

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE MEDICINA y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Programa de Doctorado: Avances en Neuroftalmología. Código 40G.

Curso 2007/2008. Departamento de Cirugía.



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

“DESCRIPTIVA DE LOS FENOTIPOS CLÍNICO-  
TERAPÉUTICOS DE PENFIGOIDE OCULAR CICATRICIAL EN  
BASE A PERFILES DE SECRECIÓN DE INTERLEUQUINAS EN  
CONJUNTIVA”. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA BIOPSIA  
CONJUNTIVAL COMO GUIA TERAPÉUTICA.

TESIS DOCTORAL presentada por Dña. Ana Marina Suelves Cogollos

Director: Prof. Manuel Díaz-Llopis

Tutor: Dr. Salvador García-Delpech

Datos presentados parcialmente en el 2º Congreso Mundial de Controversias en Oftalmología (Barcelona, 2011) y publicados parcialmente en la Revista Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;53: 8112-7.

Valencia, Abril 2013



**MANUEL DÍAZ LLOPIS**, Catedrático de Oftalmología del Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia, Doctor en Medicina y Cirugía y Jefe del servicio de Oftalmología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**CERTIFICO:**

Que Doña Ana Marina Suelves Cogollos ha efectuado bajo mi dirección la presente tesis titulada “DESCRIPTIVA DE LOS FENOTIPOS CLÍNICO-TERAPÉUTICOS DE PENFIGOIDE OCULAR CICATRICAL EN BASE A PERFILES DE SECRECIÓN DE INTERLEUQUINAS EN CONJUNTIVA”. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA BIOPSIA CONJUNTIVAL COMO GUIA TERAPÉUTICA.

Considero que reúne todas las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste a todos los efectos, se expide el presente certificado en Valencia, Abril 2013.

**Fdo. Prof. Dr. Manuel Díaz Llopis**



**SALVADOR GARCÍA DELPECH**, Doctor en Medicina y Cirugía, médico adjunto del servicio de oftalmología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**CERTIFICO:**

Que Doña Ana Marina Suelves Cogollos ha efectuado bajo mi dirección la presente tesis titulada “DESCRIPTIVA DE LOS FENOTIPOS CLÍNICO-TERAPÉUTICOS DE PENFIGOIDE OCULAR CICATRICIAL EN BASE A PERFILES DE SECRECIÓN DE INTERLEUQUINAS EN CONJUNTIVA”. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA BIOPSIA CONJUNTIVAL COMO GUIA TERAPÉUTICA.

Considero que reúne todas las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste a todos los efectos, se expide el presente certificado en Valencia, Abril 2013.

**Fdo. Dr. Salvador García Delpech**



## ***Dedico este trabajo***

- A Ana, mi madre, una luchadora incansable, por impulsarme a ser mejor cada día y enseñarme el verdadero valor de las cosas.
  
- A mis abuelos Juan y Ana, referentes en mi vida, por su apoyo incondicional y perenne.





## ***Agradecimientos***

- Al Profesor. M. Díaz Llopis, Catedrático de Oftalmología de la Universidad de Valencia y jefe de servicio de Oftalmología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Mi mentor. Gracias por enseñarme tantas y tantas cosas y mostrarme como la ilusión , la curiosidad intelectual y la innovación deben ser ingredientes indispensables en un oftalmólogo del siglo XXI.
- Al Profesor C. Stephen Foster, por enseñarme lo que es la excelencia y descubrirme el apasionante mundo de la inmunología ocular.
- Al Dr. Salvador García Delpech, virtuoso cirujano.
- A la Dra. Zhao, ejemplo de sabiduría y tesón, sin la cuál esta tesis no hubiera podido realizarse.



La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la beca-premio Dr. Juan Pallarés 2012 para Investigación Oftalmológica y la beca SECOIR 2011. Gracias al Instituto Médico Valenciano y a la Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto Refractiva por seguir apoyando y promoviendo la investigación básica en Oftalmología, especialmente en estos tiempos tan difíciles.



