



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD**

**“ESTUDIO PILOTO”**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE COESTIMULACIÓN DE LA  
FAMILIA B7 Y FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN IRF-4, EN CÉLULAS DENDRÍTICAS  
DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CONJUNTIVITIS ALÉRGICA DURANTE EL  
TRATAMIENTO DE INMUNOTERAPIA SUBLINGUAL ANTÍGENO  
DESENSIBILIZANTE**

## **TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**MED. CIR. MARÍA FERNANDA REAL SAN MIGUEL**

**TUTOR**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ**

**Departamento de bioquímica, FacMed y Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana,  
IAP.**

**Ciudad Universitaria, CDMX. diciembre 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Jiménez Martínez y el M. en C. Henry Velázquez Soto del Departamento de Inmunología de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”.

Este Trabajo fue apoyado en parte por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM y la Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de Maestría CVU 917720.

Dedico este trabajo a:

Mis padres, Queta y Andrés, por su apoyo y motivación en todo.

Mis hermanos Queta, Andrés Pao, su cariño y consejos han sido mi guía.

Los niños de la consulta, por su ayuda, enseñanzas y risas.

Agradezco a todo el equipo del Departamento de Inmunología de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP” ya que con sus enseñanzas me permitieron concretar este proyecto así como crecer personal y profesionalmente.

En especial quiero agradecer al M. en C. Velázquez y a la Dra. Maca por su paciencia y orientación.

Pepe!

# Índice general

Capítulo 1 Conjuntivitis alérgica .....	14
Capítulo 2 Fisiopatología de la CA.....	22
Capítulo 3 Tratamiento.....	26
Capítulo 4 Células dendríticas .....	30
Capítulo 5 Metodología .....	37
Capítulo 6 Resultados .....	54
Capítulo 7 Discusión .....	81
Capítulo 8 Conclusiones .....	93
Capítulo 9 Perspectivas y limitaciones .....	94
Capítulo 10 Referencias.....	95
Anexo 1 .....	114
Anexo 2.....	120
Anexo 3.....	123
Anexo 4.....	125
Anexo 5.....	126
Formatos de reporte de caso .....	131

## Índice de tablas

Tabla 1.1 Causas de consulta nacional general de acuerdo con el anuario del 2019 de morbilidad estatal. ....	15
Tabla 1.2 Escala de evaluación de los síntomas de la CA.....	19
Tabla 4.1 Clasificación y función de las DCs en sangre periférica.....	31
Tabla 5.1 Esquema de administración de SLIT.....	47
Tabla 5.2 Concentración proteica por frasco de SLIT .....	47
Tabla 5.3 Anticuerpos para el marcaje de antígenos de membrana e intracelulares de MoDCs .....	50
Tabla 6.1 Características clínicas de los sujetos incluidos.....	54
Tabla 6.2 Concentraciones y tiempos de estímulo de MoDCs.....	56
Tabla 6.3 Características clínicas individuales de los sujetos con CA antes de iniciar con SLIT.....	63
Tabla 6.4 Características clínicas de los sujetos con CA antes de iniciar con SLIT.....	63
Tabla 6.5 Síntomas de sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT.....	70
Tabla 6.6 Signos de sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT .....	71
Tabla 6.7 Puntaje total de gravedad de síntomas y signos de sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT .....	73
Tabla 6.8 Puntuación de cada ítem de síntomas de nariz de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT.....	74
Tabla 6.9 Comparación de medias de cada ítem que conforma a síntomas de nariz del PQRQL.....	75
Tabla 6.10 Puntuación de cada ítem de síntomas de ojo de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT .....	75
Tabla 6.11 Comparación de medias de cada ítem que conforma a síntomas de ojos del PQRQL.....	75
Tabla 6.12 Puntuación de cada ítem de problemas prácticos de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT .....	76
Tabla 6.13 Comparación de medias de cada ítem que conforma a problemas prácticos del PQRQL.....	77
Tabla 6.14 Puntuación de cada ítem de otros síntomas de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT .....	77
Tabla 6.15 Comparación de medias de cada ítem que conforma a otros síntomas del PQRQL.....	78
Tabla 6.16 Puntuación de cada ítem de otros síntomas de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT .....	78
Tabla 6.17 Comparación de medias de cada ítem que conforma a limitación de actividades del PQRQL.....	79

Tabla 0.1 Componentes de la película lagrimal. ....	114
Tabla 0.2 Componentes de la capa lipídica. ....	115
Tabla 0.3 Componentes de la capa acuosa ....	115
Tabla 0.4 Componentes de la capa mucoproteica ....	116
Tabla 0.5 Partes de la conjuntiva ....	117
Tabla 0.6 Componentes celulares de la conjuntiva ....	118



## Índice de figuras

Figura 1.1 Anatomía de la superficie ocular .....	14
Figura 1.2 Clasificación de la Conjuntivitis alérgica Clasificación de la CA basado en su mecanismo de hipersensibilidad. IgE, inmunoglobulina E. Tomada y modificada de Sánchez-Hernández MC, et al. 2011 .....	16
Figura 1.3 Principales signos y síntomas de la CA. Frecuencia de presentación de los principales signos y síntomas de la CA. Fuente: Modificado de Guillermina Cortés-Morales, et al., 2014. Fotografía original de paciente captado del servicio de inmunología del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP” en el año 2017 .....	17
Figura 1.4 Clasificación de frecuencia y gravedad de los signos y síntomas de la alergia ocular .....	18
Figura 1.5 Escala de gravedad visual análoga de los signos de la CA. Imagen que representa los items evaluados durante la exploración física para determinar la gravedad de los signos de la CA Tomado: Robles-Contreras, et al., 2011 .....	21
Figura 3.1 Tratamiento de la CA Tomado y modificado de Sánchez-Hernández MC, et al. 201 .....	27
Figura 5.1 Metodología del procesamiento de muestras de la primera parte del proyecto Muestras de sangre periférica recolectadas en tubos EDTA. Lipopolisacárido, LPS. ....	49
Figura 5.2 Metodología del procesamiento de muestras de la segunda parte del proyecto. Muestras de sangre periférica recolectadas en tubos EDTA. Lipopolisacárido, LPS; Dermatophagoides pteronyssinus, Der-p. ....	51
Figura 6.1 Morfología celular de MoDCs.....	55
Figura 6.2 Fenotipo celular del día 0 y día 7. Evaluación del fenotipo celular de las células cultivadas al día 0 y al día 7. A) Singlets. B) Células obtenidas al día 0 (Monocitos). C) Células obtenidas al día 7 (MoDCs). D) Histogramas de la IMF de HLA-DR y CD14 al día 0, (Día 0 sin marca (línea negra discontinua), día 0 con marca (línea negra continua), día 7 sin marca (línea roja discontinua) y día 7 con marca (línea roja continua)). E) Histogramas de la IMF de HLA-DR y CD14 al día 07.....	56
Figura 6.3 Estrategia de análisis de evaluación de moléculas de coestimulación e IRF-4 .....	57
Figura 6.4 Gráfica de la IMF de CD86 en MoDCs de sujetos adultos sin alergia. Gráfico de barras de la expresión de CD86 en distintas concentraciones de LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3, cada condición fue evaluada por triplicado. Prueba Kruskal-Wallis .....	58
Figura 6.5 Gráfica de la IMF de ICOS-L en MoDCs de sujetos adultos sin alergia. ....	58
Figura 6.6 Gráfica de la IMF de PD-L1 en MoDCs de sujetos adultos sin alergia.....	59
Figura 6.7 Gráfica de la IMF de PD-L2 en MoDCs de sujetos adultos sin alergia.....	59
Figura 6.8 Gráfica de la IMF de IRF-4 en MoDCs de sujetos adultos sin alergia. ....	60

Figura 6.9 Gráfica de la concentración de IL-6 en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia .....	60
Figura 6.10 Gráfica de la concentración de IL-10 en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia. ....	61
Figura 6.11 Gráfica de la concentración de TNF en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia. ....	61
Figura 6.12 Gráfica de la concentración de INF- $\gamma$ en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia .....	62
Figura 6.13 Gráfica de la concentración de IL-2 en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia .....	62
Figura 6.14 Gráfica de la concentración de IL-4 en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia .....	63
<i>Figura 6.15 Gráfica de la IMF de CD86 en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA bajo el estímulo con diferentes ligandos (Sin estímulo, LPS y Der-p). Representación mediante un gráfico de barras de la expresión CD86 en MoDCs de sujetos sanos (n=3) y sujetos con CA (n=2) posterior a la incubación con sin estímulo, LPS y Der-p. Prueba Kruskal-Wallis. ....</i>	65
Figura 6.16 Gráfica de la IMF de ICOS-L en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA bajo el estímulo con diferentes ligandos (Sin estímulo, LPS y Der-p).....	66
Figura 6.17 Gráfica de la IMF de PD-L1 en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA bajo el estímulo con diferentes ligandos (Sin estímulo, LPS y Der-p) Representación mediante un gráfico de barras de la expresión de PD-L1 en MoDCs de sujetos sanos (n=3) y sujetos con CA (n=2) posterior a la incubación con RPMI-1640, LPS y Der-p por 48 horas. Prueba Kruskal-Wallis. ....	67
Figura 6.18 Gráfica de la IMF de PD-L2 en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA. Representación mediante un gráfico de barras de la expresión de PD-L2 en MoDCs de sujetos sanos (n=3) y sujetos con CA (n=2) posterior a la incubación con sin estímulo, LPS y Der-p, LPS y Der-p. Prueba Kruskal-Wallis. ....	68
Figura 6.19 Gráfica de la IMF de IRF-4 en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA. ....	69
Figura 6.22 Gráfica de la comparación de la gravedad de la puntuación de los síntomas oculares de los sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT.....	71
Figura 6.23 Gráfica de la comparación de la gravedad de los signos oculares de los sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT.....	72
Figura 6.24 Gráfica de la comparación de la gravedad de síntomas y signos oculares de los sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT. ....	73
Figura 6.25 Gráfica comparativa general de cada dominio que conforma al PQRLQ... ..	80
Figura 6.26 Gráfica comparativa global del PQRLQ. ....	80

Figura 12.1 Ontogenia de las DCs Precursores de las DCs. Tomada y modificada de Collin M et al., 2018..... 120

## ***Abreviaturas***

- (AIT) Inmunoterapia antígeno desensibilizante
- (AKC) Queratoconjuntivitis atópica
- (APCs) Células presentadoras de antígeno
- (Bregs) Linfocitos B reguladores
- (CA) Conjuntivitis alérgica
- (CALT) Tejido linfoide asociado a la conjuntiva
- (CD80) B7.1
- (CD86) B7.2
- (CDP) Precusores de DCs comunes
- (cMoPs) Progenitores de monocitos comunes
- (CMP) Progenitores mieloides comunes
- (DCs) Células dendríticas
- (DECA) Documento de Consenso sobre la Conjuntivitis Alérgica
- (Der-p) Dermatophagoides pteronyssinus
- (EALT) Tejido linfoide asociado a los ojos
- (ECP) Proteína catiónica de eosinófilos
- (EGF) Factor de crecimiento epidérmico
- (ELISA, por sus siglas en inglés) Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- (FcεRI) *Receptor* de alta afinidad para IgE
- (FcεRII) *Receptor* de baja afinidad para IgE
- (FOXP3) Forkhead box P3
- (GM-CSF) Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
- (HSF) Factor de crecimiento hepático
- (ICAM-1) Moléculas de adhesión intercelulares-1

(ICOS-L) Ligando de coestimulador indecible de linfocitos T

(IDO) Indoleamina 2,3-dioxigenasa

(IFN- $\gamma$ ) Interferón gamma

(IgA) Inmunoglobulina A

(IgD) Inmunoglobulina D

(IgE) Inmunoglobulina E

(IgG) Inmunoglobulina G

(IgM) Inmunoglobulina M

(IL-1 $\alpha$ ) Interleucina 1 $\alpha$

(IL-1 $\beta$ ) Interleucina 1 $\beta$

(IL-6) Interleucina

(ILC2) Linfocitos innatos tipo 2

(INEGI) Instituto Nacional de Estadística y Geografía

(IP3) Inositol-1,4,5-trifosfato

(IRF-4) Factor de transcripción regulador de interferón 4

(LC) Células de Langherhans

(LDALT) Tejido linoide asociado al drenaje lagrimal

(mDCs) DCs mieloides de sangre periférica

(MDMs) Macrófagos derivados de monocitos

(MDP) Macrófagos y precursores de DCs

(MHC-II) Molécula de histocompatibilidad clase II

(MoDCs) Células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica

(PAC) Conjuntivitis alérgica perenne

(PBMCs) Células mononucleares de sangre periférica

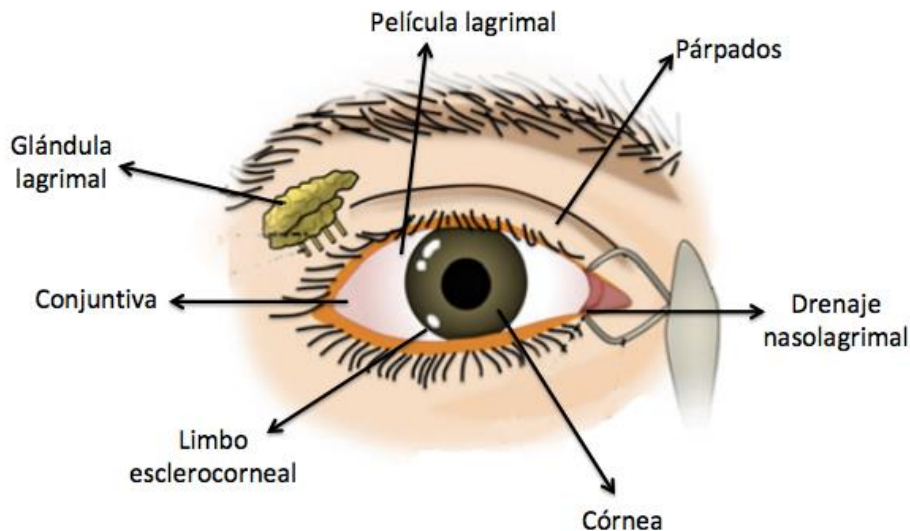
(PCP) Pruebas cutáneas de Prick

(PD-L1/CD274) Ligando 1 de muerte programada  
(PD-L1/CD274) Ligando 1 de muerte programada  
(PDL-2/CD273) Ligando 2 de muerte programada  
(PPRs) Receptores de reconocimiento de patrones  
(SAC) Conjuntivitis alérgica estacional  
(SCIT) Inmunoterapia antígeno específica subcutánea  
(SLIT) Inmunoterapia antígeno específica sublingual  
(TCR, por sus siglas en inglés) Receptor de los linfocitos T  
(TGF- $\beta$ ) Factor de crecimiento  $\beta$   
(TLRs) Receptores tipo Toll  
(TNF-a) Factor de necrosis tumoral alfa  
(Tregs) Linfocitos T reguladores  
(TSLP) Linfopoyetina del estroma tímico  
(VEGF) Factor de crecimiento vasculoendotelial  
(VKC) Queratoconjuntivitis vernal

# Capítulo 1 Conjuntivitis alérgica

- **Definición**

La conjuntivitis alérgica (CA), es una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular, desencadenada por el contacto con alérgenos, mediada principalmente por un mecanismo de hipersensibilidad tipo I.<sup>(1, 2)</sup> (Figura 1.1)



**Figura 1.1 Anatomía de la superficie ocular**

Componentes de la superficie ocular. Tomada y modificada de Skalicky, S. E. *et al.* 2016. Ver anexo 1.

- **Epidemiología**

Aproximadamente del 15 al 40% de la población mundial es afectada por algún tipo de manifestación alérgica y de ese porcentaje de los pacientes alérgicos, se estima que del 40 al 60% presentan síntomas oculares.<sup>(3)</sup>

En México se desconoce la incidencia a nivel nacional de pacientes afectados por la CA, sin embargo, de acuerdo al anuario del 2019 de morbilidad nacional publicado por la Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, todo el espectro de las conjuntivitis se encuentran dentro de las diez principales causas de consulta general. (Tabla 1.1)<sup>(4)</sup> En el Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP" el cual es un centro oftalmológico de referencia nacional ubicado en la Ciudad de México, en donde al año se otorgan más de 9,000 consultas y se ha identificado que la CA, es la segunda causa de consulta en edades pediátricas.<sup>(5)</sup>

**Tabla 1.1 Causas de consulta nacional general de acuerdo con el anuario del 2019 de morbilidad estatal.**

Diagnóstico	Total de casos de enfermedades registradas
1. Infecciones respiratorias agudas	23, 778, 438
2. Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	5, 360, 604
3. Infección de vías urinarias	4, 348, 079
4. Úlceras, gastritis y duodenitis	1, 418, 236
5. Gingivitis y enfermedades periodontales	1, 131, 482
6. Conjuntivitis	1, 035, 140
7. Obesidad	790, 660
8. Otitis media aguda Hipertensión arterial	677, 075
9. Vulvovaginitis	648, 473
10. Hipertensión arterial	543, 933

Información de total de las diez principales causas de enfermedad en el 2019 Tomado y modificado de: Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, 2019.

- Prevalencia de los diferentes alérgenos en pacientes con CA.

Los cuadros alérgicos oculares son causados por la exposición directa de la superficie ocular a los alérgenos, los cuales son sustancias capaces de desencadenar una respuesta inmunológica la cual resulta en una reacción alérgica. <sup>(6-8)</sup>

Tradicionalmente se han dividido en alérgenos estacionales y perennes. Los alérgenos estacionales incluyen principalmente a los pólenes (pastos, árboles, malezas y flores) varían según el área geográfica y la época del año. Por otro lado, los alérgenos perennes, son aquellos que pueden estar presentes en cualquier temporada del año, ya que su presencia es continua (ácaros, polvo y caspa de animales). <sup>(7, 9)</sup>

En el 2010, en el Hospital para el Niño de la Ciudad de México, se realizaron pruebas cutáneas a pacientes pediátricos con alergia ocular para identificar el alérgeno causal más constante, encontrando que los alérgenos más frecuentes fueron los ácaros del polvo casero (32.33%), seguido por la cucaracha (6.96%), y por último el pasto y pino con (5.47%).<sup>(10)</sup>

En el 2012 en el Hospital Militar de la Ciudad de México, se realizaron pruebas cutáneas a los pacientes con sintomatología alérgica e identificaron que el panel de

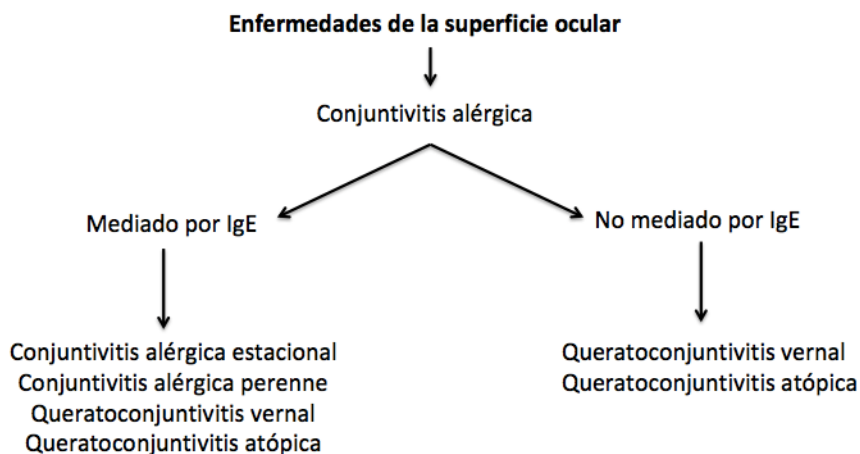


ácaros-polvos y pastos fueron los más frecuentes (30% y 41%, respectivamente), seguido por los árboles-arbustos (35%), y en último lugar quedaron las malezas (17%).<sup>(7)</sup>

En niños de 1 a 15 años se ha identificado mediante el estudio de pruebas cutáneas que el Der-p es el alérgeno con mayor prevalencia de sensibilización en este grupo de edad. <sup>(11)</sup> Debido a que la gravedad de los síntomas de la alergia ocular varían con el nivel de exposición es importante reforzar la importancia de la identificación y tratamiento de estas sensibilidades alérgicas.<sup>(12)</sup>

- **Cuadro clínico y clasificación**

La CA incluye un espectro de varias enfermedades con diferentes mecanismos inmunopatológicos en donde se puede observar sobrelapamiento de síntomas y signos, los cuales pueden ser intermitentes o persistentes variando en su gravedad y presentación.<sup>(1)</sup> Por lo que en el 2001, la Academia Europea de Alergia e Inmunología (EAACI) introdujo una nomenclatura para distinguir de acuerdo a su mecanismo fisiopatológico a la CA el cual fue validado por el Comité Revisor de Nomenclaturas de la Organización Mundial de Alergia (WAO). <sup>(8)</sup> De acuerdo con esta clasificación la CA se divide en dos grupos: mediada por inmunoglobulina E (IgE) y no mediada por IgE.<sup>(13)</sup> (Figura 1.2)

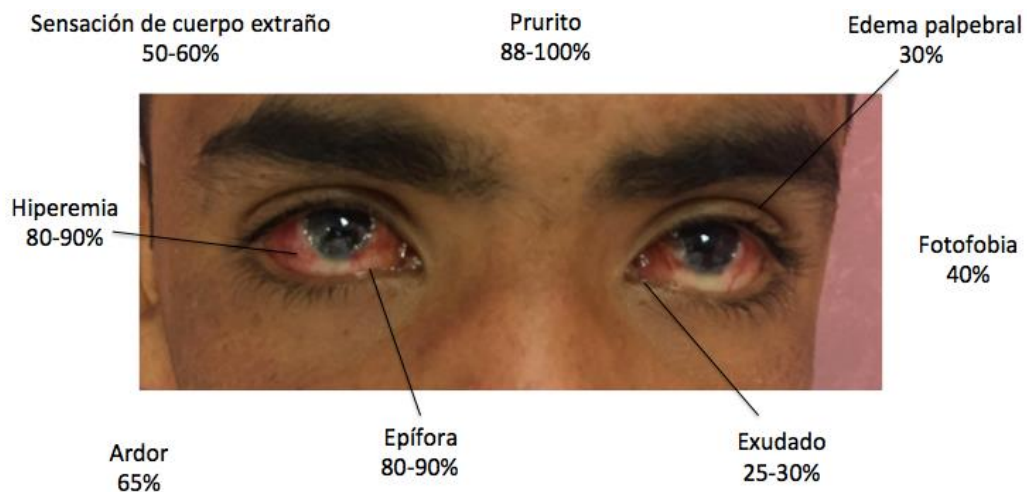


**Figura 1.2 Clasificación de la Conjuntivitis alérgica**

Clasificación de la CA basado en su mecanismo de hipersensibilidad. IgE, inmunoglobulina E. Tomada y modificada de Sánchez-Hernández MC, *et al.* 2011

El mecanismo mediado por IgE involucra condiciones agudas como la conjuntivitis alérgica estacional (SAC) y perenne (PAC) y crónicas como a la queratoconjuntivitis vernal (VKC) o atópica (AKC). En las formas agudas se observa que la inflamación es mediada principalmente por IgE, así como por infiltrado de linfocitos T, mastocitos, eosinófilos así como de la liberación de citocinas del perfil Th2; sin embargo, en VKC y AKC existe un aumento de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) lo que sugiere que la respuesta inmunológica es principalmente mediada por un perfil Th1.<sup>(12, 13)</sup>

En la CA los síntomas y signos distintivos son el prurito, hiperemia conjuntival, epifora, ardor, sensación de cuerpo extraño, fotofobia, exudado, edema palpebral y visión borrosa.<sup>(1, 14)</sup> (Figura 1.3) Estos pacientes también pueden presentar síntomas nasales de alergia como comezón en la nariz, estornudos, flujo nasal y congestión nasal a lo que se le conoce como rinoconjuntivitis.<sup>(15)</sup> Estos signos y síntomas modifican las actividades diarias, académicas y/o laborales generando alteraciones en la calidad de vida de los pacientes.<sup>(16)</sup>



**Figura 1.3 Principales signos y síntomas de la CA.** Frecuencia de presentación de los principales signos y síntomas de la CA. Fuente: Modificado de Guillermina Cortés-Morales, et al., 2014. Fotografía original de paciente captado del servicio de inmunología del Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP" en el año 2017

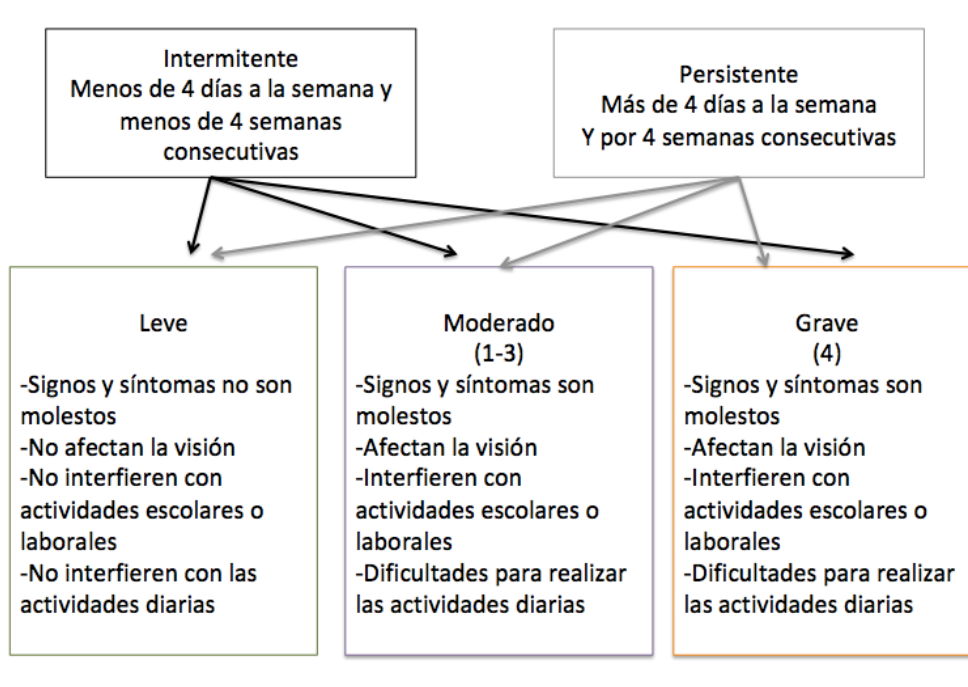
Las dos formas más frecuentes de la CA son la SAC y PAC. La primera depende de la época de polinización, en cambio, la PAC se presenta en sujetos sensibilizados a alérgenos que están presentes en el medio ambiente durante todo el año, como ácaros de polvo, caspa de animales y mohos. Los pacientes con SAC y PAC presentan generalmente, de forma bilateral los signos y síntomas de la CA. Estos signos y síntomas pueden remitir, dependiendo de la exposición del paciente al alérgeno.<sup>(6)</sup>

En niños y adultos jóvenes con atopia la presentación de la VKC es frecuente y presentan cambios proliferativos conjuntivales bilaterales tales como hiperplasia papilar de la conjuntiva tarsal superior, puntos de Horner-Trantas.<sup>(17, 18)</sup>

Otro proceso inflamatorio crónico bilateral ocular es la AKC, se presenta en hombres adultos entre 30-50 años, con antecedentes de dermatitis atópica en el 95% de los casos. Se observan los signos y síntomas característicos de la CA con la particularidad de presentar lesiones eczematosas en los párpados lo cuales tienden a engrosarse, endurecerse y fisurarse lo que conlleva a disfunción de las glándulas de meibomio y también pueden presentar alopecia superciliar lateral (Signo de Hertoghe) secundario a

rascado frecuente.<sup>(12, 18, 19)</sup>

Debido a que la CA incluye un amplio espectro de enfermedades en el año 2011, Sánchez-Hernández MC, *et al.*, en el Documento de Consenso sobre la Conjuntivitis Alérgica (DECA) elaboraron una propuesta para poder evaluar la frecuencia y gravedad de los signos y síntomas de la alergia ocular. Consideran que la CA es intermitente cuando la frecuencia de los signos y síntomas oculares se presentan máximo 4 días a la semana o en un máximo de 4 semanas, por otro lado, se denomina persistente cuando la frecuencia de estos es de más de 4 días a la semana y por más de 4 semanas consecutivas. Para evaluar la gravedad, se propone que la CA es; a) leve, cuando los signos y síntomas no son molestos, no afectan la visión y no obstaculizan las tareas diarias o actividades ocupacionales; b) moderado, cuando afectan de 1 a 3 de estas condiciones; y c) grave, cuando afectan a todas las condiciones.<sup>(13)</sup> (Figura 1.4)



**Figura 1.4 Clasificación de frecuencia y gravedad de los signos y síntomas de la alergia ocular**

Tomado y modificado de Sánchez-Hernández MC, *et al.* 2011

En el año 2011 Robles-Contreras, *et al.*, desarrollaron en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana una escala análogo-visual en donde se evalúa las características clínicas de los síntomas y signos de la CA de forma objetiva. En esta escala se les otorga un valor numérico a los diferentes síntomas (prurito, lagrimeo, fotofobia, sensación de cuerpo extraño y ardor) se les otorga un valor numérico que depende de la frecuencia de su aparición: 0=No sucede, 1=Algunas veces, 2=La mitad de las veces, 3=La mayor parte de las veces, 4=Todo el tiempo. (Tabla 1.2)

**Tabla 1.2 Escala de evaluación de los síntomas de la CA.**

	Ausente	Algunas veces	La mitad de las veces	La mayor parte de las veces	Todo el tiempo
<b>Prurito</b>	0	1	2	3	4
<b>Lagrimeo</b>	0	1	2	3	4
<b>Sensación de cuerpo extraño</b>	0	1	2	3	4
<b>Ardor</b>	0	1	2	3	4

Valor otorgado a cada síntoma de acuerdo a la frecuencia de aparición. Fuente: Atzin Robles- Contreras, *et al.*, 2011

Por medio del uso de la lámpara de hendidura los signos también son evaluados del 0 al 4, de acuerdo con las siguientes características (Figura 1.5):

A) Posición y aspecto de la piel del párpado:

0=Sin edema palpebral.

1=Edema localizado en el párpado superior o inferior, sin presencia de líneas de Dennie Morgan

2=Edema palpebral superior e inferior generalizado con ligero pseudoapoptosis y con presencia de líneas de Dennie Morgan

3=Moderada pseudo-ptosis unilateral o bilateral con presencia de líneas de Dennie Morgan

4=Severa pseudo-ptosis unilateral o bilateral con presencia de líneas de Dennie Morgan, con cambios en la textura y pigmentación de la piel con signo de Hertoghe presente.

B) Margen palpebral:

0= Sin desplazamiento

1=Desplazamiento de 1/3 de la unión mucocutánea

2=Desplazamiento de 2/3 de la unión mucocutánea

3=Desplazamiento generalizado de la unión mucocutánea

4=Cicatrización o cambios de queratinización

C) Hiperemia y edema conjuntival:

0=Sin hiperemia o edema conjuntival

1=Hiperemia conjuntival +/++, con 1/3 de apariencia de edema en conjuntiva.

2=Hiperemia conjuntival ++/+++ , con 2/3 de apariencia de edema en conjuntiva, con una leve formación de plica conjuntival en el fondo de saco.

3=Hiperemia conjuntival mayor a +++ , con más de 2/3 de apariencia de edema en conjuntiva, con engrosamiento de los vasos conjuntivales y moderada formación de plica conjuntival en el fondo de saco.

4=Hiperemia conjuntival mayor a +++ , con más de 2/3 de apariencia de edema en conjuntiva, con engrosamiento de los vasos conjuntivales y severa formación de plica conjuntival en el fondo de saco.

D) Descarga conjuntival

0=Sin descarga

1=Descarga acuosa o con pocos debris

2=Descarga blanca-grisácea en el fondo de saco o localizado adyacente a 1/3 del limbo o conjuntiva tarsal.

3=Descarga grisácea-amarillenta con abundantes filamentos mucosos en el fondo de saco o localizado adyacente a 2/3 del limbo o la conjuntiva tarsal.

4=Secreción abundante de filamentos mucosos adheridos principalmente a la superficie corneal.

E) Respuesta de la conjuntiva Tarsal

0=Sin hiperplasia o folículos

1=Menos de 1/3 de las papilas son de un tamaño menor a 0.3mm con vasos visibles en conjuntiva tarsal.

2=Papilas de 1/3 a 2/3 de tamaño 0.3-0.5 con vasos visibles en la conjuntiva tarsal

3= Papilas en empedrado, más de 2/3 de las papilas del tarso son de 0.75, con o sin fibrosis, vasos irregulares en conjuntiva tarsal.

4=Pocas papilas tarsales mayores a 0.75, con fibrosis o con macro papilas y posible simblerafón o conjuntiva papilar pálida.

F) Involucro del limbo:

0=Sin nódulos o puntos visibles

1=Presencia de puntos de Trantas en menos de un cuadrante

2=Presencia de puntos de Trantas de  $\frac{1}{4}$  a  $\frac{1}{2}$  en el limbo con ligera pigmentación

3=Presencia de puntos de Trantas en más de un  $\frac{1}{2}$  del limbo o de  $\frac{1}{4}$  a  $\frac{1}{2}$  de deficiencia de células madre limbales.

4=Puntos de Trantas generalizados en el limbo con fibrosis y pigmento o con más de  $\frac{1}{2}$  de deficiencia de células madre limbales.

G) Involucro corneal:

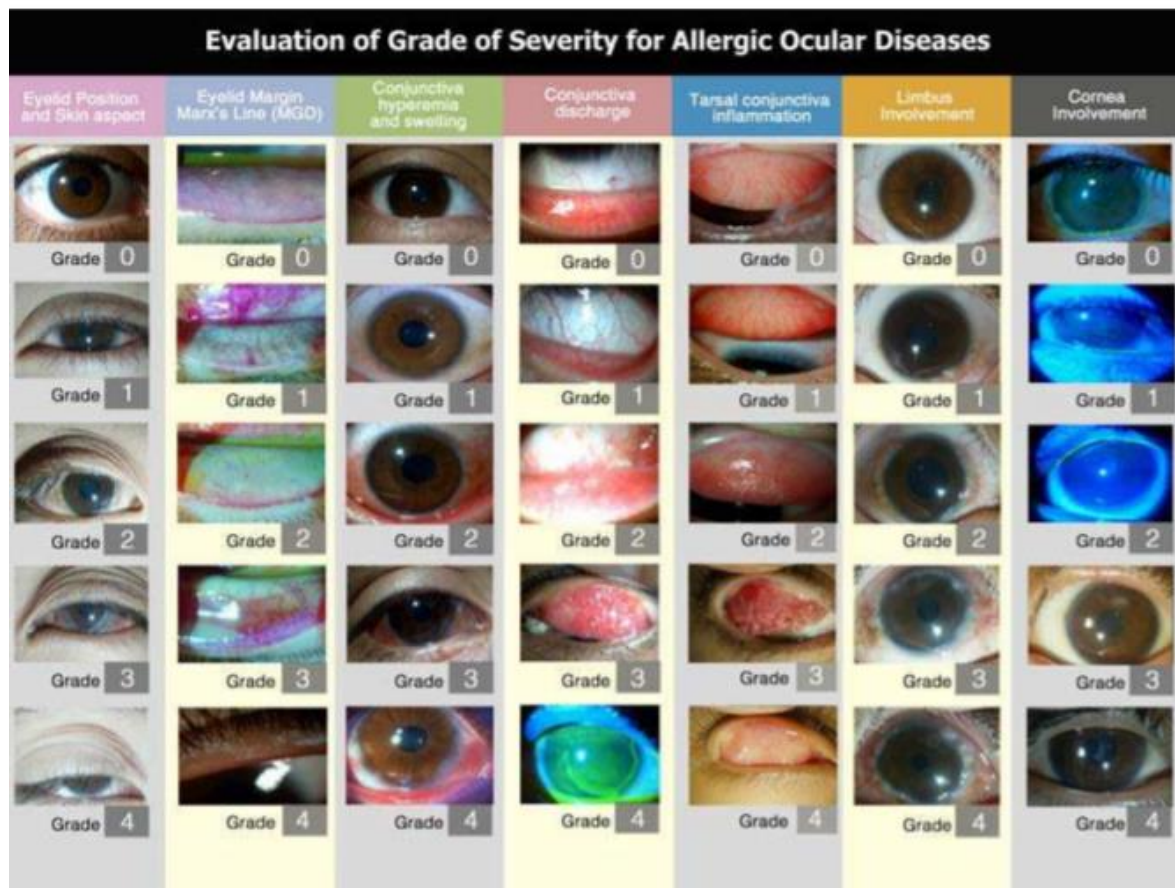
0=Sin queratopatía punteal superficial

1=Leve queratopatía punteada superficial sin involucro central

2=De  $\frac{1}{4}$  a  $\frac{1}{2}$  de queratopatía punteada superficial sin compromiso del eje visual

3=Queratopatía superficial generalizada con compromiso del eje visual o defectos epiteliales, úlcera corneal indolente en cuadrantes superiores.

4=Queratocono con o sin leucoma central.



**Figura 1.5 Escala de gravedad visual análoga de los signos de la CA.**

Imagen que representa los ítems evaluados durante la exploración física para determinar la gravedad de los signos de la CA Tomado: *Robles-Contreras, et al., 2011*

La suma total de los puntajes de síntomas y signos da un resultado de 48 puntos de los cuales veinte puntos corresponden a los síntomas y veintiocho corresponden a los signos. De acuerdo al puntaje final se puede definir la gravedad de la enfermedad de forma objetiva de la siguiente manera: 0 puntos: Ausente, 1-12 puntos: leve, 13-24 puntos: moderada, 25-36 puntos: moderado-grave y 36 a 48 puntos: grave.

## Capítulo 2 Fisiopatología de la CA

Para entender la fisiopatología de la CA, es necesario conocer las modificaciones anátomo-funcionales involucradas en la alergia ocular, las cuales han podido ser estudiadas tanto de exámenes directos de muestras conjuntivales de pacientes con alergia ocular así como de la evaluación de modelos murinos con alergia ocular.

En específico, los modelos murinos experimentales de alergia ocular han contribuido mucho al entendimiento de la CA debido a que clínicamente y fisiopatológicamente es parecido a lo que ocurre en los humanos, proveen suficiente tejido para poder realizar los análisis y existe una amplia disponibilidad de reactivos a diferencia de otras especies.<sup>(20)</sup>

La fisiopatología de la alergia se caracteriza por una fase de sensibilización y una fase efectora.

- **Fase de sensibilización**

Esta fase refleja la capacidad de un alérgeno para provocar una respuesta inmunológica del tipo Th2, caracterizado por una expresión de IL-4 e IL-13 las cuales promueven el cambio de isotipo a IgE por parte de los linfocitos B.<sup>(21)</sup>

Se ha establecido que la disfunción de la barrera epitelial de la piel facilita la entrada de alérgenos, en modelos animales se ha comprobado que es un factor clave para el desarrollo de otras enfermedades alérgicas como dermatitis, asma, rinitis y CA.<sup>(22, 23)</sup>

Lo que sugiere que los defectos en la función de las barreras epiteliales aumentan la probabilidad de sensibilización a los alérgenos contribuyendo al desarrollo de respuestas inmunológicas sistémicas las cuales provocan enfermedades alérgicas en órganos distintos a donde ocurrió la sensibilización.<sup>(73)</sup>

Otros factores observados que favorecen el desarrollo de enfermedades alérgicas involucran a las características propias de los alérgenos, algunos alérgenos como el ácaro de polvo (Der-p) en específico del grupo 1 (Derp-1) debido a que tienen actividad proteolítica.<sup>(24)</sup>

Se ha reportado que este alérgeno en el epitelio pulmonar, genera alteración en su arquitectura y permeabilidad ya que produce proteasas las cuales digieren moléculas de adhesión celular (occludina y claudina)<sup>(25, 26)</sup> lo que favorece el paso de los alérgenos través de la barrera epitelial.

