AMA. Ocular Mast Cells and Mediators. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2008 Feb;28(1):25–42.

32. Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol*. 2019 Jul 12;16(7):634–43.
33. Dias J, Boulouis C, Gorin JB, van den Biggelaar RHGA, Lal KG, Gibbs A, et al. The CD4⁻ CD8⁻ MAIT cell subpopulation is a functionally distinct subset developmentally related to the main CD8⁺ MAIT cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018 Dec 4;115(49).
34. Zhu J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 Oct;10(10):a030338.
35. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry Part A*. 2019 Jun 4;95(6):647–54.
36. Foulsham W, Marmalidou A, Amouzegar A, Coco G, Chen Y, Dana R. Review: The function of regulatory T cells at the ocular surface. *Ocul Surf*. 2017 Oct;15(4):652–9.
37. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*. 2013 Nov;25(4):305–12.
38. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol*. 2015 Dec 17;6.
39. Romagnani S. Th1/Th2 Cells. *Inflamm Bowel Dis*. 1999 Nov;5(4):285–94.
40. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmbj H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor- β “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9–producing subset. *Nat Immunol*. 2008 Dec 19;9(12):1341–6.
41. Abdelaziz M, Wang H, Cheng J, Xu H. Th2 cells as an intermediate for the differentiation of naïve T cells into Th9 cells, associated with the Smad3/Smad4 and IRF4 pathway. *Exp Ther Med*. 2020 Jan 3;
42. Akdis M, Palomares O, van de Veen W, van Splunter M, Akdis CA. TH17 and TH22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012 Jun;129(6):1438–49.
43. Reyes NJ, Saban DR. T helper subsets in allergic eye disease. Vol. 14, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014. p. 477–84.
44. Xu W, Li R, Sun Y. Increased IFN- γ -producing Th17/Th1 cells and their association with lung function and current smoking status in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med*. 2019 Jul 26;19(1).
45. Eyerich K, Eyerich S. Th22 cells in allergic disease. Vol. 24, *Allergo Journal International*. Springer Medizin; 2015.
46. Samji T, Khanna KM. Understanding memory CD8⁺T cells. Vol. 185, *Immunology Letters*. Elsevier B.V.; 2017. p. 32–9.
47. Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014 Dec 1;62(6):449–58.

48. Middendorp S, Nieuwenhuis EES. NKT cells in mucosal immunity. Vol. 2, *Mucosal Immunology*. 2009. p. 393–402.
49. Zeissig S, Blumberg RS. Commensal microbiota and NKT cells in the control of inflammatory diseases at mucosal surfaces. Vol. 25, *Current Opinion in Immunology*. 2013. p. 690–6.
50. Montalban-Arques A, Chaparro M, Gisbert JP, Bernardo D. The Innate Immune System in the Gastrointestinal Tract: Role of Intraepithelial Lymphocytes and Lamina Propria Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Inflamm Bowel Dis* • [Internet]. 2018;00. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/advance-article-abstract/doi/10.1093/ibd/izy177/4999626>
51. Kurioka A, Klenerman P, Willberg CB. Innate-like CD8+ T-cells and NK cells: converging functions and phenotypes. Vol. 154, *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 547–56.
52. Amand M, Iserentant G, Poli A, Sleiman M, Fievez V, Sanchez IP, et al. Human CD56dimCD16dimCells As an Individualized Natural Killer Cell Subset. *Front Immunol*. 2017 Jun 19;8(JUN).
53. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013 Apr;131(4):959–71.
54. Aziz M, Holodick NE, Rothstein TL, Wang P. The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol Res*. 2015 Dec 1;63(1–3):153–66.
55. O’Sullivan NL, Montgomery PC. Ocular Mucosal Immunity. In: *Mucosal Immunology: Fourth Edition*. Elsevier Inc.; 2015. p. 1873–97.
56. Sack RA, Conradi L, Krumholz D, Beaton A, Sathe S, Morris C. Membrane Array Characterization of 80 Chemokines, Cytokines, and Growth Factors in Open- and Closed-Eye Tears: Angiogenin and Other Defense System Constituents. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005 Apr 1;46(4):1228.
57. Korb DR, British Contact Lens Association. *The tear film : structure, function, and clinical examination*. Butterworth-Heinemann; 2002. 200 p.
58. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011 Aug;22(4):189–95.
59. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation, and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27–37.
60. Olejniczak K, Kasprzak A. Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases--a review. *Med Sci Monit*. 2008 Oct;14(10):RA179-89.
61. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GAW, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives.” *J Leukoc Biol*. 2012 Oct;92(4):753–64.
62. Brown MA, Hural J. Functions of IL-4 and Control of Its Expression. *Crit Rev Immunol*. 1997;17(1):1–32.

63. Weltman JK, Karim AS. IL-5: biology and potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000 Mar 24;9(3):491–6.
64. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Oct 1;6(10):a016295–a016295.
65. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 28;20(23):6008.
66. Rojas-Zuleta WG, Sanchez E. IL-9: Function, sources, and detection. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2017. p. 21–35.
67. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*. 2008 May 1;180(9):5771–7.
68. Zundler S, Neurath MF. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015 Oct;26(5):559–68.
69. Brombacher F. The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy. *BioEssays*. 2000 Jun 23;22(7):646–56.
70. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. Vol. 50, *Immunity*. Cell Press; 2019. p. 892–906.
71. Liu SM, King C. IL-21–Producing Th Cells in Immunity and Autoimmunity. *The Journal of Immunology*. 2013 Oct 1;191(7):3501–6.
72. Konforte D, Simard N, Paige CJ. IL-21: An Executor of B Cell Fate. *The Journal of Immunology*. 2009 Feb 15;182(4):1781–7.
73. Nikoopour E, Bellemore SM, Singh B. IL-22, cell regeneration and autoimmunity. Vol. 74, *Cytokine*. Academic Press; 2015. p. 35–42.
74. BERRY M, BRIGHTLING C, PAVORD I, WARDLAW A. TNF- α in asthma. *Curr Opin Pharmacol*. 2007 Jun;7(3):279–82.
75. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004 Feb;75(2):163–89.
76. Teixeira AL, Gama CS, Rocha NP, Teixeira MM. Revisiting the Role of Eotaxin-1/CCL11 in Psychiatric Disorders. *Front Psychiatry*. 2018 Jun 14;9.
77. Pease J. Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol*. 2001 Jun 1;1(3):248–53.
78. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2009 Jun;29(6):313–26.
79. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol*. 2001 Feb;22(2):83–7.
80. Ziegler SF, Roan F, Bell BD, Stoklasek TA, Kitajima M, Han H. The Biology of Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP). In 2013. p. 129–55.
81. Liu Y. Chapter 1 TSLP in Epithelial Cell and Dendritic Cell Cross Talk. In 2009. p. 1–25.