# ***RESUMEN***



**OBJETIVO:** Determinar la expresión conjuntival de las interleuquinas (IL)-1, IL-6, IL-12, IL-13 e IL-17 en una cohorte de pacientes con penfigoide ocular cicatricial (POC) y sujetos sanos. Investigar la correlación entre la expresión de estas citoquinas y parámetros epidemiológicos, perfiles clínicos y respuesta terapéutica en pacientes con POC, e identificar a los grupos de riesgo de esta entidad

**MATERIAL Y MÉTODO:** Estudio bidireccional de casos y controles. Se obtuvieron especímenes conjuntivales en 12 pacientes con POC clínicamente activo y 6 sujetos sanos. Retrospectivamente, se estudió la histología, y los distintos patrones de expresión de IL 1, IL-6, IL-12, IL-13, IL-17 en todos los sujetos. Se realizó un seguimiento prospectivo de los rasgos clínicos y respuesta al tratamiento en pacientes con POC. Se realizó un análisis estadístico mediante SPSS V.15 para Windows.

**RESULTADOS:** No se encontró una expresión significativa de ninguna de las citoquinas estudiadas en los sujetos control. En los especímenes conjuntivales de individuos con POC, se observó una sobreexpresión estadísticamente significativa de IL-12 e IL-17 en epitelio, estroma y área perivascular; junto a un aumento de la expresión estromal de IL-1 e IL-6. Los pacientes con POC más activo clínicamente presentaron una mayor expresión de IL-13, especialmente en la sustancia propia, comparado con los sujetos menos activos clínicamente en el momento de la biopsia

La actividad inflamatoria observada clínicamente se correlacionó directamente con una microangiopatía mediada por IL-12, IL-13 e IL-17. La expresión estromal de IL-1 y la presencia de microangiopatía mediada por IL-12 e IL-17 fueron predictores de una mejor respuesta terapéutica. Se identificaron como grupo de riesgo de progresión rápida los pacientes que presentaron microangiopatía.

**CONCLUSIONES:** Los resultados presentados en la presente tesis apoyan otros estudios que muestran la sobreexpresión de la IL-13 en pacientes con POC activo, pero además demuestran por primera vez la implicación local de la IL-1, IL-6, IL-12 e IL-17. La combinación de hallazgos inmunohistoquímicos en la biopsia conjuntival unidos a *scores* clínicos permiten clasificar a los pacientes con POC según fenotipos clínico-terapéuticos, y proporcionan una valiosa información pronóstica.



# ÍNDICE

<b>1. RACIONAL y OBJETIVOS</b>	
1.1 FUNDAMENTO	21
1.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO	22
1.3 OBJETIVOS	23
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	
2.1 EMBRIOLOGÍA Y DESARROLLO DE LA CONJUNTIVA	27
2.2 ANATOMIA E HISTOLOGÍA CONJUNTIVAL	28
2.3 FISIOLÓGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA CONJUNTIVA	35
2.4 IMMUNOPRIVILEGIO CONJUNTIVAL	36
2.5 POC: REVISIÓN DEL TEMA	
2.5.1 EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y GENERALIDADES	38
2.5.2 MANIFESTACIONES OCULARES Y ESTADIAJE	40
2.5.3 MANIFESTACIONES EXTRAOCULARES Y ENFERMEDADES ASOCIADAS	43
2.5.4 IMMUNOPATOLOGÍA , HISTOLOGÍA Y DIAGNOSTICO	44
2.5.5 TRATAMIENTO	51
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1 PARTICIPANTES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	55
3.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA	56
3.3 TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA POR IMMUNOPEROXIDASA	56
3.4 VALORACIÓN DESPUÉS DE LA BIOPSIA	61
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1 DESCRIPCIÓN EPIDEMIOLÓGICA , CLÍNICA, RESPUESTA AL TRATAMIENTO	65
4.2 DESCRIPCIÓN BIOPSIAS: HISTOLOGÍA, PERFIL DIAGNÓSTICO Y PATRÓN INTERLEUQUINAS	70
4.3 COMPARACION ENTRE PACIENTES POC Y CONTROLES	95
4.4 COMPARACION ENTRE PACIENTES POC ‘PUROS’ Y CONTROLES	97
4.5 COMPARACION ENTRE PACIENTES POC “PUROS” Y PACIENTES POC CON OTRA COMORBILIDAD OCULAR	99
4.6 CORRELACIÓN 4.1 Y 4.2	101
<b>5. DISCUSIÓN</b>	
5.1 PAPEL DE LAS IL Y CÉLULAS T EN LA FISIOPATOGENIA DEL POC	105
5.2 USO BIOPSIA CONJUNTIVAL COMO GUÍA TERAPÉUTICA	110
<b>6. CONCLUSIONES</b>	
CONCLUSIONES	115
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	
BIBLIOGRAFÍA	118