En los ojos, sugiere que una vez que estas moléculas superen las barreras mecánicas como el parpadeo y la película lagrimal un mecanismo similar podría estar ocurriendo ya que también se ha descrito la presencia de estas moléculas de adhesión en el epitelio conjuntival humano, sin embargo, hasta la fecha solo se ha reportado que el Derp-1 promueve la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8.<sup>(27) (28)</sup>

También es importante mencionar la capacidad de los alérgenos de iniciar una respuesta inmunológica a través de la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PPRs), en específico por medio de una familia de glicoproteínas llamadas receptores tipo Toll (TLR), los cuales reconocen una gran variedad de moléculas de bacterias, virus y protozoarios, así como moléculas de daño celular.<sup>(29)</sup>

Las células de la superficie ocular expresan una amplia variedad de TLRs, particularmente el TLR-4 en conjunto con el antígeno linfocitario 96 (MD-2) identifican al LPS, en el contexto de alergia el Derp-2 es una estructura presente en el ácaro de polvo el cual tiene una estructura homóloga al MD-2 por lo que interacciona con el TLR-4 facilitando su activación.<sup>(29)</sup>

En modelos murinos de asma se ha observado que en el epitelio pulmonar la interacción Derp-2/TLR-4 desencadena la inducción de la expresión de mediadores activadores y atrayentes de DCs como la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), IL-33 e IL-25. Las cuales favorecen la polarización de la respuesta inmunológica hacia el perfil Th2, sin embargo, se tienen pocos conocimientos de su participación en la fisiopatología de la alergia ocular.<sup>(30, 31)</sup>

Se ha demostrado que en un modelo murino experimental de CA posterior al reto tópico con un agonista de TLR-4 como los alérgenos del polén de la ambrosía las células epiteliales producían TSLP, esta molécula interactúa con su receptor (TSLPR) presente en las DCs CD11c<sup>+</sup> lo que favorece la activación el eje TSLP-TSLPR-OX40-OX40 en linfocitos T naive promoviendo así la producción de IL-4.<sup>(32)</sup>

También se ha demostrado que en epitelio conjuntival de ratones la sobreexpresión de IL-33 favorece el desarrollo de conjuntivitis alérgica caracterizada por infiltración eosinofílica, sin queratitis y la expresión de IL-4, IL-13 e IL-5.<sup>(33)</sup> Es importante mencionar que en modelos murinos de alergia ocular, no se ha identificado la producción de IL-25 por parte del epitelio conjuntival.<sup>(34)</sup>

También ha reportado que en el epitelio cutáneo así como en la mucosa bronquial, nasal y conjuntival contienen células presentadoras de antígeno (APCs) las cuales captan alérgenos a través de varios mecanismos como 1) endocitosis a través de la expresión de PPRs y en específico de TLRs, 2) macropinocitosis y 3) fagocitosis.<sup>(35)</sup>

Por medio de estos mecanismos las DCs capturan y procesan alérgenos para posteriormente migrar hacia los ganglios linfáticos, esto último lo realizan mediante la expresión de CCR7 el cual responde quimiotácticamente a un gradiente de CCL19/21 establecido por células endoteliales linfáticas locales y vénulas de endotelio alto, respectivamente.<sup>(36)</sup>

Esta migración de las DCs al área rica de linfocitos T tiene la finalidad de presentarles los antígenos procesados a través de la molécula de histocompatibilidad clase II (MHC-II) al receptor de los linfocitos T (TCR) *naive* y de activarlos por medio de la interacción de moléculas de coestimulación, lo que da como resultado la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-13.<sup>(36-39)</sup>



El microambiente generado favorece la polarización de la respuesta inmunológica hacia el perfil Th2 ya que promueve la activación de linfocitos T y el cambio de isotipo de IgM a IgE por parte de los linfocitos B. <sup>(40)</sup>

La IgE secretada se difunde localmente, entra a los vasos linfáticos para posteriormente incorporarse a la sangre y distribuirse sistémicamente. La IgE se une a sus receptores de alta y baja afinidad (FcεRI y FcεRII, respectivamente, por sus siglas en inglés) encontrados en la membrana superficial de los mastocitos, basófilos y células dendríticas de todo el cuerpo.<sup>(41, 42)</sup> Y cuando el individuo se re-expone al alérgeno, ocurre la fase efectora.

- **Fase efectora**

Esta fase se subdivide a su vez en temprana y tardía.

La fase temprana ocurre cuando el sujeto previamente sensibilizado se reencuentra con el mismo alérgeno, este se es captado por la IgE localizada en la membrana del mastocito y desencadena su desgranulación, liberando: histamina, triptasa, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, factores activadores de plaquetas y quimiocinas.<sup>(43)</sup>

Los efectos clínicos de la fase efectora temprana en pacientes con CA han sido observados de 20 a 30 minutos posteriores al reto conjuntival con algún alérgeno, debido a que estos factores estimulan las terminaciones nerviosas, aumentan la permeabilidad y vasodilatación de vasos sanguínea y reclutan células inflamatorias clínicamente en estos pacientes se observa prurito ocular, edema, hiperemia, exudado y epífora.<sup>(44-46)</sup>

Se ha observado que las DCs de pacientes con CA expresan en su superficie celular altos niveles de receptores para IgE, se sugiere que estos altos niveles de receptores mejoran la captura, internalización y presentación de alérgenos ya que en ensayos *in vitro* realizados en monocitos se ha observado que su presentación antigénica a linfocitos T es 1000 veces más eficiente si el alérgeno fue internalizado por medio de FcεRI.<sup>(47, 48)</sup>

Por lo que se sugiere que las DCs conjuntivales tienen una función parecida a lo estudiado en DCs pulmonares la cuales reestiman a los linfocitos T efectores residentes en el tejido pulmonar a través de la presentación antigénica y de la expresión de moléculas de coestimulación activadoras como CD86.<sup>(49)</sup>

La fase efectora tardía se caracteriza por la presencia en la lágrima de IL-4, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y por la proteína catiónica de eosinófilos (ECP) los cuales generan infiltración y activación de eosinófilos, neutrófilos, basófilos, linfocitos T, células epiteliales y fibroblastos en la conjuntiva<sup>(45, 50-52)</sup>

Esta fase comienza de las 4 a 24 horas posteriores al reto conjuntival, se ha demostrado IL-4 y TNF-α son sintetizadas por los mastocitos y aumentan la expresión de receptores de superficie de IgE de las células cebadas así como la expresión de

moléculas de adhesión intercelulares-1 (ICAM-1), RANTES, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), IL-1 e IL-6 en las células epiteliales conjuntivales, en los fibroblastos aumenta la expresión de eotaxina favoreciendo principalmente la quimiotaxis de eosinófilos los cuales sintetizan a ECP.<sup>(44, 53-56)</sup>

Durante esta fase también se expresan citocinas del perfil Th1, como interferón IFN- $\gamma$ , se sugiere que en el humano contribuye en la inflamación ocular y perpetuación de la reacción de fase tardía de forma similar a lo que se ha descrito en modelos de animales.<sup>(6, 57, 58)</sup>

La respuesta inmunológica crónica también activa mecanismos inmunológicos que regulan la inflamación como los linfocitos T reguladores (*Tregs*) y linfocitos B reguladores (*Bregs*) los cuales secretan IL-10, esta citocina tiene efectos inmunosupresores y antiinflamatorios.<sup>(59)</sup>

Se ha descrito que la frecuencia y función de estas poblaciones reguladoras se encuentra afectada o alterada en pacientes con enfermedades alérgicas en comparación con sujetos sin alergia.<sup>(60-62)</sup>

En sangre periférica de pacientes con CA se ha demostrado que hay un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4+/CCR4+/CCR9+.<sup>(63)</sup> CCR4 induce la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13, en cambio, CCR9 regula la migración de linfocitos T. También se observó una disminución de los linfocitos en la frecuencia de linfocitos T reguladores CD4+/CD25+/FOXP3+ (*Tregs*) de sangre periférica de pacientes con CA, esto último en modelos murinos se ha correlacionado con exacerbaciones en las enfermedades alérgicas oculares.<sup>(63-67)</sup>

Recientemente en un modelo murino de neuroinflamación autoinmune describió que la inducción de los *Tregs* se encuentra controlada por un subconjunto de linfocitos B que expresan IL-10 (*Bregs*).<sup>(68)</sup>

Un estudio reciente no observó diferencias significativas en la frecuencia de CD19+IL10+ de sangre periférica de sujetos con CA comparados con sujetos sanos, sin embargo, en estudios *ex vivo* se observó una disminución en la intensidad media de fluorescencia de IL-10 con un aumento en la expresión de TNF- $\alpha$ , lo cual sugiere que este cambio en las concentraciones de estas citocinas podría promover un ambiente proinflamatorio local.<sup>(69)</sup>

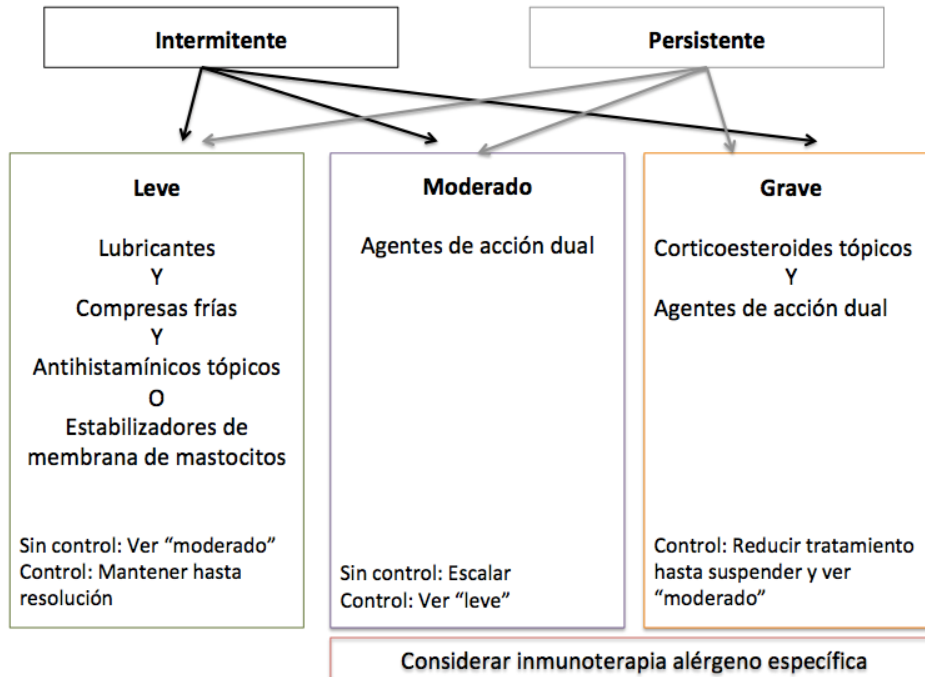
## Capítulo 3 Tratamiento

El manejo óptimo de la CA incluye la evitación de alérgenos, medidas farmacológicas y el uso de inmunoterapia alérgeno específica (AIT, por sus siglas en inglés).<sup>(70, 71)</sup>

En el tratamiento de la CA el primer enfoque tiene como objetivo prevenir o minimizar el contacto con el alérgeno, por medio de medidas no farmacológicas, entre las cuales se encuentran: usar compresas frías sobre los párpados, lavar con frecuencia la ropa de cama, alfombras y tapetes, usar lentes protectores durante las actividades diarias.<sup>(72)</sup>

Actualmente se encuentran disponibles una gran variedad de agentes oftalmológicos para el control de la CA (Ej, lubricantes, corticoesteroides, antihistamínicos y estabilizadores de membrana). Sin embargo, el uso de uno o más de estos tratamientos es limitado por la baja tolerancia a las gotas oftalmológicas, dificultad de su administración de forma estéril, falta de apego al tratamiento, falta de control de los síntomas y es importante mencionar que el uso crónico de algunos de estos agentes, pueden generar reacciones adversas irreversibles como la formación de catarata y glaucoma.<sup>(73)</sup>

Por otro lado, la AIT se comienza a considerar en los casos moderados y graves de la CA cuando los síntomas y síntomas no se han podido controlar con las medidas no farmacológicas y farmacológicas.<sup>(74)</sup>



**Figura 3.1 Tratamiento de la CA**

Tomado y modificado de Sánchez-Hernández MC, et al. 201

- **Inmunoterapia antígeno desensibilizante**

A diferencia de los tratamientos previamente mencionados, la AIT es el único tratamiento capaz de restaurar la homeostasis de la inmunidad contra los alérgenos a largo plazo.<sup>(75)</sup>

Es un tratamiento personalizado que consiste en la administración repetida de extractos de alérgenos (identificados por medio de las pruebas cutáneas de Prick) a dosis crecientes por un periodo de tiempo determinado.<sup>(1, 76)</sup> El cual se divide en la fase de inducción y fase de mantenimiento, en la primera se administran dosis crecientes en un corto intervalo de tiempo, después de este periodo el paciente generalmente ha desarrollado suficiente tolerancia al alérgeno como para alcanzar la dosis de mantenimiento en la cual se observan los cambios clínicos e inmunológicos.<sup>(77)</sup>

Se ha observado que previene el desarrollo de la sensibilización a otros alérgenos, reduce los síntomas de la alergia y el uso de medicamentos. Otra característica importante de esta terapia es que su efecto persiste de 2 a 3 años después de haber concluido el tratamiento y mejora la calidad de vida de los pacientes.<sup>(76)</sup> Esta última característica es valorada por medio de cuestionarios de calidad de vida para pacientes con rinoconjuntivitis, en México el único cuestionario validado es el cuestionario de calidad de vida (RQLQ) de E. Juniper *et al.*, 1998.<sup>(16)</sup>

Inicialmente la ruta de administración era la subcutánea (SCIT) sin embargo, debido a que esta vía de administración consiste en múltiples inyecciones y puede asociarse con

efectos secundarios graves como el choque anafiláctico, la vía de administración sublingual (SLIT) se caracteriza por ser más segura y no invasiva.<sup>(78)</sup>

El procedimiento clásico de la administración de la SLIT, es administrarla debajo de la lengua con la boca vacía y mantener durante 1 a 5 minutos para después deglutirla. En estudios detallados de biodistribución de SLIT en modelos murinos, se ha demostrado que incluso en tan poco tiempo, los alérgenos se unen inmediatamente al epitelio, por consecuencia de interacciones electrostáticas con el glucocáliz el cual se encuentra cargado negativamente en la superficie de las células epiteliales.<sup>(79)</sup>

### Mecanismo de acción de la SLIT

El epitelio de la mucosa oral no se encuentra queratinizado,<sup>(80)</sup> lo que lo hace una vía de administración ideal para la adsorción de los antígenos de la SLIT y aprovecha el potencial tolerogénico de la mucosa oral caracterizado por contener bajos números de mastocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos B, así como por la presencia de DCs FcεRI+, CD32B e indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) productoras de IL-10, las cuales favorecen la inducción de respuestas reguladoras por parte de los linfocitos T.<sup>(81, 82)</sup>

Se ha observado una reducción en el reclutamiento y activación de mastocitos, basófilos y eosinófilos en la piel, nariz, ojos y mucosa bronquial.<sup>(75, 83, 84)</sup> Como previamente mencionado la mayor parte de las APCs de la mucosa oral exhiben características morfológicas compatibles con las LC, incluyendo la presencia de los gránulos de Birbeck, también expresan TLR-4 y los receptores tipo I y II para la IgE, lo que facilita la captura de alérgenos en pacientes atópicos.<sup>(85, 86)</sup> cDCs y pDCs han sido purificadas de mucosa oral de modelos murinos y se observó que posterior al procesamiento de antígeno, pueden promover la síntesis de IFN-γ e IL-10, estableciendo una respuesta Th1 y un perfil regulatorio por parte de los linfocitos T,<sup>(87)</sup> otro factor importante para la inducción de tolerancia es la ausencia de señales de daño tisular.<sup>(78)</sup>

Los efectos de esta terapia observados en las moléculas de coestimulación de las DCs se mencionará a detalle en el capítulo No. 4

En la fase de inducción (aproximadamente a los 6 meses de tratamiento)<sup>(88)</sup> ya se puede observar un cambio en las células y mediadores de la inmunidad adaptativa ya que se promueve el desarrollo de Tregs productores de IL-10 y TGF-β, así como una disminución de células y mediadores del perfil Th2 favoreciendo la polarización de la respuesta inmunológica al perfil Th1.<sup>(83, 89, 90)</sup> También se observa una disminución prolongada de los niveles de IgE, así como un aumento de la IgG4.<sup>(91) (92-96)</sup>

### Reacciones adversas

La SLIT en comparación con la SCIT, tiene un excelente perfil de seguridad establecido en niños y adultos.<sup>(97)</sup> Las reacciones adversas asociados a la SLIT suelen ser locales:

picazón oral, edema de la lengua, prurito óptico, irritación de garganta y nasofaringitis. Los cuales se observan en un 40 a 75% de los pacientes y generalmente ocurren durante los primeros minutos posteriores a la aplicación. Por lo tanto se recomienda que la primera administración se realice bajo supervisión médica, seguido de un monitoreo médico por 30 minutos.<sup>(98)</sup>

Por lo que la vía de administración sublingual para la AIT, es un sitio ideal no solo para promover la tolerancia hacia los alérgenos, ya que el antígeno es capturado y procesado por APCs antes de que sufran degradación proteolítica, preservando la integridad de los epítopes, y por otro lado se disminuyen las probabilidades de presentar reacciones adversas sistémicas debido al bajo número de células inflamatorias presentes en la mucosa oral.<sup>(79)</sup>

## Capítulo 4 Células dendríticas

Inicialmente, los científicos se cuestionaban los mecanismos detrás de las respuestas inmunes mediadas por células y desconocían como se introducían los antígenos en el sistema inmune y como esto generaba la inducción de respuestas clonales de linfocitos.<sup>(99, 100)</sup>

En 1974 Steinman identificó una nueva célula en el bazo de ratones, diferente a los macrófagos, que se caracterizaba por tener proyecciones citoplasmáticas con pocos lisosomas en su citoplasma y alta expresión de MHC a las cuales se les denominaron como células dendríticas (DCs).<sup>(101)</sup>

Las DCs son esenciales para la presentación antigénica e iniciar respuestas protectoras de linfocitos T y, por lo tanto, constituyen una defensa de primera línea contra la invasión de patógenos. Las DCs se encuentran en todo el cuerpo formando parte de una sofisticada y compleja red celular que les permite comunicarse con diferentes poblaciones de linfocitos, creando una interfaz entre el entorno externo y el sistema adaptativo. Las DCs son parte del sistema inmune innato porque reconocen y responden a señales asociadas a patógenos y a peligro, dando forma a la respuesta inflamatoria aguda. Su función en la inmunidad adaptativa es procesar proteínas extracelulares e intracelulares, así como presentar antígenos a los linfocitos T, por medio del complejo mayor de histocompatibilidad I y II.<sup>(102, 103)</sup>

En la sangre de humanos, existen principalmente dos subpoblaciones de DCs las cuales se identifican dependiendo de la expresión de marcadores de superficie: a) plasmacitoides (pDCs) y b) DCs convencionales (cDCs). Aunque también se pueden encontrar a las células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs). (Tabla 4.1) (Para mayor información de ontogenia, función y clasificación de DCs ver Anexo 2.)<sup>(104)</sup>

Las DCs representan aproximadamente el 0.2% de las células mononucleares de la sangre periférica humana lo cual genera dificultad para su aislamiento y capacidad de estudiar su participación en modelos de enfermedades, por lo tanto, se utilizan a las MoDCs generadas de forma *in vitro* al añadir IL-4 y GM-CSF a los cultivos de monocitos como modelos de estudio para entender lo que ocurre de forma *in vivo*.<sup>(105, 106)</sup>

**Tabla 4.1 Clasificación y función de las DCs en sangre periférica**

Subpoblación	Marcadores	Función	Referencias
Plasmacitoide	CD123, BDCA2 (CD303), BDCA4 (NRP1), MHCII, CD11c, FCER1, ILT3, ILT7, DR6, TLR7 y TLR9.	Antiviral INF- $\alpha$ (IRF7) TNF- $\gamma$ e IL-6	(103, 107-115)
Mieloide cDC1	BDCA-3 (CD141), MHCII, CD11c, CD11b <sub>low</sub> , CLEC9A, CADM1, XCR1 y CD26.	Presentación cruzada Respuesta Th1	(103, 107, 116, 117)
Mieloide cDC2	BDCA-1 (CD1c), MHC II, CD11c, CD11b, CD2, FCER1, SIRPA, ILT1, CLECL4Ay CLECL10A.	IL-12 Respuesta Th1 IL-23 Respuesta Th2 Th17	(102, 103, 118, 119)
Mo-DCs	CD14, CD11c, BDCA-1, MHC II, CD206, SIRPA, S100A8, CD209	Aumentan su expansión en sitios de inflamación	(103, 119)

Células dendríticas convencionales tipo 1; cDC1, células dendríticas convencionales tipo 2; cDC2, Células dendríticas inflamatorias; Mo-DCs.

- **Participación de las células dendríticas en la alergia ocular**

Actualmente se conoce poco sobre el fenotipo, distribución y roles de las DCs que contribuyen a la fisiopatología de la reacción de hipersensibilidad tipo 1 de la superficie ocular.<sup>(120)</sup>

En el año 1993, McCallum *et al.*, identificaron células presentadoras de antígeno MHC-II+ en el tejido conjuntival.<sup>(121)</sup>

En el año 1997, Baudouin y colaboradores obtuvieron muestras de tejido conjuntival mediante citología de impresión con la finalidad de evaluar el fenotipo de las APCs presentes en la conjuntiva de sujetos sanos y pacientes con CA, observaron una población heterogénea de APCs en la cual la mayoría de las células expresaron HLA-DR, CD1a, CD11a, CD11c, CD18 así como en algunas ocasiones CD14<sup>(122)</sup> lo que sugiere que las células conjuntivales dendriformes también se pueden originar de monocitos de sangre periférica.<sup>(123)</sup>

En este mismo año Ayako Yoshida y colaboradores, identificaron LC con fenotipo IgE/CD1a en la conjuntiva de pacientes con dermatitis atópica que presentaban algún tipo de manifestación alérgica ocular.<sup>(124)</sup>

Abu El-Asrar y colaboradores en el año 2001, identificaron en las capas basales y superficiales de biopsias conjuntivales de pacientes con CA la presencia de LC CD1a+<sup>(125)</sup> En el año 2009, Manzouri y colaboradores identificaron que en pacientes con VKC presentaban en el epitelio y sustancia propia superficial de la conjuntiva un mayor número de DCs CD1a+ Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  que el grupo de sujetos sanos.<sup>(48)</sup>



En experimentos de modelos murinos se induce la alergia ocular mediante la sensibilización en la base de la cola o en la almohadilla plantar a alérgenos como ovoalbúmina o polen de ambrosía. Posteriormente de 7 a 15 días se aplican los retos tópicos conjuntivales, lo que induce la fase efectora de la alergia ocular.<sup>(126-128)</sup>

Sin embargo, solo existe un reporte de un modelo murino de CA en la literatura en el que se ha fenotipificado y evaluado la distribución de los diferentes subconjuntos de DCs presentes en el tejido conjuntival, en el cual se identificó que en la conjuntiva del grupo control las mDCs (CD11c+ CD11b+) se encontraban principalmente en la capa subepitelial y sustancia propia, las LC (Langerin+ CD11c+) se encuentran en la capa epitelial y subepitelial en cambio no encontraron pDCs (CD11c+ mPDCA-1+) en ninguna de las capas estudiadas. En cambio, cuando se estudiaron los cambios histológicos a las 24 y 72 horas posteriores al reto tópico, se observó que en la capa subepitelial aumentó progresivamente el número de mDCs y pDCs pero no de LC. Esto indica que los diferentes subconjuntos de DCs pueden tener un papel en los procesos inflamatorios de la alergia ocular.<sup>(120)</sup>

- **Características de las moléculas de coestimulación de la familia B7 y su participación en la alergia.**

Las APCs coordinan la polarización de la respuesta inmunológica por medio de tres señales, las cuales se encuentran involucradas en la activación de los linfocitos T.<sup>(129)</sup>

Señal 1: Activación específica del antígeno proporcionada por la interacción de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) en el cual presenta una molécula peptídica al receptor de células T al linfocito T CD4+. Esta señal se caracteriza por ser de baja afinidad por lo que necesita la presencia de la segunda señal.<sup>(129)</sup>

Señal 2: La interacción de las moléculas de coestimulación presentes en la membrana superficial de las DCs con los sus receptores expresados en los linfocitos T en los cuales se inducen vías de activación o inhibición.<sup>(130)</sup>

Señal 3: Se caracteriza por la secreción de citocinas por parte de las DCs, las cuales van a polarizar hacia los diferentes perfiles de la respuesta inmunológica.<sup>(131)</sup>

En este interactivo microambiente, la segunda señal, caracterizada por la expresión de manera espaciotemporal superpuesta de diversas moléculas de coestimulación expresadas por las DCs, son clave para regular los procesos de activación o inhibición, supervivencia y polarización de los linfocitos T. Se ha observado que estas moléculas de coestimulación están implicadas en casi todas las enfermedades inflamatorias y que sin esta señalización, generalmente se induce un estado muerte celular o anergia en los linfocitos T.<sup>(130)</sup>

En la actualidad, las moléculas de coestimulación han sido estudiadas de forma individual o en pares en diferentes líneas celulares en algunos procesos alérgicos como

rinitis alérgica, asma y en pocos casos en CA son: CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), ligando de coestimulador inducible (ICOS-L/CD275), el ligando 1 de muerte programada (PDL1/B7-H1/CD274) y el ligando 2 de muerte programada (PDL-2/B7-DC/CD273) las cuales pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas.<sup>(132)</sup> (Información detallada de moléculas de coestimulación de la familia B7 en Anexo 3)

- **CD80 y CD86**

B7.2 (CD86) y B7.1 (CD80) son moléculas coestimuladoras de activación las cuales comparten al receptor CD28 del linfocito T lo que genera su activación y proliferación a través de la síntesis de IL-2.<sup>(133)</sup>

Se ha reportado disminución en la proliferación y producción de IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de sujetos sanos al ser cultivados con polen de ambrosía en presencia de anti-CD86, este fenómeno no se presentó en los ensayos con anti-CD80.<sup>(134)</sup>

Se ha reportado que en estudios *in vitro* de linfocitos B y monocitos estimulados con polen de ambrosía de sujetos con atopia existe un aumento en la expresión de CD86 comparado con el grupo de sujetos sanos.<sup>(135)</sup> En un estudio *in vivo* de un modelo murino de asma se observó que la coestimulación por parte de CD80/CD86 en células dendríticas es necesaria solo en la fase de sensibilización.<sup>(49)</sup>

Sin embargo, se ha reportado que APCs CD1a+ presentes en la conjuntiva de pacientes con VKC expresan más CD86 que CD80 comparados con los sujetos sanos, en los cuales no se observan diferencias en la expresión de CD80 y CD86.<sup>(125)</sup> En MoDCs de pacientes con VKC observaron que estas células tenían una mayor expresión de HLA-DR, CD86, CD11c y CD11b.<sup>(136)</sup>

CD86 en las DCs es una molécula de coestimulación importante para el desarrollo de una respuesta inmunológica alérgeno específico efectiva y existe evidencia que sugiere que cuando el paciente se re expone al alérgeno puede haber una regulación positiva de CD86 lo que desempeña un papel crítico en la mediación de la respuesta de hipersensibilidad tipo 1.<sup>(137)</sup>

- **ICOS-L**

Otra molécula de coestimulación de activación involucrada en los procesos alérgicos es el ligando de coestimulador inducible de linfocitos T (ICOS-L, por sus siglas en inglés) la cual se encuentra expresada en monocitos y DCs, se une a su receptor ICOS presente en los linfocitos T.<sup>(138)</sup>

En ratones con asma, esta interacción desempeña un importante papel en la función y supervivencia de los linfocitos T, debido a que participan en el control de la liberación

de citocinas del perfil Th2, en la diferenciación de las células B, y en el cambio de isotipo a IgE.<sup>(139)</sup>

En un modelo murino de asma deficiente de ICOS-L se observó que existe una alteración en la arquitectura de los centros germinales lo que interfiere con la interacción de linfocitos B y T también se observó una disminución en la producción de IgE sérica así como disminución en la producción de IL-4 en cultivos de linfocitos T.<sup>(140)</sup>

Kadkhoda K en el año 2011, en un modelo murino de asma deficiente de ICOS-L se observó una disminución en el infiltrado eosinófilos en el tejido pulmonar. Por otro lado, al analizar los anticuerpos en suero se observó una disminución estadísticamente significativa en los títulos de IgG1, IgG2 e IgE específico. También en ensayos *in vitro* de linfocitos T hubo una disminución en la producción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 comparados con el grupo control.<sup>(141)</sup>

Botturi y colaboradores en el año 2011, observaron que en sujetos con rinitis alérgica y asma la sobreexpresión de ICOS en linfocitos T de sangre periférica estimulados con Derp-1 genera un desequilibrio que favorece la polarización de la respuesta inmunológica a un perfil Th2.<sup>(142)</sup>

Sin embargo, Shen C y colaboradores en el año 2014, caracterizaron el fenotipo y la expresión de ICOS-L en células de la mucosa nasal y en DCs mieloides de sangre periférica (mDCs) de sujetos con rinitis alérgica y en sujetos control. Encontraron que la expresión de ICOS-L de sujetos con rinitis alérgica, tanto en la sangre como en el tejido nasal era menor que la de los sujetos control.<sup>(143)</sup>

Posteriormente, Maazi y colaboradores en el año 2015, observaron que al bloquear *in vitro* el eje ICOS/ICOS-L en linfocitos innatos tipo 2 (ILC2) de humanos disminuye la síntesis de IL-5 e IL-13.<sup>(144)</sup>

- **-PD-L1**

El ligando 1 de muerte programada (PD-L1/CD274) es un ligando de PD-1, un miembro de la familia CD28 / CTLA-4, es una molécula de cohibición ya que induce anergia de linfocitos T resultado de la activación de la desfosforilación de cinasas críticas involucradas en la señalización del TCR.<sup>(145, 146)</sup>

En ratones deficientes de PD-1 se ha observado que desarrollan enfermedades autoinmunes debido a una alteración en la tolerancia periférica,<sup>(147)</sup> debido a que PD-L1 regula el desarrollo, mantenimiento y función de Tregs.<sup>(148)</sup>

También se ha observado que en modelos murinos de hipersensibilidad tipo IV, el bloqueo de anti-PD-L1<sup>(149)</sup> aumenta la proliferación de linfocitos T en respuesta al contacto con APCs estimuladas con haptenos y que la sobreexpresión de PD-L1 disminuyen la proliferación y función de linfocitos T CD8+.<sup>(150)</sup>

Por otro lado, en células T asesinas naturales invariantes de murinos de hiperreactividad bronquial, se ha observado que la expresión de PD-L1 inhibe la producción de IFN- $\gamma$ , disminuyendo la hiperreactividad bronquial.<sup>(151)</sup>

En pacientes con rinitis alérgica, se ha reportado que existe una menor cantidad de linfocitos B reguladores CD19+ CD25+IL10+PD-L1+ comparado con los sujetos sanos, también se reportó que en un cultivo *in vitro* de linfocitos B al bloquear la vía PD-1/PD-L1 aumenta la apoptosis de estas células lo que suprime la secreción de IL-10. También analizaron que existe una correlación negativa entre la expresión de PD-L1 en linfocitos B reguladores y el número de linfocitos T efectores.<sup>(152)</sup>

Kalmarzi y colaboradores en el año 2017, observaron una correlación inversa entre la concentración de PD-L1 soluble, la cuenta de eosinófilos en sangre periférica y la gravedad clínica de pacientes con rinitis alérgica.<sup>(153)</sup>

- **PD-L2**

Otra molécula de coestimulación inhibitoria es el ligando 2 de muerte programada (PDL-2/CD273) ya que cuando se une su receptor CD279(PD1), suprime la activación de los linfocitos T y regula la tolerancia de los linfocitos T.<sup>(154)</sup>

En un modelo murino con asma, al aplicar AntiPD-L2 intraperitonealmente antes de los retos se observó un aumento significativo en la hiperreactividad bronquial y eosinofilia en las vías respiratorias y en el lavado broncoalveolar se observó un aumento en la producción de citocinas del perfil Th2.<sup>(155)</sup>

Akbari y colaboradores en el año 2010, en un modelo murino de hiperreactividad bronquial deficiente de PD-L2 encontraron resultados parecidos, ya que estos ratones tenían un aumento significativo de la hiperreactividad bronquial, y en ratones control al bloquear de forma *in vitro* la función de iNKT con un anticuerpo antiPD-L2 se observó un aumento en la producción de IL-4.<sup>(151)</sup>

En un modelo murino experimental de CA se observó que posterior al tratamiento con anti-PD-L2 en la fase de inducción generaba un aumento en la producción de citocinas del perfil Th2 en el suero y el mismo tratamiento pero administrado durante la fase efectora incrementaba en el infiltrado de eosinófilos en la conjuntiva.<sup>(156)</sup>

Al analizar los determinantes transcripcionales que permiten a las células dendríticas maduras modular respuestas tolerogénicas, se encontró que el factor de transcripción regulador de interferón 4 (IRF-4), en modelos murinos promueve la generación de células T reguladoras, y en células dendríticas derivadas de médula ósea deficientes de IRF4, la expresión de PD-L2 se redujo severamente.<sup>(157)</sup>

- **Inmunoterapia alérgeno específica y moléculas de coestimulación de la familia B7.**

Como previamente comentado, la AIT es el único tratamiento capaz de modificar la fisiopatología de la alergia. Estudios recientes han estudiado de forma individual o en pares a las moléculas de coestimulación de la familia B7 en pacientes con asma y rinitis alérgica en tratamiento con AIT, lo que ha proporcionado una nueva visión de los efectos de este tratamiento.<sup>(158)</sup>

Wang *et al.*, en el año 2013, evaluaron que la expresión de CD86 en MoDCs de pacientes pediátricos con asma alérgicos al ácaro de polvo se encontraba aumentada comparado con la expresión en sujetos control. Posterior al tratamiento con inmunoterapia los valores de la expresión de CD86 en sujetos alérgicos era parecida a la de los sujetos control en los cultivos de MoDCs estimulados con LPS.<sup>(159)</sup>

Piconi y colaboradores en el año 2007, evaluaron el efecto de la AIT sobre la expresión de las moléculas de coestimulación CD28, CTLA-4 y B7H1 y la producción de citocinas de linfocitos T de pacientes alérgicos a la betula durante la época de polinización. Los resultados demostraron que en los pacientes alérgicos bajo el tratamiento con AIT existe un aumento del porcentaje de linfocitos T CD28+CD4+ y una disminución en los linfocitos T CTLA4-CD4-, en cambio en los sujetos que no recibieron AIT, se observó un aumento en el fenotipo CD19+/CD80 y CD14+/CD80+. Por otro lado, el porcentaje de CD19+CD86+ y CD14+CD80+ en APCs aumentó significativamente en pacientes alérgicos que no recibieron AIT, en cambio se observó un aumento de CD14+B7-H1+ y CD19+B7H1+IL10+ en los cultivos de pacientes que recibieron AIT.<sup>(158)</sup> Concluyendo que hay mayor susceptibilidad de activación del sistema inmunológico en pacientes alérgicos sin tratamiento alérgeno-específico.

Por otro lado, otro equipo de investigación evaluó que el porcentaje de linfocitos T ICOS+ de pacientes con alergia al veneno de abeja que habían terminado su tratamiento con AIT era bajo, el cual aumentó al realizar ensayos *in vitro* de cocultivos de linfocitos T con MoDCs estimulados con veneno de abeja, también se midieron citocinas en el sobrenadante, así como la expresión de ICOS-L en la membrana superficial de MoDCs. Se observó un aumento en IL-4, IL-5 e IL-10 en el sobrenadante de los cocultivos. Los MoDCs expresaron altos niveles de ICOS-L, CD80, CD86 y CD83. También observaron que al añadir IL-10 a los cocultivos de pacientes antes del tratamiento con AIT la expresión de ICOS en linfocitos T se inhibe en cambio al final del tratamiento la expresión de ICOS se reduce.<sup>(160)</sup>

# Capítulo 5 Metodología

- **Planteamiento del problema**

En la actualidad, la SLIT es el único tratamiento capaz de modificar la fisiopatología de la conjuntivitis alérgica, no obstante, se conoce muy poco acerca del uso de la SLIT y la inducción de mecanismos tolerogénicos en las células de la inmunidad innata por medio de moléculas de coestimulación de la familia B7 y del factor de transcripción IRF-4 presentes en las APC de pacientes con conjuntivitis alérgica.

- **Pregunta de Investigación**

En pacientes con conjuntivitis alérgica, ¿Se modificará la expresión de moléculas de coestimulación y del factor de transcripción IRF4 en las células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs) de sangre periférica durante el tratamiento con SLIT comparado con la expresión de estas moléculas antes del tratamiento?

- **Justificación**

La SLIT en la CA es la única terapia capaz de modificar la respuesta inmune al alérgeno. Actualmente las moléculas de coestimulación de la familia B7 y el factor de transcripción IRF4, han sido estudiados de forma individual o en pares en diferentes líneas celulares en algunos procesos alérgicos como rinitis alérgica, asma y en pocos casos en CA por lo que el estudio de estas moléculas antes y durante el tratamiento con SLIT proporcionará conocimientos para entender de una mejor manera el mecanismo de acción de la SLIT y proponer biomarcadores para el monitoreo de la eficacia de este tratamiento.

- **Hipótesis**

El tratamiento con SLIT disminuirá la expresión de CD86 e ICOSL, incrementará la expresión de PD-L1, PD-L2 y el factor de transcripción IRF4 en MoDCs de pacientes con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con SLIT.

Hipótesis nula:

No existen diferencias en la expresión de moléculas de MoDCs de pacientes con conjuntivitis alérgica tratados con SLIT.

- **Objetivos**

Objetivo general:

Evaluar la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y el factor de transcripción IRF4 en MoDCs de sangre periférica de pacientes con conjuntivitis

alérgica antes y después del tratamiento con SLIT.

Objetivos específicos:

Los objetivos del estudio se dividirán en dos partes:

### **Primera parte del protocolo: Sujetos adultos sin alergia.**

-Objetivo 1: Identificar el tiempo y concentración óptimo de estímulo para evaluar la expresión de las moléculas de coestimulación CD86, ICOSL (activadoras) PD-L1, PD-L2 (inhibitorias) y el factor de transcripción IRF4 en células dendríticas derivadas de monocitos de sujetos adultos sin alergia

-Objetivo 2: Determinar las concentraciones de citocinas IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 en los sobrenadantes de los cultivos de MoDCs mediante la realización de ensayos a distintos tiempos y concentraciones de estimulación con LPS.

### **Segunda parte del protocolo: Sujetos sin alergia y con CA activa de 7 a 17 años.**

-Objetivo 3: Evaluar la expresión de las moléculas de coestimulación CD86, ICOSL (activadoras) PD-L1, PD-L2 (inhibitorias) y el factor de transcripción IRF4 en MoDCs de sujetos con conjuntivitis alérgica antes del inicio del tratamiento en comparación con la expresión de estas mismas en sujetos sin alergia.

-Objetivo 4: Evaluar la expresión de las moléculas de coestimulación CD86, ICOSL (activadoras) PD-L1, PD-L2 (inhibitorias) y el factor de transcripción IRF4 en MoDCs de sujetos con conjuntivitis alérgica antes del inicio del tratamiento y al término del sexto frasco de tratamiento con SLIT.

-Objetivo 5: Evaluar el efecto de la administración de SLIT sobre la gravedad de los síntomas y signos en sujetos con CA antes y al término del sexto frasco de SLIT.

-Objetivo 6: Evaluar los cambios en la calidad de vida de sujetos con conjuntivitis alérgica antes del inicio del tratamiento y al término del sexto frasco de tratamiento con SLIT.

- **Diseño**

-Tipo de estudio:

Estudio piloto, longitudinal, antes-después.

-Universo de estudio:

**Primera parte del proyecto:**

Población objetivo/diana: Pacientes Sujetos de 20 a 30 años aparentemente sanos.  
 Población accesible/estudio: Sujetos de 20 a 30 años aparentemente sanos reclutados durante el periodo de diciembre del 2018 a julio del 2019.

**Segunda parte del proyecto:**

Población objetivo/diana: Pacientes en edad pediátrica con conjuntivitis alérgica.  
 Población accesible/estudio: Pacientes con conjuntivitis alérgica de 7 a 17 años, que sean atendidos en el Instituto Conde de Valenciana durante el periodo de julio del 2019 a febrero del 2020.

-Tamaño de muestra:

El tamaño de muestra para los individuos sin alergia adultos se realizó por conveniencia.

Para los sujetos pediátricos con CA se calculó el tamaño de muestra tomando como referencia el trabajo de Angelini, Federica, et al., 2010 ya que explora los cambios en la expresión de la molécula CD86 antes y después del tratamiento con SLIT. Se utilizó la fórmula para comparación de medias:

$$n = 2 \left[ \frac{(Z_{\alpha} - Z_{\beta}) DE}{\mu_1 - \mu_2} \right]^2$$

Se tomaron en consideración los siguientes supuestos: significancia de alfa de 0.05, un valor de beta menor a 0.2, desviación estándar de 68.9 MFI, valor de u1 de 202.7 MFI, valor de u2= 99.3 MFI.

Se estima un cálculo de tamaño de muestra de 4 sujetos de experimentación por grupo y estimando una pérdida del 20%, se considera un tamaño de muestra de 5 individuos.