82. Woof JM, Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206(1):64–82.
83. Clark DA, Coker R. Molecules in focus Transforming growth factor-beta (TGF- β). *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Mar;30(3):293–8.
84. Benito MJ, Calder V, Corrales RM, García-Vázquez C, Narayanan S, Herreras JM, et al. Effect of TGF- β on ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2013 Feb;107:88–100.
85. Leonardi A, Brun P, Abatangelo G, Plebani M, Secchi AG. Tear levels and activity of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 in vernal keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Jul 1;44(7):3052–8.
86. Shivaji S, Jayasudha R, Prashanthi GS, Chakravarthy SK, Sharma S. The human ocular surface fungal microbiome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019 Jan 1;60(1):451–9.
87. Leger AJ, Desai J v., Drummond RA, Kugadas A, Almaghrabi F, Silver P, et al. An Ocular Commensal Protects against Corneal Infection by Driving an Interleukin-17 Response from Mucosal $\gamma\delta$ T Cells. *Immunity.* 2017 Jul;47(1):148-158.e5.
88. Ivanov II, de Llanos Frutos R, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, et al. Specific microbiota direct the differentiation of Th17 cells in the mucosa of the small intestine. 2008.
89. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, Deroos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013;504(7480):451–5.
90. Galdiero M, Petrillo F, Pignataro D, Lavano MA, Santella B, Folliero V, et al. Current evidence on the ocular surface microbiota and related diseases. Vol. 8, *Microorganisms.* MDPI AG; 2020. p. 1–13.
91. Cavuoto KM, Stradiotto AC, Galor A. Role of the ocular surface microbiome in allergic disease. Vol. 19, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.* Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. 482–7.
92. Lievin V. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut.* 2000 Nov 1;47(5):646–52.
93. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science (1979).* 2006 Jun 2;312(5778):1355–9.
94. Silva F. Kocuria spp. *Revista chilena de infectología.* 2012 Apr;29(2):215–6.
95. Pedro-Aguilar L, Ramirez-Miranda A, Bautista-de Lucio VM, Navas A, Ortiz-Casas M, Graue-Hernandez EO. Epidemiology and Outcomes of Kocuria Keratitis. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice.* 2016 Sep;42(5):e20–4.
96. Inada N, Shoji J, Yamagami S. Atopic keratoconjunctivitis complicated by Kocuria korensis keratitis: the first case. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology.* 2017 Dec 25;13(1):6.

97. Achermann Y, Goldstein EJC, Coenye T, Shirtliff ME. Propionibacterium acnes: from Commensal to Opportunistic Biofilm-Associated Implant Pathogen. Clin Microbiol Rev. 2014 Jul;27(3):419–40.
98. O’Callaghan R. The Pathogenesis of Staphylococcus aureus Eye Infections. Pathogens. 2018 Jan 10;7(1):9.
99. Kustrzeba-Wójcicka I, Siwak E, Terlecki G, Wolańczyk-Mędrala A, Mędrala W. Alternaria alternata and Its Allergens: a Comprehensive Review. Clin Rev Allergy Immunol. 2014 Dec 10;47(3):354–65.
100. Weber RW. On the Cover. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 2006 May;96(5):A6.
101. Leino M, Reijula K, Mäkinen-Kiljunen S, Haahtela T, Mäkelä MJ, Alenius H. Cladosporium herbarum and Pityrosporum ovale allergen extracts share cross-reacting glycoproteins. Int Arch Allergy Immunol. 2006;140(1):30–5.
102. Gupta AK, Bluhm R, Cooper EA, Summerbell RC, Batra R. Seborrheic dermatitis. Dermatol Clin. 2003 Jul;21(3):401–12.
103. Limon JJ, Skalski JH, Underhill DM. Commensal Fungi in Health and Disease. Vol. 22, Cell Host and Microbe. Cell Press; 2017. p. 156–65.
104. Khan R, Petersen FC, Shekhar S. Commensal Bacteria: An Emerging Player in Defense Against Respiratory Pathogens. Front Immunol. 2019;10:1203.
105. Shekhawat NS, Shtein RM, Blachley TS, Stein JD. Antibiotic Prescription Fills for Acute Conjunctivitis among Enrollees in a Large United States Managed Care Network. Ophthalmology. 2017 Aug;124(8):1099–107.
106. Bielory L. Allergic conjunctivitis and the impact of allergic rhinitis. Vol. 10, Current Allergy and Asthma Reports. 2010. p. 122–34.
107. Azari AA, Arabi A. Conjunctivitis: A Systematic Review. J Ophthalmic Vis Res. 2020 Sep 1;15(3):372–95.
108. Villegas BV, Benitez-del-Castillo JM. Current Knowledge in Allergic Conjunctivitis. Turk J Ophthalmol. 2021 Feb 25;51(1):45–54.
109. Wong A, Barg S, Leung A. Seasonal and Perennial Allergic Conjunctivitis. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2014 Jul 21;8(2):139–53.
110. Bielory L. Allergic and immunologic disorders of the eye. Part I: Immunology of the eye. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2000 Nov;106(5):805–16.
111. Miyazaki D, Takamura E, Uchio E, Ebihara N, Ohno S, Ohashi Y, et al. Japanese guidelines for allergic conjunctival diseases 2020. Vol. 69, Allergology International. Japanese Society of Allergology; 2020. p. 346–55.
112. Rosa M la, Lionetti E, Reibaldi M, Russo A, Longo A, Leonardi S, et al. Allergic conjunctivitis: a comprehensive review of the literature [Internet]. 2013. Available from: <http://www.ijponline.net/content/39/1/18>