## **ABREVIATURAS**

**AZA:** azatioprina

**CsA:** ciclosporina A

**FGF:** factor de crecimiento fibroblástico

**IF:** inmunofluorescencia

**Ig:** inmunoglobulina

**IL:** interleuquina

**IFN:** interferón

**IV:** intravenoso

**MB:** membrana basal

**MFM:** micofenolato de mofetilo

**MTX:** metotrexato

**OCT®:** *optimum cutting temperature*

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de las plaquetas

**PMM:** penfigoide membranoso mucoso

**POC:** penfigoide ocular cicatricial

**TGF:** factor de crecimiento transformante

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular



“El experimentador que no sabe lo que está buscando,  
no comprenderá lo que encuentra”

(C. Bernard)

***RACIONAL Y OBJETIVOS***

---

---



## 1.1 FUNDAMENTO.

El POC es una enfermedad crónica inflamatoria muy heterogénea, con una gran variabilidad clínica. Su espectro de afectación abarca desde formas “benignas”, sin apenas desarrollo de alteración estructural ocular tras más de 20 años de evolución, a formas de progresión rápida e imparable, que producen una afectación ocular muy grave con posible ceguera legal en pocos años<sup>1,2</sup>. El diagnóstico definitivo de esta entidad exige la confirmación inmunohistoquímica. Sin embargo, a día de hoy, no existe ningún marcador clínico, histológico o biológico que permita establecer el pronóstico evolutivo de la enfermedad o determinar patrones de respuesta al tratamiento. A la vez, son cada vez más los tratamientos que existen con efectos secundarios graves, que no deberían ser administrados pacientes con formas potencialmente benignas. Por estas razones es fundamental contar con marcadores biológicos que permitan identificar los diferentes niveles de riesgo en los pacientes que sufren POC.

El establecimiento de una clasificación que englobe no solo características clínicas o histológicas, sino también hallazgos inmunohistoquímicos, permitiría definir los patrones de enfermedad más acorde con los fenómenos patogénicos.

## **1.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

Los pacientes con POC presentan una gran heterogeneidad clínica y terapéutica que tiene su expresión en diferentes subgrupos no bien caracterizados. Estas diferencias probablemente se deban a distintas formas de activación inmunológica a nivel conjuntival. Establecer estos patrones ayudaría a clasificar a los pacientes con POC en diferentes subgrupos clínico-terapéuticos en el mismo momento del diagnóstico histológico mediante biopsia conjuntival, lo que ayudaría a establecer un pronóstico a medio-largo plazo en estos pacientes.



### **1.3 OBJETIVOS CONCRETOS que se persiguen.**

1. Determinar la expresión conjuntival de IL- 1, 6, 12, 13, 17 en sujetos con POC y sujetos sanos.
2. Establecer la relación entre en presencia conjuntival de mediadores inflamatorios y los perfiles de presentación clínica (Correlación clínico-inmunohistoquímica)
3. Correlacionar las características diferenciales de respuesta al tratamiento en base al perfil inmunohistoquímico (Correlación inmunohistoquímica-terapéutica)
4. Identificar grupos de riesgo de sufrir una progresión inexorable y rápida en pacientes con POC.

La relevancia de estos objetivos reside en que su consecución permitirá establecer una clasificación pronóstica del POC en base a mecanismos fisiopatológicos concretos, lo que se traduciría en una mejora de las actuales guías clínico-terapéuticas para esta entidad.