• **Variables**

Variable	Definición conceptual	Definición Operativa	Tipo de variable
Grado de gravedad de la CA	Enfermedad inflamatoria de la superficie ocular, desencadenada por el contacto con alérgenos, mediada predominantemente por un mecanismo de hipersensibilidad tipo I	-Leve: 1-12 puntos, - Moderado: 13-24 puntos, - Moderado-grave: 25-36 puntos, -grave 36-48 puntos	Independiente Cualitativa ordinal
Inmunoterapia sublingual	Tratamiento personalizado que consiste en la administración sublingual de dosis	Antes y durante	Independiente Cualitativa dicotómica



	crecientes de extractos de alérgenos específicos por un periodo determinado de tiempo		
Expresión de las moléculas de coestimulación (activadoras e inhibitorias) en MoDCs	PD-L1 PD-L2 ICOS-L CD86	Índice Medio de Fluorescencia	Dependiente Cuantitativa continua
Expresión de citocinas en sobrenadante	Th1/Th2	pg/ml	Dependiente Cuantitativa continua

- **Criterios de selección: Inclusión, exclusión, eliminación para sujetos experimentales:**

Criterios de selección para la primera parte del proyecto:

-Criterios de Inclusión para sujetos adultos sin alergia:

1. Sujetos de 20 a 30 años.
2. Sujetos clínicamente sanos, evaluados por el servicio de inmunología del Instituto Conde de Valenciana.
3. Firma de consentimiento informado.

-Criterios de exclusión para sujetos adultos sin alergia:

1. Presentar cualquier enfermedad sistémica, endocrinológica, autoinmune, neoplásica, infecciosa, crónico degenerativo activa.
2. Embarazo y/o lactancia.
3. Con algún tratamiento sistémico, que induzca algún tipo de modificación en la respuesta inmunológica, particularmente tratamientos: Naturistas, psiquiátricos, bariátricos, corticoesteroides, hormonales o inmunosupresores.

-Criterios de eliminación para sujetos adultos sin alergia:

1. Embarazo y/o lactancia.
2. Retiro voluntario
3. No acuda a la cita

Criterios de selección para la segunda parte del proyecto:

-Criterios de Inclusión para sujetos con CA activa previo al tratamiento con SLIT:

1. Sujetos entre los 7 a 17 años, con diagnóstico oftalmológico de CA activa, de moderada a grave.
2. Pruebas cutáneas positivas al Der-p.
3. Que estén por iniciar tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante.
4. Firma de consentimiento y asentimiento informado.

-Criterios de exclusión para sujetos con CA activa previo al tratamiento con SLIT:

1. Presencia de otras enfermedades inflamatorias de la superficie ocular.
2. Presentar cualquier enfermedad sistémica, endocrinológica, autoinmune, neoplásica, infecciosa, crónico degenerativo activa.
3. Presencia de dermatitis alérgica, rinitis alérgica o asma activa en el momento de la evaluación y/o toma de muestra.
4. Embarazo y/o lactancia.
5. Con algún tratamiento sistémico, que induzca algún tipo de modificación en la respuesta inmunológica, particularmente tratamientos: Naturistas, psiquiátricos y/o bariátricos.

-Criterios de eliminación para sujetos con CA activa previo al tratamiento con SLIT:

1. Embarazo y/o lactancia.
2. Retiro voluntario
3. No acuda a la cita

Criterios de selección para sujetos con conjuntivitis alérgica al término del frasco número 6.

-Criterios de Inclusión para sujetos con CA activa al término del frasco número 6 de SLIT:

1. Sujetos entre los 7 a 17 años, con diagnóstico oftalmológico de Conjuntivitis alérgica activa, de moderada a severa.
2. Pruebas cutáneas positivas al Der-p.
3. Que estén por iniciar tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante.
4. Firma de consentimiento y asentimiento informado.

-Criterios de exclusión para sujetos con CA activa al término del frasco número 6 de SLIT:

1. Presencia de otras enfermedades inflamatorias de la superficie ocular.
2. Presentar cualquier enfermedad sistémica, endocrinológica, autoinmune, neoplásica, infecciosa, crónico degenerativo activa.

3. Presencia de dermatitis alérgica, rinitis alérgica o asma activa en el momento de la evaluación y/o toma de muestra.
4. Embarazo y/o lactancia.
5. Con algún tratamiento sistémico, que induzca algún tipo de modificación en la respuesta inmunológica, particularmente tratamientos: naturistas, psiquiátricos y/o bariátricos.

-Criterios de eliminación para sujetos con CA activa al término del frasco número 6 de SLIT:

1. Embarazo y/o lactancia.
2. Retiro voluntario
3. No acuda a la cita

- **Materiales y métodos:**

-Sujetos experimentales

Para la primera parte del protocolo constará de un grupo:

A) Sujetos adultos sin alergia.

Para la segunda parte del protocolo, los sujetos de investigación, serán divididos en dos grupos:

B) Sujetos con CA activa previo al tratamiento con SLIT

C) Sujetos con CA activa al término del frasco número 6 de SLIT

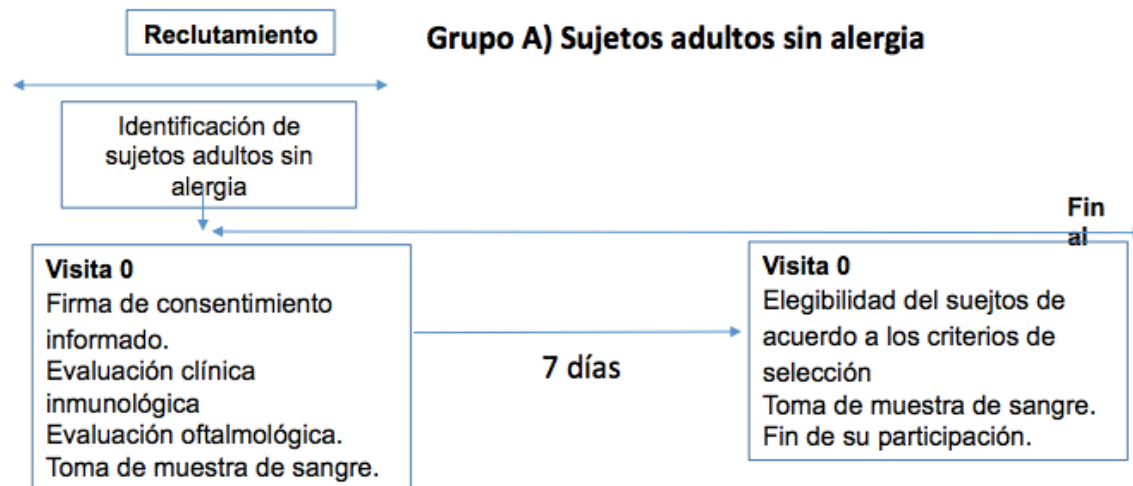
Descripción de la participación de los sujetos:

Grupo A) Sujetos adultos sin alergia:

Los sujetos acudirán en dos ocasiones:

Visita 0: Se realizó la invitación al estudio, se firmó el consentimiento informado, se realizó la historia clínica general y se tomaron de muestras sanguíneas

Visita 1: Se evaluó la elegibilidad del paciente y se tomaron las muestras de sangre para los ensayos, posteriormente se concluyó su participación en el proyecto de investigación. (Ilustración 5.1)



**Ilustración 5.1 Cronograma de la participación de los sujetos del grupo A**

Grupo B) Sujetos con CA previo al tratamiento con SLIT:

Los sujetos acudieron en tres ocasiones:

-Visita 0: El día que el paciente tuvo su consulta programada de seguimiento al servicio de inmunología, se evaluó la elegibilidad de los pacientes de acuerdo a los criterios de selección.

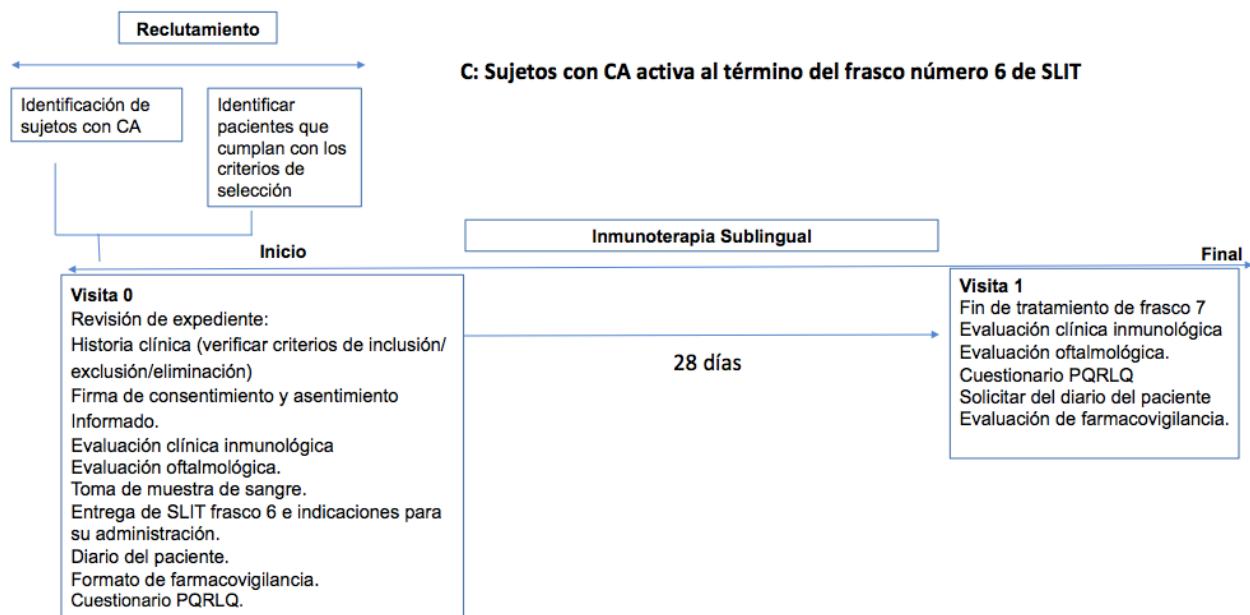
Al paciente y tutor se le explicaron las características del estudio y se realizó la invitación para participar en el mismo.

-Visita 1: Se realizó la inclusión formal de los sujetos ya que se firmaron los consentimientos y asentimientos, se realizó la evaluación clínica (interrogatorio y exploración oftalmológica), se llenaron los cuestionarios de calidad de vida, se realizó la toma de muestra de sangre, se dieron las indicaciones para la administración del primer frasco de SLIT y se explicó y entregó el diario del paciente al sujeto de experimentación.

-Visita 2: Cita de seguimiento al término del primer frasco (28 días) en la cual se recibió y resguardó el diario del paciente, se llenó otro cuestionario de calidad de vida y se realizó una valoración de farmacovigilancia. En esta visita finalizó su participación en el proyecto de investigación. (Ilustración 5.2)

Durante estas visitas la atención médica se realizó sin costo.





**Ilustración 5.3 Cronograma de la participación de los sujetos del grupo C**

- **Metodología específica**

**Valoración clínica de los sujetos de experimentación**

En la consulta de inmunología del Instituto Conde de Valenciana se realizó la evaluación clínica en conjunto por el médico general, médico sub-especialista en alergología y medico sub-especialista en córnea.

Los cuales evaluaron clínicamente a todos los grupos de sujetos de investigación, se les realizó la prueba de Schirmer y se evaluó el tiempo de ruptura lagrimal.

En caso de cumplir con los criterios de selección, se procedió con la toma de muestras de sangre para iniciar con los ensayos experimentales.

1. Clasificación de la gravedad de la CA:

Se evaluó la gravedad de la enfermedad basándonos en la escala de Robles-Contreras *et al.*, 2011. La gravedad de la CA se clasifica en ausente, leve, moderada, moderada/severa y severa. El sistema de clasificación se basa en la evaluación de síntomas y signos a los cuales se les da un valor numérico de la escala del 0 al 4, la puntuación total es de 48 puntos. Este puntaje nos permite definir la gravedad de la CA de la siguiente manera: 0 puntos = Ausente, 1-12 puntos = leve, 13-24 puntos = moderado, 25-36 puntos = moderado/grave y 36-48 puntos = grave. El puntaje del lado más severo en casos bilaterales, es el que se usará para la clasificación de la CA

### 1.3 Prueba de Schirmer:

Se colocó una tira de papel con escala milimétrica en el párpado inferior de cada ojo. Ambas tiras se colocaron simultáneamente y retiraron a los 5 minutos de ser aplicadas. Posteriormente se medirá la cantidad de humedad del papel y se reportará el resultado en milímetros.

### 1.4 Tiempo de ruptura de la película lagrimal:

Se instiló una gota de tetracaína en el fondo de saco conjuntival inferior de cada ojo, se le solicitó al paciente que cerrara los párpados varias veces para su distribución por toda la película lagrimal. Posteriormente el médico oftalmólogo observó por medio de la lámpara de hendidura con filtro azul cobalto la superficie ocular. Se le indicó al paciente que parpadeara y que mantuviera el ojo abierto a explorar, y en ese momento se comenzó a tomar el tiempo hasta que apareció la primera mancha oscura, que indica el rompimiento de la película lagrimal.

### 1.5 Herramientas de evaluación

-Calidad de vida:

Se evaluó la modificación de la calidad de vida mediante la aplicación del cuestionario de calidad de vida en niños/as con rinoconjuntivitis antes de comenzar con el tratamiento y después de terminar el frasco 6 (6 meses de tratamiento). Un cambio en el puntaje del cuestionario igual o mayor a 0.5 se consideró como una modificación clínicamente significativa en la calidad de vida del paciente. (Ver anexo 5)

### **Tratamiento:**

Los sujetos con CA activa antes del tratamiento y al término del frasco 6 de SLIT recibirán los siguientes tratamientos:

-Medidas no farmacológicas:

Lubricante hialuronato sódico gotas oftálmicas al 0.15%, aplicar 1 gota en ojo afectado cada 4 horas.

Usar compresas frías en ojo afectado en caso de presentar síntomas leves de alergia.

-Medidas farmacológicas:

#### **Olopatadina (Tratamiento estándar)**

Descripción del medicamento y posología:

La presentación de ketotifeno consta de un gotero de plástico con etiqueta blanca, que contiene el nombre comercial del medicamento, el nombre del principio activo, fecha de caducidad, e indicaciones generales.

Gotas oftálmicas al 0.025%, se aplicaron 1 gota en ojo afectado cada 24hrs por 1 mes.

## SLIT

La presentación de la SLIT consta de una bolsa de aluminio con una etiqueta blanca que contiene el nombre del paciente, número de gotero y fecha de caducidad; dentro contiene un gotero de plástico con etiqueta blanca que contiene el nombre del paciente, número de gotero y fecha de caducidad. (En el anexo 4 podrán encontrar las fotos representativas).

Se administrará todos los días por vía sublingual en los sujetos con conjuntivitis alérgica siguiendo un esquema terciado hasta alcanzar la dosis máxima de 5 gotas por día. (Tabla 5.1) Cada frasco contiene una dosis diferente de alérgenos. (Tabla 5.2)

**Tabla 5.1 Esquema de administración de SLIT**

1er día	1 gota
2do día	
3er día	2 gotas
4to día	
5to día	3 gotas
6to día	
8vo día	4 gotas
9no día	
10mo día	5 gotas
Hasta terminar	

**Tabla 5.2 Concentración proteica por frasco de SLIT**

	Número de frasco	µg/ml	Duración	Tiempo acumulado
Fase de Inducción	Frasco 1	2.4	28 días	28 días
	Frasco 2	3.2	28 días	56 días
	Frasco 3	4.8	28 días	84 días
	Frasco 4	9	28 días	112 días
	Frasco 5	17	28 días	140 días
	Frasco 6	23	28 días	168 días

Almacenamiento:

Se deberá almacenar en la puerta del refrigerador o en la caja de verduras.

Reacciones adversas:

Percepción del gusto alterado, comezón en los labios, hinchazón de los labios, comezón dentro de la boca, comezón en los oídos, hinchazón de la lengua, ardor en la lengua, úlcera en la lengua, úlcera en la boca, Irritación de la garganta, ronchas,



salpullido en la piel, tos y/o dificultad para respirar, dolor abdominal, vómito, hipotensión arterial y/o desmayo. <sup>(161)</sup>

-Medidas no farmacológicas:

Uso de lubricante ocular hialuronato sódico gotas oftálmicas al 0.15%, aplicar 1 gota en ojo afectado cada 4 horas.

Usar compresas frías en ojo afectado en caso de presentar síntomas leves de alergia.

-Medidas farmacológicas:

#### Olopatadina (Tratamiento estándar)

Descripción del medicamento y posología:

La presentación de ketotifeno consta de un gotero de plástico con etiqueta blanca, que contiene el nombre comercial del medicamento, el nombre del principio activo, fecha de caducidad, e indicaciones generales.

Gotas oftálmicas al 0.025%, se aplicaron 1 gota en ojo afectado cada 24hrs por 1 mes.

-Tratamiento de rescate:

Loratadina, se usó en caso de presentar lagrimeo, fotofobia, prurito ocular y/o ardor ocular importante, así como cualquier sospecha de reacción adversa previamente comentada, bajo el siguiente esquema:

1. Sujetos de 6-12 años: loratadina suspensión 10mg/10ml, tomar 5mg/5ml vía oral cada 12 horas de por 5 días.
2. Sujetos de 13 años a 17 años: loratadina tabletas 10mg, tomar 1 tableta vía oral cada 12 horas de por 5 días.

3.

Se deberá registrar en el diario del paciente la hora de toma, la dosis y la razón por la cual la tomó.

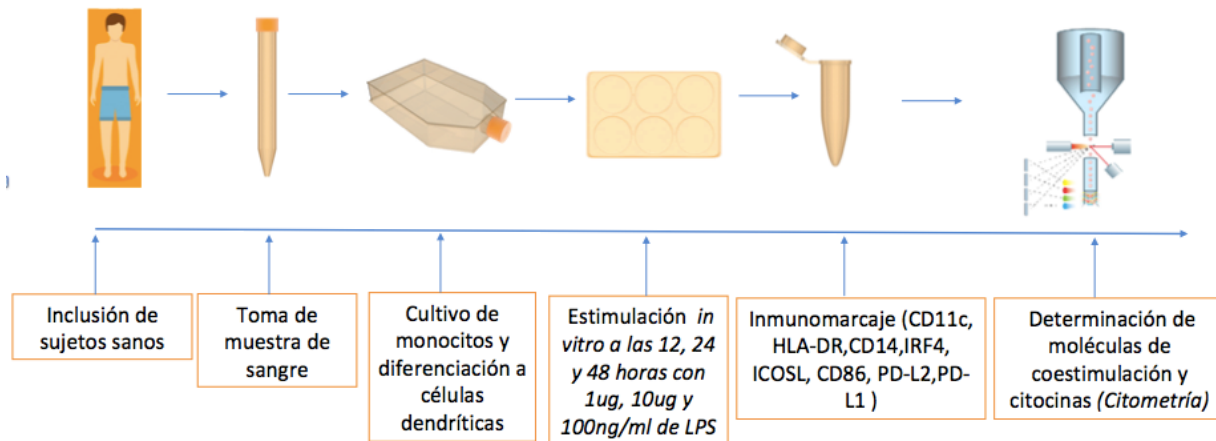
#### **Toma de muestras sanguíneas**

Se realizó extracción de sangre periférica mediante venopunción, la cual se recolectó en: 5 tubos de EDTA y 1 tubo amarillo con gel coagulante.

Las muestras de sangre obtenidas de los tubos EDTA, fueron inmediatamente procesadas (ver "procesamiento de muestras") y las muestras de sangre de los tubos amarillos, se permitió la coagulación durante 30 minutos y posteriormente fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5min, el suero fue recolectado en microtubos de 1.5ml y almacenados en congelación a -20°C.

#### **Procesamiento de muestras**

Metodología del procesamiento de muestras de sangre periférica de tubos EDTA y lágrima (Figura 5.1) de todos los sujetos de experimentación de la primera parte del proyecto (Grupo A):



**Figura 5.1 Metodología del procesamiento de muestras de la primera parte del proyecto**  
Muestras de sangre periférica recolectadas en tubos EDTA. Lipopolisacárido, LPS.

-Cultivo de MoDCs de sangre periférica:

Se usó la sangre recolectada en tubos de EDTA. Se realizó la separación de células mononucleares a partir de sangre periférica, por medio del método de separación por gradiente de densidad con Lymphoprep.

Se cultivaron  $10 \times 10^6$ /ml de células mononucleares por pozo en placas de cultivo de 12 pozos y se colocaron en la incubadora por 2 horas a  $36^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Posteriormente las células en suspensión se desecharon, y a las células adherentes se les añadió medio RPMI-1640 suplementado con 80 ng/ml de GM-CSF y 50 ng/ml de IL-4 para su diferenciación a células dendríticas. Cada dos días se cambió el medio y a los 7 días se les añadió 500ml de tripsina a cada pozo por 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Se realizó conteo celular y se cultivaron  $4.5 \times 10^4$  células por pozo en placas de 24 pozos donde se realizaron los siguientes ensayos:

-Estímulo con LPS (12, 24 y 48 horas con 1ug, 10ug y 100ng).

Brevemente, las células fueron recolectadas y transferidas a microtubos. Los tubos se centrifugaron para la recuperación de los sobrenadantes.

Posteriormente las células fueron re-suspendidas en 300  $\mu\text{l}$  de PBS y transferidas a tubos de 12x75mm. Los tubos fueron centrifugados y decantados. Las células se re-suspendieron en 500 $\mu\text{l}$  de medio RPMI-1640 y se les añadieron los anticuerpos conjugados a fluorocromos, las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a  $4^\circ\text{C}$ . (Tabla 5.3)

**Tabla 5.3 Anticuerpos para el marcaje de antígenos de membrana e intracelulares de MoDCs**

Panel 1	Panel 2
-Alexa Fluor 488 Anti-human CD11c Biolegend™	-Alexa Fluor 488 Anti-human CD11c Biolegend™
-PE/Cy7 Anti-human HLA-DR Biolegend™	-PE/Cy7 Anti-human HLA-DR Biolegend™
-PerCP Anti-human CD14 Biolegend™	-PerCP Anti-human CD14 Biolegend™
-PE Anti-human IRF4 Biolegend™*	-PE Anti-human CD86 Biolegend™
-APC Anti-human CD273 (B7-DC, PD-L2) Biolegend™	-APC Anti-human CD275 (B7-H2, ICOSL) Biolegend™
-Brilliant violet 421 Anti CD274 (B7-H1, PD-L1) Biolegend™	

Para la tinción intracelular de IRF-4, las células fueron tratadas previamente con una solución fijadora y con otra permeabilizante (BD Cytotfix/Cytoperm™ y BD Permwash™, respectivamente).

Se realizó un último lavado y las células fueron re-suspendidas en 300µl de FACS Flow. Los tubos se mantuvieron en oscuridad hasta el momento de su adquisición.

-Análisis de los datos de citometría de flujo de MoDCs:

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACS Verse BD Biosciences™ equipado con la aplicación BD FACSuite™ software Versión 1.0.5.3841.

Los análisis se realizaron en el software Flow Jo V10. Se analizaron las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de las distintas marcas del tratamiento con inmunoterapia sublingual.

Se realizó la siguiente estrategia de análisis para determinar la IMF de las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica:

Se seleccionaron a los singlets (células individuales) usando FSC-H (altura)/FSC-A (área), después dependiendo de su tamaño celular y granularidad usando FSC/SSC en un dot plot biparamétrico, se seleccionaron a las células mononucleares, posteriormente, se identificaron y seleccionaron a las células marcadas con HLA DR, para determinar a partir de esta población el IMF de cada molécula de coestimulación.

-Determinación de citocinas en el sobrenadante:

Se recolectó el sobrenadante de los cultivos de MoDCs estimuladas con LPS y se determinaron las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e IL-17 por Cytometric Bead Array de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

-Determinación de IgE en sangre periférica:

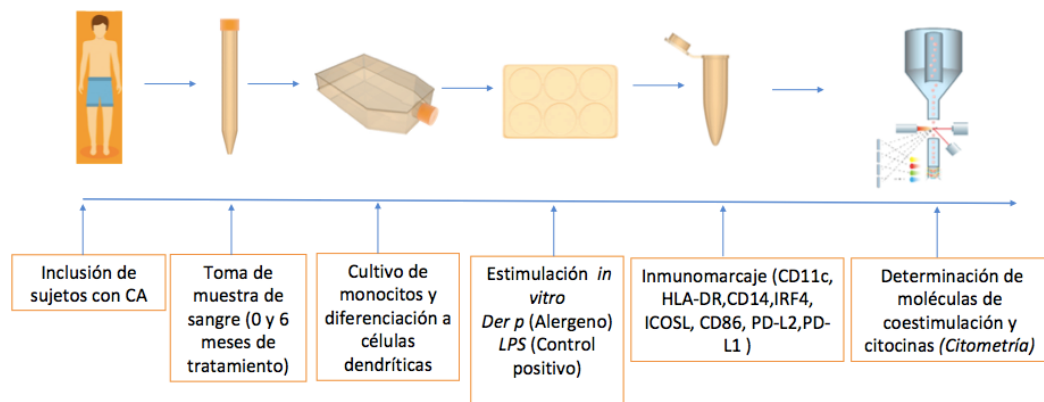
Se descongelarán las muestras de suero previamente almacenadas y se procederá a determinar la concentración de IgE total por medio de ImmunoCap Total IgE Phadia de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Una vez identificado el tiempo y concentración óptima para la expresión de las moléculas de coestimulación en MoDCs, se realizó el reclutamiento de sujetos y procesamiento de las muestras de la segunda parte del proyecto

-Metodología del procesamiento de muestras de sangre periférica de tubos EDTA (Figura 5.2) de todos los sujetos de experimentación de la segunda parte del proyecto (Grupo B y C):

Se realizó la separación de PBMCs, el protocolo de diferenciación de monocitos de sangre periférica a MoDCs como previamente mencionado.

El cultivo de MoDCs de sangre periférica se estimuló con Der-p y LPS, se realizó el marcaje de antígenos de membrana e intracelular de MoDCs como previamente mencionado, se analizaron de los datos de citometría de flujo de MoDCs, y se guardaron a -4 °C para determinar las citocinas en el sobrenadante.



**Figura 5.2 Metodología del procesamiento de muestras de la segunda parte del proyecto.**

Muestras de sangre periférica recolectadas en tubos EDTA. Lipopolisacárido, LPS; Dermatophagoides pteronyssinus, Der-p.

- **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron por estadística descriptiva, dependiendo de la distribución de los datos se presentaron en medias y desviación estándar o medianas y rangos intercuantiles. Las comparaciones de medias de dos grupos se realizaron con T de

Student y en el caso de la comparación de tres grupos se utilizó Kruskal-Wallis. Se consideró una  $p=0.05$  como estadísticamente significativa.

- **Consideraciones éticas**

A todos los sujetos experimentales que decidieron participar en el estudio, se les proporcionó un consentimiento y/o asentimiento informado, los cuales firmaron antes de participar en el estudio. Este protocolo se basa en la NOM 012 SSA3 2012, la cual establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos, la cual concuerda con la norma internacional “Declaración de Helsinki” sobre los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y con el “Protocolo de Estambul”, el cual es el manual para la investigación y documentación eficaces de la tortura y otros tratos o penas crueles, inhumanos o degradantes.

Las consultas médicas de los sujetos no tuvieron ningún costo para los padres o responsables durante el periodo de estudio.

En el caso específico de los sujetos sin alergia, fueron evaluados mediante una consulta médica realizada en la consulta externa del Departamento de Inmunología, en el Instituto Conde de Valenciana y en caso de concluir ausencia de alergia, continuaron en el proceso, y se les realizaron los siguientes estudios de laboratorio: biometría hemática, IgE sérica y eosinófilos en moco nasal; sin costo para los participantes.

En caso de que durante su valoración se determinara que era necesario hacer estudios complementarios que no están descritos en este documento, los participantes, padres o responsables debieron cubrir su costo, ya que no tienen relación con este protocolo y son parte del seguimiento clínico de los pacientes.

- **Aspectos de bioseguridad**

La toma de muestra de sangre y lágrima se llevará a cabo en el área de toma de muestra en el 4to piso del edificio de hospitalización del Instituto Conde de Valenciana de acuerdo al Manual de Procedimientos del Instituto.

Durante la realización de los ensayos experimentales del presente trabajo de investigación, se vigilará el cumplimiento de las siguientes Normas Oficiales Mexicanas (NOM):

-NOM-017-STPS-2008 Para el equipo de protección personal- Selección, uso y manejo en los centros de trabajo.

-NOM-005-STPS-1998. Para las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

-NOM-018-STPS-2000. Para la identificación y comunicación de riesgos por sustancias químicas en los centros de trabajo.

-NOM-087-ECOL-SSA1-2002. (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002). Para la protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos-biológico-infecciosos- clasificación y especificaciones de manejo.

- **Financiamiento y sitio de la investigación**

Fue otorgado por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM y la Unidad de investigación del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" IAP.

- **Declaración de conflicto de intereses de los investigadores**

No existe conflicto de interés.

# Capítulo 6 Resultados

- **Resultados de la primera parte del proyecto.**

Para llevar el cumplimiento de los objetivos de la primera parte del proyecto se realizó un muestreo por conveniencia y se incluyeron 3 voluntarios masculinos sin alergia ocular con un rango de edad de 20 a 30 años, con una mediana (RIQ) de edad de 29 (24-29) (Tabla. 6.1) Los sujetos que tuvieran algún antecedente familiar o personal de atopia, que presentaran enfermedades sistémicas, endocrinológicas, autoinmunes, neoplásicas, infecciosas o crónico degenerativas fueron excluidos del estudio. Los resultados de biometría hemática mostraron recuentos sanguíneos completos dentro de los rangos normales para la edad y sexo. Previo a la valoración clínica y toma de muestras sanguíneas se firmaron los consentimientos informados.

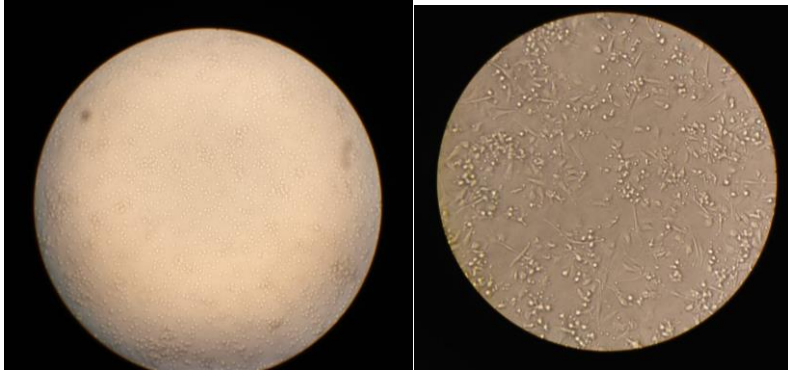
**Tabla 6.1 Características clínicas de los sujetos incluidos.**

Características	Sujetos sin alergia n = 3 (Medianas, IQR)
Edad	29 (24-29)
Sexo	Masculino (2)
IgE total (UI/mL)	14 (13-20)
Eosinófilos en SP	1 (0.5-1.5)
PCP Der-p (mm)	0 (0-0)
Schirmer (mm)	12 (10-15)
Tiempo de ruptura lagrimal (seg)	13 (12-15)

Descripción de medianas (IQR) de las características clínicas de los sujetos incluidos. Sangre periférica, SP; Pruebas cutáneas de Prick, PCP.

## **Morfología**

A los 7 días de cultivo se evaluó la morfología celular por medio de microscopia óptica de campo de claro, la cual permitió observar células grandes y con prolongaciones de la membrana que se extienden en muchas direcciones desde el cuerpo celular, las cuales son características de DCs (Figura 6.1)



**Figura 6.1 Morfología celular de MoDCs**

Morfología celular evaluada por microscopía óptica de campo de claro en el día 0 y día 7 de cultivo 20x

### **Inmunofenotipo**

El análisis del inmunofenotipo se determinó por medio de citometría de flujo con los marcadores de superficie CD14 y HLA-DR. Estos marcadores se evaluaron en las células obtenidas a partir de las PBMCs aisladas de sangre posterior a 2 horas de adherencia a la caja de cultivo y en las células obtenidas a los 7 días resuspendidas en medio RPMI-1640 suplementado con IL-4 y GM-CSF con la finalidad de corroborar su diferenciación.

Se seleccionaron a los singlets usando FSC-H/FSC-A, después mediante un dot plot (FSC/SSC) y dependiendo del tamaño celular y granularidad, se seleccionaron a los monocitos en el día cero y a las MoDCs al día 7, posteriormente se identificaron y seleccionaron a las células marcadas con HLA-DR y con CD14.

Demostrando que las células al día 0 de cultivo tienen elevados niveles de expresión de la IMF del marcador específico CD14 y baja expresión de HLA-DR y posterior a la estimulación con GM-CSF e IL-4, existe una disminución de la expresión del marcador CD14 y un incremento en los niveles de expresión de la HLA-DR. (Figura 6.2)



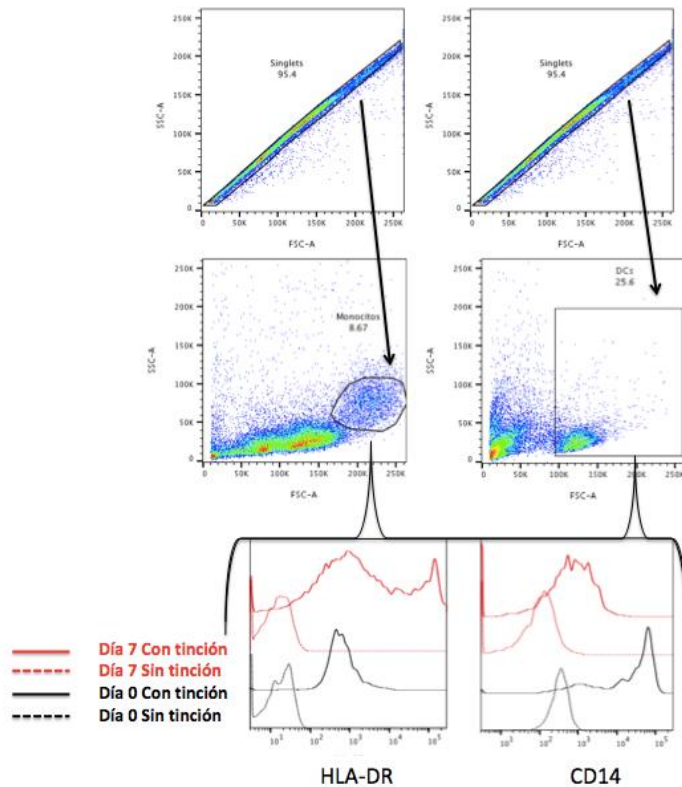


Figura 6.2 Fenotipo celular del día 0 y día 7.

Evaluación del fenotipo celular de las células cultivadas al día 0 y al día 7. A) Singlets. B) Células obtenidas al día 0 (Monocitos). C) Células obtenidas al día 7 (MoDCs). D) Histogramas de la IMF de HLA-DR y CD14 al día 0, (Día 0 sin marca (línea negra discontinua), día 0 con marca (línea negra continua), día 7 sin marca (línea roja discontinua) y día 7 con marca (línea roja continua)). E) Histogramas de la IMF de HLA-DR y CD14 al día 07.

**Resultado de objetivo 1.** Identificar el tiempo y concentración óptimo de estímulo para evaluar la expresión de las moléculas de CD86, ICOSL (activadoras) PD-L1, PD-L2 (inhibitorias) y el factor de transcripción IRF4 en células dendríticas derivadas de monocitos de sujetos adultos sin alergia

Este objetivo se realizó mediante la evaluación de la expresión de las moléculas de coestimulación en MoDCs mediante la realización de ensayos a distintos tiempos y concentraciones (tabla 6.2) de estimulación con LPS ya que se caracteriza por ser un inductor de maduración de DCs.<sup>(162)</sup>

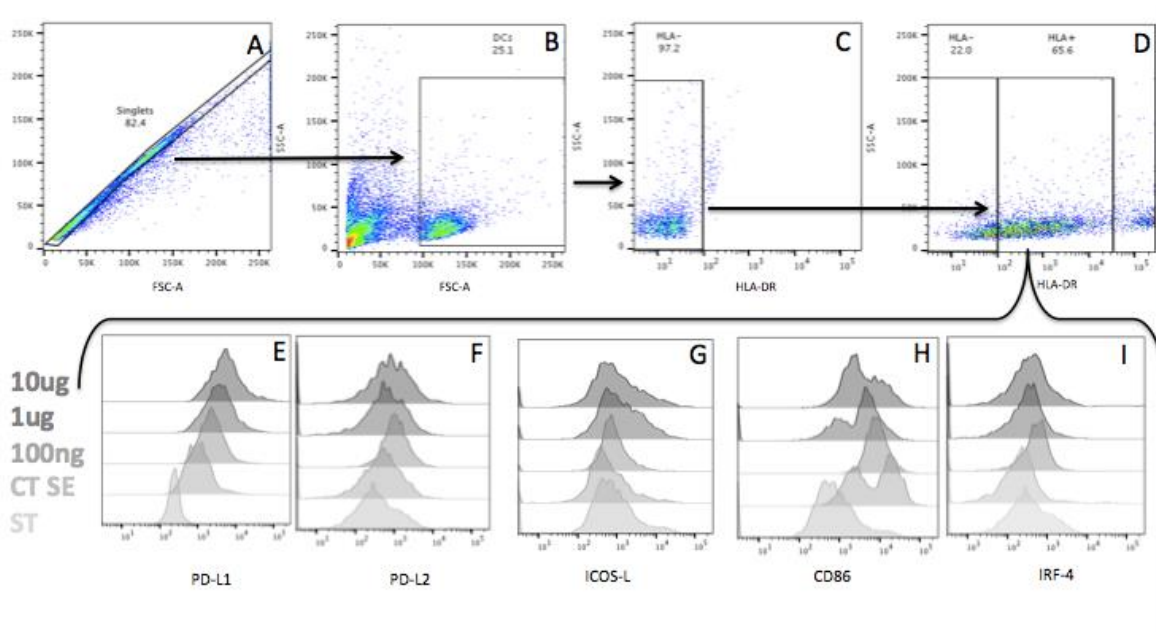
Se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado de cada una de las condiciones.

**Tabla 6.2 Concentraciones y tiempos de estímulo de MoDCs.**

Concentración de LPS	Tiempo
100ng/ml <sup>(163)</sup>	12h, 24h y 48h

1µg/ml <sup>(143)</sup>	12h, 24h y 48h
10µg/ml <sup>(162)</sup>	12h, 24h y 48h

Por medio del software FlowJo V10, se realizó la siguiente estrategia de análisis para determinar la IMF de las moléculas de coestimulación: Primero se seleccionaron a los singlets usando FSC-H/FSC-A, después mediante un dot plot (FSC/SSC) y dependiendo del tamaño celular y granularidad, se seleccionaron a las DCs, posteriormente, se identificaron y seleccionaron a las células marcadas con HLA-DR para determinar a partir de esta población las IMF de PD-L1, PDL-2 y ICOS-L, IRF-4 y CD86. (Figura 6.3)

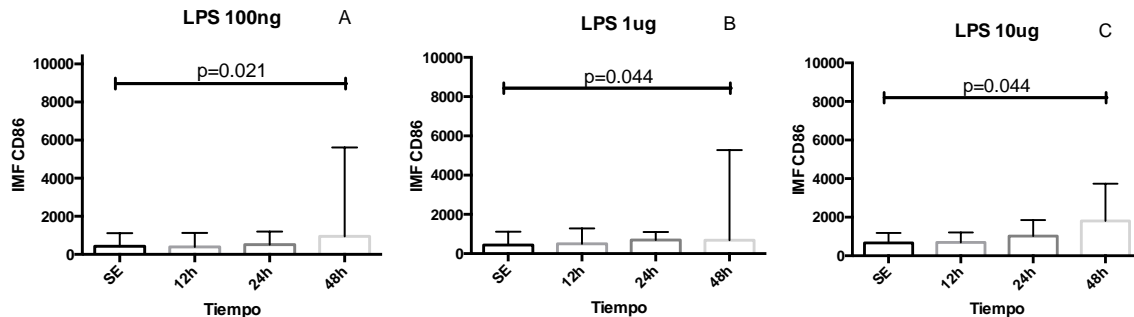


**Figura 6.3 Estrategia de análisis de evaluación de moléculas de coestimulación e IRF-4**

Dot Plot representativo de la estrategia de análisis para la evaluación de las moléculas de coestimulación en MoDCs posterior a su estimulación con diferentes concentraciones de LPS. A) Singlets. B) MoDCs. C) Región de HLA-DR negativo obtenido de células sin tinción. D) Región de HLA-DR positivo de la cual se obtuvo la IMF de E) PD-L1, F) PD-L2, G) ICOS-L, H) CD86 e I) IRF-4.