113. Martínez-Osorio H, Calonge M, Corell A, Reinoso R, López A, Fernández I, et al. Characterization and short-term culture of cells recovered from human conjunctival epithelium by minimally invasive means. *Mol Vis*. 2009 Oct 27;15:2185–95.
114. Reinoso R, Martín-Sanz R, Martino M, Mateo ME, Blanco-Salado R, Calonge M, et al. Topographical distribution and characterization of epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in the human ocular mucosa. *Mucosal Immunol*. 2012 Jul;5(4):456–67.
115. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*. 2011 Nov 23;52(4):413–35.
116. Wotherspoon AC, Isaacson PG, Hardman-Lea S. Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the human conjunctiva. *J Pathol*. 1994 Sep;174(1):33–7.
117. HINGORANI M, METZ D, LIGHTMAN SL. Characterisation of the Normal Conjunctival Leukocyte Population. *Exp Eye Res*. 1997 Jun;64(6):905–12.
118. Tsubota K, Kajiwara K, Ugajin S, Hasegawa T. Conjunctival brush cytology. *Acta Cytol*. 1990;34(2):233–5.
119. Fujihara T, Takeuchi T, Saito K, Tsubota K. Flow Cytometric Analysis of Surface Antigens on Human Conjunctival Epithelial Cells. *Ophthalmic Res*. 1997;29(2):103–9.
120. Fujihara T, Takeuchi T, Saito K, Kitajima Y, Kobayashi TK, Tsubota K. Evaluation of human conjunctival epithelium by a combination of brush cytology and flow cytometry: An approach to the quantitative technique. *Diagn Cytopathol*. 1997 Dec;17(6):456–60.
121. Wen X, Nian S, Wei G, Kang P, Yang Y, Li L, et al. Changes in the phenotype and function of mucosal-associated invariant T cells in neutrophilic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2022 May;106:108606.
122. Krejsek J, Král B, Vokurková D, Derner V, Toušková M, Paráková Z, et al. Decreased peripheral blood ?? T cells in patients with bronchial asthma. *Allergy*. 1998 Jan;53(1):73–7.
123. BEYER K, NIGGEMANN B, NASERT S, RENZ H, WAHN U. Severe allergic reactions to foods are predicted by increases of CD4+CD45RO+ T cells and loss of L-selectin expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1997 Apr;99(4):522–9.
124. Zhao Y, Yang J, Gao YD. Altered Expressions of Helper T Cell (Th)1, Th2, and Th17 Cytokines in CD8⁺ and $\gamma\delta$ T Cells in Patients with Allergic Asthma. *Journal of Asthma*. 2011 Jun 15;48(5):429–36.
125. Uchio E, Ono SY, Ikezawa Z, Ohno S. Tear levels of interferon-g, interleukin (IL)-2, IL-4 and IL-5 in patients with vernal keratoconjunctivitis, atopic keratoconjunctivitis and allergic conjunctivitis.
126. Zhang L, Li Y gang, Li Y hua, Qi L, Liu X guang, Yuan C zhong, et al. Increased Frequencies of Th22 Cells as well as Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2012 Apr 2;7(4):e31000.
127. Habener A, Grychtol R, Gaedcke S, DeLuca D, Dittrich AM, Happel C, et al. IgA⁺ memory B-cells are significantly increased in patients with asthma and small airway dysfunction. *European Respiratory Journal*. 2022 Nov;60(5):2102130.

128. Toshitani A, Imayama S, Shimozone Y, Yoshinaga T, Furue M, Hori Y. Reduced amount of secretory component of IgA secretion in tears of patients with atopic dermatitis. Vol. 19, *Journal of Dermatological Science*. 1999.
129. Dimitrova D, Youroukova V, Ivanova-Todorova E, Tumangelova-Yuzeir K, Velikova T. Serum levels of IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 and IL-17A in pre-defined groups of adult patients with moderate and severe bronchial asthma. *Respir Med*. 2019 Jul;154:144–54.
130. Nomura K, Takamura E. Tear IgE concentrations in allergic conjunctivitis. *Eye*. 1998 Mar;12(2):296–8.
131. Leonardi A. Vernal keratoconjunctivitis: pathogenesis and treatment. Vol. 21, *Progress in Retinal and Eye Research*. 2002.
132. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell PA. Analysis of Inflammatory Cytokines in the Tears of Dry Eye Patients [Internet]. Available from: www.corneajrnl.com
133. Zheng X, Yao J, Li B. Expression of TSLP and Downstream Molecules IL-4, IL-5, and IL-13 on the Eye Surface of Patients with Various Types of Allergic Conjunctivitis. *J Ophthalmol*. 2016;2016.
134. Ciprandi G, de Amici M, Giunta V, Marseglia A, Marseglia G. Serum Interleukin-9 Levels Are Associated With Clinical Severity in Children With Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol*. 2013 Mar;30(2):222–5.
135. Engelbrecht C, Sardinha LR, Rizzo LV. Cytokine and Chemokine Concentration in the Tear of Patients with Age-Related Cataract. *Curr Eye Res*. 2020 Sep 1;45(9):1101–6.
136. Shetty R, Deshmukh R, Ghosh A, Sethu S, Jayadev C. Altered tear inflammatory profile in Indian keratoconus patients - The 2015 Col Rangachari Award paper. *Indian J Ophthalmol*. 2017;65(11):1105.
137. Lim SA, Hyun Nam D, Hye Lee J, Kwok SK, Park SH, Chung SH. Association of IL-21 Cytokine With Severity of Primary Sjögren Syndrome Dry Eye [Internet]. Vol. 34, | www.corneajrnl.com *Cornea*. 2015. Available from: www.corneajrnl.com
138. Liu R, Gao C, Chen H, Li Y, Jin Y, Qi H. Analysis of Th17-associated cytokines and clinical correlations in patients with dry eye disease. *PLoS One*. 2017 Apr 1;12(4).
139. Acera A, Rocha G, Vecino E, Lema I, Durán JA. Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease. *Ophthalmic Res*. 2008 Oct;40(6):315–21.
140. Marcella R, Croce A, Moretti A, Barbacane RC, di Gicchino M, Conti P. Transcription and translation of the chemokines RANTES and MCP-1 in nasal polyps and mucosa in allergic and non-allergic rhinopathies. *Immunol Lett*. 2003 Dec;90(2–3):71–5.
141. Carreño E, Portero A, Herreras JM, García-Vázquez C, Whitcup SM, Stern ME, et al. Cytokine and chemokine tear levels in patients with uveitis. *Acta Ophthalmol*. 2017 Aug 1;95(5):e405–14.
142. Nagata K, Eishi Y, Uchida K, Yoneda K, Hatanaka H, Yasuhara T, et al. Immunohistochemical Detection of *Propionibacterium acnes* in the Retinal Granulomas in Patients with Ocular Sarcoidosis. *Sci Rep*. 2017 Nov 9;7(1):15226.