“La felicidad es la clave del éxito.  
Si amas lo que haces, tendrás éxito en la vida”  
*Albert Schweitzer*

# *INTRODUCCIÓN*

---

---



## **2.1 EMBRIOLOGIA Y DESARROLLO DE LA CONJUNTIVA.**

La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que tapiza la superficie interna de los párpados, se refleja sobre la lámina epiescleral anterior hasta insertarse a nivel del limbo corneal. Durante el desarrollo embriológico, la conjuntiva se origina a partir de la vesícula óptica. En la octava semana de vida intrauterina se forman los párpados por el plegamiento de la superficie ectodérmica, que inicialmente se encuentran fusionados. La conjuntiva se desarrolla dentro de estos pliegues palpebrales a partir de tejido ectodérmico y tejido de la cresta neural. Entre la décima y doceava semana, el epitelio conjuntival se diferencia a partir de epitelio cutáneo y epitelio corneal. La gemación del epitelio en el fornix conjuntival forma la glándula lagrimal superotemporal y las glándulas accesorias de Wolfring y Krause<sup>3,4</sup>.

## 2.2 ANATOMÍA e HISTOLOGÍA CONJUNTIVAL

### 2.2.1 ANATOMÍA

Se reconocen tres regiones diferenciadas en la conjuntiva. Estas incluyen la *conjuntiva palpebral o tarsal*, que linda con la región interna palpebral, los *fórnicas conjuntivales*, que forman el receso entre el párpado superior e inferior, y la *conjuntiva bulbar*, que ocupa la región entre los fórnicas y el limbo sobre la esclera<sup>5</sup>.

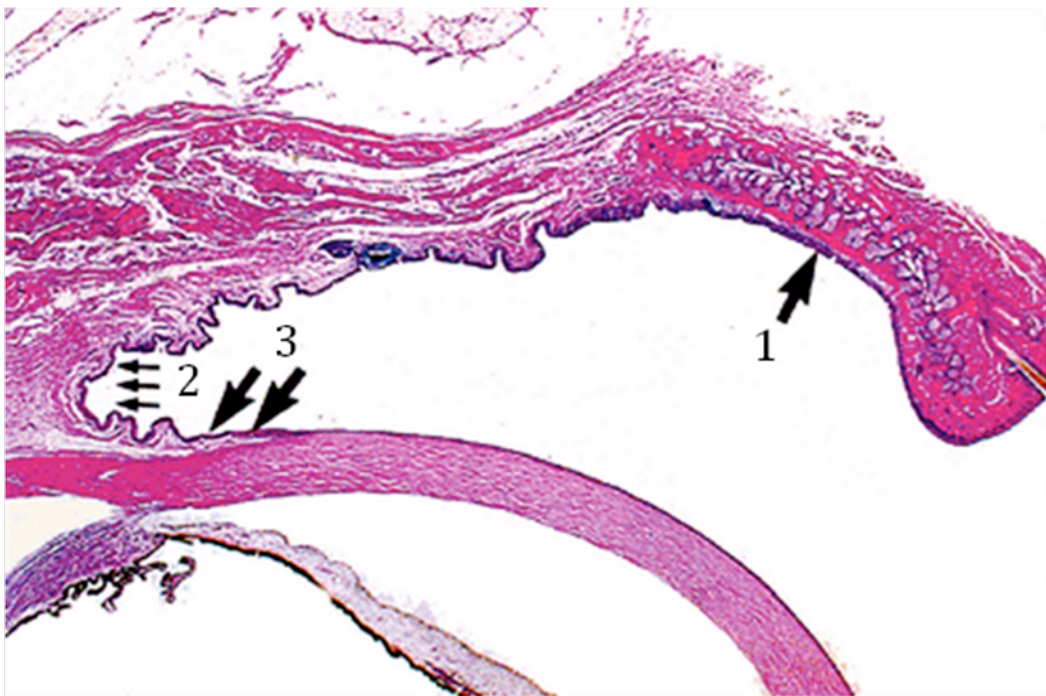


Fig. 1: Tinción hematoxilina-eosina. Corte histológico mostrando las 3 porciones diferenciadas de la conjuntiva. 1: Conjuntiva tarsal, 2: Fornix conjuntival, 3: Conjuntiva bulbar.