## CD86

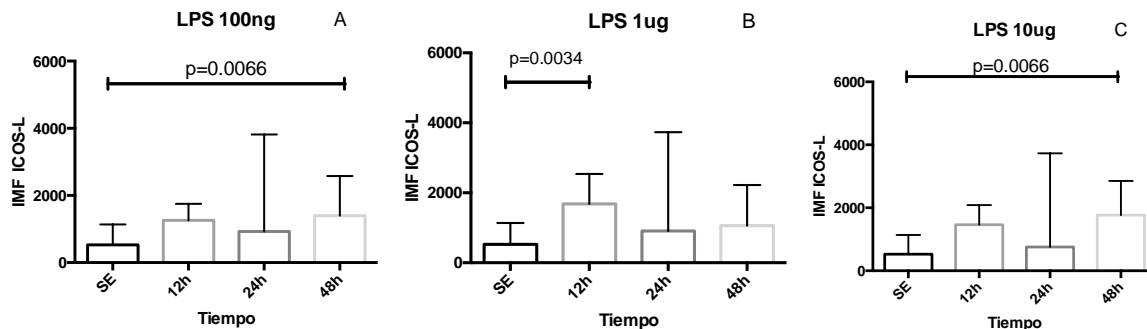
Se observa un incremento significativo de CD86 sin importar la concentración a las 48 horas. (Figura 6.4)



**Figura 6.4 Gráfica de la IMF de CD86 en MoDCs de sujetos adultos sin alergia.** Gráfico de barras de la expresión de CD86 en distintas concentraciones de LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3, cada condición fue evaluada por triplicado. Prueba Kruskal-Wallis

## ICOS-L

En las células dendríticas estimuladas con 100ng y 10ug de LPS se observó que la expresión de ICOS-L aumenta a las 48 horas, y con 1ug aumenta de forma significativa a las 12 horas. (Figura 6.5)

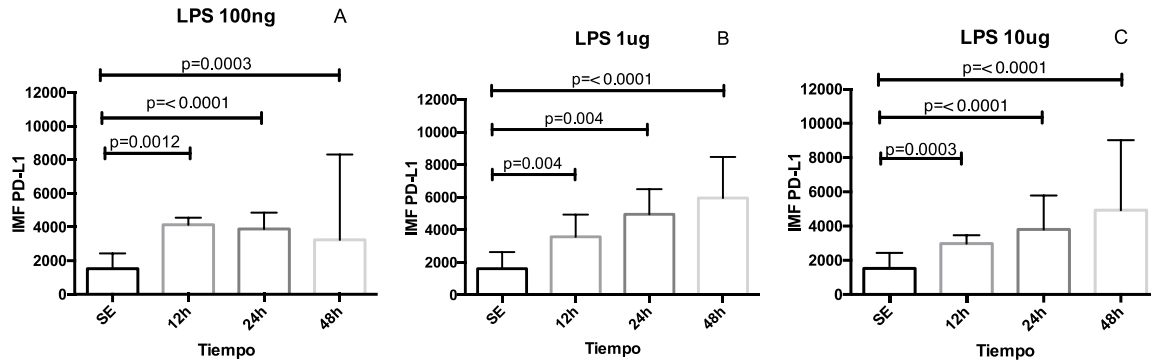


**Figura 6.5 Gráfica de la IMF de ICOS-L en MoDCs de sujetos adultos sin alergia.**

Gráfico de barras de la expresión de ICOS-L en distintas concentraciones de LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3. Prueba Kruskal-Wallis.

## PD-L1

Se observó que PDL1 se incrementó de forma significativa a las 12, 24 y 48 horas con todas las concentraciones evaluadas comparado con las MoDCs sin estímulo. (Figura 6.6)

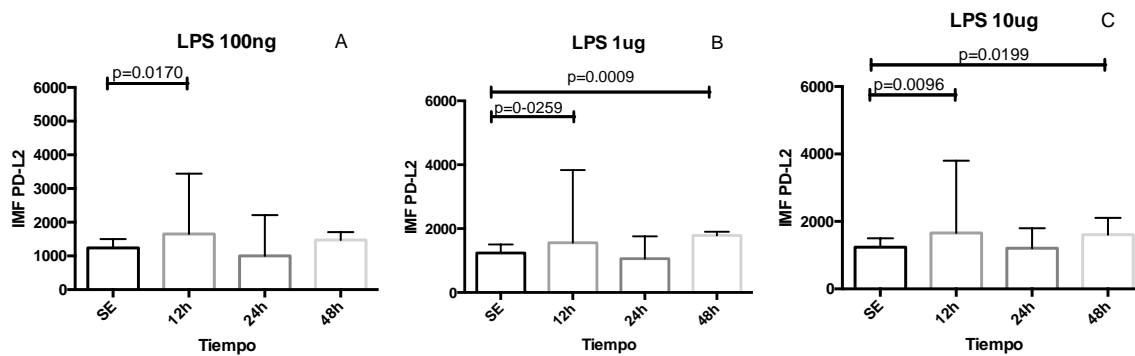


**Figura 6.6 Gráfica de la IMF de PD-L1 en MoDCs de sujetos adultos sin alergia.**

Gráfico de barras de la expresión de PD-L1 en distintas concentraciones de LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3. Prueba Kruskal-Wallis.

### PD-L2

Se observó que hay un aumento a las 12 horas sin importar la concentración usada y con las concentraciones de 1ug/ml y 10ug/ml hay un aumento en la expresión de PD-L2 comparado con las células que no fueron estimuladas. (Figura 6.7)



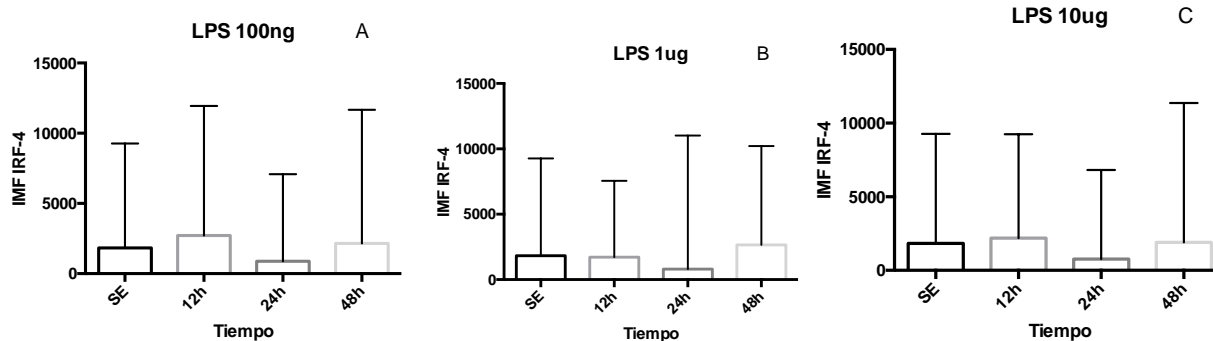
**Figura 6.7 Gráfica de la IMF de PD-L2 en MoDCs de sujetos adultos sin alergia.**

Gráfico de barras de la expresión de PD-L2 en distintas concentraciones de LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3. Prueba Kruskal-Wallis.

### IRF-4

Se analizó la expresión intracelular de IRF-4 posterior a la estimulación de MoDCs con LPS, y se observó que no hay cambios significativos al comparar la misma concentración de LPS en distintos tiempos. (Figura 6.8)

Figura 6.8 Gráfica de la IMF de IRF-4 en MoDCs de sujetos adultos sin alergia.



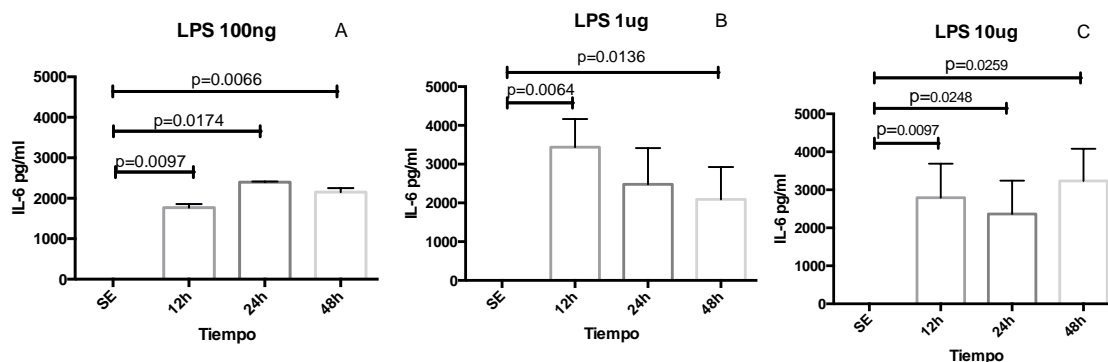
**Figura 6.8 Gráfica de la IMF de IRF-4 en MoDCs de sujetos adultos sin alergia.**

Gráfico de barras de la expresión de IRF-4 en distintas concentraciones de LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3. Prueba Kruskal-Wallis.

**Resultados del objetivo 2:** Determinar las citocinas IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 en los sobrenadantes de los cultivos de MoDCs mediante la realización de ensayos dosis-respuesta a distintos tiempos y concentraciones de estimulación con LPS.

## IL-6

Se analizó la expresión de IL-6 posterior a la estimulación de MoDCs con LPS y se observó que se incrementó significativamente a las 12 y 48 horas con todas las concentraciones evaluadas. Y a las 24 horas aumento de forma significativa en las concentraciones de 100ng. (Figura 6.9)

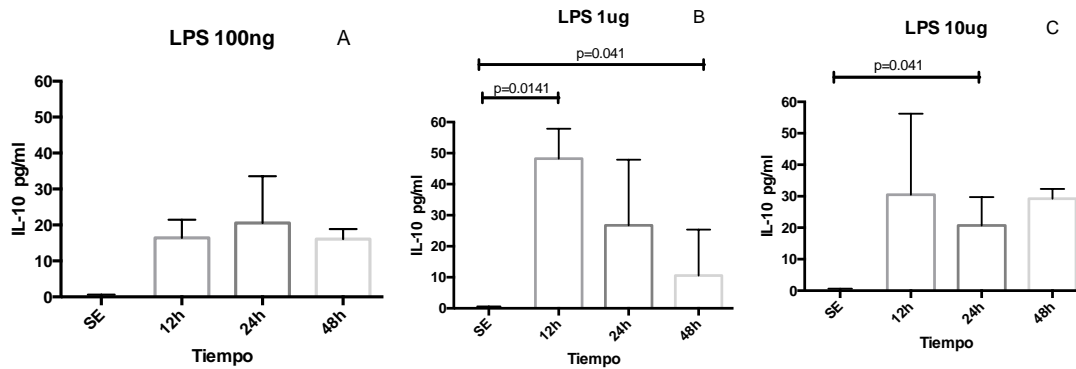


**Figura 6.9 Gráfica de la concentración de IL-6 en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia**

Representación mediante un gráfico barras de la concentración de IL-6 en sobrenadante de MoDCs de individuos sanos estimuladas con LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3. Prueba Kruskal-Wallis.

## IL-10

En los sobrenadantes de MoDCs estimuladas se observó que IL-10 se incrementó a las 12 y 48 horas con 1ug y a las 24 horas aumentó con 10ug comparado con las células que no recibieron estímulo. (Figura 6.10)

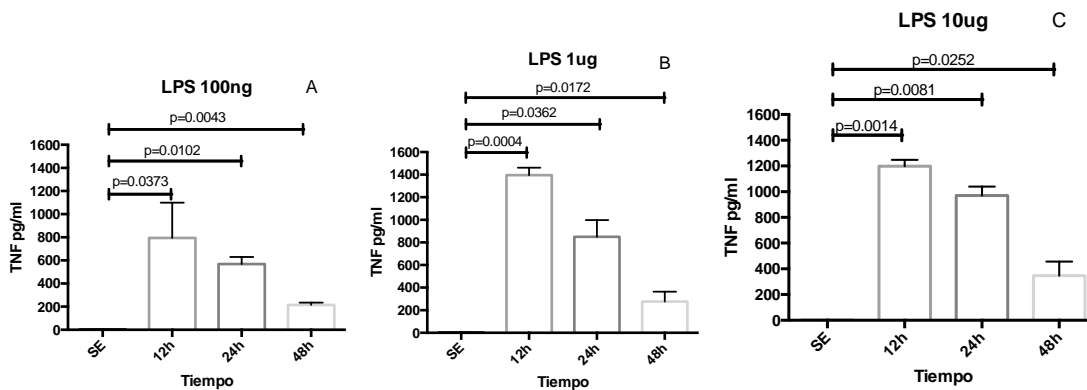


**Figura 6.10 Gráfica de la concentración de IL-10 en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia.**

Representación mediante un gráfico barras de la concentración de IL-10 en sobrenadante de MoDCs de individuos sanos estimuladas con LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3. Prueba Kruskal-Wallis.

## TNF

Existe aumento significativo en todas las concentraciones y horas estudiadas comparadas con las MoDCs sin estímulo. El pico de mayor expresión fue a las 12 horas posterior a esa hora su concentración disminuyó de forma gradual hasta las 48 horas donde se observa la concentración mínima la cual es estadísticamente significativa mayor a las MoDCs sin estímulo. (Figura 6.11)



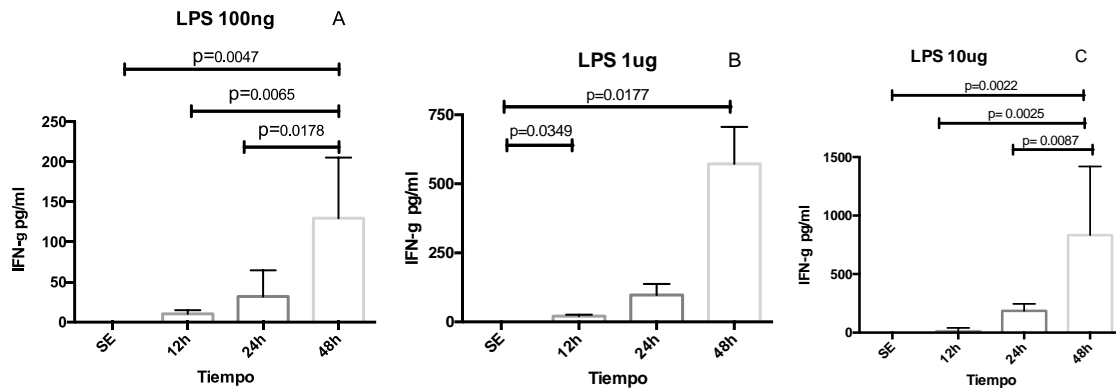
**Figura 6.11 Gráfica de la concentración de TNF en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia.**

Representación mediante un gráfico de barras de la concentración de TNF en sobrenadante de MoDCs de individuos sanos estimuladas con LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3. Prueba Kruskal-Wallis.

## IFN-γ

En los sobrenadantes de MoDCs estimuladas se observó que IFN-γ se incrementó a

las 12 horas con 100ng y 1ug/ml de LPS y a las 48 horas con 100ng, 1 ug y 10ug/ml en comparación con sin estímulo, 12 y 24 horas. (Figura 6.12)

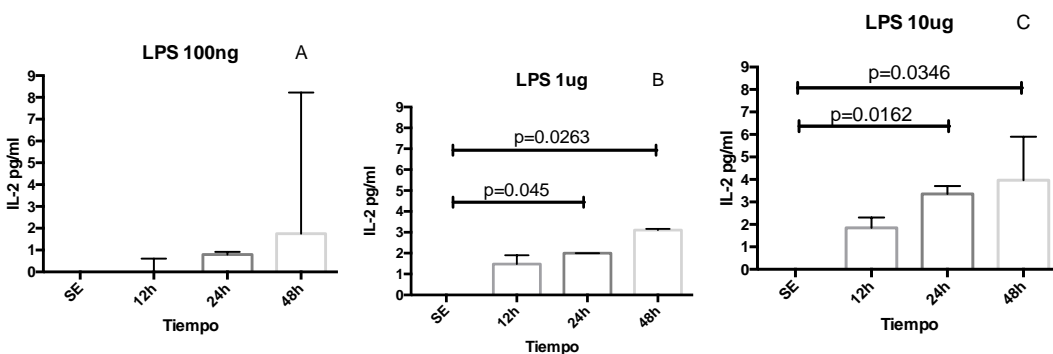


**Figura 6.12 Gráfica de la concentración de INF-γ en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia**

Representación mediante un gráfico de barras de la concentración de INF-γ en sobrenadante de MoDCs de individuos sanos estimuladas con LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3. Prueba Kruskal-Wallis.

## IL-2

Cuando las MoDCs permanecieron de 24 a 48 horas con 1ug y 10ug/ml de LPS, se observó un incremento significativo de IL-2. (Figura 6.13)

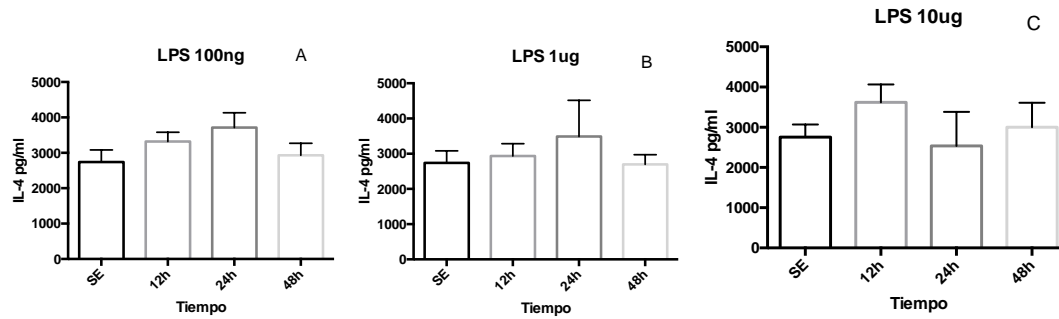


**Figura 6.13 Gráfica de la concentración de IL-2 en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia**

Representación mediante un gráfico de barras de la concentración de IL-2 en sobrenadante de MoDCs de individuos sanos estimuladas con LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3. Prueba Kruskal-Wallis.

## IL-4

Observamos que en el sobrenadante de las MoDCs la IL-4 se expresa de forma basal la cual no se modifica posterior a su estimulación con diferentes concentraciones de LPS en ninguno de los tiempos estudiados. (Figura 7.14 y tabla 6.14)



**Figura 6.14 Gráfica de la concentración de IL-4 en sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos adultos sin alergia**

Representación mediante un gráfico de barras de la concentración de IL-4 en sobrenadante de MoDCs de individuos sanos estimuladas con LPS A) 100ng, B) 1ug y C) 10ug a lo largo del tiempo. n= 3. Prueba Kruskal-Wallis.

- **Resultados de la segunda parte del proyecto**

Para llevar el cumplimiento de los objetivos de la segunda parte del proyecto se incluyeron hasta este momento a dos sujetos de investigación con CA con un rango de edad de 7 a 17 años A todos los pacientes se les realizó medición de IgE total sérica, eosinófilos en sangre periférica y PCP. (Tabla 6.6 y 6.7)

**Tabla 6.3 Características clínicas individuales de los sujetos con CA antes de iniciar con SLIT**

Sujetos	Edad	Sexo	IgE level (kU/l)	Eosinófilos en SP (%)	PCP Der-p (mm)	Coproparasitoscópico	Schirmer (mm)	Tiempo de ruptura lagrimal (seg)
DCs 001	10	M	463.63	4.20	6	Negativo	10	9
DCs 002	12	F	376.10	0.00	5	Negativo	11	8

Sangre periférica, SP; Pruebas cutáneas de Prick, PCP;

**Tabla 6.4 Características clínicas de los sujetos con CA antes de iniciar con SLIT**

Características	Sujetos sin alergia
	n = 2 (Medianas IQR)
Edad	11 (10-12)



Sexo	Femenino (1) masculino (1)
IgE level (U/l)	419.9 (376.1-463.6)
Eosinófilos en SP	2.1 (0-4.2)
PCP Der-p (mm)	5.5 (5-6)
Coproparasitoscópico	Negativo (2)
Schirmer (mm)	10.5 (10-11)
Tiempo de ruptura lagrimal (seg)	8.5 (8-9)

Descripción de medianas (IQR) de las características clínicas de los sujetos incluidos. coproparasitoscópico, CPS; Sangre periférica, SP; Pruebas cutáneas de Prick, PCP.

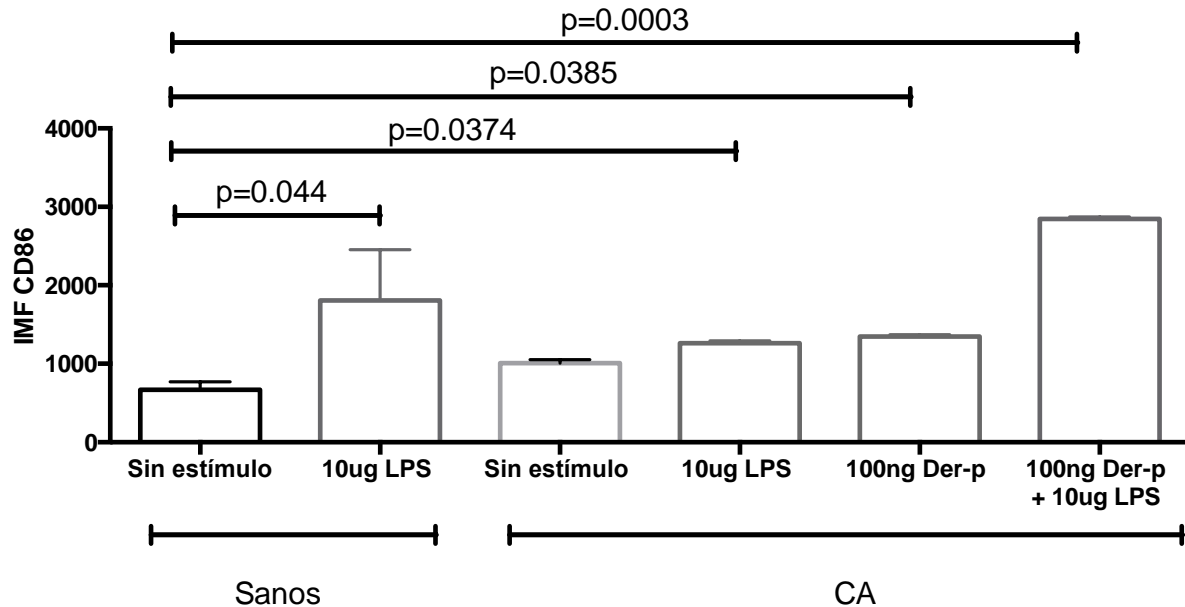
**Resultados del objetivo 3:** Evaluación de la expresión de las moléculas de coestimulación CD86, ICOSL (activadoras) PD-L1, PD-L2 (inhibitorias) y factor de transcripción IRF-4 en MoDCs en sujetos con CA antes del inicio del tratamiento con SLIT en comparación con la expresión de estas mismas en sujetos sin alergia.

### **-CD86**

Como lo previamente mencionado existe una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de CD86 en MoDCs de sujetos sanos al persistir el estímulo de 10ug de LPS por 48 horas.

En sujetos con CA observamos aumento estadísticamente significativo al estimular con 10ug de LPS, 100ug de Der-p y 10ng Der-p+10ug de LPS comparado con la IMF de sujetos sanos sin estímulo. (Figura 6.15)

**IMF de CD86 a las 48 horas en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA**



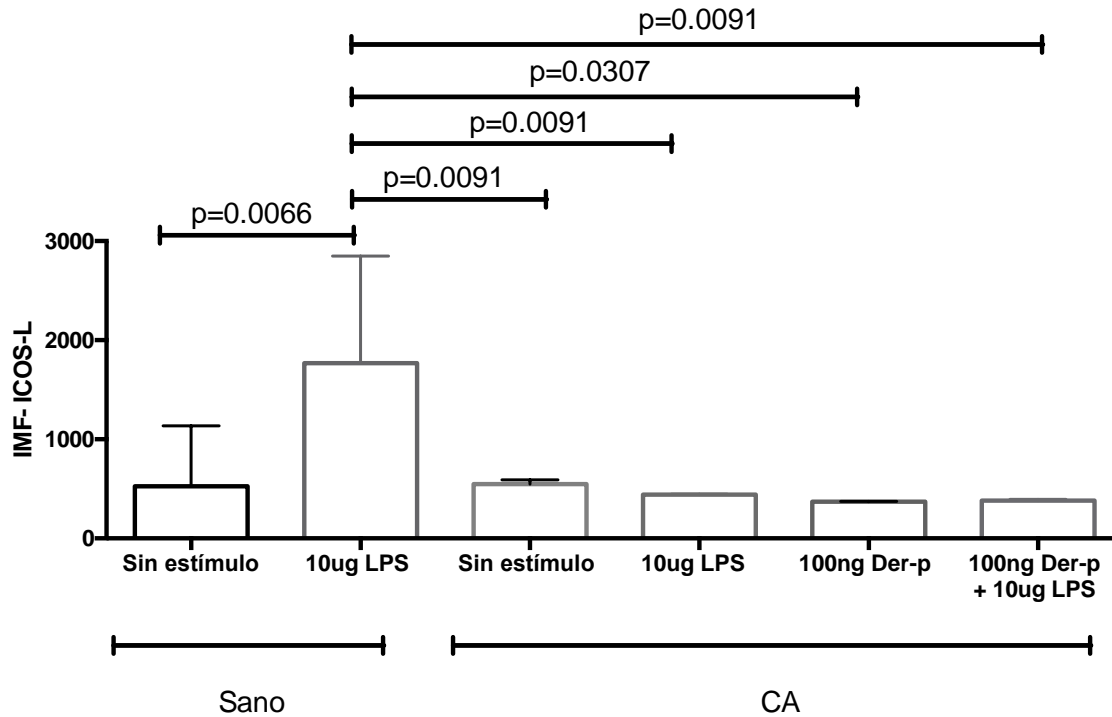
**Figura 6.15 Gráfica de la IMF de CD86 en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA bajo el estímulo con diferentes ligandos (Sin estímulo, LPS y Der-p).** Representación mediante un gráfico de barras de la expresión CD86 en MoDCs de sujetos sanos (n=3) y sujetos con CA (n=2) posterior a la incubación con sin estímulo, LPS y Der-p. Prueba Kruskal-Wallis.

**-ICOS-L**

Como lo previamente mencionado existe una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de ICOS-L en MoDCs de sujetos sanos al persistir el estímulo de 10ug de LPS por 48 horas.

En sujetos con CA observamos una disminución estadísticamente significativa de la expresión de la IMF de ICOS-L al estimular con 10ug de LPS, 100ug de Der-p y 100ng Der-p+ 10ug de LPS comparado con la IMF de sujetos sanos estimulados con 10ug de LPS (Figura 6.16)

**IMF de ICOS-L a las 48 horas en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA**



**Figura 6.16 Gráfica de la IMF de ICOS-L en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA bajo el estímulo con diferentes ligandos (Sin estímulo, LPS y Der-p).**

Representación mediante un gráfico de barras de la expresión de ICOS-L en MoDCs de sujetos sanos (n=3) y sujetos con CA (n=2) posterior a la incubación con RPMI-1640, LPS y Der-p. Prueba Kruskal-Wallis.

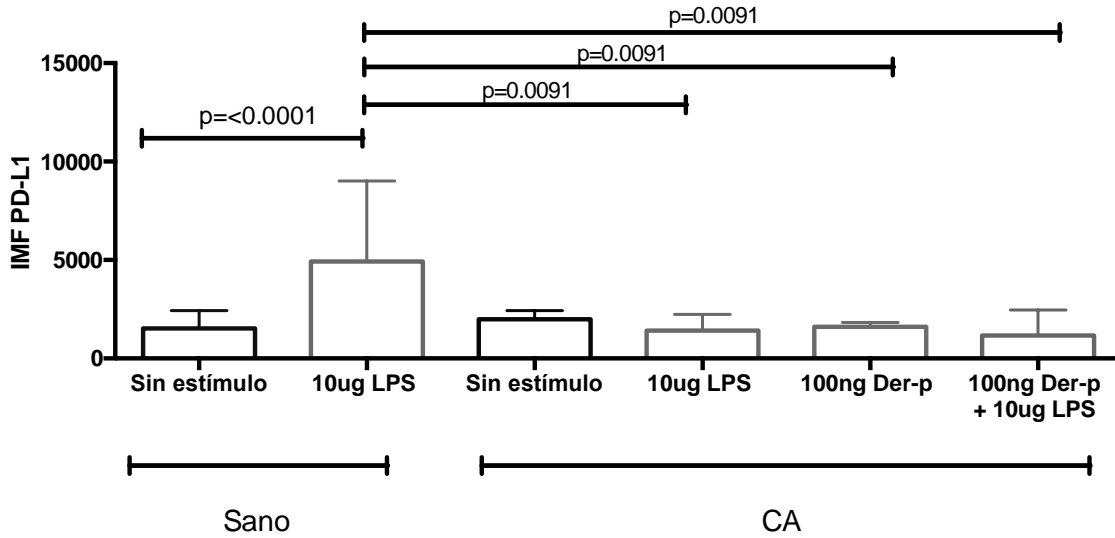
**-PD-L1**

Como previamente mencionado existe una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de PD-L1 en MoDCs de sujetos sanos al persistir el estímulo de 10ug de LPS por 48 horas.

Observamos una disminución estadísticamente significativa en la IMF de PD-L1 de MoDCs de sujetos con CA estimuladas con 10ug de LPS en comparación con la IMF de sujetos sanos. (Figura 6.17)

También observamos disminución estadísticamente significativa en la IMF de PD-L1 de sujetos con CA estimuladas con 100ng de Der-p en comparación con la IMF de MoDCs de sujetos sanos estimuladas con 10ug de LPS, este mismo fenómeno se observó cuando las MoDCs de sujetos con CA fueron estimuladas con 100ng de Der-p más 10ug de LPS. (Figura 6.17)

**IMF de PD-L1 a las 48 horas en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA**



**Figura 6.17 Gráfica de la IMF de PD-L1 en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA bajo el estímulo con diferentes ligandos (Sin estímulo, LPS y Der-p)** Representación mediante un gráfico de barras de la expresión de PD-L1 en MoDCs de sujetos sanos (n=3) y sujetos con CA (n=2) posterior a la incubación con RPMI-1640, LPS y Der-p por 48 horas. Prueba Kruskal-Wallis.

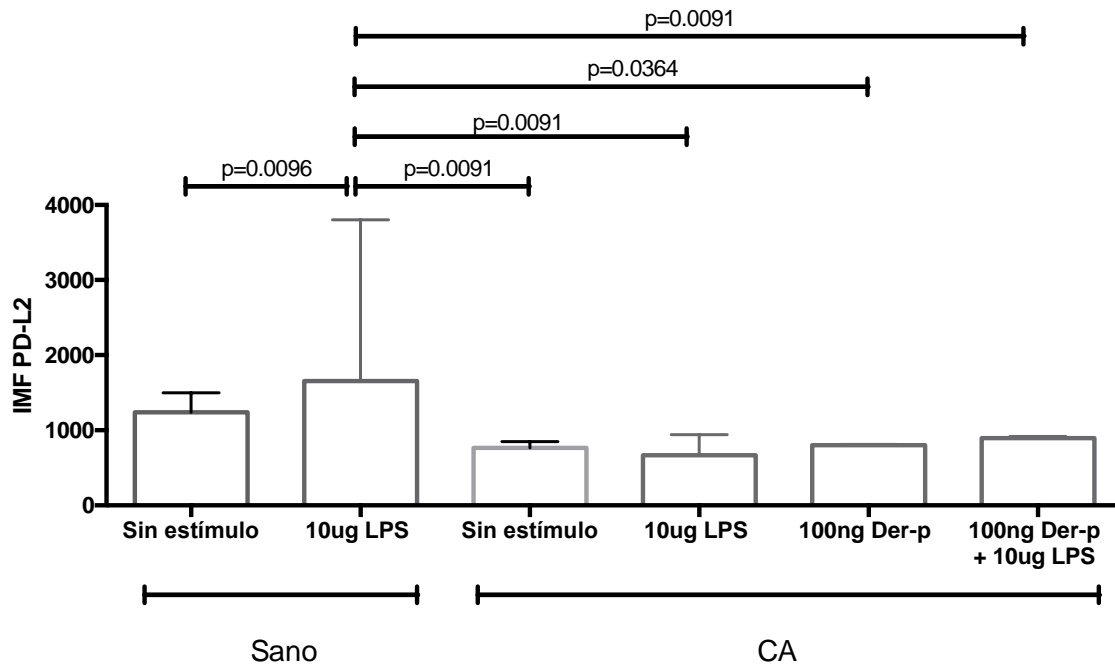
**-PD-L2**

Como lo previamente mencionado existe una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de PD-L2 en MoDCs de sujetos sanos al persistir el estímulo de 10ug de LPS por 12 horas.

Observamos una disminución estadísticamente significativa en la IMF de MoDCs de sujetos con CA estimuladas con 10ug de LPS en comparación con la IMF de sujetos sanos. (Figura 6.18)

También observamos disminución estadísticamente significativa en la IMF de PD-L2 de sujetos con CA estimuladas con 100ng de Der-p en comparación con la IMF de MoDCs de sujetos sanos estimuladas con 10ug de LPS, este mismo fenómeno se observó cuando las MoDCs de sujetos con CA fueron estimuladas con 100ng de Der-p más 10ug de LPS. (Figura 6.18)

**IMF de PD-L2 a las 12 horas en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA**



**Figura 6.18 Gráfica de la IMF de PD-L2 en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA.**

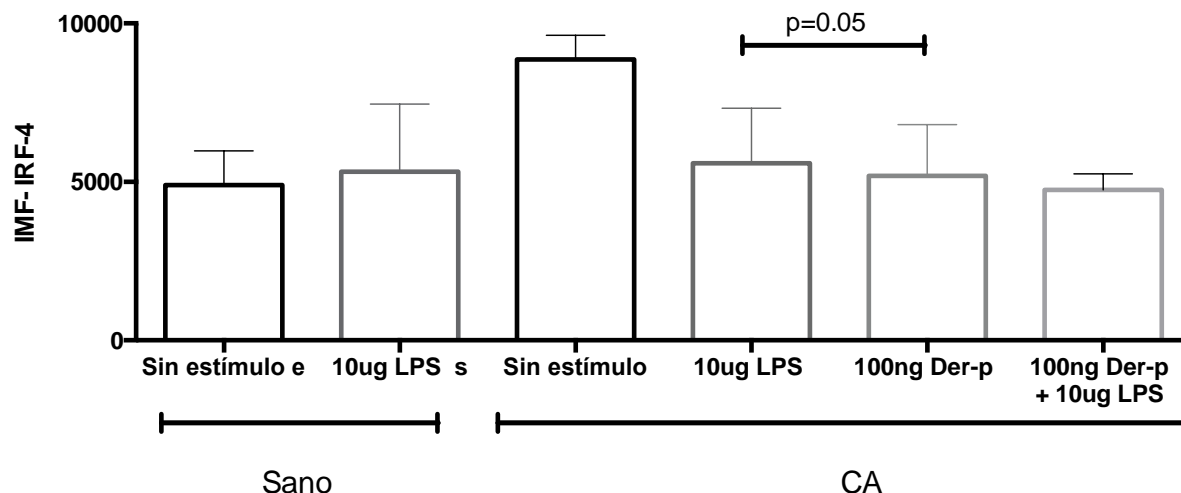
Representación mediante un gráfico de barras de la expresión de PD-L2 en MoDCs de sujetos sanos (n=3) y sujetos con CA (n=2) posterior a la incubación con sin estímulo, LPS y Der-p, LPS y Der-p. Prueba Kruskal-Wallis.

### **-IRF-4**

Como lo previamente mencionado no existe una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de IRF-4 en MoDCs de sujetos sanos al persistir el estímulo de 10ug de LPS por 48 horas.

En sujetos con CA se observó un aumento significativo en la condición de estímulo con Der-p en comparación con LPS. (Figura 6.19)

### IMF de IRF-4 a las 48 horas en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA



**Figura 6.19** Gráfica de la IMF de IRF-4 en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA.

Representación mediante un gráfico de barras de la expresión de IRF-4 en MoDCs de sujetos (n=3) y sujetos con CA (n=2) posterior a la incubación con sin estímulo, LPS y Der-p. Prueba Kruskal-Wallis.

**Objetivo 4:** Evaluar la expresión de las moléculas de coestimulación CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2 y el factor de transcripción IRF4 en MoDCs de sujetos con conjuntivitis alérgica antes del inicio del tratamiento y al término del sexto frasco de tratamiento con SLIT.

Objetivo no alcanzado, debido a que la siguiente toma de muestra se tiene que realizar a los 6 meses, se comentará más adelante en perspectivas.

**Objetivo 5:** Evaluar el efecto de la administración de SLIT sobre las características clínico-oftalmológicas en sujetos con CA antes y al término del tratamiento con SLIT.

Debido a las limitantes que se tuvieron durante este proyecto, se realizó una modificación y a continuación se presenta la comparación de la gravedad de los síntomas y signos de dos sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT (28 días después) los cuales fueron evaluados mediante la escala de evaluación de Robles-Contreras, *et al.*, 2011 (Tabla 1.2 y figura 1.5)

### Gravedad de síntomas oculares

En sujetos con CA se comparó la puntuación de síntomas oculares antes y después del primer frasco de SLIT en la tabla 6.5 se muestran los valores individuales de cada sujeto.

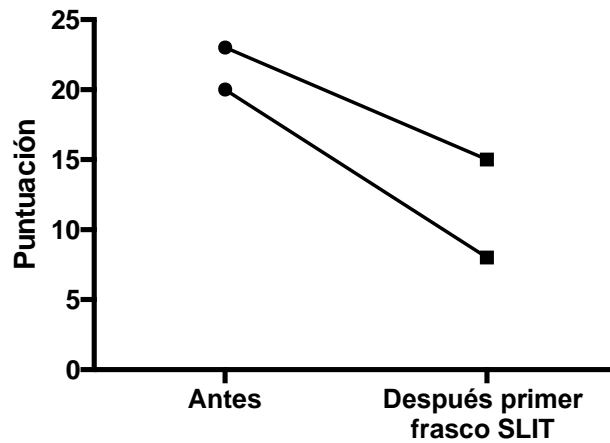
**Tabla 6.5 Síntomas de sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT**

Items	Dcs 001		Dcs 002	
	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Antes	Después 1er Frasco SLIT
<b>Prurito</b>	7	3	4	2
<b>Lagrimeo</b>	2	0	2	2
<b>Fotofobia</b>	4	3	6	2
<b>Sensación de cuerpo extraño</b>	4	4	2	0
<b>Ardor</b>	5	5	6	2
<b>Total</b>	22	15	20	8

Cambios en la gravedad de los síntomas oculares de sujetos con CA después del tratamiento con el primer frasco SLIT. Clasificando como: 0=Ausente, 1=Algunas veces, 2=La mitad de las veces, 3=La mayor parte de las veces, 4=Todo el tiempo.

Se observa mejoría clínica en la puntuación de cada paciente de la escala de gravedad de síntomas oculares en las condiciones antes y después del primer frasco de SLIT. (Figura 6.22)

**Gravedad de los síntomas oculares de los sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco**



**Figura 6.20 Gráfica de la comparación de la gravedad de la puntuación de los síntomas oculares de los sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT.**

Cambios en la gravedad de los síntomas oculares de sujetos con CA después del tratamiento con el primer frasco SLIT. n=2

**Gravedad de signos oculares**

En sujetos con CA se comparó la puntuación de signos antes y después del primer frasco de SLIT en la tabla 6.6 se muestran los valores individuales de cada sujeto.

**Tabla 6.6 Signos de sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT**

Ítems	Dcs 001		Dcs 002	
	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Antes	Después de 1er Frasco SLIT
Aspecto del párpado	0	0	1	0
Margen del párpado y líneas de Marx	0	0	1	0
Hiperemia conjuntival y exudado	0	0	1	0

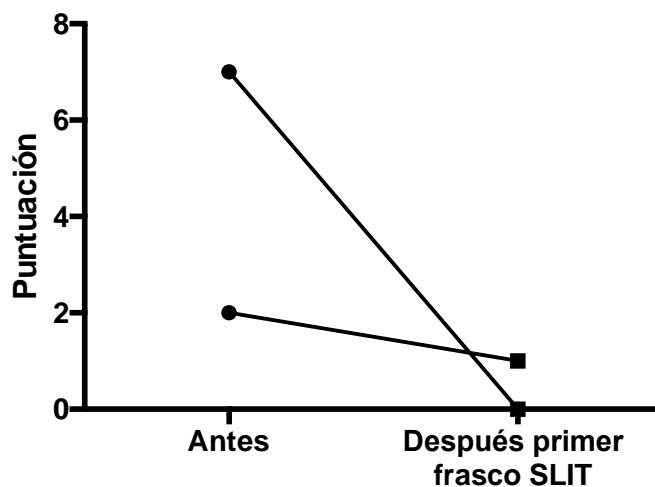


<b>Exudado</b>	0	0	1	0
<b>Inflamación de la conjuntiva tarsal</b>	1	1	2	0
<b>Compromiso limbal</b>	1	0	1	0
<b>Compromiso corneal</b>	0	0	0	0
<b>Total</b>	2	1	7	0

Cambios en la gravedad de los signos oculares de sujetos con CA después del tratamiento con el primer frasco SLIT.