143. Tao R, Li R, Wang R. Dysbiosis of skin mycobiome in atopic dermatitis. *Mycoses*. 2022 Mar 3;65(3):285–93.
144. Hinks TSC. Mucosal-associated invariant T cells in autoimmunity, immune-mediated diseases and airways disease. *Immunology*. 2016 May 1;148(1):1–12.
145. Lee OJ, Cho YN, Kee SJ, Kim MJ, Jin HM, Lee SJ, et al. Circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their cytokine levels in healthy adults. *Exp Gerontol*. 2014 Jan;49(1):47–54.
146. Sobkowiak MJ, Davanian H, Heymann R, Gibbs A, Emgård J, Dias J, et al. Tissue-resident MAIT cell populations in human oral mucosa exhibit an activated profile and produce IL-17. *Eur J Immunol*. 2019 Jan 14;49(1):133–43.
147. Booth JS, Salerno-Goncalves R, Blanchard TG, Patil SA, Kader HA, Safta AM, et al. Mucosal-Associated Invariant T Cells in the Human Gastric Mucosa and Blood: Role in *Helicobacter pylori* Infection. *Front Immunol*. 2015 Sep 17;6.
148. Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, Cansler ME, Vogt TM, Delepine J, et al. Human Mucosal Associated Invariant T Cells Detect Bacterially Infected Cells. *PLoS Biol*. 2010 Jun 29;8(6):e1000407.
149. Rahimpour A, Koay HF, Enders A, Clanchy R, Eckle SBG, Meehan B, et al. Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. *Journal of Experimental Medicine*. 2015 Jun 29;212(7):1095–108.
150. Chen Z, Wang H, D'Souza C, Sun S, Kostenko L, Eckle SBG, et al. Mucosal-associated invariant T-cell activation and accumulation after in vivo infection depends on microbial riboflavin synthesis and co-stimulatory signals. *Mucosal Immunol*. 2017 Jan 4;10(1):58–68.
151. Nel I, Bertrand L, Toubal A, Lehuen A. MAIT cells, guardians of skin and mucosa? Vol. 14, *Mucosal Immunology*. Springer Nature; 2021. p. 803–14.
152. Godfrey DI, Berzins SP. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jul;7(7):505–18.
153. Bannai M, Kawamura T, Naito T, Kameyama H, Abe T, Kawamura H, et al. Abundance of unconventional CD8+ natural killer T cells in the large intestine. *Eur J Immunol*. 2001 Nov;31(11):3361–9.
154. Ishimoto Y, Tomiyama-Miyaji C, Watanabe H, Yokoyama H, Ebe K, Tsubata S, et al. Age-dependent variation in the proportion and number of intestinal lymphocyte subsets, especially natural killer T cells, double-positive CD4+ CD8+ cells and B220+ T cells, in mice. *Immunology*. 2004 Nov;113(3):371–7.
155. Carding SR, Egan PJ. $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):336–45.
156. Leonardi A, Fregona IA, Plebani M, Secchi AG, Calder VL. Th1- and Th2-type cytokines in chronic ocular allergy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2006 Oct;244(10):1240–5.

157. Reyes NJ, Mayhew E, Chen PW, Niederkorn JY. NKT cells are necessary for maximal expression of allergic conjunctivitis. *Int Immunol*. 2010 May 26;22(8):627–36.
158. Papotto PH, Yilmaz B, Silva-Santos B. Crosstalk between $\gamma\delta$ T cells and the microbiota. *Nat Microbiol*. 2021 Sep 2;6(9):1110–7.
159. Legoux F, Salou M, Lantz O. MAIT Cell Development and Functions: the Microbial Connection. *Immunity*. 2020 Oct;53(4):710–23.
160. Chen X, Deng R, Chi W, Hua X, Lu F, Bian F, et al. IL-27 signaling deficiency develops Th17-enhanced Th2-dominant inflammation in murine allergic conjunctivitis model. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019 May 1;74(5):910–21.
161. Yoshimura T, Sonoda KH, Ohguro N, Ohsugi Y, Ishibashi T, Cua DJ, et al. Involvement of Th17 cells and the effect of anti-IL-6 therapy in autoimmune uveitis. *Rheumatology*. 2009 Jan 30;48(4):347–54.
162. de Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan SB, Pitcher JD, Fang B, Zheng X, et al. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol*. 2009 May 25;2(3):243–53.
163. Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, et al. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med*. 2007 Jun 13;13(6):711–8.
164. Kang MH, Kim MK, Lee HJ, Lee H il, Wee WR, Lee JH. Interleukin-17 in Various Ocular Surface Inflammatory Diseases. *J Korean Med Sci*. 2011;26(7):938.
165. Qiu AW, Liu QH, Wang JL. Blocking IL-17A Alleviates Diabetic Retinopathy in Rodents. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;41(3):960–72.
166. Yoon CH, Lee D, Jeong HJ, Ryu JS, Kim MK. Distribution of Interleukin-22–secreting Immune Cells in Conjunctival Associated Lymphoid Tissue. *Korean Journal of Ophthalmology*. 2018;32(2):147.
167. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing “T22” T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;123(6).
168. Tang J, Xiao P, Luo X, Bai J, Xia W, Chen W, et al. Increased IL-22 Level in Allergic Rhinitis Significantly Correlates with Clinical Severity. *Am J Rhinol Allergy*. 2014 Nov 1;28(6):e197–201.
169. Czarnowicki T, Gonzalez J, Shemer A, Malajian D, Xu H, Zheng X, et al. Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but not TH17/TC17, cells within the skin-homing T-cell population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015 Jul;136(1):104-115.e7.
170. Moy AP, Murali M, Kroshinsky D, Duncan LM, Nazarian RM. Immunologic Overlap of Helper T-Cell Subtypes 17 and 22 in Erythrodermic Psoriasis and Atopic Dermatitis. *JAMA Dermatol*. 2015 Jul 1;151(7):753.