La conjuntiva palpebral se encuentra fuertemente adherida a la superficie del tarso, no existiendo un plano subconjuntival real, sino virtual entre estas 2 regiones a este nivel. Se forma así una superficie completamente lisa que contacta directamente con la superficie corneal, previniendo así cualquier traumatismo corneal con el parpadeo. La conjuntiva bulbar y los fornices conjuntivales se encuentran menos adheridos a planos profundos, para permitir la movilidad del globo ocular. A nivel del limbo esclerocorneal, se encuentran las empalizadas de Vogt, que son crestas epiteliales sobre condensaciones estromales<sup>6</sup>.

### **2.2.2 HISTOLOGÍA**

La conjuntiva es una membrana mucosa. El estudio histológico de la conjuntiva revela la presencia de un epitelio estratificado, escamoso, no queratinizado sobre una sustancia propia. Ver figura 2. La conjuntiva se considera un tejido muy rico en células del sistema inmune cuando se compara con el limbo y la córnea.

#### **Epitelio**

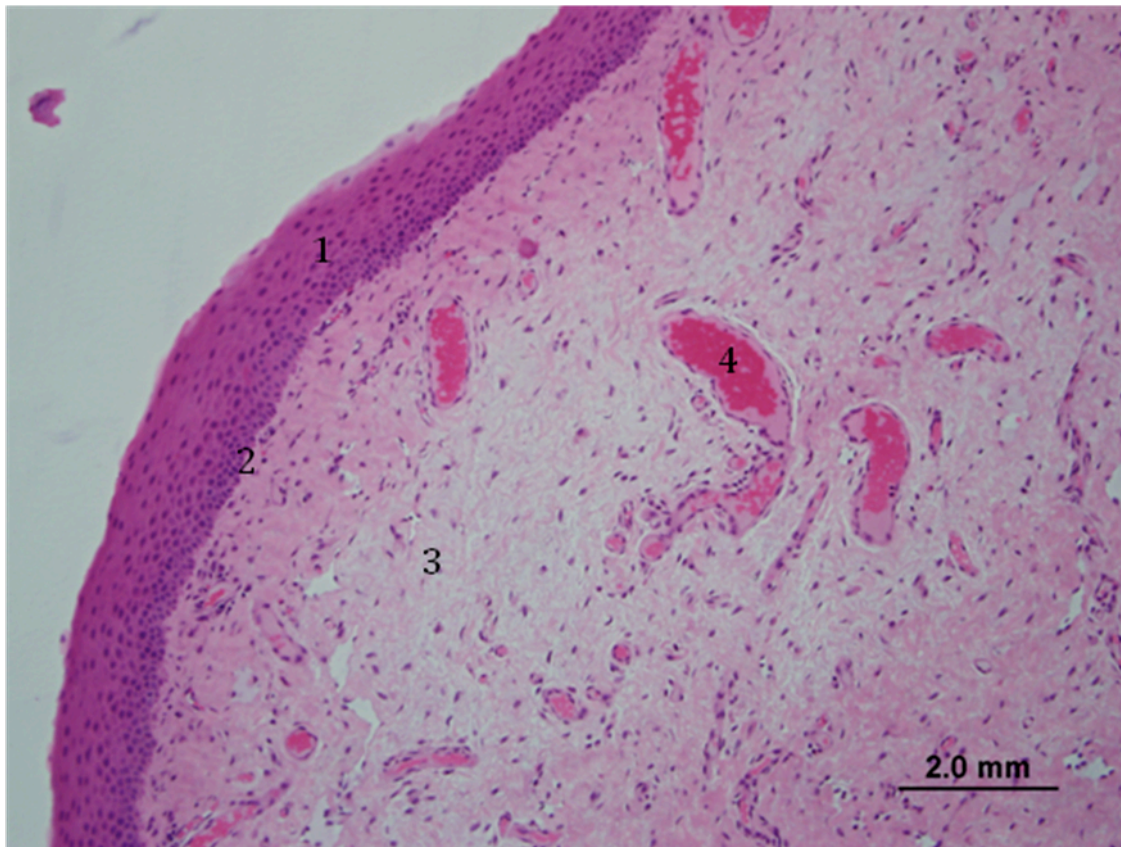
El epitelio conjuntival se considera único entre los epitelios escamosos no queratinizados, en el que se encuentran intercaladas células caliciformes. Tiene características diferenciadas según la localización. A nivel tarsal es más cuboideo,