Se observa mejoría clínica en la puntuación de cada paciente de la escala de gravedad de signos oculares en las condiciones antes y después del primer frasco de SLIT. (Figura 6.23)

***Gravedad de los signos oculares de los sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco***



***Figura 6.21 Gráfica de la comparación de la gravedad de los signos oculares de los sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT.***

Cambios en la gravedad de los signos oculares de sujetos con CA después del tratamiento con el primer frasco SLIT. n=2

La suma de la puntuación total de la gravedad de signos y síntomas oculares también fue evaluada con la finalidad de comparar los cambios en la gravedad de la CA en sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT. (Tabla 6.7)

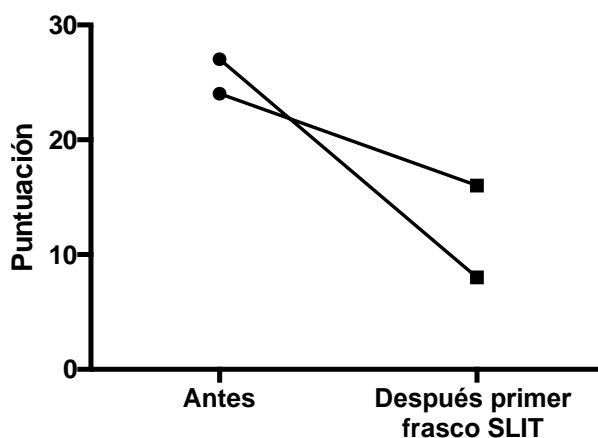
**Tabla 6.7 Puntaje total de gravedad de síntomas y signos de sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT**

Sujeto con CA	DCs 001		DCs 002	
	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Antes	Término 1er Frasco SLIT
<b>Puntaje total</b>	24	16	27	8

Clasificación: 0 puntos = Ausente, 1-12 puntos = leve, 13-24 puntos = moderado, 25-36 puntos = moderado/grave y 36-48 puntos = grave.

Se observa mejoría clínica en la puntuación total de cada sujeto de la escala de gravedad de síntomas y signos oculares en las condiciones antes y después del primer frasco de SLIT. Ya que la clasificación del sujeto Dcs 001 antes del primer frasco de SLIT era moderado/grave y posteriormente fue moderado y el sujeto Dcs 002 antes del primer frasco de SLIT era moderado/grave y posteriormente fue leve. (Figura 6.24)

**Gravedad de síntomas y signos oculares de los sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT**



**Figura 6.22 Gráfica de la comparación de la gravedad de síntomas y signos oculares de los sujetos con CA antes y después del tratamiento con el primer frasco SLIT.**

Cambios en la gravedad clínica de sujetos con CA después del tratamiento con el primer frasco SLIT. n=2

**Objetivo 6:** Evaluar los cambios en la calidad de vida de sujetos con conjuntivitis alérgica antes del inicio del tratamiento y al término del sexto frasco de tratamiento con SLIT.

Como lo comentado previamente debido a las limitantes que se tuvieron durante este proyecto, se realizó una modificación y a continuación les presentaré la comparación de la gravedad de los síntomas y signos de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT (28 días después) los cuales fueron evaluados mediante el cuestionario pediátrico de calidad de vida para rinoconjuntivitis (PQRQL).<sup>(16)</sup>

El cuestionario PRQLQ consta de 23 preguntas agrupadas en 5 dominios (Síntomas de nariz, síntomas de ojos, problemas prácticos, otros síntomas y limitación de actividades) las cuales los pacientes contestaron el grado de sus molestias por medio de la selección de respuestas de una escala que va de 0 a 6, donde 0 es la ausencia de molestias y 6 es la mayor expresión de molestia.

Se considera una mejoría clínicamente significativa (MID, por sus siglas en inglés) cuando la diferencia de medias es de 0.5.

### **Síntomas de nariz**

En la evaluación de la puntuación cada ítem del PQRQL de síntomas de nariz antes-después del primer frasco de SLIT de cada paciente, se observa que en ambos sujetos existe reducción de la percepción de la mayoría de los ítems estudiados. En específico el sujeto DCs 002 tiene una mejoría de tres puntos en el total de todos los síntomas de este cluster (Tabla 6.8)

***Tabla 6.8 Puntuación de cada ítem de síntomas de nariz de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT.***

Sujeto	DCs 001		DCs 002	
	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Antes	Después 1er Frasco SLIT
Nariz tapada	2	2	4	3
Estornudos	1	2	1	0
Goteo de nariz	0	2	3	3
Picor en la nariz	5	2	2	1
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>7</b>

Comparación de las puntuaciones antes-después del primer frasco de SLIT de cada sujeto con CA.

Al realizar el ejercicio de la comparación de las medias y desviación estándar de cada ítem del PQRQL de síntomas de nariz se observa que a pesar de que ninguno tiene una diferencia estadísticamente significativa, en los ítems de nariz tapada y picor de nariz se observa una diferencia clínica de mejoría de al menos 0.5 obtenida por la diferencia de medias. También se observa diferencia clínica de aumento en la percepción de las molestias del ítem goteo de nariz. (Tabla 6.9)

**Tabla 6.9 Comparación de medias de cada ítem que conforma a síntomas de nariz del PQRQL.**

Síntomas de nariz	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Diferencia de medias	p
Nariz tapada	3 ( $\pm 1.4$ )	2.5 ( $\pm 0.71$ )	-0.50	ns
Estornudos	1 ( $\pm 0$ )	1 ( $\pm 1.41$ )	0	ns
Goteo de nariz	1.5 ( $\pm 2.12$ )	2.5 ( $\pm 0.70$ )	1	ns
Picor en la nariz	3.5 ( $\pm 2.12$ )	1.5 ( $\pm 0.70$ )	-2	ns
<b>Total</b>	2.5 ( $\pm 1.66$ )	1.8 ( $\pm 0.99$ )	-0.37	ns

Se muestran las medias ( $\pm$  desviación estándar), diferencia de medias y p obtenida de la prueba T de Student para la comparación de medias de cada ítem que conforma a este dominio. n=2

### **Síntomas de ojos**

En la evaluación de la puntuación cada ítem del cuestionario de calidad de vida de síntomas de ojos antes-después del primer frasco de SLIT de cada paciente, se observa que en ambos sujetos existe reducción de la percepción de algunos de los ítems estudiados. Se observa que ambos sujetos tienen una mejoría considerable en el total de todos los síntomas de este cluster (Tabla 6.10)

**Tabla 6.10 Puntuación de cada ítem de síntomas de ojo de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT**

Sujeto	DCs 001		DCs 002	
	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Antes	Después 1er Frasco SLIT
Picor de ojos	0	1	3	1
Te lloran los ojos	0	0	2	0
Ojos hinchados	3	0	0	0
Dolor en los ojos	3	1	1	0
<b>Total</b>	6	2	6	1

Comparación de las puntuaciones antes-después del primer frasco de SLIT de cada sujeto con CA.

En la evaluación de cada ítem del PQRQL de síntomas de ojos se observa que a pesar de que ninguno tiene una diferencia estadísticamente significativa en los ítems de picor de ojos, ojos llorosos y dolor en ojos se observa una diferencia clínica de mejoría de al menos 0.5 obtenida por la diferencia de medias. (Tabla 6.11)

**Tabla 6.11 Comparación de medias de cada ítem que conforma a síntomas de ojos del PQRQL.**

Síntomas de	Antes	Después 1er	Diferencia de	p
-------------	-------	-------------	---------------	---

<b>ojos</b>		<b>Frasco SLIT</b>	<b>medias</b>	
<b>Picor de ojos</b>	3.5 ( $\pm 0.71$ )	1.5 ( $\pm 0.71$ )	-1.5	ns
<b>Te lloren los ojos</b>	1 ( $\pm 1.4$ )	0.5 ( $\pm 0.70$ )	-0.5	ns
<b>Ojos hinchados</b>	0 ( $\pm 0$ )	0 ( $\pm 0$ )	0	ns
<b>Dolor en los ojos</b>	2 ( $\pm 1.4$ )	0 ( $\pm 0$ )	-2	ns
<b>Total</b>	1.6 ( $\pm 1.6$ )	0.50 ( $\pm 0.76$ )	-1.1	ns

Se muestran las medias ( $\pm$  desviación estándar), diferencia de medias y p obtenida de la prueba T de Student para la comparación de medias de cada ítem que conforma a este dominio. n=2

### **Problemas prácticos**

En la evaluación de la puntuación cada ítem del PQRQL de problemas prácticos antes-después del primer frasco de SLIT de cada paciente, se observa que en ambos sujetos existe reducción de la percepción de la mayoría de los ítems estudiados. En específico, el sujeto DCs 002 tiene una mejoría considerable en el total de todos los síntomas de este grupo. (Tabla 6.12)

**Tabla 6.12 Puntuación de cada ítem de problemas prácticos de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT**

<b>Sujeto</b>	<b>DCs 001</b>		<b>DCs 002</b>	
	<b>Antes</b>	<b>Después 1er Frasco SLIT</b>	<b>Antes</b>	<b>Después 1er Frasco SLIT</b>
<b>ítem</b>				
<b>Tener que frotarte los ojos y nariz</b>	5	3	3	1
<b>Tener que sonarte la nariz</b>	0	2	3	3
<b>Tener que llevar pañuelos</b>	0	0	4	1
<b>Tener que tomar medicinas para tus alergias</b>	3	2	2	0
<b>Vergüenza</b>	0	0	0	0
<b>Total</b>	8	8	12	5

Comparación de las puntuaciones antes-después del primer frasco de SLIT de cada sujeto con CA.

En la evaluación de cada ítem del PQRQL de problemas prácticos se observa que a pesar de que ninguno tiene una diferencia estadísticamente significativa en los ítems de tener que frotarse los ojos y nariz, tener que llevar pañuelos y tener que tomar medicinas para tus alergias se observa una diferencia clínica de mejoría de al menos 0.5 obtenida por la diferencia de medias. También se observa diferencia clínica de

aumento en la percepción de las molestias del ítem tener que sonarte la nariz. (Tabla 6.13)

**Tabla 6.13 Comparación de medias de cada ítem que conforma a problemas prácticos del PQRQL.**

Problemas prácticos	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Diferencia de medias	P
Tener que frotarte los ojos y nariz	4 ( $\pm 1.4$ )	2 ( $\pm 1.4$ )	-2	ns
Tener que sonarte la nariz	1.5 ( $\pm 2.1$ )	2.5 ( $\pm 0.70$ )	1	ns
Tener que llevar pañuelos	2 ( $\pm 2.8$ )	0.5 ( $\pm 0.70$ )	-1.5	ns
Tener que tomar medicinas para tus alergias	2.5 ( $\pm 0.70$ )	1 ( $\pm 1.4$ )	-1.5	ns
Vergüenza	0 ( $\pm 0$ )	0 ( $\pm 0$ )	0	ns
Total	2 ( $\pm 1.9$ )	1.2 ( $\pm 1.2$ )	-0.80	ns

Se muestran las medias ( $\pm$  desviación estándar), diferencia de medias y p obtenida de la prueba T de Student para la comparación de medias de cada ítem que conforma a este dominio. n=2

### Otros síntomas

En la evaluación de la puntuación cada ítem del PQRQL de otros síntomas antes-después del primer frasco de SLIT de cada paciente, se observa que en ambos sujetos existe reducción de la percepción de todos los ítems estudiados. Ambos sujetos tienen una mejoría considerable en el total de todos los síntomas de este conjunto. (Tabla 6.14)

**Tabla 6.14 Puntuación de cada ítem de otros síntomas de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT**

Sujeto	DCs 001		DCs 002	
	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Antes	Después 1er Frasco SLIT
Tener sed	3	2	2	0
Picor de garganta	0	0	0	0
Dolor de cabeza	4	1	1	0
Cansancio	0	0	1	0
Mal en general	0	0	1	0
Irritable	0	0	2	2
Total	7	0	7	2

Comparación de las puntuaciones antes-después del primer frasco de SLIT de cada sujeto con CA.

En la evaluación de cada ítem del PQRQL de otros síntomas se observa que a pesar de que ninguno tiene una diferencia estadísticamente significativa en los ítems de tener sed, dolor de cabeza, cansancio y mal en general se observa una diferencia clínica de mejoría de al menos 0.5 obtenida por la diferencia de medias. (Tabla 6.15)

**Tabla 6.15 Comparación de medias de cada ítem que conforma a otros síntomas del PQRQL.**

Otros síntomas	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Diferencia de medias	P
Tener sed	2.5 ( $\pm 0.70$ )	1 ( $\pm 1.4$ )	-1.5	ns
Picor de garganta	0 ( $\pm 0$ )	0 ( $\pm 0$ )	0	ns
Dolor de cabeza	2.5 ( $\pm 2.12$ )	0.5 ( $\pm 0.70$ )	-2	ns
Cansancio	0.5 ( $\pm 0.70$ )	0 ( $\pm 0$ )	-0.5	ns
Mal en general	0.5 ( $\pm 0.70$ )	0 ( $\pm 0$ )	-0.5	ns
Irritable	1 ( $\pm 1.41$ )	1 ( $\pm 1.41$ )	0	ns
Total	1.2 ( $\pm 1.3$ )	0.42 ( $\pm 0.79$ )	-0.75	0.02

Se muestran las medias ( $\pm$  desviación estándar), diferencia de medias y p obtenida de la prueba T de Student para la comparación de medias de cada ítem que conforma a este dominio. n=2

### **Limitación de actividades**

En la evaluación de la puntuación cada ítem del PQRQL de limitación de actividades antes-después del primer frasco de SLIT de cada paciente, se observa que el sujeto DCs 001 tienen una mejoría considerable en el total de todos los síntomas de este cluster, en cambio en el sujeto DCs 002 la percepción de estos ítems empeoró (Tabla 6.16)

**Tabla 6.16 Puntuación de cada ítem de otros síntomas de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT**

Sujeto	DCs 001		DCs 002	
	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Antes	Después 1er Frasco SLIT
Jugar al aire libre	0	0	5	3
Dificultad para quedarse dormido	0	1	3	3
Despertar durante la noche	5	0	0	2
Dificultad para prestar atención	1	0	0	0
Total	6	1	8	9

Comparación de las puntuaciones antes-después del primer frasco de SLIT de cada sujeto con CA.

En la evaluación de cada ítem del PQRQL de limitación de actividades se observa que a pesar de que ninguno tiene una diferencia estadísticamente significativa en los ítems de tener que jugar al aire libre, despertar durante la noche y dificultad para prestar atención se observa una diferencia clínica de mejoría de al menos 0.5 obtenida por la diferencia de medias. También se observa diferencia clínica de aumento en la percepción de las molestias del ítem de dificultad para quedarse dormido. (Tabla 6.17)

**Tabla 6.17 Comparación de medias de cada ítem que conforma a limitación de actividades del PQRQL**

Limitación de actividades	Antes	Después 1er Frasco SLIT	Diferencia de medias	P
Jugar al aire libre	2.5 ( $\pm$ 3.53)	1.5 ( $\pm$ 2.12)	-1	ns
Dificultad para quedarse dormido	1.5 ( $\pm$ 2.12)	2 ( $\pm$ 1.4)	0.5	ns
Despertar durante la noche	2.5 ( $\pm$ 3.53)	1 ( $\pm$ 1.4)	-1.5	ns
Dificultad para prestar atención	0.5 ( $\pm$ 0.70)	0 ( $\pm$ 0)	-0.5	ns
<b>Total</b>	1.8 ( $\pm$ 2.3)	1.1 ( $\pm$ 1.4)	-0.63	ns

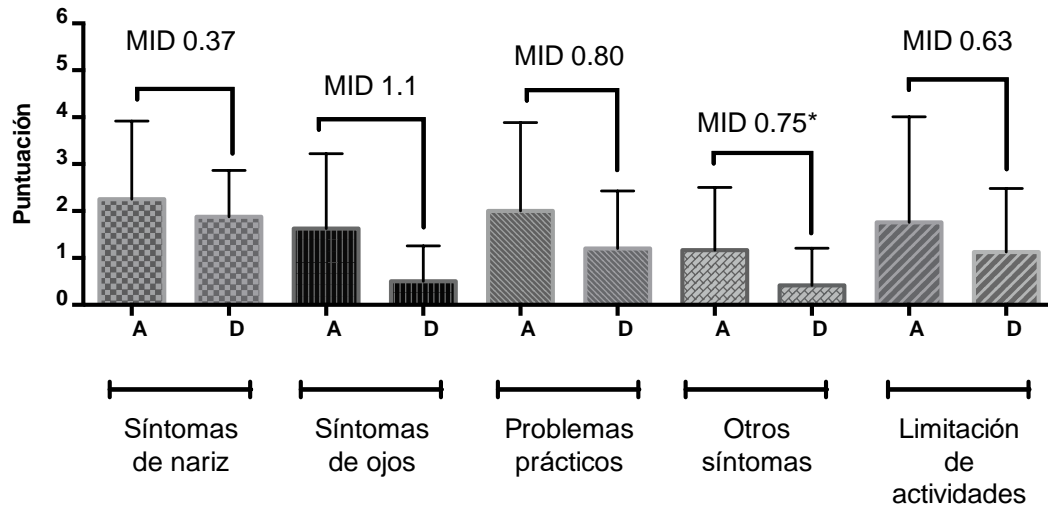
Se muestran las medias ( $\pm$  desviación estándar), diferencia de medias y p obtenida de la prueba T de Student para la comparación de medias de cada ítem que conforma a este dominio. n=2

En la figura 6.25 se observa la representación gráfica de los cambios en la puntuación general de cada dominio del cuestionario en sujetos con CA antes y después del primer frasco de inmunoterapia.

Todos los dominios excepto síntomas de nariz mejoraron a los 28 días de tratamiento con SLIT ya que se observa una MID de 0.5 y solo en el dominio “otros síntomas” se observa una diferencia estadísticamente significativamente diferente en la calidad de vida antes y después del tratamiento con el primer frasco de SLIT.



**Comparación general de cada dominio que conforma al PQRLQ**

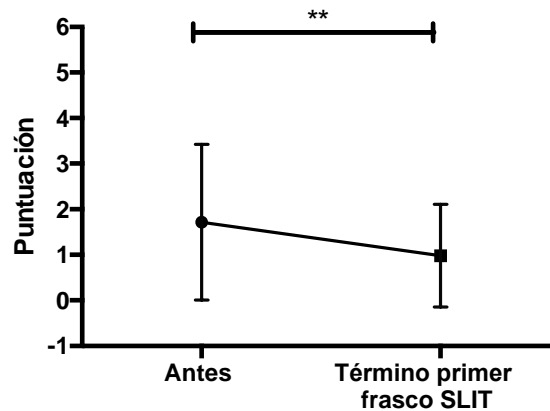


**Figura 6.23 Gráfica comparativa general de cada dominio que conforma al PQRLQ.**

Comparación de los cinco dominios que integran al PQRLQ. Antes, A; Después primer frasco de SLIT, D. \* $p=0.0210$ , obtenida de la prueba T de Student.  $n=2$

Por último, se realizó un análisis global de todos los dominios para comparar los resultados del PQRLQ de sujetos con CA antes y después del primer frasco de SLIT obteniendo que sí hay diferencia estadísticamente significativa de 0.0011 con una diferencia de medias de -0.74 por lo que los sujetos con CA tuvieron una mejoría ya que sus síntomas mejoraron al término de primer frasco de SLIT. (Figura 6.26)

**Comparación global del PQRLQ**



**Figura 6.24 Gráfica comparativa global del PQRLQ.**

Representación de los cambios en el puntaje global de PQRLQ antes y después del primer frasco de SLIT. \*\* $p=0.001$ , obtenida de la prueba T de Student  $n=2$

# Capítulo 7 Discusión

En condiciones fisiológicas las DCs existen en menos del 1% en sangre periférica<sup>(164)</sup> lo que dificulta su investigación, sin embargo, es sabido que las DCs pueden ser diferenciadas a partir de monocitos de sangre periférica (MoDCs) en presencia de GM-CSF e IL-4, las MoDCs generadas *in vitro* se aproximan a las poblaciones de DCs que existen *in vivo* en condiciones de estado estacionario, es decir son inmaduras y se caracterizan por ser eficientes en capturar antígenos pero con ineficiencia para la activación de linfocitos T, por lo que necesitan un estímulo como el LPS, el cual es una estructura microbiana prototipo que induce la maduración de DCs.<sup>(165)</sup>

En este estado de maduración se disminuye la capacidad de captura de antígenos, pero aumenta la capacidad de expresión MHCII, moléculas de coestimulación y síntesis de citocinas, estos últimos tres procesos integran las tres señales críticas para la activación y diferenciación de linfocitos.<sup>(130)</sup>

En específico la segunda señal es clave para definir el destino de la función del linfocito T, ya que se caracteriza por inducir cascadas de señalización de activación o inhibición, las cuales modifican la señalización de activación o inhibición del receptor de linfocitos T.<sup>(166, 167)</sup>

Actualmente existe conocimiento sobre la función de las moléculas de coestimulación, sin embargo, en estos reportes de literatura la expresión de las moléculas de coestimulación de la familia B7 se conoce poco de la expresión espaciotemporal superpuesta en las DCs, debido a que han sido evaluadas de forma individual o en pares en diferentes líneas celulares bajo diferentes concentraciones de LPS y tiempos de estímulo.<sup>(48, 125, 134, 141, 152, 155)</sup>

Por lo que los objetivos de la primera parte de esta investigación se centraron en evaluar en MoDCs de sujetos sanos la cinética de expresión de las moléculas de coestimulación CD86, ICOSL (activadoras) PD-L1, PD-L2 (inhibitorias) y el factor de transcripción IRF-4 así como la expresión de citocinas en el sobrenadante de los cultivos para integrar el patrón de su expresión espaciotemporal posterior al estímulo con LPS a distintas concentraciones.

## Primera parte del proyecto

### -Moléculas de coestimulación activadoras (CD86 e ICOS-L) en sujetos sin alergia

La molécula de coestimulación CD86 es expresada de forma constitutiva en DCs, monocitos, linfocitos T y B<sup>(168)</sup>

Granucci, *et al.* en el año 1999, estudiaron por medio de citometría de flujo los cambios en la expresión de CD86 inducidos por LPS en células dendríticas mieloides inmaduras de la línea celular D1, las cuales fueron cultivadas en ausencia (tiempo 0) o presencia de 10µg/ml LPS durante 1, 2, 4, 6 y 18 horas. Observaron que CD86 aumenta su expresión de forma homogénea y progresiva a través del tiempo.<sup>(162)</sup>

En contraste con estos resultados, en nuestros ensayos no hay cambios significativos en la expresión de CD86 a las 12 horas comparado con las MoDCs sin estímulo. Sin embargo, es importante mencionar que nosotros usamos MoDCs y no la línea celular D1 por lo que la diferencia de estos resultados en la expresión de CD86 se puede deber a esta variable en las células evaluadas.

Por otro lado, Han TH., *et al*, en el año 2009 realizaron ensayos donde comparan el uso LPS con IFN- $\gamma$  (100 mg/mL y 1000 IU/mL, respectivamente) en combinación con IL-1 $\beta$  y/o TNF- $\alpha$  por 24 horas con la finalidad de determinar la efectividad de esos cócteles de citocinas en la maduración de las MoDCs. Observaron que expresión de CD86 a las 24 horas fue mayor que al tiempo 0 sin importar el estímulo añadido.<sup>(169)</sup>

En nuestros ensayos no observamos cambios significativos en la expresión de CD86 a las 24 horas bajo ningún estímulo, por lo que concluimos que la causa de los cambios observados desde las 24 horas por este grupo de investigación son resultado de la combinación de esas citocinas y no del uso de forma individual de LPS.

Torres-Aguilar H., *et al*, en el año 2010, estimularon MoDCs con una concentración de 0.5ug/ml de LPS por dos días y observaron que expresaron altos niveles de CD86.<sup>(170)</sup> En nuestros ensayos observamos que también existe un aumento significativo de CD86 a las 48 horas en las tres concentraciones evaluadas, lo que sugiere que el estímulo inicial con LPS es suficiente para iniciar el proceso de maduración de los MoDCs y que conforme pasa el tiempo se desencadenan eventos que se observan como tendencia de aumento progresivo en la expresión de CD86 los cuales culminan a las 48 horas, tiempo en donde se observa un pico máximo de expresión de CD86.

Por otro lado, la molécula de coestimulación de activación ICOS-L es expresada de forma constitutiva en DCs, linfocitos B, macrófagos del bazo y peritoneo.<sup>(138)</sup> En nuestros ensayos también se observó que las MoDCs tienen una expresión basal.

En nuestros ensayos observamos que a las 12 horas posteriores del estímulo con 1ug/ml de LPS, la expresión de ICOS-L aumenta de forma significativa, en un tiempo similar (18 horas) Tomoki y colaboradores en el año 2007, reportaron que posterior a las 18 horas de estímulo con 1ug/ml de LPS había una disminución en la expresión de ICOS-L.<sup>(171)</sup>

Nieminen y colaboradores en el año 2014, estudiaron posterior al estímulo de 100ng/ml LPS por 18 que la expresión de ICOS-L por medio de la técnica de microarreglos se encontraba aumentada.<sup>(172)</sup> Nosotros no observamos modificaciones en la expresión de ICOS-L en las 12 ni 24 horas posteriores al estímulo con 100ng/ml de LPS, no obstante esto puede ser debido a que ellos usaron una técnica para cuantificar la expresión génica de ICOS-L y nosotros medimos la presencia de la proteína en la membrana superficial de los MoDCs.

Aicher y colaboradores en el año 2000, observaron que la expresión de ICOS-L no se modificaba en MoDCs en las 48 horas posteriores al estímulo con 100ng/ml de LPS.<sup>(163)</sup> Sin embargo, nosotros observamos que ICOS-L aumenta de forma significativa a las 48 horas de la estimulación con 100ng/ml y 10ug/ml de LPS.

Al estudiar el patrón de expresión de CD86 e ICOS-L en MoDCs posterior al estímulo de LPS en concentraciones y tiempos diferentes, nos permitió observar que ambas moléculas se expresan de forma constitutiva en ausencia de estímulo y que conforme pasa el tiempo posterior a la activación inicial con LPS su expresión aumenta de forma significativa a lo largo del tiempo observando un pico máximo de expresión a las 48 horas.

Observamos que el patrón de expresión de estas moléculas se sobrelapa, sin embargo, nuestros ensayos no nos permiten conocer los mecanismos que regulan su expresión génica ni como se coordinan funcionalmente para iniciar respuestas inmunológicas contra los antígenos.

#### -Moléculas de coestimulación inhibitoras (PD-L1 y PD-L2) en sujetos sin alergia.

Las moléculas de coestimulación PD-L1 y PL-D2 son descritas principalmente por su función de regulación negativa ya que se vinculan con la capacidad de las DCs para inducir tolerancia. <sup>(173)</sup> Comparten 38% de la homología de aminoácidos y se ha identificado que el receptor de ambos es PD-1.<sup>(174)</sup>

Se ha reportado PD-L1 y PD-L2 tienen una expresión basal en DCs, macrófagos, células endoteliales y en MoDCs. <sup>(175-177)</sup> Lo que concuerda con nuestros ensayos ya que también observamos expresión basal de PD-L1 y PD-L2 en MoDCs.

Se ha descrito que en macrófagos derivados de monocitos (MDMs) y en MoDCs la expresión de PD-L1 aumenta significativamente a las 48 horas posteriores a la activación con 10µg/ml y 20ng/ml de LPS, respectivamente. <sup>(176)</sup> <sup>(177)</sup> Por otro lado, se ha reportado que la expresión de PD-L1 y PD-L2 con 100ng de LPS por 24 horas en MoDCs se mantiene sin cambios <sup>(178)</sup> y con 10ug/ml de LPS por 48 horas la expresión de PD-L2 aumenta ligeramente.<sup>(176)</sup> Nosotros observamos que ambas moléculas de coestimulación tienen un patrón de expresión parecido: ya que a las 12 horas ya que ambas aumentan su expresión bajo cualquier concentración. PD-L1 mantiene un aumento progresivo y significativo a través del tiempo en todas las concentraciones mientras que PD-L2 solo aumenta de forma significativa nuevamente a las 48 horas con 1ug y 10ug comparado con las células sin estímulo.

La participación de estas moléculas de coestimulación inhibitoras en la producción de citocinas se discutirá más adelante, sin embargo, para conocer de forma cuantitativa cuál de las dos moléculas provoca una mayor disminución de la proliferación celular se podría realizar un ensayo de cocultivo de MoDCs con linfocitos T en presencia del compuesto fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína en presencia de anticuerpos bloqueadores de PD-L1 o con anti-PD-L2.

#### IRF-4

Eguchi y colaboradores en el año 2013, evaluaron por medio de western blot la expresión de IRF-4 en macrófagos de médula ósea (BMDMs) de ratones en presencia

de 10ng/ml de LPS a los 5, 15, 30 y 60 minutos así como a las 2, 4 y 8 horas y observaron que existe un aumento progresivo de IRF-4.<sup>(179)</sup>

En nuestros ensayos observamos que IRF-4 tiene una expresión basal intracelular la cual se mantiene sin importar la concentración de estímulo a lo largo del tiempo, esto concuerda con la literatura ya que se ha reportado que de IL-4 y GM-CSF durante el proceso de generación de DCs a partir de monocitos de sangre periférica induce la expresión de IRF-4.<sup>(119)</sup>

### -Concentración de citocinas presentes en el sobrenadante de cultivos de MoDCs de sujetos sin alergia

Las interacciones entre las MoDCs y su ambiente son fundamentales para la generación de las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas, ya que posterior a la estimulación con antígenos como componentes bacterianos (Ej. LPS), las DCs inmaduras se someten a un proceso de maduración que implica como ya observamos la expresión de las moléculas de coestimulación y expresión de citocinas. Estas últimas pueden ser proinflamatorias o antiinflamatorias las cuales tienen la finalidad de proporcionar señales críticas para la activación y diferenciación celular, por lo que se evaluó la expresión de las citocinas de IL-6, IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$  y INF- $\gamma$  en el sobrenadante de los cultivos mediante Cytometric bead arrays.

#### **IL-6**

Distintos grupos de investigación han observado por medio de ELISA un incremento en la presencia de IL-6 en el sobrenadante de MoDCs humanos a pocas horas de estímulo (4 horas) con 100ng/ml,<sup>(180)</sup> 1ug/ml de LPS<sup>(181)</sup> así como las 24 horas con 1ug/ml de LPS.<sup>(182)</sup>

Con nuestros datos se puede observar que la producción de IL-6 en MoDCs aumenta desde las 12 horas posteriores a la estimulación con LPS lo que podría generar una retroalimentación positiva para continuar con su expresión fluctuante, aunque con incremento significativo a lo largo del tiempo (a las 24 horas con 100ng y 10ug y a las 48 horas en todas las concentraciones) comparado con las MoDCs sin estímulo.

Esto es concordante con la literatura ya que se ha observado que citometría de flujo se ha reportado que en el sobrenadante de MoDCs aumenta la expresión de IL-6 a las 12 horas bajo el estímulo de 100ng/ml de LPS.<sup>(183)</sup> y con 100ng/ml de LPS por 24 horas aumenta la expresión de IL-6 intracelular en MoDCs. <sup>(184)</sup>

#### **IL-10**

La citocina IL-10 es considerada como inmunosupresora debido a sus propiedades antiinflamatorias ya que limita o inhibe las respuestas excesivas de los linfocitos T a los patógenos microbianos para prevenir la inflamación crónica y daño tisular.<sup>(185)</sup> En MoDCs humanas se observó que posterior a la estimulación con 10ug/ml y 1ug/ml LPS por 18 y 24 horas, respectivamente las MoDCs expresan en el sobrenadante altos niveles de IL-10.<sup>(186, 187)</sup> En nuestros ensayos se observa un patrón semejante ya que la

IL-10 se incrementa a las 12 y 48 horas con el estímulo de 1ug, y a las 24 horas con 10ug/ml comparadas con las MoDCs que no fueron estimuladas.

Se ha demostrado que el LPS en monocitos y MoDCs humanos induce la activación de diversas cascadas intracelulares, una de ellas es p38 la cual es importante para la producción de TNF- $\alpha$ .<sup>(188, 189)</sup> También se ha descrito en estas células que posterior a la estimulación con LPS se sintetiza el precursor transmembranal de TNF- $\alpha$  (pro-TNF) y se acumula en el aparato de Golgi, este posteriormente se relocaliza en la superficie celular el cual es escindido mediante metaloproteinasas por lo que consecuentemente es liberado al sobrenadante.<sup>(190) (191)</sup>

### **TNF- $\alpha$**

Langenkamp y colaboradores en el año 2000, encontraron en el sobrenadante de DCs que con el estímulo de 100ng/ml de LPS, TNF- $\alpha$  incrementa de forma lineal desde las 4 horas de estímulo hasta 10 horas posteriores.<sup>(180)</sup> y también se ha estudiado que con 100ng/ml de LPS a las 12 y 24 horas <sup>(183, 184)</sup> y con 1ug/ml a las 48 horas<sup>(192)</sup> hay un incremento de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de cultivos de DCs.

En concordancia, nosotros observamos hay un aumento significativo en todas las concentraciones y horas estudiadas comparadas con las MoDCs sin estímulo, resaltando que bajo cualquier concentración a las 12 horas se registró la concentración máxima de esta citocina y la concentración disminuyó de forma gradual hasta las 48 horas donde se observa la concentración mínima la cual sigue siendo estadísticamente significativamente mayor a las MoDCs sin estímulo.

Se ha descrito que en MoDCs inmaduras mueren dentro de las 48 horas posteriores al retiro de citocinas exógenas usadas para su diferenciación (IL-4 y GM-CSF) y que el TNF autocrino inducido por la estimulación con LPS a través de sus receptores TNFR1 Y 2 rescata a estas MoDCs inmaduras. Sin embargo, una vez que estas células han madurado existe una disminución en la expresión de TNF y de sus receptores lo que desencadena el proceso de muerte celular. <sup>(192, 193)</sup>

Con estas observaciones en la disminución progresiva a través del tiempo de la expresión de TNF- $\alpha$  se puede hipotetizar que puede estar representando un papel de autorregulación en nuestras MoDCs.

### **IFN- $\gamma$**

En modelos murinos se ha descrito la capacidad de inducción del RNAm de IFN- $\gamma$  de los macrófagos estimulados con LPS.<sup>(194) (195)</sup> En MoDCs inmaduras humanas se ha descrito que no existe producción de IFN- $\gamma$ , en cambio posterior a las 48 horas de estímulo con 50ng/ml de LPS se observa un aumento significativo de esta citocina en el espacio intracelular y en el sobrenadante.<sup>(196)</sup>

En concordancia con nuestros ensayos en los sobrenadantes de MoDCs sin estimular no se observa producción de IFN- $\gamma$ , en cambio posterior al estímulo con LPS se

observó que IFN- $\gamma$  aumenta de forma significativa solo a las 12 y 48 horas siendo este último el pico máximo.

Nuestros datos nos permiten explorar la expresión de IFN- $\gamma$  en las MoDCs a lo largo del tiempo y sugieren que posterior al estímulo con LPS se observa el aumento gradual de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante. La producción y exposición a esta citocina podría ser una señal autocrina <sup>(195)</sup> capaz de contribuir a la generación de MoDCs maduras y funcionales las cuales podrían llevar a la activación de linfocitos T mediante la interacción de las moléculas de coestimulación y por ser una fuente temprana de IFN- $\gamma$ .

Para corroborar la síntesis de IFN- $\gamma$  por MoDCs se podrían realizar tinciones intracitoplasmáticas de IFN- $\gamma$  posterior al estímulo con LPS. Y posteriormente se podrían hacer cocultivos con linfocitos T en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueadores de esta citocina para explorar la capacidad del IFN- $\gamma$  para promover la activación y proliferación de linfocitos T.

## **IL-2**

IL-2 es una citocina que promueve la proliferación de linfocitos T, así como la activación de NKs para la inducción de la transcripción de genes pro-apoptóticos.<sup>(197)</sup> Se ha observado que posterior a la activación con LPS en DCs existe una translocación del factor de transcripción “factor nuclear de linfocitos T activados” (NFAT) lo que resulta en la activación y expresión génica de IL-2.<sup>(198)</sup>

En MoDCs de sujetos sanos se ha observado que en las 24 horas posteriores al estímulo con 1 $\mu$ g/ml de LPS existe un incremento en la producción de IL-2 en comparación con las MoDCs control.<sup>(182)</sup> Esto es concordante con nuestros ensayos ya que si dejamos que las MoDCs permanezcan de 24 a 48 horas con 1 $\mu$ g y 10 $\mu$ g/ml de LPS también observamos un aumento significativamente estadístico en la expresión de IL-2.

Sin embargo, a diferencia de nuestros tiempos de estudio en los reportes de literatura se ha reportado que la producción de IL-2 se encuentra presente en el sobrenadante de DCs D1 en “olas” de las 4 a 8 horas y posteriormente de las 14 a 18 horas lo que sugiere que es así como se puede realizar la activación de NKs durante la inmunidad innata y activación temprana (priming) de linfocitos T al inicio de la inmunidad adaptativa.<sup>(199)</sup>

Nosotros no observamos diferencias estadísticamente significativas de incremento en la expresión de IL-2 a las 12 horas, por lo que para conocer si un fenómeno parecido ocurre en las MoDCs se podrían realizar mediciones de la concentración de IL-2 a las 8 horas. Y en ensayos alternos se podrían realizar cocultivos de MoDCs estimuladas con LPS con NKs y medir la producción intracelular de IFN- $\gamma$  en presencia y ausencia de anticuerpos bloqueadores de IL-2.

Y también de forma alterna, evaluar la capacidad de proliferación en los linfocitos T en presencia de la IL-2 sintetizada por las MoDCs, a través de la medición de la incorporación de [ $^3$ H]-timidina.

De forma integral se puede observar que existe una expresión basal de las moléculas de coestimulación estudiadas tanto de activación (CD86 e ICOS-L) como de inhibición (PD-L1 y PD-L2). Se observó que a las 48 horas CD86 (en todas las concentraciones), ICOS-L (solo con 100ng y 10ug) y PD-L1 (en todas las concentraciones) tuvieron su pico máximo de expresión. En cambio, PD-L2 tuvo su pico máximo de expresión a las 12 horas en todas las concentraciones estudiadas.

### **Interacción entre citocinas y moléculas de coestimulación**

Por otro lado, las citocinas estudiadas no tuvieron una expresión basal y se observó que a las 48 horas fue el pico máximo de IL-2 e IFN- $\gamma$ , en particular IFN- $\gamma$  tuvo un incremento significativo desde las 12 horas, en cuanto a IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  su pico máximo ocurrió a las 12 horas.

Se ha descrito que la presencia de IL-2 producida por DCs incrementa la expresión de CD86 en la superficie celular de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.<sup>(168)</sup> Esto se desconoce en MoDCs, sin embargo nosotros observamos un aumento estadísticamente significativo a las 48 horas de IL-2 y de CD86, por lo que sería interesante conocer el efecto un inhibidor de mTOR como la rapamicina en la expresión de CD86 de MoDCs.

En cuanto a las citocinas cuyo incremento significativo fue a las 12 horas (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) se ha reportado por distintos grupos de investigación que al añadirlas a cultivos de APCs funcionan como inductores de la expresión de PD-L1.<sup>(176, 200-202)</sup> Nosotros observamos un incremento significativo desde las 12 hasta las 48 horas de PD-L1, por lo que hipotetizamos que la acción autocrina y/o paracrina de estas citocinas conlleva a un incremento de la expresión de PD-L1 en MoDCs.

También se ha descrito que la adición de TNF- $\alpha$  a cultivos de MoDCs genera un aumento en su capacidad de maduración, activación, migración y presentación antigénica.<sup>(188, 203)</sup> Por lo que tiene sentido que en nuestros ensayos comencemos a observar su pico máximo a las 12 horas que es cuando comienzan con los eventos de maduración.

Por otro lado, también se ha descrito que la adición de IL-10 a cultivos de MoDCs de humanos induce un incremento en la expresión de PD-L2.<sup>(204)</sup> Esto podría ser concordante con nuestros ensayos ya que observamos que su pico máximo de expresión a las 12 horas en todas las concentraciones estudiadas.

Sin embargo, aunque tenemos aumento significativo de estas citocinas nuestros ensayos no nos permiten conocer cual citocina contribuye más a la expresión de PD-L1 o PD-L2, por lo que podríamos realizar ensayos con anticuerpos bloqueadores de estas citocinas para conocer cual citocina contribuye más a la expresión de PD-L1 o PD-L2.