171. Fujita H, Nograles KE, Kikuchi T, Gonzalez J, Carucci JA, Krueger JG. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4⁺ T cells lacking IL-17 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Dec 22;106(51):21795–800.
172. Wang Q, Xie X, Li H, Hao S. Discovery of microRNA expression profiles involved in regulating TGF- β 2 expression in the tears of dry eye patients.
173. 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. *Clinical and Experimental Allergy*. 2006;36(6):777–84.
174. Tan X, Sun S, Liu Y, Zhu T, Wang K, Ren T, et al. Analysis of Th17-Associated cytokines in tears of patients with dry eye syndrome. *Eye (Basingstoke)*. 2014;28(5):608–13.
175. Sen DK, Sarin GS. Immunoglobulin concentrations in human tears in ocular diseases. Vol. 63, *British Journal of Ophthalmology*. 1979.
176. Somas S, Schneider I, Farkas B. Immunoglobulins in Tears and Sera in Patients with Atopic Dermatitis. Vol. 48. 2016.
177. 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 Sep;51(5):338–42.
178. Aragona P, Aguenouz M, Rania L, Postorino E, Sommario MS, Roszkowska AM, et al. Matrix metalloproteinase 9 and transglutaminase 2 expression at the ocular surface in patients with different forms of dry eye disease. *Ophthalmology*. 2015 Jan 1;122(1):62–71.
179. Eperon S, Berguiga M, Ballabeni P, Guex-Crosier C, Guex-Crosier Y. Total IgE and eotaxin (CCL11) contents in tears of patients suffering from seasonal allergic conjunctivitis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2014 Sep 12;252(9):1359–67.
180. Blanco-Vázquez M, Vázquez A, Fernández I, Novo-Diez A, Martínez-Plaza E, García-Vázquez C, et al. Inflammation-related molecules in tears of patients with chronic ocular pain and dry eye disease. *Exp Eye Res*. 2022 Jun;219:109057.
181. Oray M, Toker E. Tear Cytokine Levels in Vernal Keratoconjunctivitis. *Cornea*. 2013 Aug;32(8):1149–54.
182. Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear Cytokine Profiles in Dysfunctional Tear Syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2009;147(2).
183. Pinto-Fraga J, Enríquez-de-Salamanca A, Calonge M, González-García MJ, López-Miguel A, López-de la Rosa A, et al. Severity, therapeutic, and activity tear biomarkers in dry eye disease: An analysis from a phase III clinical trial. *Ocular Surface*. 2018 Jul 1;16(3):368–76.
184. Na KS, Mok JW, Kim JY, Rho CR, Joo CK. Correlations between tear cytokines, chemokines, and soluble receptors and clinical severity of dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Aug;53(9):5443–50.

185. López-Villalobos EF, Muñoz-Valle JF, Palafox-Sánchez CA, García-Arellano S, Martínez-Fernández DE, Orozco-Barocio G, et al. Cytokine profiles and clinical characteristics in primary Sjögren's syndrome patient groups. *J Clin Lab Anal.* 2021 Feb 17;35(2).
186. Chotikavanich S, de Paiva CS, de Quan Li, Chen JJ, Bian F, Farley WJ, et al. Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(7):3203–9.
187. Stehlikova Z, Kostovcik M, Kostovcikova K, Kverka M, Juzlova K, Rob F, et al. Dysbiosis of Skin Microbiota in Psoriatic Patients: Co-occurrence of Fungal and Bacterial Communities. *Front Microbiol.* 2019 Mar 21;10.
188. Sei Y. Malassezia Related Diseases. *Med Mycol J.* 2012;53(2):97–102.
189. Bjerre RD, Bandier J, Skov L, Engstrand L, Johansen JD. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis: a systematic review. *British Journal of Dermatology.* 2017 Nov 12;177(5):1272–8.
190. Savini V, Catavittello C, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Bianco A, et al. Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. *J Med Microbiol.* 2010 Dec 1;59(12):1395–402.
191. Achermann Y, Goldstein EJC, Coenye T, Shirtliff ME. *Propionibacterium acnes*: from Commensal to Opportunistic Biofilm-Associated Implant Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul;27(3):419–40.
192. Dupuis P, Prokopich CL, Hynes A, Kim H. A contemporary look at allergic conjunctivitis. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology.* 2020 Dec 21;16(1):5.



ANEXO III – DOC. COMPLEMENTARIA

1. Cuaderno de recogida de datos
2. Consentimiento informado
3. Informes favorables del CEIC

**CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS:
BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE
LA CONJUNTIVITIS ALÉRGICA**

Patología:

- Queratoconjuntivitis vernal
 Queratoconjuntivitis atópica
 Conjuntivitis alérgica

Sujeto Control:

Diagnosticado (Prick test)

- | | | | |
|--|--|---|---|
| <input type="checkbox"/> <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> | <input type="checkbox"/> Soja | <input type="checkbox"/> <i>Lolium perenne</i> | <input type="checkbox"/> <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| <input type="checkbox"/> <i>Dermatophagoides farinae</i> | <input type="checkbox"/> Avellana | <input type="checkbox"/> <i>Phleum pratense</i> | <input type="checkbox"/> <i>Alternaria alternata</i> |
| <input type="checkbox"/> Gato | <input type="checkbox"/> Gambas | <input type="checkbox"/> <i>Poa pratensis</i> | <input type="checkbox"/> Anisakis |
| <input type="checkbox"/> Perro | <input type="checkbox"/> Kiwi | <input type="checkbox"/> Abeja (veneno) | <input type="checkbox"/> <i>Betula verrucosa</i> |
| <input type="checkbox"/> Clara de huevo | <input type="checkbox"/> Melocotón | <input type="checkbox"/> Avispa (veneno) | <input type="checkbox"/> <i>Olea europea</i> |
| <input type="checkbox"/> Leche de vaca | <input type="checkbox"/> Lentejas | <input type="checkbox"/> Cucaracha | <input type="checkbox"/> <i>Ambrosia artemisiifolia</i> |
| <input type="checkbox"/> Bacalao | <input type="checkbox"/> Garbanzos | <input type="checkbox"/> Látex | <input type="checkbox"/> <i>Artemisa vulgaris</i> |
| <input type="checkbox"/> Trigo | <input type="checkbox"/> <i>Dactylis glomerata</i> | <input type="checkbox"/> <i>Cladosporium herbarum</i> | <input type="checkbox"/> <i>Parietaria judaica</i> |
| <input type="checkbox"/> Cacahuete | <input type="checkbox"/> Otros: | | |

Nº muestra:

Paciente:

Edad:

Sexo: V M

Fecha de recogida:

Ojo: OI OD

Nº historia:

Raza:

Lugar de recogida:

EVALUACIÓN DEL PACIENTE. ANAMNESIS

Hábitos de vida (tache lo que proceda): _____

1. ¿A qué tipo de población pertenece? Rural Urbana Semiurbano
2. ¿Consume usted alcohol?
 Nunca Una vez por semana 2-4 veces por semana 5 o más veces por semana
3. ¿Fuma usted? Sí No
4. ¿Consume usted estupefacientes?
 Nunca Una vez por semana 2-4 veces por semana 5 o más veces por semana
5. ¿Realiza usted actividad física?
 Nunca Una vez por semana 2-4 veces por semana 5 o más veces por semana