mientras que a nivel del fórnix es más columnar. En ocasiones, invaginaciones del epitelio conjuntival palpebral pueden dar lugar a quistes subepiteliales , que en caso de encerrarse se conocen como pseudocriptas de Henle. Estos quistes contienen abundante mucina, secretada por las células caliciformes.

En caso de exposición crónica del epitelio no queratinizado al aire ambiental, es decir, que éste no esté cubierto permanentemente por lágrima, se producirá la queratinización epitelial. Esto ocurrirá de manera fisiológica en los párpados y de manera patológica en síndromes severos de disfunción lagrimal, pudiéndose verse por tanto en estadios avanzados del POC.

A nivel de la conjuntiva bulbar, el epitelio está formado por 6 a 8 capas de epitelio escamoso no queratinizado. Se cree que existe un gran metabolismo oxidativo a dicho nivel, dado el abundante número de mitocondrias y organelas citoplasmáticas encontradas en esta localización. Las membranas de las células epiteliales forman interdigitaciones entre sí. Esta configuración permite que anticuerpos y otras células del sistema inmune se acumulen.



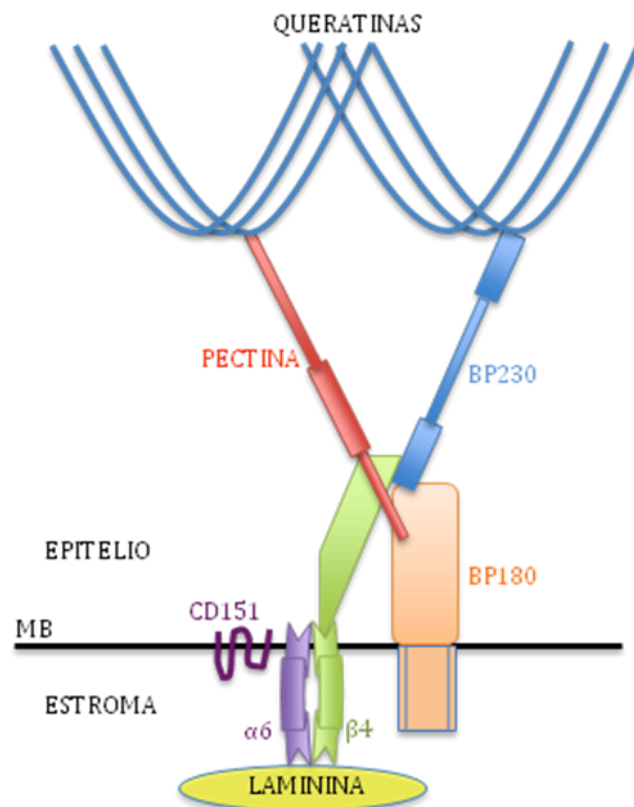


**Fig. 2 : Corte histológico de la conjuntiva, tinción hematoxilina-eosina. 1: epitelio escamoso conjuntival. 2: membrana basal. 3: substancia propia. 4: vaso sanguíneo conjuntival, lleno de hematíes.**

La conjuntiva bulbar se encuentra adherida a la membrana basal de manera discontinua por hemidesmosomas. Estos son complejos proteicos que estabilizan el anclaje de las células basales a la membrana basal subyacente<sup>9-10</sup>. Los hemidesmosomas sirven de unión activa entre la matriz extracelular y los filamentos intermedios del citoesqueleto celular. Estas unidades contienen al menos 5 estructuras proteicas: la integrina  $\alpha 6\beta 4$ , la pectina, los antígenos del penfigoide bulloso (BP 180 y BP 230) y la tetraspanina CD 151. Ver figura 3.