Con estos datos proponemos que, para desarrollar los objetivos de la segunda parte del proyecto, el tiempo y concentración óptima para la expresión de las moléculas de coestimulación de la familia B7 e IRF-4 que usaremos para estimular a las MoDCs de



pacientes con CA será de 10µg/ml a las 48 horas para la evaluación de las moléculas PD-L1, ICOS-L, IRF-4 y CD86.

Y hemos definido que para la determinación de las moléculas PD-L2 deberemos utilizar las concentraciones de 10µg/ml durante un tiempo de estímulo de 12 horas.

### **Segunda parte del proyecto**

Una vez establecida la concentración y tiempo óptimo de estímulo para la evaluación de la expresión de las moléculas de coestimulación CD86, ICOSL (activadoras) PD-L1, PD-L2 (inhibitorias) y factor de transcripción IRF-4 se realizaron los ensayos en MoDCs en sujetos con CA antes del inicio del tratamiento con SLIT y se compararon con la expresión de estas mismas en sujetos sin alergia.

Es importante mencionar que existe una diferencia entre la edad de los integrantes del grupo de sujetos sanos y sujetos con CA. Esto es consecuencia de la dificultad de obtención de sangre en volúmenes adecuados de sujetos sanos en edad pediátrica para el grupo control, sin embargo, se ha reportado que en linfocitos T no existe diferencia en la expresión de CD86 entre sujetos adultos sanos y neonatos, por otro lado, Manzouri y colaboradores en el año 2010 también se enfrentaron ante una problemática parecida y condujeron sus ensayos de la misma manera.<sup>(48, 136, 205)</sup>

#### **-Moléculas de coestimulación activadoras (CD86 e ICOS-L) en sujetos con CA.**

Se sabe que CD86 en modelos murinos de inflamación de la vía aérea, el bloqueo de CD86 y no de CD80 inhibe la eosinofilia, hiperreactividad bronquial,<sup>(206)</sup> producción de IgE sérica y disminución de IL-4 e IL-2.<sup>(207)</sup>

Manzouri y colaboradores en el año 2010, observaron que en MoDCs de sujetos en edad pediátrica con CA existe un aumento en la IMF de CD86 comparado con la expresión en sujetos sanos adultos.<sup>(136)</sup> También se ha reportado que en APCs CD1a+ de la mucosa conjuntival de pacientes con VKC expresan más CD86 en comparación con los sujetos sanos.<sup>(125)</sup>

En nuestros ensayos se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la IMF de CD86 de sujetos sanos en comparación con sujetos con CA sin tratamiento. En cambio, observamos que existe un aumento significativo en la expresión de esta molécula de activación cuando las MoDCs de los sujetos con CA fueron estimuladas con LPS, Der-p y Der-p+LPS comparado con la IMF de sujetos sanos sin estímulo. Lo cual concuerda con lo observado por Hammad y colaboradores en el año 2016, ya que al estimular MoDCs de sujetos con alergia y sujetos sanos con Der-p y LPS, el CD86 de sujetos sanos aumentó con el estímulo de LPS, en contraste la expresión de CD86 en MoDCs de sujetos con alergia aumentó en presencia de Der-p.<sup>(208)</sup>

Hasta el momento nuestro tamaño de muestra de sujetos con CA es muy pequeña, sin embargo, se observa que en sujetos con CA hay un incremento en la expresión de esta molécula en comparación con la expresada en sujetos sanos.

Por parte de ICOS-L se ha estudiado que las señales de coestimulación provenientes de ICOS-L generan una respuesta de activación hacia los linfocitos T.<sup>(209)</sup> En modelos murinos que carecen del receptor de ICOS-L, tienen defectos en la producción de IgE, así como en la producción de IL-4 e IL-13.<sup>(210)</sup> También se ha establecido en modelos murinos de asma que al administrar anticuerpos bloqueadores de ICOS-L posterior a la exposición con el alérgeno disminuyen la producción de IgE en centros germinales (GC), también se observó que hay reducción en la producción de IL-13 en el tejido pulmonar así como disminución de la hiperreactividad pulmonar.<sup>(211)</sup>

Nuestros resultados hasta el momento nos permiten observar que en sujetos sanos y con CA existe una producción basal de ICOS-L, y al contrario lo referido previamente, la IMF de ICOS-L de MoDCs de sujetos con CA bajo el estímulo de todas las condiciones no tiene modificaciones en su IMF en comparación con su expresión basal e incluso se encuentra significativamente disminuida en comparación con la IMF de sujetos sanos estimulados con LPS. Lo cual concuerda con lo reportado en el año 2014, Shen y colaboradores, quienes observaron que en las MoDCs de sujetos con rinitis alérgica y no en las de sujetos sanos, existe un menor porcentaje de MoDCs que expresan ICOS-L y que existe una producción aumentada de IL-13 e IL-5 por parte de linfocitos T.<sup>(143)</sup>

#### -Moléculas de coestimulación inhibitoras (PD-L1 y PD-L2) en sujetos con CA.

Por parte de PD-L1 se ha reportado que en linfocitos B de sujetos con rinitis alérgica existe una menor cantidad de estas células que expresan IL10+PD-L1+ comparado con sujetos sanos.<sup>(152)</sup> Piconi y colaboradores en el año 2010, han reportado que en APCs CD14+ existe una menor expresión de PD-L1 en sujetos con alergia comparado con sujetos que han terminado el tratamiento con SLIT.<sup>(212)</sup>

En cuanto a PD-L2 se ha estudiado que en modelos murinos con asma, al aplicar AntiPD-L2 intraperitonealmente antes de los retos existe aumento significativo en la hiperreactividad bronquial y eosinofilia en las vías respiratorias así como incremento en la producción de citocinas del perfil Th2 en líquido broncoalveolar.<sup>(155)</sup> En contraste en el año 2013 Lewkowich y colaboradores observaron que las DCs al ser estimuladas *in vitro* con ácaro de polvo tienen un incremento en la expresión del RNA mensajero de PD-L2 lo que genera un aumento en la gravedad de esta enfermedad asociado a una reducción en la síntesis de IL-12.<sup>(213)</sup>

En humanos solo se ha reportado que existe una correlación positiva entre la expresión de PD-L2 en tejido pulmonar de sujetos con asma y la gravedad de su enfermedad.<sup>(213)</sup> También se ha observado que en pacientes con asma persistente existe un aumento

en la producción de IL-5 e IL-13 posterior al estímulo con alérgeno, y esto podía ser revertido al agregar IL-12 o anticuerpos anti-PD-L2.<sup>(214)</sup>

Nosotros hasta este momento encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión basal de PD-L1 ni de PD-L2 en MoDCs de sujetos sanos comparado con sujetos con CA, sin embargo, se observa que la expresión de estas moléculas de inhibición de la familia B7 no tienen modificaciones en su IMF en comparación con su expresión basal, por otro lado, en comparación con la IMF de sujetos sanos estimulados con LPS se encuentran significativamente disminuida.

El LPS en las MoDCs de los sujetos sin alergia tiene la capacidad de aumentar la expresión de PD-L1 y PD-L2 lo cual no sucede en los sujetos con CA, lo que sugiere que en presencia del mismo antígeno la respuesta inmunológica depende del estado inmunológico del sujeto.

En específico se ha estudiado que al estimular DCs con LPS existe un fenómeno llamado “agotamiento” en el cual las DCs pierden su capacidad para inducir la diferenciación de linfocitos T *naïve* hacia el perfil Th1 y en cambio existe un aumento en la expresión de PD-L1 e IL-10 lo que promueve la diferenciación hacia el perfil T regulador.<sup>(177, 215, 216)</sup>

Dentro de los factores de transcripción encargados de regular la transcripción de citocinas y moléculas de coestimulación, en específico de PD-L1 y PD-L2, se encuentra IRF-4.<sup>(217, 218)</sup> Hasta el momento la información acerca de la función transcripcional de IRF-4 en DCs es controversial, ya que se ha reportado que en modelos murinos las DCs PD-L2+ IRF-4+ expresan altos niveles de BAFT3+ factor necesario para la polarización de la respuesta inmunológica hacia el perfil Th2.<sup>(219)</sup>

Pero también se ha descrito que IRF-4 promueve la generación de células Tregs, y que en DCs derivadas de la médula ósea de ratones deficientes de IRF-4 la generación de Tregs y expresión de PD-L2 se reduce severamente.<sup>(157)</sup>

En sujetos con CA observamos un aumento en la expresión de IRF-4 en la condición de estímulo de Der-p comparado con LPS. Se ha observado en linfocitos T de sujetos con asma que existe un aumento en la expresión del RNA mensajero de IRF-4 comparado con los sanos, así como de citocinas del perfil Th2.<sup>(220)</sup> Por lo que al aumentar el número de nuestros pacientes incluidos podremos analizar la expresión de IRF-4 y correlacionarlo con la expresión de PD-L2 y PD-L1.

Hasta ahora nosotros podemos observar que existe un aumento en la expresión de CD86 en las MoDCs de sujetos con CA bajo cualquier estímulo comparado con la expresión basal de las MoDCs de sujetos sin alergia. Por otro lado, PD-L1 y PD-L2 se encuentran disminuidos bajo cualquier tipo de estímulo en las MoDCs de los sujetos con CA comparado con la expresión de MoDCs estimuladas de sujetos sin alergia. Al contrario de lo esperado, existe una disminución de la expresión de ICOS-L bajo cualquier tipo de estímulo en las MoDCs de los sujetos con CA comparado con la expresión de MoDCs estimulados con LPS.

-Efecto de la administración de SLIT sobre las características clínico-oftalmológicas en sujetos con CA antes y al término del tratamiento con el primer frasco de SLIT.

La CA requiere de una atención personalizada integrada por un equipo de médicos oftalmólogos y alergólogos los cuales realicen una historia clínica detallada y un examen físico general, así como un examen físico directo de la superficie ocular para evaluar aspecto del párpado, margen del párpado y líneas de Marx, hiperemia conjuntival y exudado, así como el compromiso limbal y corneal, esto se realiza mediante el uso de la lámpara de hendidura,

Esta evaluación permite ofrecerles a los pacientes con CA la mejor opción terapéutica para tratar los síntomas de su enfermedad, sin embargo, existen pacientes cuya sintomatología alérgica ocular no mejora bajo ningún esquema de tratamiento farmacológico convencional, por lo que se tienen que explorar otras opciones como la SLIT.<sup>(13)</sup>

Hasta este momento nosotros solo podemos evaluar el efecto de la administración de SLIT sobre las características de signos y síntomas en sujetos con CA antes y al término del primer frasco con SLIT, los cuales fueron evaluados mediante la escala de evaluación de Robles-Contreras en el año 2011.<sup>(1)</sup>

Observamos que, aunque no existe una disminución estadísticamente significativa entre la presentación de síntomas y signos oculares antes y después del primer frasco de SLIT, clínicamente los sujetos mejoraron sus puntuaciones en la escala de gravedad.

Lo cual concuerda con lo reportado en la literatura en donde se observa que sujetos con asma<sup>(221)</sup>, rinoconjuntivitis<sup>(222)</sup> y CA <sup>(223)</sup> de estudios controlados con placebo e AIT contra el ácaro de polvo, que los sujetos con alergia tienen una mejoría clínica bajo el tratamiento con AIT ya que disminuye la sintomatología así como la necesidad de medicamentos sintomáticos.

Lo que nos permite observar que posterior al primer frasco de tratamiento con SLIT (28 días) ya se podrían estar generando cambios en el microambiente ocular e inferimos que existe una disminución de los mediadores de la inflamación y por ende disminuye la activación de receptores especialmente los H1 y H2 de las fibras sensoriales los cuales generan la sintomatología característica de la CA.<sup>(56, 224)</sup>

Otro aspecto importante a revisar en los sujetos con CA bajo el tratamiento con SLIT es la calidad de vida, ya que nos permite conocer que tan molestos son los síntomas, rendimiento en las actividades diarias, trastornos del sueño e incluso reacciones adversas.<sup>(225)</sup>

Existen reportes que asocian a la CA de forma constante con irritabilidad, frustración y vergüenza, así como, cansancio, disminución de la productividad escolar y

concentración.<sup>(225, 226)</sup> Es importante conocer los cambios en la calidad de vida posterior al uso de SLIT en estos sujetos,<sup>(227)</sup> por lo que el uso del cuestionario de calidad de vida para rinoconjuntivitis validado para la edad pediátrica estandarizado (PRQLQ) en población mexicana nos es de utilidad. Este cuestionario cuenta con cinco dominios entre los cuales se incluyen síntomas oculares (síntomas de nariz, síntomas de ojos, problemas prácticos, otros síntomas y limitación de actividades) haciendo este cuestionario de utilidad para evaluar cada aspecto de la percepción de calidad de vida de los sujetos en edad pediátrica. <sup>(16)</sup>

Se ha reportado que los sujetos con rinitis alérgica y CA presentan dolor de cabeza generada por entrecerrar los ojos y el parpadeo constante.<sup>(228)</sup> Por otro lado, también se ha reportado que estos pacientes presentan cansancio producido por falta de sueño, incluso se ha reportado que la restricción de una hora de sueño puede conducir a disfunción en la corteza prefrontal, afectando el comportamiento y a la función cognitiva, esta última también es influenciada por el aumento del estrés oxidativo.<sup>(229-231)</sup>

Nosotros observamos que posterior al tratamiento con el primer frasco de SLIT existe una disminución clínicamente significativa de la percepción de los síntomas, en los problemas prácticos y en la limitación de actividades de sujetos con CA. Pero sobretodo observamos una disminución estadísticamente significativa en la percepción de síntomas como dolor de cabeza, cansancio, malestar general y tener sed.

Otro punto importante en la calidad de vida al recibir el tratamiento de SLIT a evaluar son las reacciones adversas, las cuales ocurren durante el uso habitual de un medicamento y caracterizan por ser un efecto no deseado en indeseable.<sup>(232)</sup> Y pesar de que se ha descrito que la administración de la inmunoterapia alérgeno específica por medio de la vía sublingual es una opción segura y eficaz.<sup>(233)</sup> En ensayos clínicos se ha reportado que las principales reacciones adversas se presentan de forma local en el sitio de administración, limitándose a boca, labios, lengua, faringe y garganta. Sin embargo, en raras ocasiones también se han reportado reacciones adversas como síntomas de rinitis, prurito ótico, asma, urticaria o anafilaxia.<sup>(234)</sup>

Y por último durante la visita 2 se les realiza un cuestionario dirigido para identificar si tuvieron alguna reacción. Hasta este momento no hemos tenido reportes de reacciones adversas posterior al uso de SLIT en sujetos con CA, sin embargo, debemos continuar promoviendo el reporte de reacciones por medio de medios de farmacovigilancia pasiva y activa.<sup>(235)</sup>

## Capítulo 8 Conclusiones

Al realizar esta investigación traslacional (inmuno-oftalmológica) entendimos por medio del estudio en MoDCs que las moléculas de coestimulación de la familia B7 y del factor de transcripción IRF-4 se encuentran expresadas de forma basal en sujetos sin alergia y que en presencia de LPS tienen un perfil de expresión dependiente del tiempo de exposición y concentración con dicho estímulo infiriendo que la máxima expresión de estas moléculas se encuentra influenciado por las citocinas presentes en el microambiente generado en los cultivos.

Al estudiar estas moléculas de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4 en los sujetos con CA se observa que también expresan de forma basal estas moléculas. Además, se encontró que posterior al estímulo con ligandos del receptor 4 tipo Toll aumenta la expresión de C86 (molécula coestimuladora de activación) y no se observan modificaciones en la expresión de las moléculas de coestimulación de inhibición (PD-L1 y PD-L2). Lo que sugiere que en la MoDCs al captar y procesar al alérgeno expresan en menor proporción moléculas inhibitorias lo que puede influenciar en la desregulación de la respuesta inmunológica hacia los alérgenos al no cumplir con su función de inducción de tolerancia.

Clínicamente estas alteraciones hasta ahora observadas en la expresión de las moléculas de coestimulación presentes en la superficie en las DCs son parte fundamental de la desregulación de la respuesta inmunológica hacia los alérgenos causando el cuadro alérgico ocular, por lo que debemos continuar su estudio con la finalidad de entender a más profundidad la fisiopatología de los procesos alérgicos para poder así generar o mejorar las estrategias terapéuticas para esta enfermedad tan frecuente pero subestimada.

Hasta este momento el único tratamiento capaz de inducir tolerancia y modificar la historia natural de los sujetos con alergia es la inmunoterapia alérgeno específica, dentro de nuestros hallazgos clínicos, observamos que en los resultados individuales de cada sujeto posterior al tratamiento con el primer frasco de SLIT existe una mejoría en la mayoría de los síntomas y signos, así como en la percepción de la calidad de vida de los sujetos con CA.

## **Capítulo 9 Perspectivas y limitaciones**

Debido a que nuestro tamaño de muestra hasta ahora es pequeño los resultados obtenidos no pueden ser generalizados, por lo que es fundamental que se continúe con la inclusión de sujetos para conocer con exactitud las modificaciones en la expresión de las moléculas de coestimulación y factor IRF-4 en las MoDCs de sujetos sin alergia comparados con la de los sujetos con CA.

Por lo otro lado, para conocer el efecto de las diferencias en la expresión de las moléculas de coestimulación de la familia B7 (CD86, ICOS-L, PD-L1 y PD-L2) así como del factor IRF-4 en MoDCs posterior a la estimulación con LPS en sujetos con sanos comparado con los sujetos con CA, se podrían realizar cocultivos de MoDCs con linfocitos T en presencia y ausencia de anticuerpos bloqueadores de todas estas moléculas, posteriormente, el sobrenadante de los linfocitos T se caracterizaría para conocer el perfil de citocinas generado en ese microambiente.

Se deben incluir a los sujetos que hayan terminado el frasco 6 (seis meses de tratamiento) ya que en esta fase de tratamiento es cuando se comienzan a observar los cambios inmunológicos asociados al tratamiento con SLIT. Al realizarles las evaluaciones oftálmico-inmunológicas planeadas podremos realizar correlaciones de la expresión de estas moléculas de la familia B7 y factor IRF-4 con la gravedad de síntomas y modificaciones en la calidad de vida para así determinar si algunos de estos parámetros inmunológicos podrían funcionar como biomarcadores de eficacia de esta terapia e incluso en el futuro estos ensayos puedan ser base para el diseño de estudios confirmatorios más grandes, así como para la mejora o diseño de inmunoterapias más eficientes

## Capítulo 10 Referencias

1. Atzin Robles-Contreras CSea. AllergicConjunctivitis: An Immunological Point of View, Conjunctivitis - A Complex and Multifaceted Disorder2011.
2. Skalicky SE. Ocular and Visual Physiology. : Springer; 2016. 363 p.
3. Rosario N, Bielory L. Epidemiology of allergic conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011;11(5):471-6.
4. México GdICd. Anuario de morbilidad nacional. 2019.
5. Galicia-Carreón J, Santacruz C, Hong E, Jiménez-Martínez MC. The ocular surface: from physiology to the ocular allergic diseases. *Rev Alerg Mex.* 2013;60(4):172-83.
6. Leonardi A, Motterle L, Bortolotti M. Allergy and the eye. *Clin Exp Immunol.* 2008;153 Suppl 1:17-21.
7. J Ricardo Sánchez Santa Ana SSC, Luis Enrique Otero Hernández Prevalencia de alérgenos en pacientes con rinitis alérgica, atendidos en el Hospital Central Militar. *AN ORL MEX.* 2012;57(1):1-7.
8. Johansson SG BT, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;113:832–6.
9. Ciprandi G CI, Vizzaccaro A, Tosca M, Passalacqua G, Palleschini E, Canonica GW. Seasonal and perennial allergic rhinitis: is this classification adherent to real life? *Allergy.* 1990;60(7):882-7.
10. David Alexander Morales Marín BZO, Gustavo Gabriel Mendieta, Alcántara. Epidemiología y tratamiento de conjuntivitis alérgica en un Hospital Pediátrico. *Investigación Materno Infantil.* 2010;II(3):108-12.
11. Baldaçara RPdC. Prevalence of allergen sensitization, most important allergens and factors associated with atopy in children. *Sao Paulo Med J.* 2013;131.
12. Leonardi A, Bogacka E, Fauquert JL, Kowalski ML, Groblewska A, Jedrzejczak-Czechowicz M, et al. Ocular allergy: recognizing and diagnosing hypersensitivity disorders of the ocular surface. *Allergy.* 2012;67(11):1327-37.
13. MC S-H. Consensus document on allergic conjunctivitis (DECA). *Investig Allergol Clin Immunol* 2011;25(2):94-106.
14. Guillermina Cortés-Morales AAV-M, Mariana Esther Arroyo-Cruz, Guillermo Velázquez-Sámamo. Frecuencia de sensibilización a aeroalergenos en pacientes con conjuntivitis alérgica estacional y perenne. *Revista Alergia México.* 2014;4(61):141-6.
15. Dhami S, Nurmatov, U., Roberts, G. et al. Allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis: protocol for a systematic review. *Clin Transl Allergy.* 2016;6.
16. Juniper EF, Howland WC, Roberts NB, Thompson AK, King DR. Measuring quality of life in children with rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101(2 Pt 1):163-70.
17. Kumar S. Vernal keratoconjunctivitis: a major review. *Acta Ophthalmologica.* 2009;87:133-47.
18. Bielory L. Allergic and immunologic disorders of the eye. Part II: ocular allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2000b;106(6):1019-32.
19. La Rosa M, Lionetti E, Reibaldi M, Russo A, Longo A, Leonardi S, et al. Allergic



- conjunctivitis: a comprehensive review of the literature. *Ital J Pediatr.* 2013;39:18.
20. Groneberg DA, Bielory L, Fischer A, Bonini S, Wahn U. Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis. *Allergy.* 2003;58(11):1101-13.
  21. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):445-54.
  22. Redlich CA. Skin exposure and asthma: is there a connection? *Proc Am Thorac Soc.* 2010;7(2):134-7.
  23. Greter M, Helft J, Chow A, Hashimoto D, Mortha A, Agudo-Cantero J, et al. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity.* 2012;36(6):1031-46.
  24. Gough L, Schulz O, Sewell HF, Shakib F. The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. *J Exp Med.* 1999;190(12):1897-902.
  25. Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest.* 1999;104(1):123-33.
  26. Wan H, Winton HL, Soeller C, Gruenert DC, Thompson PJ, Cannell MB, et al. Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1. *Clin Exp Allergy.* 2000;30(5):685-98.
  27. Yusuke Yoshida, Yuriko Ban, Kinoshita S. Tight Junction Transmembrane Protein Claudin Subtype Expression and Distribution in Human Corneal and Conjunctival Epithelium. 2009;50:2103-8.
  28. Seto T, Takai T, Ebihara N, Matsuoka H, Wang XL, Ishii A, et al. SLPI prevents cytokine release in mite protease-exposed conjunctival epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379(3):681-5.
  29. Redfern RL, McDermott AM. Toll-like receptors in ocular surface disease. *Exp Eye Res.* 2010;90(6):679-87.
  30. Jacquet A. Innate immune responses in house dust mite allergy. *ISRN Allergy.* 2013;2013:735031.
  31. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(3):193-204.
  32. Li DQ, Zhang L, Pflugfelder SC, De Paiva CS, Zhang X, Zhao G, et al. Short ragweed pollen triggers allergic inflammation through Toll-like receptor 4-dependent thymic stromal lymphopoietin/OX40 ligand/OX40 signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(6):1318-25 e2.
  33. Imai Y, Hosotani Y, Ishikawa H, Yasuda K, Nagai M, Jitsukawa O, et al. Expression of IL-33 in ocular surface epithelium induces atopic keratoconjunctivitis with activation of group 2 innate lymphoid cells in mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):10053.
  34. Yosuke Asada, Akira Matsuda, Kanji Hori, Satoshi Iwamoto, Nobuyuki Ebihara, Akira Murakami, et al. Interleukin(IL)-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), but not IL-25, induced Allergic Conjunctivitis in Mouse Models Papain-Induced Conjunctivitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2014;55.
  35. Norbury CC. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology.* 2006;117(4):443-51.

36. Simona Schlereth, Hyun Soo Lee, Payal Khandelwal, Daniel R. Saban, et-al. Blocking CCR7 at the Ocular Surface Impairs the Pathogenic Contribution of Dendritic Cells in Allergic Conjunctivitis. *Immunopathology and Infectious Diseases*. 2012;180:2351-60.
37. KleinJan A, Willart M, van Rijt LS, Braunstahl GJ, Leman K, Jung S, et al. An essential role for dendritic cells in human and experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(5):1117-25.
38. Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang JM, Bucana C, al. e. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol*. 1990;1(9):2833-8.
39. Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med*. 2001;193(1):51-60.
40. Lundgren M, Persson U, Larsson P, Magnusson C, Smith CI, Hammarstrom L, et al. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol*. 1989;19(7):1311-5.
41. James L. Stahl, Ellen B. Cook, Neal P. Barney, Frank M. Graziano, al. e. Human conjunctival mast cells: expression of Fc $\epsilon$ RI, c-kit, ICAM-1, and IgE. *Pathophysiology of Ocular Allergy*. 2002;2.
42. Togias A. Systemic effects of local allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(1 Suppl):S8-14.
43. Leonardi A. The central role of conjunctival mast cells in the pathogenesis of ocular allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002;2(4):325-31.
44. Andrea Leonardi, Chiara De Dominicis, Laura Motterle, et-al. Immunopathogenesis of ocular allergy: a schematic approach to different clinical entities. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2007;7:429-35.
45. Bacon AS, Ahluwalia P, Irani AM, Schwartz LB, Holgate ST, Church MK, et al. Tear and conjunctival changes during the allergen-induced early- and late-phase responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(5):948-54.
46. Acosta MC, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J. Changes in sensory activity of ocular surface sensory nerves during allergic keratoconjunctivitis. *Pain*. 2013;154(11):2353-62.
47. Maurer D, Ebner C, Reininger B, Fiebiger E, Kraft D, Kinet JP, et al. The high affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J Immunol*. 1995;154(12):6285-90.
48. Manzouri B, Ohbayashi M, Leonardi A, Larkin DF, Ono SJ. Characterization of dendritic cell phenotype in allergic conjunctiva: increased expression of Fc(epsilon)RI, the high-affinity receptor for immunoglobulin E. *Eye (Lond)*. 2009;23(11):2099-104.
49. van Rijt LS, Vos N, Willart M, Kleinjan A, Coyle AJ, Hoogsteden HC, et al. Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(1):166-73.
50. Leonardi A, Brun P, Tavolato M, Plebani M, Abatangelo G, Secchi AG. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Eur J Ophthalmol*. 2003;13(7):606-10.

51. Leonardi A. Allergy and allergic mediators in tears. *Exp Eye Res.* 2013;117:106-17.
52. Lisa A. Beck M, Donald Y.M. Leung, MD, PhD. Allergen sensitization through the skin induces systemic allergic responses. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL.* 2000;106:S258-S63.
53. Cook EB, Stahl JL, Miller ST, Gern JE, Sukow KA, Graziano FM, et al. Isolation of human conjunctival mast cells and epithelial cells: tumor necrosis factor-alpha from mast cells affects intercellular adhesion molecule 1 expression on epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(2):336-43.
54. Fukagawa K, Saito H, Tsubota K, Shimmura S, Tachimoto H, Akasawa A, et al. RANTES production in a conjunctival epithelial cell line. *Cornea.* 1997;16(5):564-70.
55. Kumagai N, Fukuda K, Ishimura Y, Nishida T. Synergistic induction of eotaxin expression in human keratocytes by TNF-alpha and IL-4 or IL-13. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1448-53.
56. Stahl JL, Cook EB, Barney NP, Graziano FM. Pathophysiology of ocular allergy: the roles of conjunctival mast cells and epithelial cells. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2002;2(4):332-9.
57. Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, Calder VL. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Exp Allergy.* 2006;36(6):777-84.
58. Stahl JL, Cook EB, Graziano FM, NP B. Differential and cooperative effects of TNF alpha, IL-1 beta, and IFN gamma on human cell conjunctival epithelial cell receptor expression and chemokine release. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2003;44:2010-5.
59. Palomares O, Akdis M, Martin-Fontecha M, Akdis CA. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunol Rev.* 2017;278(1):219-36.
60. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(4):271-83.
61. Luo J, Guo H, Liu Z, Peng T, Hu X, Han M, et al. Analysis of Peripheral B Cell Subsets in Patients With Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2018;10(3):236-43.
62. Shaoqing Y, Yinjian C, Zhiqiang Y, Ruxin Z, Na C, Rongming G. The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with allergic rhinitis. *Allergol Select.* 2018;2(1):144-50.
63. J. Galicia-Carreón, C. Santacruz, J. Ayala-Balboa, A. Robles-Contreras, S. M. Perez-Tapia, Y. Garfias, et al. An Imbalance between Frequency of CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells and CCR4+ and CCR9+ Circulating Helper T Cells Is Associated with Active Perennial Allergic Conjunctivitis. *Clinical and Developmental Immunology.* 2013:1-11.
64. Sumi T, Fukushima A, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Takeuchi M, et al. Thymus-derived CD4+ CD25+ T cells suppress the development of murine allergic conjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;143(4):276-81.
65. Palomares O, Martin-Fontecha M, Lauener R, Traidl-Hoffmann C, Cavkaytar O, Akdis M, et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta. *Genes Immun.* 2014;15(8):511-20.

66. al. JYe. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effect or populations within circulating CD4+ T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000;68:568-74.
67. Uehara S, Grinberg A, Farber JM, Love PE. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol*. 2002;168(6):2811-9.
68. Pennati A, Ng S, Wu Y, Murphy JR, Deng J, Rangaraju S, et al. Regulatory B Cells Induce Formation of IL-10-Expressing T Cells in Mice with Autoimmune Neuroinflammation. *J Neurosci*. 2016;36(50):12598-610.
69. Alberto Salazar, Israel Casanova-Méndez, Michele Pacheco-Quito, Henry Velázquez-Soto, Julio Ayala-Balboa, Enrique O. Graue-Hernández, et al. Low Expression of IL-10 in Circulating Bregs and Inverted IL-10/TNF- $\alpha$  Ratio in Tears of Patients with Perennial Allergic Conjunctivitis: A Preliminary Study. *Int J Mol Sci*. 2019;20:1-14.
70. Carr W, Schaeffer J, Donnenfeld E. Treating allergic conjunctivitis: A once-daily medication that provides 24-hour symptom relief. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2016;7(2):107-14.
71. Sandra Y. Lin EN, Suarez-Cuervo C, et al. Allergen-Specific Immunotherapy for the Treatment of Allergic Rhinoconjunctivitis and/or Asthma: Comparative Effectiveness Review Comparative Effectiveness Reviews. 2013;111:2-489.
72. Pedram Hamrah MD, MD, MPH, MSc. Allergic conjunctivitis: Management. In: *UpToDate*, editor. 2019.
73. Bjermer L, Westman M, Holmstrom M, Wickman MC. The complex pathophysiology of allergic rhinitis: scientific rationale for the development of an alternative treatment option. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2019;15:24.
74. Désirée Larenas-Linnemann ea. GUMIT 2019, Guía Mexicana de Inmunoterapia. Guía de diagnóstico de alergia mediada por IgE e inmunoterapia aplicando el método ADAPTE. *Revista Alergia México*. 2019;66:1-105.
75. Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Van Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy*. 2006;61(2):151-65.
76. Jutel M, Akdis CA. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2011;66(6):725-32.
77. Moote W, Kim H, Ellis AK. Allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018;14(Suppl 2):53.
78. Moingeon P, Mascarell L. Induction of tolerance via the sublingual route: mechanisms and applications. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:623474.
79. Moingeon P. Update on Immune Mechanisms Associated with sublingual Immunotherapy: Practical Implications for the Clinician. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL: IN PRACTICE*. 2013;1:228-41.
80. Gartner-Hiatt. *Texto atlas de histología*: McGraw-Hill; 2008.
81. Frati F, Moingeon P, Marcucci F, Puccinelli P, Sensi L, Di Cara G, et al. Mucosal immunization application to allergic disease: sublingual immunotherapy. *Allergy Asthma Proc*. 2007;28(1):35-9.
82. Novak N, Haberstick J, Bieber T, Allam JP. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends Mol Med*. 2008;14(5):191-8.
83. Scadding G, Durham S. Mechanisms of sublingual immunotherapy. *J Asthma*. 2009;46(4):322-34.

84. Marcucci F, Sensi L, Frati F, Senna GE, Canonica GW, Parmiani S, et al. Sublingual tryptase and ECP in children treated with grass pollen sublingual immunotherapy (SLIT): safety and immunologic implications. *Allergy*. 2001;56(11):1091-5.
85. Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Berge S, Appel T, et al. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεR1 expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(1):141-8.
86. Allam JP, Peng WM, Appel T, Wenghoefer M, Niederhagen B, Bieber T, et al. Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(2):368-74 e1.
87. Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(3):603-9 e5.
88. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):621-31.
89. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(3):707-13.
90. Jay DC, Nadeau KC. Immune mechanisms of sublingual immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14(11):473.
91. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J*. 2015;8(1):17.
92. Canonica GW, Passalacqua G. Noninjection routes for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(3):437-48; quiz 49.
93. Cosmi L, Santarlasci V, Angeli R, Liotta F, Maggi L, Frosali F, et al. Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon-gamma- and interleukin-10-production. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(3):261-72.
94. Bahceciler NN, Arikan C, Taylor A, Akdis M, Blaser K, Barlan IB, et al. Impact of sublingual immunotherapy on specific antibody levels in asthmatic children allergic to house dust mites. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;136(3):287-94.
95. La Rosa M, Ranno C, Andre C, Carat F, Tosca MA, Canonica GW. Double-blind placebo-controlled evaluation of sublingual-swallow immunotherapy with standardized *Parietaria judaica* extract in children with allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(2 Pt 1):425-32.
96. Lima MT, Wilson D, Pitkin L, Roberts A, Nouri-Aria K, Jacobson M, et al. Grass pollen sublingual immunotherapy for seasonal rhinoconjunctivitis: a randomized controlled trial. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(4):507-14.
97. Andre C, Vatrinet C, Galvain S, Carat F, Sicard H. Safety of sublingual-swallow immunotherapy in children and adults. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;121(3):229-34.
98. Aboshady OA, Elghanam KM. Sublingual immunotherapy in allergic rhinitis: efficacy, safety, adherence and guidelines. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2014;7(4):241-9.
99. FM. B. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust J Sci*. 1957;20:67-9.

100. Gowans JL. The Role of Lymphocytes in the Destruction of Homografts. *Br Med Bull.* 1965;21:106-10.
101. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137(5):1142-62.
102. Williams M, Dutertre CA, Scott CL, McGovern N, Sichien D, Chakarov S, et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity.* 2016;45(3):669-84.
103. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018;154(1):3-20.
104. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 2013;140(1):22-30.
105. Nair S, Archer GE, Tedder TF. Isolation and generation of human dendritic cells. *Curr Protoc Immunol.* 2012;Chapter 7:Unit7 32.
106. Sim WJ, Malinarich F, Fairhurst AM, Connolly JE. Generation of Immature, Mature and Tolerogenic Dendritic Cells with Differing Metabolic Phenotypes. *J Vis Exp.* 2016(112).
107. Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(2):101-13.
108. Holtzschke T, Lohler J, Kanno Y, Fehr T, Giese N, Rosenbauer F, et al. Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell.* 1996;87(2):307-17.
109. Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, CH U. Id2 and Id3 inhibit development of CD34+ stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. *J Exp Med.* 200;1992:1775–84. .
110. Hacker C, Kirsch RD, Ju XS, Hieronymus T, Gust TC, Kuhl C, et al. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol.* 2003;4(4):380-6.
111. Scott CL, Soen B, Martens L, Skrypek N, Saelens W, Taminau J, et al. The transcription factor Zeb2 regulates development of conventional and plasmacytoid DCs by repressing Id2. *J Exp Med.* 2016;213(6):897-911.
112. Allman D, et al. Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood.* 2006;108::4025–34.
113. Cytlak U, Resteu A, Bogaert D, Kuehn HS, Altmann T, Gennery A, et al. Ikaros family zinc finger 1 regulates dendritic cell development and function in humans. *Nat Commun.* 2018;9(1):1239.
114. Rathinam C, Geffers R, Yucel R, Buer J, Welte K, Moroy T, et al. The transcriptional repressor Gfi1 controls STAT3-dependent dendritic cell development and function. *Immunity.* 2005;22(6):717-28.
115. Bigley V, Haniffa M, Doulatov S, Wang XN, Dickinson R, McGovern N, et al. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J Exp Med.* 2011;208(2):227-34.
116. Merad Miriam, et-al. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology.* 2013;31:563–604., .

117. Sichiën D, Scott CL, Martens L, Vanderkerken M, Van Gassen S, Plantinga M, et al. IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity*. 2016;45(3):626-40.
118. Gilliet M, et al. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3 ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 2001;195:953–8.
119. Briseno CG, Haldar M, Kretzer NM, Wu X, Theisen DJ, Kc W, et al. Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cell Rep*. 2016;15(11):2462-74.
120. Ohbayashi M, Manzouri B, Flynn T, Toda M, Ikeda Y, Nakamura T, et al. Dynamic changes in conjunctival dendritic cell numbers, anatomical position and phenotype during experimental allergic conjunctivitis. *Exp Mol Pathol*. 2007;83(2):216-23.
121. Rex M, McCallum LMC, and Barton F. Hayne. Analysis of Corneal and Conjunctival Microenvironments Using Monoclonal Antibodies. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1993;34:1793-803.
122. Baudouin C, Brignole F, Pisella PJ, Becquet F, Philip PJ. Immunophenotyping of human dendriform cells from the conjunctival epithelium. *Curr Eye Res*. 1997;16(5):475-81.
123. Rossi G, Heveker N, Thiele B, Gelderblom H, Steinbach F. Development of a Langerhans cell phenotype from peripheral blood monocytes. *Immunol Lett*. 1992;31(2):189-97.
124. Yoshida A, Imayama S, Sugai S, Kawano Y, Ishibashi T. Increased number of IgE positive Langerhans cells in the conjunctiva of patients with atopic dermatitis. *Br J Ophthalmol*. 1997;81(5):402-6.
125. Abu-el-Asrar AM, et al. Langerhans' cells in vernal keratoconjunctivitis express the costimulatory molecule 87-2 (CD86), but not 87-1 (CD80). *Eye*. 2001;15(5):648-54.
126. Merayo-Llôves J, Zhao TZ, Dutt JE, Foster CS. A new murine model of allergic conjunctivitis and effectiveness of nedocromil sodium. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97(5):1129-40.
127. Whitcup SM, Chan CC, Luyo DA, Bo P, Li Q. Topical cyclosporine inhibits mast cell-mediated conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(13):2686-93.
128. Kunert KS, Keane-Myers AM, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Gipson IK. Alteration in goblet cell numbers and mucin gene expression in a mouse model of allergic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(11):2483-9.
129. Castiello L, Sabatino M, Jin P, Clayberger C, Marincola FM, Krensky AM, et al. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(4):457-66.
130. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol*. 2013;4:82.
131. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):984-93.
132. Lombardi V, Singh AK, Akbari O. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(3):179-89.

133. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med*. 1991;173(3):721-30.
134. Bashian G. G. CMB, S.-K. Huang, A. Kagey-Sobotka, L. M. Lichtenstein, and D. M. Essayan. . Differential regulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses by the B-7 homologues, CD80 and CD86. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17:235-42.
135. Nakada M, Nishizaki K, Yoshino T, Okano M, Masuda Y, Ohta N, et al. CD86 (B7-2) antigen on B cells from atopic patients shows selective, antigen-specific upregulation. *Allergy*. 1998;53(5):527-31.
136. Bitar Manzouri MO, Andrea Leonardi, Dilniya Fattah,, Daniel F P Larkin SJO. Characterisation of the phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in allergic conjunctiva. *Br J Ophthalmol* 2. 2010;94:1662-7.
137. Pereira C, Tavares B, Loureiro G, Paiva A, Henriques A, Abrantes M, et al. Dynamics of CD86 expression on allergic inflammation--new insights. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2009;3(2):128-31.
138. Yoshinaga SK, Zhang M, Pistillo J, Horan T, Khare SD, Miner K, et al. Characterization of a new human B7-related protein: B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS. *Int Immunol*. 2000;12(10):1439-47.
139. Martin-Orozco E, Norte-Munoz M, Martinez-Garcia J. Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. *Front Pediatr*. 2017;5:117.
140. Mak TW, Shahinian A, Yoshinaga SK, Wakeham A, Boucher LM, Pintilie M, et al. Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat Immunol*. 2003;4(8):765-72.
141. Kadkhoda K, Wang S, Fan Y, Qiu H, Basu S, Halayko AJ, et al. ICOS ligand expression is essential for allergic airway hyperresponsiveness. *Int Immunol*. 2011;23(4):239-49.
142. Botturi K, Lacoueille Y, Cavailles A, Vervloet D, Magnan A. Differences in allergen-induced T cell activation between allergic asthma and rhinitis: Role of CD28, ICOS and CTLA-4. *Respir Res*. 2011;12:25.
143. Shen C, Hupin C, Froidure A, Detry B, Pilette C. Impaired ICOSL in human myeloid dendritic cells promotes Th2 responses in patients with allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(6):831-41.
144. Maazi H, Patel N, Sankaranarayanan I, Suzuki Y, Rigas D, Soroosh P, et al. ICOS:ICOS-ligand interaction is required for type 2 innate lymphoid cell function, homeostasis, and induction of airway hyperreactivity. *Immunity*. 2015;42(3):538-51.
145. Nicole Selenko-Gebauer OM, Andreas Szekeres, Gerald Höfler, Elisabeth Guthann, Ulf Korthäuer, Gerhard Zlabinger, Peter Steinberger, Winfried F. Pickl, Hannes Stockinger, Walter Knapp and Johannes Stöckl. B7-H1 (Programmed Death-1 Ligand) on Dendritic Cells Is Involved in the Induction and Maintenance of T Cell Anergy. *J Immunol April*. 2003;170:3637-44.
146. Chen L, and Dallas B. Flies. Erratum: Molecular Mechanisms of T Cell Co-Stimulation and Co-Inhibition. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13:542–.



147. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51.
148. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009;206(13):3015-29.
149. Tsushima F, Iwai H, Otsuki N, Abe M, Hirose S, Yamazaki T, et al. Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses. *Eur J Immunol*. 2003;33(10):2773-82.
150. Ritprajak P, Hashiguchi M, Tsushima F, Chalermarp N, Azuma M. Keratinocyte-associated B7-H1 directly regulates cutaneous effector CD8+ T cell responses. *J Immunol*. 2010;184(9):4918-25.
151. Akbari O, Stock P, Singh AK, Lombardi V, Lee WL, Freeman GJ, et al. PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. *Mucosal Immunol*. 2010;3(1):81-91.
152. Wang Z, Tan F. The blockade of PD-1/PD-L1 pathway promotes the apoptosis of CD19(+) CD25(+) Bregs and suppresses the secretion of IL-10 in patients with allergic rhinitis. *Scand J Immunol*. 2019:e12836.
153. Nasiri Kalmarzi R, Fattahi N, Kaviani Z, Ataee P, Mansouri M, Moradi G, et al. Inverse correlation of soluble programmed cell death-1 ligand-1 (sPD-L1) with eosinophil count and clinical severity in allergic rhinitis patients. *Allergol Int*. 2017;66(2):326-31.
154. Chen Y, Mo J, Jia X, He Y. The B7 Family Member B7-H6: a New Bane of Tumor. *Pathol Oncol Res*. 2018;24(4):717-21.
155. Matsumoto K, Inoue H, Nakano T, Tsuda M, Yoshiura Y, Fukuyama S, et al. B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol*. 2004;172(4):2530-41.
156. Fukushima A, Yamaguchi T, Azuma M, Yagita H, Ueno H. Involvement of programmed death-ligand 2 (PD-L2) in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Br J Ophthalmol*. 2006;90(8):1040-5.
157. Vander Lugt B, Riddell J, Khan AA, Hackney JA, Lesch J, DeVoss J, et al. Transcriptional determinants of tolerogenic and immunogenic states during dendritic cell maturation. *J Cell Biol*. 2017;216(3):779-92.
158. Piconi S, Trabattoni D, Saresella M, Iemoli E, Schenal M, Fusi A, et al. Effects of specific immunotherapy on the B7 family of costimulatory molecules in allergic inflammation. *J Immunol*. 2007;178(3):1931-7.
159. Wang CM, Chuang JJ. Effect of mite allergen immunotherapy on the altered phenotype of dendritic cells in allergic asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;110(2):107-12.
160. Bellinghausen I, Klostermann B, Bottcher I, Knop J, Saloga J. Importance of the inducible costimulator molecule for the induction of allergic immune responses and its decreased expression on T helper cells after venom immunotherapy. *Immunology*. 2004;112(1):80-6.
161. Passalacqua G, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, Canonica GW, Casale TB, Cox L, et al. Grading local side effects of sublingual immunotherapy for respiratory allergy: speaking the same language. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(1):93-8.

162. Granucci F, Ferrero E, Foti M, Aggujaro D, Vettoretto K, Ricciardi-Castagnoli P. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect.* 1999;1(13):1079-84.
163. Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA, Pezzutto A, Richter G, Magaletti D, et al. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol.* 2000;164(9):4689-96.
164. Joanne Haller Hasskamp ea. Dendritic Cell Counts in the Peripheral Blood of Healthy Adults. *Am J Hematol.* 2005;78 314-5.
165. Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 2005;175(3):1373-81.
166. Xu Z, Shen J, Wang MH, Yi T, Yu Y, Zhu Y, et al. Comprehensive molecular profiling of the B7 family of immune-regulatory ligands in breast cancer. *Oncoimmunology.* 2016;5(8):e1207841.
167. Nielsen C, Barington T, Hansen S, Lillevang ST. Comment on "Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis". *J Immunol.* 2007;178(8):4708; author reply 9.
168. Paine A, Kirchner H, Immenschuh S, Oelke M, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. IL-2 upregulates CD86 expression on human CD4(+) and CD8(+) T cells. *J Immunol.* 2012;188(4):1620-9.
169. Han TH, Jin P, Ren J, Slezak S, Marincola FM, Stroncek DF. Evaluation of 3 clinical dendritic cell maturation protocols containing lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Immunother.* 2009;32(4):399-407.
170. Torres-Aguilar H, Sanchez-Torres C, Jara LJ, Blank M, Shoenfeld Y. IL-10/TGF-beta-treated dendritic cells, pulsed with insulin, specifically reduce the response to insulin of CD4+ effector/memory T cells from type 1 diabetic individuals. *J Clin Immunol.* 2010;30(5):659-68.
171. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med.* 2007;204(1):105-15.
172. Nieminen JK, Sipponen T, Farkkila M, Vaarala O. Monocyte-derived dendritic cells from Crohn's disease patients exhibit decreased ability to activate T helper type 17 responses in memory cells. *Clin Exp Immunol.* 2014;177(1):190-202.
173. Wolfle SJ, Strebovsky J, Bartz H, Sahr A, Arnold C, Kaiser C, et al. PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur J Immunol.* 2011;41(2):413-24.
174. Latarjet RL. Anatomía humana. 5, editor: Panamericana; 2019.
175. Weyand CM, Berry GJ, Goronzy JJ. The immunoinhibitory PD-1/PD-L1 pathway in inflammatory blood vessel disease. *J Leukoc Biol.* 2018;103(3):565-75.
176. Rodriguez-Garcia M, Porichis F, de Jong OG, Levi K, Diefenbach TJ, Lifson JD, et al. Expression of PD-L1 and PD-L2 on human macrophages is up-regulated by HIV-1 and differentially modulated by IL-10. *J Leukoc Biol.* 2011;89(4):507-15.
177. Gardner JK, Cornwall SMJ, Musk AW, Alvarez J, Mamotte CDS, Jackaman C, et al. Elderly dendritic cells respond to LPS/IFN-gamma and CD40L stimulation despite incomplete maturation. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195313.
178. Planes R, BenMohamed L, Leghmari K, Delobel P, Izopet J, Bahraoui E. HIV-1 Tat protein induces PD-L1 (B7-H1) expression on dendritic cells through tumor necrosis

- factor alpha- and toll-like receptor 4-mediated mechanisms. *J Virol.* 2014;88(12):6672-89.
179. Eguchi J, Kong X, Tenta M, Wang X, Kang S, Rosen ED. Interferon regulatory factor 4 regulates obesity-induced inflammation through regulation of adipose tissue macrophage polarization. *Diabetes.* 2013;62(10):3394-403.
180. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.* 2000;1(4):311-6.
181. Verboogen DRJ, Revelo NH, Ter Beest M, van den Bogaart G. Interleukin-6 secretion is limited by self-signaling in endosomes. *J Mol Cell Biol.* 2019;11(2):144-57.
182. Ryan KR, Hong M, Arkwright PD, Gennery AR, Costigan C, Dominguez M, et al. Impaired dendritic cell maturation and cytokine production in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without APECED. *Clin Exp Immunol.* 2008;154(3):406-14.
183. Kyoko Nohmi ea. Zymosan Induces Immune Responses Comparable with Those of Adults in Monocytes, Dendritic Cells, and Monocyte-Derived Dendritic Cells from Cord Blood. *The Journal of pediatrics.* 2015;167:155-62.
184. Dixon GL, Newton PJ, Chain BM, Katz D, Andersen SR, Wong S, et al. Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria. *Infect Immun.* 2001;69(7):4351-7.
185. Schulke S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front Immunol.* 2018;9:455.
186. Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol.* 2001;166(7):4312-8.
187. Kim NS, Torrez T, Langridge W. LPS enhances CTB-INSULIN induction of IDO1 and IL-10 synthesis in human dendritic cells. *Cell Immunol.* 2019;338:32-42.
188. Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol.* 2001;166(6):3837-45.
189. van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun.* 1999;67(8):3824-9.
190. Endang Kumolosasi. ea. Kinetics of Intracellular, Extracellular and Production of Pro-Inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Trop J Pharm Res.* 2014;13:536-43.
191. Deora A, Hegde S, Lee J, Choi CH, Chang Q, Lee C, et al. Transmembrane TNF-dependent uptake of anti-TNF antibodies. *MAbs.* 2017;9(4):680-95.
192. Lehner M, Kellert B, Proff J, Schmid MA, Diessenbacher P, Ensser A, et al. Autocrine TNF is critical for the survival of human dendritic cells by regulating BAK, BCL-2, and FLIPL. *J Immunol.* 2012;188(10):4810-8.
193. Maney NJ, Reynolds G, Krippner-Heidenreich A, Hilkens CMU. Dendritic cell maturation and survival are differentially regulated by TNFR1 and TNFR2. *J Immunol.* 2014;193(10):4914-23.

194. Salkowski CA et al. IL-12 is dysregulated in macrophages from IRF-1 and IRF-2 knockout mice. *J Immunol.* 1999;163.
195. Fultz MJ, Barber SA, Dieffenbach CW, Vogel SN. Induction of IFN-gamma in macrophages by lipopolysaccharide. *Int Immunol.* 1993;5(11):1383-92.
196. Lemoine R, Velge-Roussel F, Herr F, Felix R, Nivet H, Lebranchu Y, et al. Interferon gamma licensing of human dendritic cells in T-helper-independent CD8+ alloimmunity. *Blood.* 2010;116(16):3089-98.
197. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:453-79.
198. Khameneh HJ, Ho AW, Spreafico R, Derks H, Quek HQ, Mortellaro A. The Syk-NFAT-IL-2 Pathway in Dendritic Cells Is Required for Optimal Sterile Immunity Elicited by Alum Adjuvants. *J Immunol.* 2017;198(1):196-204.
199. Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol.* 2001;2(9):882-8.
200. Karakhanova S, Meisel S, Ring S, Mahnke K, Enk AH. ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets. *Eur J Immunol.* 2010;40(1):254-66.
201. Copland A, Sparrow A, Hart P, Diogo GR, Paul M, Azuma M, et al. Bacillus Calmette-Guerin Induces PD-L1 Expression on Antigen-Presenting Cells via Autocrine and Paracrine Interleukin-STAT3 Circuits. *Sci Rep.* 2019;9(1):3655.
202. Peng Q, Qiu X, Zhang Z, Zhang S, Zhang Y, Liang Y, et al. PD-L1 on dendritic cells attenuates T cell activation and regulates response to immune checkpoint blockade. *Nat Commun.* 2020;11(1):4835.
203. McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM, Pemper FL, Nelson DJ, Pimm CL, et al. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J Exp Med.* 1996;184(6):2429-32.
204. Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, et al. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2011;208(2):235-49.
205. Elliott SR, Macardle PJ, Robertson DM, Zola H. Expression of the costimulator molecules, CD80, CD86, CD28, and CD152 on lymphocytes from neonates and young children. *Hum Immunol.* 1999;60(11):1039-48.
206. Haczku A, Takeda K, Redai I, Hamelmann E, Cieslewicz G, Joetham A, et al. Anti-CD86 (B7.2) treatment abolishes allergic airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(5 Pt 1):1638-43.
207. Mark DA, Donovan CE, De Sanctis GT, Krinzman SJ, Kobzik L, Linsley PS, et al. Both CD80 and CD86 co-stimulatory molecules regulate allergic pulmonary inflammation. *Int Immunol.* 1998;10(11):1647-55.
208. Hammad H, Charbonnier AS, Duez C, Jacquet A, Stewart GA, Tonnel AB, et al. Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood.* 2001;98(4):1135-41.
209. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515-48.

210. Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shrestha S, Allison JP, Ruddle NH, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*. 2001;409(6816):97-101.
211. Uwadiae FI, Pyle CJ, Walker SA, Lloyd CM, Harker JA. Targeting the ICOS/ICOS-L pathway in a mouse model of established allergic asthma disrupts T follicular helper cell responses and ameliorates disease. *Allergy*. 2019;74(4):650-62.
212. Piconi S, Trabattoni D, Rainone V, Borgonovo L, Passerini S, Rizzardini G, et al. Immunological effects of sublingual immunotherapy: clinical efficacy is associated with modulation of programmed cell death ligand 1, IL-10, and IgG4. *J Immunol*. 2010;185(12):7723-30.
213. Lewkowich IP, Lajoie S, Stoffers SL, Suzuki Y, Richgels PK, Dienger K, et al. PD-L2 modulates asthma severity by directly decreasing dendritic cell IL-12 production. *Mucosal Immunol*. 2013;6(4):728-39.
214. Froidure A, Vandenplas O, D'Alpaos V, Evrard G, Pilette C. Persistence of asthma following allergen avoidance is associated with proTh2 myeloid dendritic cell activation. *Thorax*. 2015;70(10):967-73.
215. Abdi K, Singh NJ, Matzinger P. Lipopolysaccharide-activated dendritic cells: "exhausted" or alert and waiting? *J Immunol*. 2012;188(12):5981-9.
216. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2010;108:111-65.
217. Inaba K, Yashiro T, Hiroki I, Watanabe R, Kasakura K, Nishiyama C. Dual Roles of PU.1 in the Expression of PD-L2: Direct Transactivation with IRF4 and Indirect Epigenetic Regulation. *J Immunol*. 2020;205(3):822-9.
218. Yan Y, Zheng L, Du Q, Yan B, Geller DA. Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 regulate PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(9):1891-903.
219. Gao Y, Nish SA, Jiang R, Hou L, Licona-Limon P, Weinstein JS, et al. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity*. 2013;39(4):722-32.
220. Chen X, Gao YD, Yang J. Elevated interferon regulatory factor 4 levels in patients with allergic asthma. *J Asthma*. 2012;49(5):441-9.
221. Bonifazi F, Bilo MB. Efficacy of specific immunotherapy in allergic asthma: myth or reality? *Allergy*. 1997;52(7):698-710.
222. Creticos PS, Esch RE, Couroux P, Gentile D, D'Angelo P, Whitlow B, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of standardized ragweed sublingual-liquid immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):751-8.
223. Jongkhajornpong P, Laisuan W. Successful Subcutaneous Allergen-Specific Immunotherapy in Refractory Atopic Keratoconjunctivitis: A Case Report. *Case Rep Ophthalmol*. 2017;8(3):562-7.
224. Thurmond RL, Kazerouni K, Chaplan SR, Greenspan AJ. Antihistamines and itch. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;226:257-90.
225. Mir E, Panjabi C, Shah A. Impact of allergic rhinitis in school going children. *Asia Pac Allergy*. 2012;2(2):93-100.

226. Palmares J, Delgado L, Cidade M, Quadrado MJ, Filipe HP, Season Study G. Allergic conjunctivitis: a national cross-sectional study of clinical characteristics and quality of life. *Eur J Ophthalmol*. 2010;20(2):257-64.
227. Alvarez-Cuesta E, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling HJ, Valovirta E, et al. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2006;61 Suppl 82:1-20.
228. Williams DC, Edney G, Maiden B, Smith PK. Recognition of allergic conjunctivitis in patients with allergic rhinitis. *World Allergy Organ J*. 2013;6(1):4.
229. Loffredo L, Zicari AM, Occasi F, Perri L, Carnevale R, Angelico F, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in children with sleep disordered breathing: role of NADPH oxidase. *Atherosclerosis*. 2015;240(1):222-7.
230. Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, et al. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology*. 2005;64(7):1152-6.
231. Chen K, Zheng X, Li Z, Xiang H, Chen B, Zhang H. Risk factors analysis of attention deficit/hyperactivity disorder and allergic rhinitis in children: a cross-sectional study. *Ital J Pediatr*. 2019;45(1):99.
232. Sahu RK, Yadav R, Prasad P, Roy A, Chandrakar S. Adverse drug reactions monitoring: prospects and impending challenges for pharmacovigilance. *Springerplus*. 2014;3:695.
233. Winther L, Arnved J, Malling HJ, Nolte H, Mosbech H. Side-effects of allergen-specific immunotherapy: a prospective multi-centre study. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(3):254-60.
234. Passalacqua G, Nowak-Wegrzyn A, Canonica GW. Local Side Effects of Sublingual and Oral Immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(1):13-21.
235. ICH. Guidance for industry: E2E pharmacovigilance planning. 2005;950:1-18.
236. Gipson IK. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(10):4390; 1-8.
237. de Souza GA, Godoy LM, Mann M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol*. 2006;7(8):R72.
238. Prabha JL. Tear Secretion-A Short Review. *J Pharm Sci & Res*. 2014;6:155-7.
239. Stahl U, Willcox M, Stapleton F. Osmolality and tear film dynamics. *Clin Exp Optom*. 2012;95(1):3-11.
240. Butovich IA. Meibomian glands, meibum, and meibogenesis. *Exp Eye Res*. 2017;163:2-16.
241. Peters E. The Tear Film. In: Tasman WJ, Edward A., editor. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
242. R Schnetlera, WDH Gillanb, Koorsen G. Immunological and antimicrobial molecules in human tears: a review and preliminary report. *S Afr Optom*. 2012;71:123-32.
243. Hodges RR, Dartt DA. Tear film mucins: front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins. *Exp Eye Res*. 2013;117:62-78.

244. Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Dana MR. Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(3):639-46.
245. Forrester JV, Xu H, Kuffova L, Dick AD, McMenamin PG. Dendritic cell physiology and function in the eye. *Immunol Rev.* 2010;234(1):282-304.
246. Mayer WJ, Irschick UM, Moser P, Wurm M, Huemer HP, Romani N, et al. Characterization of antigen-presenting cells in fresh and cultured human corneas using novel dendritic cell markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(10):4459-67.
247. Van Buskirk EM. The anatomy of the limbus. *Eye (Lond).* 1989;3 ( Pt 2):101-8.
248. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(9):2514-22.
249. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol.* 2018;66(2):190-4.
250. Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat.* 2005a;206(3):271-85.
251. Melanie Hingorani VL-C, Leonard Bielory, Susan Lightman. Allergic conjunctivitis. In: ELSEVIER, editor. *Allergy2012.* p. 227-46.
252. Yasuhiro Takahashi, Akihide Watanabe, al. e. Anatomy of Secretory Glands in the Eyelid and Conjunctiva: A Photographic Review. (*Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2013;29:215-129.
253. Bielory L. Allergic and immunologic disorders of the eye. Part I: immunology of the eye. *J Allergy Clin Immunol.* 2000a;106(5):805-16.
254. Dua HS, Gomes JA, Donoso LA, Laibson PR. The ocular surface as part of the mucosal immune system: conjunctival mucosa-specific lymphocytes in ocular surface pathology. *Eye (Lond).* 1995;9 ( Pt 3):261-7.
255. Knop E, Knop N. Influence of the eye-associated lymphoid tissue (EALT) on inflammatory ocular surface disease. *Ocul Surf.* 2005 b;3(4 Suppl):S180-6.
256. Govindarajan B, Gipson IK. Membrane-tethered mucins have multiple functions on the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2010;90(6):655-63.
257. IK G. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2004;78:379-88.
258. Pearlman E. Toll-like Receptors at the Ocular Surface. *Ocul Surf.* 2008;6:108-16.
259. Anderson DF, Zhang S, Bradding P, McGill JI, Holgate ST, Roche WR. The relative contribution of mast cell subsets to conjunctival TH2-like cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(5):995-1001.
260. Macleod JD, Anderson DF, Baddeley SM, Holgate ST, McGill JI, Roche WR. Immunolocalization of cytokines to mast cells in normal and allergic conjunctiva. *Clin Exp Allergy.* 1997;27(11):1328-34.
261. Church MK, McGill JI. Human ocular mast cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2002;2(5):419-22.
262. Hingorani M, Metz D, Lightman SL. Characterisation of the normal conjunctival leukocyte population. *Exp Eye Res.* 1997;64(6):905-12.
263. Metz DP, Bacon AS, Holgate S, Lightman SL. Phenotypic characterization of T cells infiltrating the conjunctiva in chronic allergic eye disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(3):686-96.

264. Knop E, Knop N, Claus P. Local production of secretory IgA in the eye-associated lymphoid tissue (EALT) of the normal human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(6):2322-9.
265. Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy.* 2007;92:36-49.
266. Qu C, Brinck-Jensen NS, Zang M, Chen K. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int J Infect Dis.* 2014;19:1-5.
267. CD80 Gene [Internet]. LifeMapSciences. Available from: [www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD80](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD80).
268. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity.* 2016;44(5):955-72.
269. Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.* 2003;24(6):314-9.
270. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* 2005;6(6):223.
271. CD86 [Internet]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD86>.
272. PDCD1LG2-201 [Internet]. Available from: [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000197646;r=9:5510570-5571254;t=ENST00000397747](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000197646;r=9:5510570-5571254;t=ENST00000397747).
273. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999;5(12):1365-9.
274. PDCD1LG2 Gene [Internet]. LifeMapSciences. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PDCD1LG2>.
275. ICOSLG Gene [Internet]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ICOSLG>.
276. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001;2(3):261-8.
277. CD276 Gene [Internet]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD276>.
278. Picarda E, Ohaegbulam KC, Zang X. Molecular Pathways: Targeting B7-H3 (CD276) for Human Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2016;22(14):3425-31.
279. Qian Y, et al. B7-H4 Expression in Various Tumors Determined Using a Novel Developed Monoclonal Antibody. *Clinical and Experimental Medicine.* 2010;11:163-70.
280. VTCN1 Gene [Internet]. LifeMapSciences. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VTCN1>.
281. Sica GL, Choi IH, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity.* 2003;18(6):849-61.
282. Smith JB, Stashwick C, Powell DJ. B7-H4 as a potential target for immunotherapy for gynecologic cancers: a closer look. *Gynecol Oncol.* 2014;134(1):181-9.
283. VSIR Gene [Internet]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VSIR>.



284. Wang L, Rubinstein R, Lines JL, Wasiuk A, Ahonen C, Guo Y, et al. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J Exp Med*. 2011;208(3):577-92.
285. Lines JL, Pantazi E, Mak J, Sempere LF, Wang L, O'Connell S, et al. VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells. *Cancer Res*. 2014;74(7):1924-32.
286. Bharaj P, Chahar HS, Alozie OK, Rodarte L, Bansal A, Goepfert PA, et al. Characterization of programmed death-1 homologue-1 (PD-1H) expression and function in normal and HIV infected individuals. *PLoS One*. 2014;9(10):e109103.
287. Scandiuizzi L, Ghosh K, Hofmeyer KA, Abadi YM, Lazar-Molnar E, Lin EY, et al. Tissue-expressed B7-H1 critically controls intestinal inflammation. *Cell Rep*. 2014;6(4):625-32.
288. Zhang M, Pang HJ, Zhao W, Li YF, Yan LX, Dong ZY, et al. VISTA expression associated with CD8 confers a favorable immune microenvironment and better overall survival in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2018;18(1):511.
289. Mulati K, Hamanishi J, Matsumura N, Chamoto K, Mise N, Abiko K, et al. VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function. *Br J Cancer*. 2019;120(1):115-27.
290. NCR3LG1 Gene [Internet]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NCR3LG1>.
291. Ni L, Dong C. New B7 Family Checkpoints in Human Cancers. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(7):1203-11.
292. Zhou Y, Xu Y, Chen L, Xu B, Wu C, Jiang J. B7-H6 expression correlates with cancer progression and patient's survival in human ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(8):9428-33.
293. HHLA2 Gene [Internet]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HHLA2>.
294. Zhao R, Chinai JM, Buhl S, Scandiuizzi L, Ray A, Jeon H, et al. HHLA2 is a member of the B7 family and inhibits human CD4 and CD8 T-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(24):9879-84.
295. Janakiram M, Chinai JM, Zhao A, Sparano JA, Zang X. HHLA2 and TMIGD2: new immunotherapeutic targets of the B7 and CD28 families. *Oncoimmunology*. 2015;4(8):e1026534.



# Anexo 1

## Características anatómo-funcionales de la superficie ocular

La superficie ocular se encuentra afectada por la fisiopatología de la CA, por lo que es importante conocer sus mecanismos anatómo-funcionales para entender como la desregulación en estos componentes desencadena la fisiopatología y por consiguiente, el cuadro clínico y la afectación a la calidad de vida.<sup>(51)</sup>

- **Características de la superficie ocular**

### -Párpados

Los párpados son pliegues de piel y músculos que se cierran de forma voluntaria o refleja sobre el ojo para protegerlo, es decir son una barrera mecánica entre el ojo y el medio ambiente. Existen cilios en la piel del párpado los cuales son bastantes sensibles al aire por consecuente a las partículas aéreas, lo que provoca un parpadeo reflejo. Al parpadear también se repone la película lagrimal homogenizando su contenido en toda la superficie ocular.<sup>(236)</sup>

### -Película lagrimal

La película lagrimal es una secreción constante pero frecuentemente inadvertida que cubre a la superficie ocular. Tiene roles críticos en el sistema óptico, mantiene lubricada a la superficie ocular, proporciona nutrientes y factores de crecimiento al epitelio, sirve como barrera contra el medio ambiente exterior y elimina los materiales extraños de la superficie ocular conforme su contenido es drenado sobre la conjuntiva y córnea hacia el ángulo interno del ojo.<sup>(237, 238)</sup>

La película lagrimal es una estructura estratificada compuesta por tres capas (de afuera hacia adentro): capa lipídica externa, una capa media acuosa y una capa interna mucoproteica. Estas capas son secretadas diferentes glándulas y tejidos.<sup>(80, 239)</sup> (Tabla 2.1)

**Tabla 0.1 Componentes de la película lagrimal.**

Capa	Características
Capa lipídica	Glándulas de meibomio.
Capa acuosa	Glándula lagrimal principal y glándulas lagrimales accesorias.
Capa mucoproteica	Células caliciformes conjuntivales y epiteliales corneales y conjuntivales.

La película lagrimal se compone de capa lipídica, capa acuosa y capa mucoproteica.

La capa lipídica es una secreción oleosa producida por las glándulas de meibomio, actúa como una barrera hidrofóbica y su función es retardar la evaporación de la película lagrimal y reducir la tensión superficial de la fase acuosa, lo que permite la distribución de la capa lipídica sobre la capa acuosa.<sup>(239, 240)</sup> (Tabla 11.2)

**Tabla 0.2 Componentes de la capa lipídica.**

Capa	Composición
Capa lipídica	Ésteres de cera, ésteres de colesterol, colesterol libre, triacilgliceroles, ácidos grasos libres, fosfolípidos, esfingomielinas y ceramidas.

Composición de la capa lipídica.

La capa acuosa proviene de la de la glándula lagrimal principal y de las glándulas accesorias (de Krause y Wolfring), representa el 98% de la película lagrimal. Esta capa actúa como una barrera física contra infecciones ya que se encuentra compuesta por: agua, electrolitos, proteínas, factores de crecimiento, citocinas, vitaminas y factores antimicrobianos.<sup>(241) (242)</sup> (Tabla 11.3)

**Tabla 0.3 Componentes de la capa acuosa**

H <sub>2</sub> O	Ceruloplasmina	Factor de crecimiento hepático (HSF)
Mg <sup>2+</sup>	Lactoferrina	Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Complemento	Factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF)
Na <sup>+</sup>	Interferón	Factor de crecimiento β (TGF-β)
Ca <sup>2+</sup>	Factores antimicrobianos	IgA, IgE, IgD, IgG e IgM
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Fosfolipasa A2	Interleucina (IL)-1β
K <sup>+</sup>	Activador de plasminógeno	IL-1α
Cl <sup>-</sup>	Metaloproteinasas	IL-6
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Prostaglandinas	

La capa acuosa se compone de agua, electrolitos, proteínas, factores de crecimiento, citocinas, vitaminas y factores antimicrobianos.

La capa mucoproteica se encuentra constituida por mucinas secretadas y unidas a membrana, proporcionan una barrera hidrofílica protectora contra la adherencia de patógenos y alérgenos, estabiliza la película lagrimal suprayacente, proporcionan lubricación, facilitan el movimiento de los párpados y del globo ocular y participan en la señalización celular.<sup>(239, 243)</sup> (Tabla 11.4)

**Tabla 0.4 Componentes de la capa mucoproteica**

<b>Capa mucoproteica</b>	<b>Características</b>
Epitelio conjuntival	Mucinas unidas a membrana: MUC1, 4 y 16
Células caliciformes	Mucinas secretoras: MUC5
Epitelio corneal	Mucinas membranales las cuales forman el glucocálix

La capa mucoproteica se compone de epitelio conjuntival, células caliciformes y epitelio corneal.

#### -Córnea

Es una membrana transparente, localizada en la abertura anterior de la esclerótica. Su cara anterior es convexa y lisa, es humedecida por la película lagrimal, y se encuentra en contacto con el aire exterior, pero esta oculta por los párpados cuando estos se ocuyen.

Su cara posterior es cóncava, y constituye la pared anterior de la cámara anterior del ojo, la córnea central no tiene vasos sanguíneos ni vasos linfáticos, pero está altamente inervada. Y en su circunferencia se encuentra unida a la esclerótica al nivel del limbo de la córnea.<sup>(174)</sup>

Histológicamente la córnea consiste en tejido conectivo transparente (estroma) cubierto por epitelio en ambos extremos. En su totalidad se compone de cinco capas distintas (de adelante hacia atrás): epitelio corneal, membrana de Bowman, estroma corneal o sustancia propia, membrana de Descemet y epitelio posterior de la córnea o endotelio.<sup>(80)</sup>

Los epitelios sellan el estroma del entorno externo por medio de expresión de moléculas de expresión (Claudina y ocludina) y mediante la producción de mucina, formando así una barrera fisicoquímica contra la adhesión y entrada de antígenos. Y se ha descrito que la habilidad de la superficie ocular para iniciar una respuesta inmunológica se atribuye a la expresión de (TLRs, por sus siglas en inglés), en la córnea se pueden encontrar: TLR-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.<sup>(27, 29)</sup>

En modelos murinos se ha descrito la presencia de células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés), las cuales disminuyen en número conforme se acercan a la región corneal central.<sup>(244, 245)</sup> En corneas humanas se han células de Langherhans (LC, por sus siglas en inglés) CD207+ en la periferia corneal (limbo corneal), y DCs CD209+ en el estroma corneal anterior periférico.<sup>(246)</sup>

En el estroma se encuentran dispersos fibrocitos o también llamados queratocitos, los cuales mantienen las fibras de colágeno y glucosaminoglucanos del componente estromal de la córnea.<sup>(245)</sup>

#### -Limbo corneal

Es una transición anular entre la córnea y conjuntiva. El epitelio corneal se convierte en epitelio columnar conjuntival, la membrana de Bowman corneal se continúa con la lámina propia de la conjuntiva y el estroma se convierte en la esclera.

En el limbo corneal se encuentran células epiteliales del limbo y células limbales. Ambos tipos celulares son responsables de la reparación del tejido epitelial corneal, con la peculiaridad de que las primeras son células madre, que dan lugar al epitelio corneal y pueden liberar factores de crecimiento antiangiogénicos y proangiogénicos en un delicado equilibrio.<sup>(247-249)</sup>

#### -Conjuntiva

La conjuntiva es una membrana mucosa delgada y transparente, la cual tiene un papel importante en mantener un ambiente adecuado para la córnea, particularmente a través de su papel en la estabilización de la película lagrimal. También al ser una barrera de defensa, protege al ojo contra infecciones, alérgenos y traumas.<sup>(250, 251)</sup>

Esta mucosa anatómicamente se divide principalmente en tres regiones: Conjuntiva palpebral o tarsiana, la conjuntiva del fondo de saco o saco conjuntival y la conjuntiva ocular o bulbar.<sup>(80, 174, 252)</sup> (Tabla 11.5)

**Tabla 0.5 Partes de la conjuntiva**

<b>Región</b>	<b>Características</b>
Conjuntiva palpebral o tarsiana:	Corresponde a la superficie interna del párpado. Contiene a las glándulas de meibomio (glándula sebácea) y de Wolfring (glándula lagrimal accesoria).
Conjuntiva del fondo de saco o saco conjuntival:	Es la unión entre a conjuntiva palpebral y ocular. Contiene a las glándulas de Krause (glándula lagrimal accesoria).
Conjuntiva ocular o bulbar:	Corresponde a la porción que cubre a la esclera anterior hasta el limbo corneal. Contiene a las glándulas de Manz.

La conjuntiva se compone de conjuntiva palpebral o tarsiana, conjuntiva del fondo de saco o saco conjuntival y conjuntiva ocular o bulbar:

Histológicamente, la conjuntiva se encuentra dividida en dos capas: la capa epitelial y la sustancia propia. La capa epitelial está constituida de dos a cinco capas de epitelio columnar no queratinizado, dentro de este epitelio se encuentran células caliciformes, células de Langerhans y linfocitos T intraepiteliales.<sup>(253)</sup>

Subyacente a esta capa se encuentra la sustancia propia, la cual se encuentra inervada y altamente vascularizada, contiene tejido linfoide difuso conocido como tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT, por sus siglas en inglés), conformado por:

macrófagos, mastocitos, células plasmáticas, LC, DCs, linfocitos T y B. (254) (80, 255)  
(Tabla 2.6)

**Tabla 0.6 Componentes celulares de la conjuntiva**

	Componentes	Características	Referencias
Capa epitelial	Epitelio columnar no queratinizado	Barrera de defensa. Producción de mucinas de membrana. Expresión de moléculas de adhesión (Claudina) TLR-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9.	(27, 29, 236, 256)
	Células caliciformes	Producción de mucinas secretoras.	(257)
	Células de Langerhans y dendríticas	Humano: CD1a <sup>+</sup> , <i>Receptor</i> de alta afinidad para IgE (FcεRI) <sup>+</sup> . Ratón: Langherina <sup>+</sup> . DCs MHCII+ TLR4+	(120, 124, 125, 258)
	Linfocitos intraepiteliales	CD8 <sup>+</sup> HML-1 <sup>+</sup> . Mecanismos de defensa y tolerancia en las mucosas.	(254)
Sustancia propia	TLRs	Expresados en el estroma conjuntival: 4, 5, 9	(29)
	Mastocitos	Localizadas en su mayoría alrededor de los vasos sanguíneos. Tipo MC <sub>TC</sub> predominantemente. 5.000 a 6,000 células por mm <sup>3</sup> . Receptor FcεRI <sup>+</sup> en su membrana superficial. Contienen vesículas con IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 y TNFα, histamina, triptasa, quimasa, prostaglandina D2, leucotrienos B4, C4 y D4, factor activador de plaquetas.	(43, 259-261)
	Macrófagos	CD68 <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , CD45RA <sup>+</sup> .	(262, 263)
	Células plasmáticas	Núcleo excéntrico y Golgi perinuclear Productoras de IgA.	(262, 264)
	Células dendríticas	Humano: Células dendríticas HLA <sup>+</sup> . Ratón: Células dendríticas mieloides (CD11c <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> y CD11b <sup>+</sup> ) Células dendríticas plasmocitoides (CD11c <sup>+</sup> , B220 <sup>+</sup> y Ly6C <sup>+</sup> ).	(120, 255, 262)
	Linfocitos T	Balance de linfocitos CD8 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> distribuidos de forma difusa y concentrados en folículos.	(265)
	Linfocitos B	Principalmente se encuentran en los folículos, rara vez se encuentran dispersos.	(262, 265)

*Características individuales de cada componente celular de la conjuntiva.*

También se pueden encontrar folículos, lo cuales contienen linfocitos T y B así como vénulas de endotelio alto, las cuales regulan la migración de las células linfoides presentes en la conjuntiva.<sup>(250)</sup> Es importante mencionar que CALT es parte del sistema inmune asociado a la mucosa, que se extiende desde la superficie ocular (conjuntiva y córnea) junto con sus anexos mucosos (tejido linoide asociado al drenaje lagrimal (LDALT, por sus siglas en inglés). En conjunto de CALT y LDALT, se le conoce como tejido linfoide asociado a los ojos (EALT, por sus siglas en inglés).<sup>(255)</sup> y que el drenaje linfático de la conjuntiva es hacia los ganglios preauriculares o submandibulares.<sup>(56)</sup>



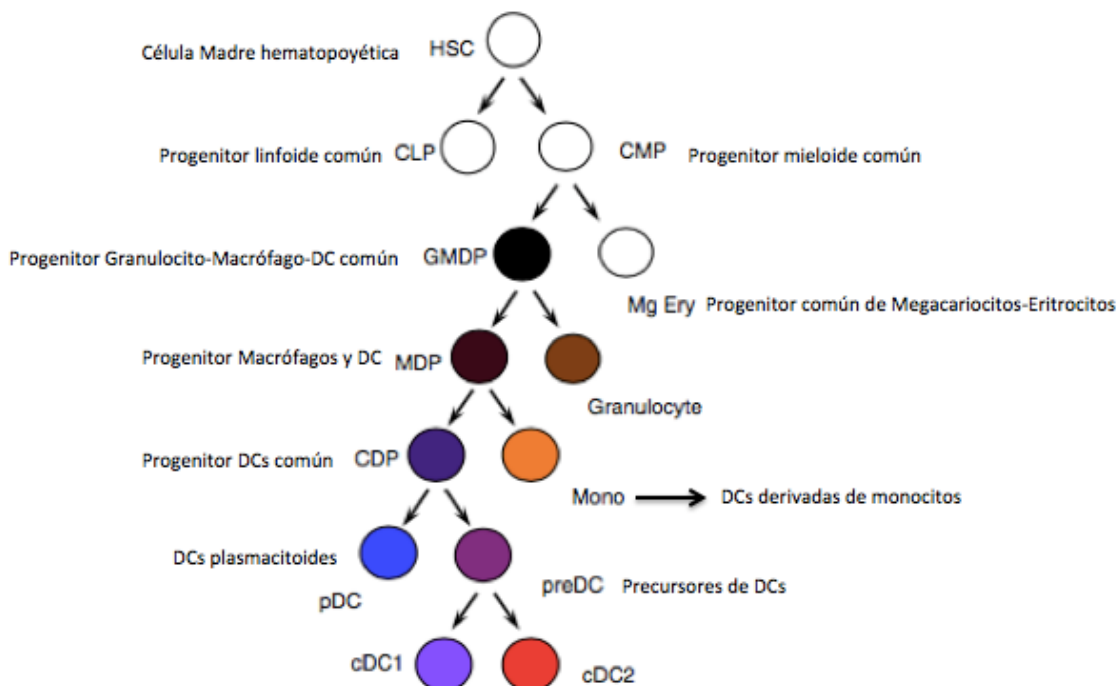
# Anexo 2

- **Ontogenia**

Los monocitos, pDCs y las cDCs se desarrollan en la médula ósea a partir de progenitores hematopoyéticos, los cuales generan sucesivamente progenitores mieloides comunes (CMP, por sus siglas en inglés) y macrófagos y precursores de DCs (MDP, por sus siglas en inglés).<sup>(103)</sup>

Los MDP, se diferencian en progenitores de monocitos comunes (cMoPs, por sus siglas en inglés) los cuales generan exclusivamente monocitos, pero los MDP, también pueden generar precursores de DCs comunes (CDP, por sus siglas en inglés) que se diferenciarán hacia pre-cDCs y pre-pDCs.<sup>(103)</sup>

Las pre-DCs se diferencian a su vez en dos subtipos: Células dendríticas convencionales tipo 1 (cDC1) y células dendríticas convencionales tipo 2 (cDC2).<sup>(103)</sup> (Figura 5.1)



**Figura 0.1 Ontogenia de las DCs**

Precusores de las DCs. Tomada y modificada de Collin M *et al.*, 2018

El potencial de diferenciación de pDC, cDC1 y cDC2, puede ser identificado a través de todos los compartimentos progenitores definidos desde las células madre hematopoyéticas, a través de progenitores multipotentes linfoides hasta los GMDPs, los cuales se caracterizan por tener una alta expresión de CD115 y CD123, características de MDP y de CDP, respectivamente. Aun cuando las DCs se derivan de dos regiones distintas del compartimento de CD34, emergen transcripcionalmente homogéneas, lo que resalta la importancia de circuitos reguladores intrínsecos que definen el linaje y función de las DCs.<sup>(116)</sup>

Este proceso mediante el cual las células madre dan lugar a una variedad de subconjuntos de DCs, se controla mediante factores de transcripción y citocinas las cuales determinan su linaje.