En caso afirmativo, dónde práctica la actividad física: Aire libre Recinto cerrado

Cuál es la intensidad: Moderada (<180ppm) Intensa (>180ppm)

6. Cuáles de las siguientes comidas realiza:
 Desayuno Tentempie Almuerzo Merienda Cena Otras
7. ¿Cuántas horas duerme al día?
 Menos de 8 horas Entre 8 y 10 horas Más de 10 horas
8. ¿Toma usted suplementos nutricionales?:
 Sí. Indique cuál/es: _____ No

Salud general (tache lo que proceda): _____

1. ¿Padece alguna alergia medicamentosa? Sí NO
 ¿Cuál? _____

2. ¿Padece alguna alergia a alimentos? Sí NO
 ¿Cuál? _____

3. ¿Tiene o ha padecido alguna de las siguientes síntomas/patologías/tratamientos?:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Asma, | <input type="checkbox"/> Esclerodermia, |
| <input type="checkbox"/> Bronquitis, | <input type="checkbox"/> Colitis ulcerosa, |
| <input type="checkbox"/> Rinitis, | <input type="checkbox"/> Enfermedad de Crohn, |
| <input type="checkbox"/> Dermatitis atópica, | <input type="checkbox"/> Neoplasias hematológicas, |
| <input type="checkbox"/> Artritis, | <input type="checkbox"/> Trasplantes, |
| <input type="checkbox"/> Enf. de Behçet u otra vasculitis, | <input type="checkbox"/> Transfusión, |
| <input type="checkbox"/> Tuberculosis, | <input type="checkbox"/> Quimioterapia, |
| <input type="checkbox"/> Sarcoidosis, | <input type="checkbox"/> Radioterapia |
| <input type="checkbox"/> Lupus, | <input type="checkbox"/> Embarazo |
| <input type="checkbox"/> Amiloidosis, | <input type="checkbox"/> Menopausia |
| <input type="checkbox"/> Enfermedades del colágeno, | <input type="checkbox"/> Patología autoinmune |
| <input type="checkbox"/> Síndrome de Sjögren, | |

4. ¿Alguna de las anteriores está activa en el momento actual? Especifique cuál. _____

5. ¿Tiene o ha padecido algún cuadro inflamatorio agudo de origen no-alérgico en las dos semanas previas?
 Infección de oído, Infección de vías respiratorias, Sinusitis, Gastroenteritis aguda, Otra
6. ¿Toma normalmente o está tomando alguna medicación sistémica? (incluyendo los tres últimos meses)
 Sí NO
- ¿Cuál?
 - ¿Para qué?
 - ¿Desde cuándo?

Historia Oftalmológica: _____

1. ¿Padece o ha padecido alguno de los siguientes procesos oculares?

	OD	OI	¿Hace cuánto tiempo?
Ojo seco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Uveítis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Queratitis infecciosa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Conjuntivitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____

2. ¿Alguien de su familia ha tenido alguno de los procesos oculares anteriormente descritos?
 Especifique cuál _____

3. ¿Se ha sometido a algún procedimiento ocular quirúrgico/láser, ej.: cirugía refractiva?

- Sí NO
 Especifique cuál _____

4. ¿Está con algún tratamiento tópico ocular? (en los tres últimos meses).

	SÍ	NO	Nombre y dosis	¿Hace cuánto tiempo?
Antihistamínicos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
AINEs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Corticoides	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Ciclosporina A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Antibióticos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Antiglaucomatosos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Estabilizadores de membranas celulares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Inmunomoduladores	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Otros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____

5. ¿Usa lágrimas artificiales?

- ¿Cuántas veces al día? _____
 ¿A qué hora se ha puesto la última gota? _____

6. En caso de que use lentillas, ¿de qué tipo son?

- Blandas; Desechables; Semirígidas; Duras.

7. ¿Cuánto tiempo al día utilizó las lentillas en la última semana?

- 0 horas 0-5 horas 5-10 horas Más de 10 horas

Test OSDI-Ojo Seco

El Test OSDI (ocular surface disease index) es un test sencillo creado para establecer una gravedad y clasificación del ojo seco según su sintomatología. Conteste a las siguientes preguntas marcando la casilla que mejor represente su respuesta:

A. ¿Ha experimentado alguna de las siguientes alteraciones durante la última semana?

	FRECUENCIA				
	En todo momento	Casi en todo momento	El 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento
1. Sensibilidad a la luz	4	3	2	1	0
2. Sensación de arenilla en los ojos	4	3	2	1	0
3. Dolor de ojos	4	3	2	1	0
4. Visión borrosa	4	3	2	1	0
5. Mala visión	4	3	2	1	0

B. ¿Ha tenido problemas en los ojos que le han limitado o impedido realizar alguna de las siguientes acciones durante la última semana?

	FRECUENCIA					
	En todo momento	Casi en todo momento	El 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	No Se
6. Leer	4	3	2	1	0	x
7. Conducir de noche	4	3	2	1	0	x
8. Trabajar con un ordenador o utilizar un cajero automático	4	3	2	1	0	x
9. Ver la televisión	4	3	2	1	0	x

C. ¿Ha sentido incomodidad en los ojos en alguna de las siguientes situaciones durante la última semana?

	FRECUENCIA					
	En todo momento	Casi en todo momento	El 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	No Se
10. Viento	4	3	2	1	0	x
11. Lugares con baja humedad (muy secos)	4	3	2	1	0	x
12. Zonas con aire acondicionado	4	3	2	1	0	x

Puntuación total OSDI:
$$\frac{(suma\ puntuación\ A+B+C) \times 25}{n^{\circ}\ respuestas\ contestadas\ sin\ incluir\ NS/NC} =$$

*Valores normales: puntuación de 13 o menor

TOMA DE MUESTRA _____

Oftalmólogo/óptico:

1. RECOGIDA DE LÁGRIMA

LÁGRIMA (2 capilares = 4µL de cada ojo)	- Fecha y hora de recogida:
	- Fecha y hora del análisis:

2. TBUT con fluoresceína: _____ seg.

***Valores normales a partir de 10seg**

3. EVALUACIÓN DE EL ESTADO DE LA CONJUNTIVA TARSAL (PRESENCIA DE PAPILAS):



4. EVALUACIÓN DE TINCIÓN CON FLUORESCÉINA: (según Escala de Oxford)

Córnea Conjuntiva

PANEL	GRADO	CRITERIO
A	0	Tinción igual o menor que A
B	I	Tinción mayor que A y menor o igual que B
C	II	Tinción mayor que B y menor o igual que C
D	III	Tinción mayor que C y menor o igual que D
E	IV	Tinción mayor que D y menor o igual que E
>E	V	Tinción mayor que E