- **Clasificación y función de las DCs**

Con anterioridad a las DCs se les caracterizaba por ser una subpoblación de células presentadoras de antígenos universales, sin embargo en la actualidad se han descrito diferentes subconjuntos de DC, los cuales son subpoblaciones especializadas en responder a señales particulares e interactuar con ciertos subconjuntos de linfocitos T, lo que permite reaccionar adecuadamente a una amplia gama de agentes patógenos y señales de peligro.<sup>(103)</sup>

En la sangre de humanos, existen principalmente dos subpoblaciones de DCs las cuales se identifican dependiendo de la expresión de marcadores de superficie: a) plasmacitoides (pDCs) y b) DCs convencionales (cDCs). Aunque también se pueden encontrar a las células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs).

Las pDCs, tienen un núcleo excéntrico, un retículo endoplásmico y aparato de Golgi prominente para la producción de interferón tipo I, expresan marcadores de superficie como: CD123, BDCA2 (CD303), BDCA4 (NRP1), MHCII, CD11c, FCER1, ILT3, ILT7, DR6, TLR7 y TLR9. Las pDCs son células especializadas que detectan (mediante TLR-7 Y 9) y responden principalmente mediante la producción de interferón tipo I y III.<sup>(104)</sup>

Las cDCs, también conocidas como DCs mieloides. En sangre periférica circulan dos tipos de cDCs (cDCs1 y cDCs2) las cuales tienen características fenotípicas y funcionales diferentes.

Las cDC1, se caracterizan por expresar BDCA-3 (CD141), MHCII, CD11c, CD11b, CLEC9A, CADM1, XCR1 y CD26. Además, expresan TLR3, 9 y 10 y capacidad para activar linfocitos T CD8+ para promover respuestas de linfocitos Th1 y de células natural killer (NKs) a través de la presentación de antígenos de forma cruzada a través del MHC clase I y síntesis de IL-12, respectivamente.<sup>(104)</sup>

Las cDC2, representan la principal proporción de cDCs mieloides en la sangre humana, tejidos y órganos linfoides, se caracterizan por expresar BDCA-1 (CD1c), MHC II, CD11c, CD11b, CD2, FCER1, SIRPA, ILT1, CLECL4A y CLECL10A. Se caracterizan por expresar una variedad de PRRs como receptores de lectinas, TLRs, receptores tipo

NOD por lo que responden a estímulos como Lipopolisacárido (LPS), flagelina, poly IC y R848. Expresan IL-12, IL-23, IL-1, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-8 e IL-10 con las cuales polarizan la respuesta inflamatoria a Th1, Th2, Th17 y Treg.<sup>(104)</sup> (Tabla 5.1)

El precursor de las MoDCs son los monocitos los cuales se diferencian en los tejidos periféricos hacia DCs.<sup>(266)</sup> Tienen una amplia gama de propiedades que incluyen la estimulación de linfocitos T CD4+ naive, presentación cruzada a linfocitos T CD8+ y producción de citocinas como IL-1, IL-6, TNF-a e IL-12. <sup>(104)</sup> El tránsito de MoDCs inmaduras a sitios de inflamación se lleva a cabo a través de la expresión de quimiocinas y de receptores de quimiocinas. <sup>(104)</sup>

Debido a que las DCs representan aproximadamente el 0.2% de las células mononucleares de la sangre periférica humana lo cual plantea una dificultad para su aislamiento y capacidad de estudiar su participación en modelos de enfermedades por lo que se utilizan a las MoDCs generadas de forma *in vitro* al añadir IL-4 y GM-CSF a los cultivos de monocitos como modelos de estudio para entender lo que ocurre de forma *in vivo*. <sup>(105, 106)</sup>

# Anexo 3

## Características de la familia B7 de la superfamilia de inmunoglobulinas.

Molécula coestimuladora	Características	Función	Expresión en tejidos linfoides	Expresión en otros tejidos	Receptor	Referencias
CD80 (B7.2)	288 a.a. 33kDa 3q21	Activadora / Coinhibitoria.	Inducible en linfocitos T y linfocitos B, DCs y monocitos.	Raro	CD28/CTLA- 4/PD-L1	(146, 267-270)
CD86 (B7.2)	329 a.a 37kDa 3q21 28% de homología con CD80	Activadora/ Coinhibitoria.	Constitutivo en linfocitos T y linfocitos B, DCs y monocitos.	Raro.	CD28/CTLA-	(146, 168, 268-271)
PD-L1 (B7-H1/ CD274)	273 a.a 30kDa 9p24.1 25% de homología con CD80	Coinhibitoria.	Constitutivo en linfocitos T y linfocitos B, DCs, monocitos y macrófagos	Corazón, músculo esquelético, placenta y pulmón. Baja expresión en timo, bazo, riñón e hígado.	PD-1/CD80	(146, 272, 273)
PD-L2 (B7- DC/CD273)	274a.a 30kDa 9p24.2 38% de homología con PD-L1 23% de homología con CD80.	Coinhibitoria.	Constitutivo en linfocitos T y linfocitos B, DCs, Monocitos y macrófagos, mastocitos y NK.	Corazón, placenta, endotelio y pulmón.	PD-1.	(146, 268, 274)
ICOS-L (B7-H2/ CD275)	309 a.a 30kDa 21q22.3 30% de homología con CD80	Activadora.	Constitutivo en linfocitos T y linfocitos B, DCs, Monocitos y macrófagos.	Tejido endotelial y epitelial, fibroblastos y osteoblastos.	ICOS- L/CD28/CTLA- 4.	(146, 163, 268, 275, 276)
B7-H3 (CD276)	534 a.a 57kDa 15q23 29% de homología con CD80	Activadora /coinhibitoria.	Inducible en linfocitos T, linfocitos B, NKs, DCs, monocitos y macrófagos.	Carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer de mama, cáncer de colorectal, carcinoma de ovario, carcinoma escamoso oral, cáncer cervical, cancer pulmonar de células pequeñas, cáncer de vejiga, melanoma.	Desconocido	(268, 277, 278)
B7-H4 (B7S1, B7x, VTCN)	282 a.a 30kDa 1p13 25% de homología con CD80	Coinhibitoria	Inducidos de forma <i>In vitro</i> en linfocitos T, linfocitos B, monocitos, y DCs.	Cáncer tiroideo, de esófago, de colon, de mama, hígado, de riñón, de útero, de ovario, de próstata y de estómago.	Desconocido	(279-282)
B7-H5 (VISTA)	311 a.a 33kDa 10q22 24% de homología con PD-L1	Coinhibitoria.	Células mieloides y granulocitos, y en bajos niveles en linfocitos T.	Hígado, bazo, corazón, hueso, cáncer de endometrio, cáncer de de ovario y hepatocarcinoma celular.	CD28H	(283-289)
B7-H6 (NCR3L1)	454 a.a. 50kDa 11p15	Coinhibitoria	NKs	Cáncer de ovario, melanoma, neuroblastoma y malignidades hematológicas, tumores cerebrales, cáncer de mama y sarcoma.	NKp3028	(154, 290-292)

B7-H7 (HHLA2)	414a.a 45kDa 3q13.13 10% de homología con CD80	Coinhibitoria	Expresada constitutivamente en monocitos y macrófagos	Placenta, riñón, vejiga, mama. Cáncer de mama, de pulmón, de tiroides, melanoma, de páncreas, de ovario, de hígado, de vejiga, de colon, de próstata, de riñón y de esófago.	TMIGD233	(291, 293-295)
---------------	--	---------------	---	---	----------	----------------

Características, función, expresión en tejidos linfoides y otros tejidos y receptores de las moléculas de coestimulación de la familia B7.

# Anexo 4



# Anexo 5

---

---

## CUESTIONARIO DE CALIDAD DE VIDA EN NIÑOS/AS CON RINOCONJUNTIVITIS (PRQLQ)

---

---

VERSIÓN ADMINISTRADA POR UN ENTREVISTADOR  
(INTERVIEWER-ADMINISTERED)  
SPANISH VERSION FOR SPAIN

© 2009  
QOL TECHNOLOGIES Ltd.



**Información adicional:**

Elizabeth Juniper, MCSP, MSc  
Professor  
20 Marcuse Fields  
Bosham, West Sussex  
PO18 8NA, England  
Telephone: +44 1243 572124  
Fax: +44 1243 573680  
E-mail: juniper@qoltech.co.uk  
Web: <http://www.qoltech.co.uk>

This translation has been made possible through  
a grant from STALLERGENES S.A.  
Translated by MAPI RESEARCH INSTITUTE  
Senior Translator: Marian Carbonell (Proyectos y  
Traducciones)

© El Cuestionario de calidad de vida en niños/as con rinoconjuntivitis (PRQLQ) está protegido por derechos de autor y tiene todos los derechos reservados. Ninguna parte de este cuestionario puede ser vendida, modificada ni reproducida en ninguna forma sin la autorización expresa de Elizabeth Juniper en representación de QOL Technologies Limited.

JUNIO 2009

Ahora quiero que me digas cuánto te han molestado tus alergias de nariz y ojos durante los últimos 7 días. Yo te indicaré qué tarjeta debes utilizar. Escoge el número que mejor describa cuánto te han molestado tus alergias durante los últimos 7 días. *Asegúrese de que, cuando pregunta sobre las "alergias", el niño/a entiende que se refiere a sus síntomas de nariz y ojos.*

- N 1. ¿Cuánto te ha molestado tener la **NARIZ TAPADA, CONGESTIONADA** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
- N 2. ¿Cuánto te han molestado los **ESTORNUDOS** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
- N 3. ¿Cuánto te ha molestado que la **NARIZ TE GOTEE** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
- N 4. ¿Cuánto te ha molestado el **PICOR DE NARIZ** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
- E 5. ¿Cuánto te ha molestado el **PICOR DE OJOS** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
- E 6. ¿Cuánto te ha molestado que **TE LLOREN LOS OJOS** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
- E 7. ¿Cuánto te ha molestado tener los **OJOS HINCHADOS** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
- E 8. ¿Cuánto te ha molestado tener **DOLOR EN LOS OJOS** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
- P 9. ¿Cuánto te ha molestado **TENER QUE FROTARTE LOS OJOS Y LA NARIZ** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
- P 10. ¿Cuánto te ha molestado **TENER QUE SONARTE LA NARIZ** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
- P 11. ¿Cuánto te ha molestado **TENER QUE LLEVAR PAÑUELOS** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]



12. ¿Cuánto te ha molestado **TENER QUE TOMAR MEDICINAS PARA TUS ALERGIAS** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
13. ¿Cuánto te ha molestado **TENER SED** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
14. ¿Cuánto te ha molestado **EL PICOR DE GARGANTA** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
15. ¿Cuánto te ha molestado tener **DOLOR DE CABEZA** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]
16. ¿Cuánto te han molestado tus alergias para **JUGAR AL AIRE LIBRE** durante los últimos 7 días? [TARJETA AZUL]

**Cambiar a la tarjeta VERDE**

17. ¿Cuántas veces tus alergias te han hecho sentir **CANSADO/A** durante los últimos 7 días? [TARJETA VERDE]
18. ¿Cuántas veces tus alergias te han hecho sentir **MAL EN GENERAL** durante los últimos 7 días? [TARJETA VERDE]
19. ¿Cuántas veces te has sentido **IRRITABLE** (de mal humor\*) debido a tus alergias durante los últimos 7 días? (TARJETA VERDE)  
(\*utilizar únicamente si el niño/a no entiende la palabra "irritable")
20. ¿Cuántas veces tus alergias te han hecho sentir **VERGÜENZA** durante los últimos 7 días? [TARJETA VERDE]
21. ¿Cuántas veces tus alergias te han causado **DIFICULTAD PARA QUEDARTE DORMIDO/A** durante los últimos 7 días? [TARJETA VERDE]

- A 22. ¿Cuántas veces tus alergias te han **DESPERTADO DURANTE LA NOCHE** durante los últimos 7 días? [TARJETA VERDE]
- A 23. ¿Cuántas veces tus alergias te han causado **DIFICULTAD PARA PRESTAR ATENCIÓN** durante los últimos 7 días? [TARJETA VERDE]

**CÓDIGO DE CAMPO**

**N** = Síntomas de nariz  
**E** = Síntomas de ojos  
**P** = Problemas prácticos  
**O** = Otros síntomas  
**A** = Limitación de actividades

## OPCIONES DE RESPUESTA

### TARJETA VERDE

6. SIEMPRE
5. CASI SIEMPRE
4. MUCHAS VECES
3. BASTANTES VECES
2. ALGUNAS VECES
1. CASI NUNCA
0. NUNCA

### TARJETA AZUL

6. ME HA MOLESTADO MUCHÍSIMO
5. ME HA MOLESTADO MUCHO
4. ME HA MOLESTADO BASTANTE
3. ME HA MOLESTADO REGULAR
2. ME HA MOLESTADO POCO
1. NO ME HA MOLESTADO CASI NADA
0. NO ME HA MOLESTADO NADA

# Formatos de reporte de caso

Fecha:   
Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:  No. De registro:  Sexo:  Femenino  Masculino

## Formato de reporte de casos

### VISITA 0

#### A. Ficha de identificación

Nombre(s):

Apellido:

Fecha de Nacimiento:

Día Mes Año

Sexo:

Femenino

Masculino

Información de contacto:

Dirección:

Calle No. Exterior No. Interior Ciudad/Municipio Estado

Teléfono:

Casa  Celular  Otro

Nombre de responsable:

Dirección:

Calle No. Exterior No. Interior Ciudad/Municipio Estado

Teléfono:

Casa  Celular  Otro

Fecha:        
 Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:  No. De registro:  Sexo:  Femenino  Masculino

Formato de reporte de casos

VISITA 0

B. Historia clínica

Fecha de realización:   -   -     
 día mes año

1. Antecedentes heredofamiliares

Enfermedad	Diagnóstico	Familiar
1.1 Conjuntivitis alérgica	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.2 Rinitis alérgica	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.3 Dermatitis atópica	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.4 Asma	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.5 Urticaria	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.6 Angioedema	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.7 Alergia a medicamentos	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.8 Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.9 Hipertensión	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.10 Enfermedades neoplásicas	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.11 Enfermedades psiquiátricas	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.12 Enfermedades pulmonares	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.13 Enfermedades cardíacas	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.14 Enfermedades renales	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.15 Obesidad	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.16 Enfermedades reumáticas	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.16 Inmunodeficiencias	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	
1.16 Autoinmunitarias	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:	

2. Antecedentes ginecoobstétricos

2.1 Menarca: <input type="text"/> <input type="text"/> Años	2.2 Gestas: <input type="text"/> <input type="text"/>	2.3 Cesáreas: <input type="text"/> <input type="text"/>	2.4 Abortos: <input type="text"/> <input type="text"/>
2.5 Lactancia actual: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí	2.6 Fecha de última menstruación: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> No aplica: <input type="checkbox"/> día mes año		

3. Antecedentes personales patológicos

Enfermedad	Diagnóstico	Observaciones (*Anotar fecha de inicio, evolución y tratamiento)
3.1 Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.2 Hipertensión	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.3 Enfermedades neoplásicas	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	

Fecha:          
 Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antigeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:  No. De registro:  Sexo:  Femenino  Masculino

Formato de reporte de casos

3.4 Enfermedades psiquiátricas	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.5 Enfermedades pulmonares	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.6 Enfermedades cardíacas	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.7 Enfermedades renales	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.8 Obesidad	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.9 Enfermedades reumáticas	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.10 Inmunodeficiencias	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.12 Cirugías	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.13 Traumatismos	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.14 Transfusiones	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.15 Angioedema	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.16 Dermatitis atópica	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.17 Urticaria	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.18 Rinitis alérgica	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.19 Asma	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.20 Alergia a alimentos	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.21 Alergia a medicamentos	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	
3.15 Otras	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, especificar*:	

4. Padecimiento actual

4.1 Síntomas oculares:	Días de presentación a la semana							
4.2 Prurito:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7
4.3 Lagrimeo:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7
4.4 Fotofobia:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7
4.5 Sensación de cuerpo extraño:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7

Clasificación de presentación de síntomas oculares a la semana:

0 Nunca
1-2 Casi nunca
3-4 Algunas veces
5-6 Casi siempre
7 Siempre

Fecha:        
 Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:     No. De registro:       Sexo:  Femenino  Masculino

**Formato de reporte de casos**

**5. Interrogatorio por aparatos y sistemas\***

5.1 Piel y tegumentos	<input type="checkbox"/> Rash <input type="checkbox"/> prurito <input type="checkbox"/> preguntados y negados
5.2 Cabeza	<input type="checkbox"/> Contusiones <input type="checkbox"/> cefalea <input type="checkbox"/> pérdida de conocimiento <input type="checkbox"/> preguntados y negados
5.3 Oídos	<input type="checkbox"/> Problemas de audición <input type="checkbox"/> descarga <input type="checkbox"/> vértigo <input type="checkbox"/> dolor <input type="checkbox"/> tinnitus <input type="checkbox"/> preguntados y negados
5.4 Nariz	<input type="checkbox"/> Secreciones <input type="checkbox"/> obstrucción <input type="checkbox"/> epistaxis <input type="checkbox"/> preguntados y negados
5.5 Cardiorespiratorio	<input type="checkbox"/> Dolor torácico <input type="checkbox"/> palpitaciones <input type="checkbox"/> falta de aire <input type="checkbox"/> falta de aire <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> tos <input type="checkbox"/> disnea <input type="checkbox"/> sibilancias <input type="checkbox"/> hemoptisis <input type="checkbox"/> preguntados y negados
5.6 Digestivo	<input type="checkbox"/> Disfagia <input type="checkbox"/> ardor retroesternal <input type="checkbox"/> náusea <input type="checkbox"/> vómito <input type="checkbox"/> hematemesis <input type="checkbox"/> dolor abdominal <input type="checkbox"/> intolerancia a alimentos <input type="checkbox"/> ictericia <input type="checkbox"/> diarrea <input type="checkbox"/> preguntados y negados
5.7 Genitourinario	<input type="checkbox"/> Poliuria <input type="checkbox"/> disuria <input type="checkbox"/> hematuria <input type="checkbox"/> preguntados y negados
5.8 Hematológico	<input type="checkbox"/> Palidez <input type="checkbox"/> equimosis <input type="checkbox"/> hemorragias <input type="checkbox"/> petequias <input type="checkbox"/> preguntados y negados
5.9 Endocrino	<input type="checkbox"/> Polidipsia <input type="checkbox"/> polifagia <input type="checkbox"/> aumento o disminución de peso <input type="checkbox"/> intolerancia al frío o calor <input type="checkbox"/> pensamiento lento <input type="checkbox"/> preguntados y negados
5.10 Osteomuscular	<input type="checkbox"/> Dolor <input type="checkbox"/> artralgias <input type="checkbox"/> mialgias <input type="checkbox"/> debilidad <input type="checkbox"/> preguntados y negados
5.11 Psico-neurológico	<input type="checkbox"/> movimientos involuntarios <input type="checkbox"/> alteraciones en la marcha <input type="checkbox"/> convulsiones <input type="checkbox"/> cambios de ánimo <input type="checkbox"/> preguntados y negados

\*En caso de presentar algún síntoma especificar: Tiempo de inicio, duración, evolución, tratamiento.

A
B

**6. Exploración física**

6.1 Neurológico	<input type="checkbox"/> Alteraciones de conducta <input type="checkbox"/> alteraciones de la memoria <input type="checkbox"/> alteraciones del lenguaje <input type="checkbox"/> Alteraciones en la marcha <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.2 Facies	<input type="checkbox"/> Signo de Dennie-Morgan <input type="checkbox"/> surco nasal <input type="checkbox"/> facies adenoidea <input type="checkbox"/> saludo alérgico <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.3 Oftalmología	Ver sección 7
6.4 Oídos	<input type="checkbox"/> Tapón de cerumen <input type="checkbox"/> surco nasal <input type="checkbox"/> facies adenoidea <input type="checkbox"/> saludo alérgico <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.5 Nariz	<input type="checkbox"/> Hipertrofia de cornetes <input type="checkbox"/> mucosa pálida <input type="checkbox"/> mucosa hiperémica <input type="checkbox"/> secreción mucosa <input type="checkbox"/> costras <input type="checkbox"/> desviación septal <input type="checkbox"/> dolor en senos paranasales <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.6 Boca	<input type="checkbox"/> Respiración oral <input type="checkbox"/> úlceras <input type="checkbox"/> quelitis <input type="checkbox"/> caries <input type="checkbox"/> aftas <input type="checkbox"/> hipertrofia amigdalina <input type="checkbox"/> descarga nasal posterior <input type="checkbox"/> faringe hiperémica <input type="checkbox"/> alteraciones linguales <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.7 Cuello	<input type="checkbox"/> ganglios <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.8 Tórax	<input type="checkbox"/> Quilla <input type="checkbox"/> excavado <input type="checkbox"/> xifosis <input type="checkbox"/> lordosis <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.9 Cardíaco	<input type="checkbox"/> Taquicardia <input type="checkbox"/> soplo <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.10 Pulmonar	<input type="checkbox"/> Rudeza respiratoria <input type="checkbox"/> estertores <input type="checkbox"/> sibilancias <input type="checkbox"/> quejido <input type="checkbox"/> frote <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.11 Extremidades	<input type="checkbox"/> Flogosis <input type="checkbox"/> hiper/hipotonía <input type="checkbox"/> movilidad alterada <input type="checkbox"/> reflejos alterados <input type="checkbox"/> deformidades <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.12 Piel y mucosas	<input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> vesículas <input type="checkbox"/> costras <input type="checkbox"/> xerosis <input type="checkbox"/> eccema <input type="checkbox"/> liquinificación <input type="checkbox"/> nódulos <input type="checkbox"/> manchas <input type="checkbox"/> equimosis <input type="checkbox"/> alopecia <input type="checkbox"/> hirsutismo <input type="checkbox"/> angioedema <input type="checkbox"/> sin alteraciones
6.13 Abdomen	<input type="checkbox"/> Globoso <input type="checkbox"/> hiperalgesia <input type="checkbox"/> visceromegalias <input type="checkbox"/> sin alteraciones

Fecha:        
Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:     No. De registro:       Sexo:  Femenino  Masculino

**Formato de reporte de casos**

Nombre del evaluador: \_\_\_\_\_

**7. Exploración física por oftalmología**

Signo	Ojo derecho				Ojo izquierdo					
7.1 Posición del párpado y aspecto de la piel:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
7.2 Unión mucocutánea	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
7.3 Hiperemia conjuntival y edema:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
7.4 Exudado conjuntival:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
7.5 Inflamación de la conjuntiva tarsal:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
7.6 Involucro Limbal:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
7.7 Involucro corneal:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4

Nombre del evaluador: \_\_\_\_\_

**8. Diagnóstico**

Conjuntivitis alérgica  Otro, especificar: \_\_\_\_\_

Puntaje total de la escala visual análoga de signos de conjuntivitis alérgica (sección 4 y 7):   puntos

**9. Tratamiento**

- Ketotifeno solución oftálmica 0.025% (Zaditen) vía de administración ocular, administrar 1 gota en cada ojo cada 12 horas por 1 mes.
- Hialuronato de sodio solución oftálmica 0.15% (Hyabak) vía de administración ocular, administrar 1 gota en cada ojo cada 4 horas por 1 mes.
- Medidas de higiene general.
- Otro, especificar: \_\_\_\_\_

**Escala visual análoga de signos de conjuntivitis alérgica**

0 puntos: Ausente,
1-12 puntos: leve,
13-24 puntos: moderada,
25-36 puntos: moderado-severo
36 a 48 puntos: severo.



Fecha:        
 Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:     No. De registro:       Sexo:  Femenino  Masculino

**Formato de reporte de casos**

**C. Resultados de laboratorio**

Fecha de realización:        
 día mes año

1. Biometría Hemática			
1.1 Hemoglobina	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> g/dl	11. Leucocitos totales	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> %
1.2 Hematocrito	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> %	11. Neutrófilos	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> %
1.3 Eritrocitos	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> 10 <sup>6</sup> /uL	11. Eosinófilos	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> %
1.4 MCV	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> fL	11. Basófilos	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> %
1.5 MHC	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> Pg	11. Monocitos	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> %
1.6 MCHC	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> 10 <sup>3</sup> /uL	11. Linfocitos	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> %
1.7 RDW-CV	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> %	11.9 IgE total	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 10 <sup>3</sup> /uL
1.8 Plaquetas	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> 10 <sup>3</sup> /uL		

2. Citología de moco nasal	Narina Derecha	Narina izquierda
2.1 Eosinófilos	<input type="text"/> <input type="text"/> %	<input type="text"/> <input type="text"/> %
2.2 Polimorfonucleares	<input type="text"/> <input type="text"/> %	<input type="text"/> <input type="text"/> %
2.3 Células polimorfonucleares	<input type="text"/> <input type="text"/> %	<input type="text"/> <input type="text"/> %
2.4 Linfocitos	<input type="text"/> <input type="text"/> %	<input type="text"/> <input type="text"/> %
2.5 Biota microbiana	<input type="text"/> <input type="text"/> %	<input type="text"/> <input type="text"/> %

3. Coproparasitológico
3.1 Primera muestra:
3.2 Segunda muestra:
3.3 Tercer muestra:

**D. Pruebas cutáneas**

Fecha de realización:        
 día mes año

Control de Histamina: Resultado en <input type="text"/> <input type="text"/> mm
Control negativo: Resultado en <input type="text"/> <input type="text"/> mm
Der-p: Resultado en <input type="text"/> <input type="text"/> mm <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo
Tratamiento: <input type="checkbox"/> Loratadina tabletas 10mg tomar 1 tableta vía oral cada 24 horas por 15 días <input type="checkbox"/> Loratadina jarabe 100mg/100ml tomar 5ml vía oral cada 24 horas por 15 días

Nombre del evaluador: \_\_\_\_\_

Nombre del revisor: \_\_\_\_\_

Fecha:        
          Día    Mes    Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:  No. De registro:  Sexo:  Femenino  Masculino

Formato de reporte de casos

VISITA 0

A. Criterios de selección

1. Criterios de inclusión

1.1 Sujetos entre los 7 a 17 años de edad, con diagnóstico oftalmológico de Conjuntivitis alérgica activa de leve a moderado: días por semana y >4 semanas consecutivas*	> 4	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.2 Pruebas cutáneas positivas al ácaro de polvo (Der-p):		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.3 Que estén por iniciar tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante:		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.4 Pruebas cutáneas positivas al ácaro de polvo (Der-p):		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.5 Firma de consentimiento y asentimiento informado:		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No

\*Prevía valoración por la clínica de alergias, deberá incluir BH, IgE, EOS moco Nasal, CPS.

2. Criterios de exclusión

2.1 Presenta alguna enfermedad inflamatorias de la superficie ocular:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
2.2 Presenta cualquier enfermedad sistémica, endocrinológica, inmunológica, neoplásica, infecciosa y/o crónico degenerativa:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
2.3 Pacientes con tratamiento previo con corticoesteroides sistémicos inmunosupresores sistémicos en los últimos 6 meses:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
2.4 Embarazo o lactancia.	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
2.5 Rinitis, asma y/o dermatitis atópica activa en el momento de la toma de muestra sanguínea:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No

Observaciones: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Fecha:        
Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:     No. De registro:       Sexo:  Femenino  Masculino

Formato de reporte de casos

VISITA 1

A. Verificación de consentimiento y asentimiento informado

1. Verificación

Fecha de realización:   -   -      
día mes año

1.1 El consentimiento y asentimiento informado, fue leído por el sujeto experimental:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.2 Tuvo suficiente tiempo para leer el consentimiento y asentimiento informado y realizar preguntas al investigador:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.3 Se obtuvo el consentimiento y asentimiento informado antes de iniciar cualquier procedimiento propio del estudio experimental:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.4 Se le entregó una fotocopia a los responsables del sujeto experimental del consentimiento y asentimiento informado:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No

Observaciones: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Fecha:          
 Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antigeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:     No. De registro:       Sexo:  Femenino  Masculino

Formato de reporte de casos

VISITA 1

C. Toma de muestras previo a la entrega de inmunoterapia sublingual antigeno desensibilizante y valoración inmunoolftalmológica

1. Laboratorio

Fecha de realización:   -   -      
 día mes año

1.1 Se le explicó el procedimiento y se pidió autorización verbal y escrita para el procedimiento:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.2 Se identificó correctamente al sujeto de investigación (Nombre completo y fecha de nacimiento):	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.3 Obtención de muestra sanguínea en 4 tubos vacutainer adicionados con EDTA:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.4 Obtención de muestra sanguínea en 1 tubo vacutainer SST:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.5 Obtención de muestra de lágrima por capilaridad:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.6 Se etiquetaron las muestras sanguíneas (No. De registro):	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.7 Se etiquetaron las muestras de lágrima (No. De registro):	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No

2. Procesamiento de muestras de laboratorio

Fecha de realización:   -   -      
 día mes año

Tubo vacutainer adicionado con EDTA

2.1 Las muestras de sangre en tubos EDTA se colocaron en agitador digital para tubos hasta su uso:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
--	---

Tubo vacutainer adicionado con EDTA

2.2 Se permite la formación de coagulo (10 min) de tubo vacutainer SST:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
2.3 El tubo vacutainer SST se centrifuga a 3500rpm por 10 min:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
2.4 Se almacena el suero proveniente de tubo vacutainer SST a -80°C en caja correspondiente:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No

Muestras de lágrima

2.5 Se almacenaron en microtubos de 200ul -80°C en caja correspondiente:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
--	---

Observaciones: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Fecha:        
 Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:     No. De registro:       Sexo:  Femenino  Masculino

Formato de reporte de casos

VISITA 1

D. Entrega de inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

1. Inmunología

Fecha de realización:   -   -     
 día mes año

1.1 Se le entregó el frasco No. 1 de Inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> NA*
1.1a Se le entregó el frasco No. 7 de Inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> NA*
1.2 Se dieron indicaciones para su almacenaje en refrigerador (puerta o caja de verduras y que no debe pasar más de 12 horas sin refrigerar)	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.3 Se dieron indicaciones para su administración de acuerdo a esquema terciado:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.4 Se entregó diario del paciente y se explicó cómo llenarlo:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.5 Se informaron posibles reacciones adversas:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.6 Se etiquetaron las muestras sanguíneas (No. De registro):	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.7 El paciente firmó hoja de recibido de inmunoterapia y de las indicaciones del punto 1.2 al 1.6:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No

NA: No aplica

2. Padecimiento actual

Fecha de realización:   -   -     
 día mes año

2.1 Síntomas oculares:	Días de presentación a la semana							
2.2 Prurito:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7
2.3 Lagrimeo:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7
2.4 Fotofobia:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7
2.5 Sensación de cuerpo extraño:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7

3. Exploración física por oftalmología

Fecha de realización:   -   -     
 día mes año

3.1 Posición del párpado y aspecto de la piel:	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
3.2 Unión mucocutánea	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
3.3 Hiperemia conjuntival y edema:	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
3.4 Exudado conjuntival:	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
3.5 Inflamación de la conjuntiva tarsal:	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
3.6 Involucro Limbal:	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
3.7 Involucro corneal:	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4

Fecha:        
 Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:     No. De registro:       Sexo:  Femenino  Masculino

Formato de reporte de casos

4. Tratamiento previo

Fecha de realización:   -   -      
 día mes año

4.1 <input type="checkbox"/> Ketotifeno solución oftálmica 0.025% (Zaditen) vía de administración ocular, administrar 1 gota en cada ojo cada 12 horas por 1 mes. Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
4.2 <input type="checkbox"/> Hialuronato de sodio solución oftálmica 0.15% (Hyabak) vía de administración ocular, administrar 1 gota en cada ojo cada 4 horas por 1 mes. Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
4.3 <input type="checkbox"/> Loratadina tabletas 10mg tomar 1 tableta vía oral cada 24 horas por 15 días Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
4.4 <input type="checkbox"/> Loratadina jarabe 10mg/10ml tomar 5ml vía oral cada 24 horas por 15 días Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
4.5 <input type="checkbox"/> Medidas de higiene general. Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
4.6 <input type="checkbox"/> Otro, especificar: _____
3.8 Test de Schirmer: <input type="text"/> <input type="text"/> mm <input type="text"/> <input type="text"/> mm

4. Tratamiento actual

Fecha de realización:   -   -      
 día mes año

4.1 <input type="checkbox"/> Ketotifeno solución oftálmica 0.025% (Zaditen) vía de administración ocular, administrar 1 gota en cada ojo cada 12 horas por 1 mes.
4.2 <input type="checkbox"/> Hialuronato de sodio solución oftálmica 0.15% (Hyabak) vía de administración ocular, administrar 1 gota en cada ojo cada 4 horas por 1 mes.
4.3 <input type="checkbox"/> Loratadina tabletas 10mg tomar 1 tableta vía oral cada 24 horas por 15 días
4.4 <input type="checkbox"/> Loratadina jarabe 100mg/100ml tomar 5ml vía oral cada 24 horas por 15 días
4.5 <input type="checkbox"/> Medidas de higiene general.
4.6 <input type="checkbox"/> Otro, especificar: _____
3.9 Tiempo de ruptura lagrimal: <input type="text"/> <input type="text"/> segundos <input type="text"/> <input type="text"/> segundos

Nombre del evaluador: \_\_\_\_\_.

5. Fotografías

5.1 ¿Se tomaron fotografías? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Lugar de almacenamiento: <input type="checkbox"/> Google drive <input type="checkbox"/> Memoria USB
Nombre del archivo: _____	

Observaciones: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Fecha:        
Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:  No. De registro:  Sexo:  Femenino  Masculino

**Formato de reporte de casos**

**VISITA 1**

**A. Cuestionario de calidad de vida en niños/as con rinoconjuntivitis (PRQLQ)**

Fecha de realización: --  
día mes año

1.1 Nariz tapada, congestionada	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.2 Estornudos	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.3 Nariz te gotee	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.4 Picor en la nariz	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.5 Picor en los ojos	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.6 Te lloren los ojos	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.7 Ojos hinchados	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.8 Dolor en los ojos	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.9 Tener que frotarte los ojos y la nariz	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.10 Tener que sonarte la nariz	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.11 Tener que llevar pañuelos	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.12 Tener que tomar medicinas para tus alergias	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.13 Tener sed	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.14 El picor de la garganta	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.15 Dolor de cabeza	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.16 Molestias para jugar al aire libre	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.16 Cansado/a	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.18 Mal en general	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.19 Irritable	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.20 Vergüenza	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.21 Dificultad para quedarte dormido/a	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.22 Despertando durante la noche	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
1.22 Dificultad para prestar atención	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6

Observaciones: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Fecha:        
Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:  No. De registro:  Sexo:  Femenino  Masculino

Formato de reporte de casos

VISITA 2

A. Consulta de inmunología

1. Interrogatorio

Fecha de realización:   -   -     
día mes año

1.1 El sujeto entrega el diario del paciente correctamente llenado de la visita previa:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.2 De acuerdo al diario del paciente, ¿Hubo adecuado apego al tratamiento?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.3 ¿El sujeto tomó su tratamiento farmacológico tópico y oral convencional? Especificar:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
1.4 <input type="checkbox"/> Ketotifeno solución oftálmica 0.025% (Zaditen) vía de administración ocular, administrar 1 gota en cada ojo cada 12 horas por 1 mes.	
1.5 <input type="checkbox"/> Hialuronato de sodio solución oftálmica 0.15% (Hyabak) vía de administración ocular, administrar 1 gota en cada ojo cada 4 horas por 1 mes.	
1.6 <input type="checkbox"/> Loratadina tabletas 10mg tomar 1 tableta vía oral cada 24 horas por 15 días	
1.7 <input type="checkbox"/> Loratadina jarabe 100mg/100ml tomar 5ml vía oral cada 24 horas por 15 días	
1.8 <input type="checkbox"/> Medidas de higiene general.	
1.9 <input type="checkbox"/> Otro, especificar: _____	

Observaciones: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



Fecha:        
Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antigeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:  No. De registro:  Sexo:  Femenino  Masculino

Formato de reporte de casos

VISITA 2

A. Farmacovigilancia activa

1. Interrogatorio

Fecha de realización:   -   -      
día mes año

1.1 ¿Presentó alguna sRAM con el frasco No. 1 de SLIT?:  Sí\*  No  NA  
 1.2 ¿Presentó alguna sRAM con el frasco No. 7 de SLIT?:  Sí\*  No  NA

Especificar\*:

1.3 Tipo de reacción: <input type="text"/> <input type="text"/>	1.4 Gravedad: <input type="text"/> <input type="text"/>	1.5 Causalidad: <input type="text"/>	1.6 Descenlace: <input type="text"/>
1.5 Fecha Inicio: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <small>día mes año</small>	1.6 Fecha término: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <small>día mes año</small>		
1.7 <input type="checkbox"/> NA	1.8 Tipo de reacción: <input type="text"/> <input type="text"/>	1.9 Gravedad: <input type="text"/> <input type="text"/>	1.10 Causalidad: <input type="text"/>
1.12 Fecha Inicio: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <small>día mes año</small>		1.13 Fecha término: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <small>día mes año</small>	
1.14 <input type="checkbox"/> NA	1.15 Tipo de reacción: <input type="text"/> <input type="text"/>	1.16 Gravedad: <input type="text"/> <input type="text"/>	1.17 Causalidad: <input type="text"/>
1.19 Fecha Inicio: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <small>día mes año</small>		1.20 Fecha término: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <small>día mes año</small>	

Tipo de reacción	Gravedad	Causalidad	Descenlace
1. Percepción del gusto alterado	1o: No grave	1 - Dudosa	0 - Fatal
2. Comezón en los labios	1a: Leve	2 - Posible	1 - No recuperado/No resuelto
3. Hinchazón de los labios	1b: Moderada	3. - Probable	2 - Recuperado con secuela
4. Comezón dentro de la boca	1c: Severa	4. - Definida	3 - Recuperado sin secuela
5. Comezón en los oídos	2o: Grave		4 - Recuperado/resuelto
6. Hinchazón de la lengua			
7. Ardor en la lengua Irritación de la garganta			
8. Ronchas			
9. Salpullido en la piel			
10. Tos y/o dificultad para respirar			
11. Dolor abdominal			
12. Vómito			
13. Presión arterial baja			
14. Desmayo			

Fecha:          
 Día Mes Año

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4, en células dendríticas de pacientes pediátricos con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante

Iniciales del sujeto:     No. De registro:       Sexo:  Femenino  Masculino

Formato de reporte de casos

Visita 2
A. Farmacovigilancia intensiva

1. Interrogatorio

Fecha de realización:   -   -      
 día mes año

1.1 ¿Presentó alguna sRAM con el frasco No. 1 de SLIT?:	<input type="checkbox"/> Sí* <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> NA
1.2 ¿Presentó alguna sRAM con el frasco No. 7 de SLIT?:	<input type="checkbox"/> Sí* <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> NA

Especificar\*:

1.3 Tipo de reacción: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1.4 Gravedad: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1.5 Causalidad: <input type="checkbox"/> 1.6 Descenlace: <input type="checkbox"/>			
1.5 Fecha Inicio: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> día mes año			
1.6 Fecha término: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> día mes año			
1.7 <input type="checkbox"/> NA 1.8 Tipo de reacción: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1.9 Gravedad: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1.10 Causalidad: <input type="checkbox"/> 1.11 Descenlace: <input type="checkbox"/>			
1.12 Fecha Inicio: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> día mes año			
1.13 Fecha término: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> día mes año			
1.14 <input type="checkbox"/> NA 1.15 Tipo de reacción: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1.16 Gravedad: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1.107Causalidad: <input type="checkbox"/> 1.18 Descenlace: <input type="checkbox"/>			
1.19 Fecha Inicio: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> día mes año			
1.20 Fecha término: <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> día mes año			
Tipo de reacción	Gravedad	Causalidad	Descenlace
1 Percepción del gusto alterado	1o: No grave	1 - Dudosa	0 - Fatal
2. Comezón en los labios	1a: Leve	2 - Posible	1 - No recuperado/No resuelto
3. Hinchazón de los labios	1b: Moderada	3. - Probable	2 - Recuperado con secuela
4. Comezón dentro de la boca	1c: Severa	4. - Definida	3 - Recuperado sin secuela
5. Comezón en los oídos	2o: Grave		4 - Recuperado/resuelto
6. Hinchazón de la lengua			
7. Ardor en la lengua Irritación de la garganta			
8. Ronchas			
9. Salpullido en la piel			
10. Tos y/o dificultad para respirar			
11. Dolor abdominal			
12. Vómito			
13. Presión arterial baja			
14. Desmayo			



---