5. EVALUACIÓN DE TINCIÓN CON ROSA DE BENGALA: (según Escala de van Bijsterveld)

GRADUACIÓN DE VAN BIJSTERVELD											
Conjuntiva bulbar temporal				Área corneal				Conjuntiva bulbar nasal			
A				B				C			
A				B				C			
0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Puntuación global = A + B + C =											
Valore el punteado utilizando la escala de 0 a 3: 2 = Zonas coloreadas bien definidas 0 = Sin puntos coloreados 1 = Presencia de algunos puntos 5 = Coloreado total											

6. - LAVADO CON SUERO –

7. ANESTESIA TÓPICA

8. TEST SCHIRMER: _____mm/5min

*Valores normales a partir de 5mm

9. BRUSH

BRUSH (zona tarsal superior)	- Fecha y hora de recogida:
	- Fecha y hora del análisis:

10. EXTRACCIÓN DE SANGRE:

SANGRE	- Fecha y hora de recogida:
	- Fecha y hora del análisis:

Enfermero:

El paciente cumple con los criterios de inclusión (Test OSDI + 3 de 4 pruebas de superficie ocular):

SI NO

Firma el consentimiento informado: SI NO

Fecha:

PARAMETROS DE NORMALIDAD:

1. **Puntuación Test OSDI** menor o igual que: **13**
2. **Evaluación con fluoresceína:** Grado menor o igual que: **I o II**
3. **Evaluación con Rosa de Bengala:** Puntuación menor que: **4**
4. **TBUT** mayor o igual que: **10seg**
5. **SCHIRMER** mayor o igual que: **5mm**

INCLUSIÓN: Normalidad en OSDI positivo y 3 de 4 pruebas de superficie ocular.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio: BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE CONJUNTIVITIS ALÉRGICA.

Nº de estudio: PI-14-213

Coordinadores: Dra. Carmen Martín Alonso (Tf. 983 186399); Dr. Alfredo Corell Almuzara (Tf. 983423187)

Centro:

DPTO. PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, PSIQUIATRÍA E HISTORIA DE LA CIENCIA, Facultad de Medicina Universidad de Valladolid Av/ Ramón y Cajal s/n 47005 Valladolid

Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid. Campus Miguel Delibes, Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Se le ha invitado (Vd. o su hijo/a) a participar en un estudio clínico coordinado por el IOBA y la Facultad de Medicina para pacientes que padecen procesos alérgicos oculares, ya sea queratoconjuntivitis vernal (QCV), queratoconjuntivitis atópica (QCA) y/o conjuntivitis alérgica aguda/crónica y su diagnóstico diferencial con otras patologías de la superficie ocular.

Este formulario de consentimiento describe el estudio y su papel (de Vd. o su hijo/a) en él. El investigador responderá todas las preguntas que tenga referentes al estudio y sus procedimientos. Por favor, lea atentamente este formulario y realice todas las preguntas que tenga sobre la información que contiene.

Objetivo del estudio

Estudiar los linfocitos intraepiteliales en alergia ocular, en las muestras conjuntivales y en sangre. Analizar los mecanismos de activación de la respuesta inmune celular implicados en esta enfermedad. Encontrar marcadores para el diagnóstico y/o seguimiento en la lágrima de en las muestras conjuntivales y las presentes en sangre si existe correlación entre las concentraciones lacrimales y plasmáticas de los diferentes marcadores inflamatorios

Participación voluntaria

Debe saber que su participación (de Vd. o su hijo/a) en este programa es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

Descripción general del estudio. Procedimiento.

Para este procedimiento NO se le administrará tratamiento extraordinario alguno. Si acepta la participación (Vd. o su hijo/a) mediante la firma de este documento, se le recogerá lágrima. Para la toma de lágrima se utilizarán capilares de 5 µl (glass capillary micropipettes; Drummond, REF DRUM1-000-0040, 5 µl, 32 mm; VWR 53440-067), que se colocarán en el canto externo de un único ojo. A continuación, se realizará una única extracción de células de conjuntiva. Previa anestesia tópica (0,04% Oxybuprocaine), se procederá a la rotación suave del cepillo (Cytobrush® plus GT, Medscand Medical, Sweden) sobre la conjuntiva tarsal superior, la misma zona que su médico evalúa rutinariamente en la consulta. Esta maniobra se repetirá en 3 ocasiones más, siempre realizándolo en el mismo sitio y con el mismo medio. Se le extraerá un máximo de 10mL de sangre periférica (1 tubo EDTA K3, 1 tubo de Heparina de Sodio)

Usted deberá notificar al responsable del estudio si en el momento de la misma (Vd. o su hijo/a) padece alguna enfermedad y/o está tomando algún tipo de medicación, bien sea bajo prescripción o no. Al aceptar participar en este programa permitirá que sus muestras se utilicen para el estudio de parámetros relacionado con la respuesta inmune.

Manejo de las muestras

Las muestras obtenidas no se etiquetarán con ningún dato que permita revelar la identidad del donante. Las muestras obtenidas se recogerán en diferentes tipos de tubos para su procesamiento y serán conservadas y almacenadas hasta su posterior análisis en el laboratorio.

Confidencialidad

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Página 1 de 3

acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad (de Vd. o su hijo/a) no será revelada a persona alguna ajena a los procedimientos aquí descritos.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, n° de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su (de Vd. o su hijo/a) información personal quedará restringido a los investigadores del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por los responsables, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

En ninguno de los informes del programa aparecerá su nombre (de Vd. o su hijo/a). Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada por medios informáticos bajo condiciones de seguridad (en un fichero registrado en la ANPD), con el propósito de determinar los resultados del estudio. Toda la información, incluido el mantenimiento de su anonimato, se tratará conforme a la legislación vigente. Su nombre no figurará en ningún informe relacionado con esta evaluación y su identidad no se revelará a ninguna otra persona en ninguna circunstancia. De acuerdo con la ley vigente tiene Vd. derecho al acceso de sus datos personales; asimismo, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al responsable o responsables del programa. Asimismo, en cumplimiento del RD1716/2011, le informamos de que los posibles excedentes de las muestras que Vd. o su hijo/a. cede, serán destruidos en el plazo de 2 meses tras finalizar el estudio.

Otra información relevante

A partir de los estudios que se realicen se podría obtener información de importancia para su salud (de Vd. o su hijo/a) y la de sus familiares. La información que se obtenga de un análisis le será comunicada, exclusivamente a Vd., cuando sea relevante para su salud.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis. También debe saber que puede ser excluido del programa si los responsables del estudio lo consideran oportuno.

Riesgos

El cepillado conjuntival puede provocar alguna molestia o alguna irritación leve local también transitoria. La extracción de sangre periférica puede provocar algunas molestias, ansiedad transitoria o un hematoma o una hemorragia leves locales. No obstante, la cantidad de sangre extraída no causará ninguna otra molestia ni anemia, ni será perjudicial para su salud.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Título del Estudio: BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE CONJUNTIVITIS ALÉRGICA.

Nº de estudio: PI-14-213

Coordinadores: Dra. Carmen Martín Alonso (Tf. 983 186399); Dr. Alfredo Corell Almuzara (Tf. 983423187)

Centro: DPTO. PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, PSIQUIATRÍA E HISTORIA DE LA CIENCIA, Facultad de Medicina Universidad de Valladolid Av/ Ramón y Cajal s/n 47005 Valladolid

Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid. Campus Miguel Delibes, Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Al firmar abajo, yo declaro que:

- 1) He leído, o me han leído, y entiendo completamente el contenido del formulario de información adjunto, Versión 2 Final de 28 de Mayo de 2015.
 - 2) He tenido la oportunidad de preguntar y obtener respuestas satisfactorias a cada una de mis preguntas
 - 3) Acepto de forma voluntaria participar en este estudio de investigación y sé que puedo retirarme del estudio en cualquier momento sin que se vea afectada la continuidad de mi tratamiento
- Responsables: S Rubio, M Cano, Dra V Marqués, Dr JM Herrerías, Dra A Armentia, Dra. Carmen Martín Alonso y/o Dr. Alfredo Corell Almuzara Dirección: DPTO. PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, PSIQUIATRÍA E HISTORIA DE LA CIENCIA, Facultad de Medicina Universidad de Valladolid Av/ Ramón y Cajal s/n 47005 Valladolid; Instituto Universitario de Oftalmología Aplicada – Paseo de Belén 17 – 47011 - Valladolid; Número de Teléfono : 983 184 750/4755; me ha explicado la información para el paciente y el formulario de consentimiento y comprendo lo que implica la investigación.
- 4) He comprendido completamente que los representantes del patrocinador, el Comité Ético Independiente o los representantes de las autoridades regulatorias pueden examinar mis registros médicos donde aparece mi nombre para verificar la exactitud de la información obtenida y entiendo que estas personas tendrán el deber de manejar esta información con confidencialidad utilizándola solamente con un objetivo legítimo para la salud pública.
 - 5) Se me entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para mis propios archivos.

Nombre del Paciente

Firma _____ Fecha _____
(Debe ser firmado y fechado por el paciente)

Nombre del representante legalmente autorizado

Firma _____ Fecha _____
(Debe ser firmado y fechado por el representante legalmente autorizado -si aplica-)

Nombre del Investigador

Firma _____ Fecha _____
(Debe ser firmado y fechado por el investigador)

Nombre de la persona que participó en la discusión del CI

Firma _____ Fecha _____
(Debe ser firmado y fechado por la persona que explicó el consentimiento informado)

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____



**COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE (CEIC-VA-ESTE-HCUV)**

Valladolid a 20 de Marzo de 2014

En la reunión del CEIC ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE del 20 de Marzo de 2014, se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente proyecto de investigación.

A continuación les señalo los acuerdos tomados por el CEIC ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE en relación a dicho Proyecto de Investigación:

PI-13-62	ALTERACIONES DEL COMPARTIMENTO EPITELIAL DEL SISTEMA INMUNE DE LA MUCOSA OCULAR EN QUERATOCONJUNTIVITIS VERNAL	ALLERGAN I.P.: CARMEN MARTÍN ALONSO - MARGARITA CALONGE CANO Otros Investigadores en IOBA: Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Dra. Ana Isabel Vallelado Magnolia T. Cano Suárez IOBA
----------	--	---

El Comité Ético de Investigación Clínica del Área Este de Valladolid, en la reunión celebrada el día 20 de marzo de 2014, aprueba la siguiente modificación:

-Se añaden pacientes atópicos y alérgicos a la población del estudio.

Considerando que el Proyecto contempla los Convenios y Normas establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética, se hace constar el **informe favorable** y la **aceptación** del Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud Valladolid Este para que sea llevado a efecto dicho Proyecto de Investigación.

Un cordial saludo.

La firma y datos personales ha sido omitidos por la ley de protección de datos

CEIC Área de Salud Valladolid Este –
Hospital Clínico Universitario de Valladolid
Farmacología
Facultad de Medicina,
Universidad de Valladolid,
c/ Ramón y Cajal 7,47005 Valladolid



REGISTRO GENERAL DE
SALIDA - SACYL
GAP VALLADOLID ESTE
24/03/2017 - 14:28
Nº Registro: 2319

CONFORMIDAD DE LA DIRECCIÓN DEL CENTRO

Don J Gerente de la Gerencia de Atención Primaria de Valladolid Este, vista la propuesta sobre el Proyecto de Investigación cuyos datos se referencian a continuación:

CODIGO CEIC	TITULO	PROMOTOR INVESTIGADOR PRINCIPAL/OTROS INVESTIGADORES
PI -14-213	BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE CONJUNTIVITIS ALÉRGICA	IOBA – Inmunolab IP: ALFREDO CORELL ALMUZARA OTROS INVESTIGADORES EN IOBA: M. CARMEN MARTÍN ALONSO, ROBERTO REINOSO, JOSÉ MARÍA HERRERAS CANTALAPIEDRA, ANA VALLELADO. OTROS INVESTIGADORES: JOSÉ CARLOS ZARZUELA VELASCO, ALICIA ARMENTIA, VICTORIA MARQUÉS, SOLEDAD RUBIO Y MAGNOLIA CANO.

Teniendo en cuenta la evaluación favorable realizada por parte del CEIC del Área de Salud Valladolid Este (última revisión favorable de fecha 29 de septiembre de 2016):

Informa favorablemente la realización de dicho estudio en la Gerencia de Atención Primaria de Valladolid Este.

Lo que firma en Valladolid, a 24 de Marzo de 2017.

EL GERENTE DE LA GERENCIA DE
ATENCIÓN PRIMARIA DE VALLADOLID ESTE

La firma y datos personales ha sido omitidos por la ley de protección de datos