Dentro del hemidesmosoma, la integrina  $\alpha 6\beta 4$  cobra una especial relevancia en pacientes con POC. Ya que la gran mayoría de pacientes afectados de POC presentan Ac que reconocen la subunidad  $\beta 4$  de esta integrina<sup>7</sup>. Este heterodímero transmembrana no solo media la adhesión celular, sino que además regula señales de transducción bidireccional<sup>9-10</sup>, permitiendo que las células accedan del epitelio al estroma conjuntival y viceversa<sup>11</sup>. Así, los linfocitos, melanocitos y las células de Langerhans pueden verse de manera fisiológica en región suprabasal del epitelio conjuntival. Por otra parte, la membrana basal conjuntival no muestra normalmente reactividad inmunohistoquímica frente a inmunoglobulinas (Ig), componentes del complemento o albúmina. Esta reactividad, está presente sin embargo en pacientes con POC, constituyendo el diagnóstico definitivo de esta entidad<sup>2</sup>.

Las células caliciformes son células apocrinas productoras de mucina. Que se tiñen con ácido periódico de Schiff (PAS). Son la fuente primaria de la mucina de la película lagrimal, que se libera en respuesta a un estímulo parasimpático. La densidad de células caliciformes es entre 1000 y 56.000 células/mm<sup>2</sup>, con el pico de densidad en jóvenes adultos, su densidad está influenciada por enfermedades locales como la queratoconjuntivitis sicca, POC, Síndrome de Stevens-Johnson y quemaduras químicas. En el caso del POC, pese a que la tasa de mitosis epitelial está aumentada, las células caliciformes están disminuidas<sup>12</sup>.



**Fig. 3: Microestructura del hemidesmosoma.**

### **Substancia propia**

La sustancia propia conjuntival es una estructura fibrovascular de grosor y densidad variables. A nivel tarsal, la sustancia propia es delgada, compacta, y se adhiere intensamente al tarso, especialmente en el párpado superior. En los fórnices, sin embargo, es más gruesa y de unión laxa al globo. A nivel del limbo, la sustancia propia se vuelve a adelgazar, y se fusiona con la cápsula de Tenon y tejido episcleral<sup>6</sup>.

La sustancia propia puede dividirse en 2 capas, capa profunda y superficial. La capa más externa está formada por tejido conectivo interconectado, que incluye tejido linfoide. Esta capa no está presente al nacimiento, sino que se desarrolla en los primeros meses de vida extrauterina. En adultos, se incluye una capa adenoide de tejido linfoide, más prominente a nivel inferior. En la conjuntiva sana, no se encuentran folículos. Sin embargo, bajo estímulo viral o infecciones por clamidias, o por ciertos medicamentos, los linfocitos pueden estimularse y los folículos se elevan sobre el epitelio conjuntival. La capa más interna está formada por tejido vascular (procedente de la arteria oftálmica), linfático (que drena hacia ganglios linfáticos preauriculares y submandibulares) y nervios sensoriales (rama oftálmica del Nervio trigémino). Entre las múltiples células que residen en la matriz de la sustancia propia se incluyen: fibroblastos residentes, gran número de linfocitos, mastocitos, células plasmáticas, y neutrófilos<sup>13</sup>.

### **2.3 FISIOLÓGÍA y FISIOPATOLOGÍA**

La conjuntiva juega un papel clave en el mantenimiento de la integridad ocular, a la vez que proporciona un medio óptimo para que la córnea actúe como elemento refractivo. Así, la conjuntiva sana es indispensable para el normal funcionamiento del ojo. Entre sus funciones destacan la producción de los componentes acuoso y mucoso de la película lagrimal, la protección de los tejidos blandos del párpado y la órbita; y facilitar un extenso movimiento del globo ocular. Además, la conjuntiva contiene agentes con propiedades inmunológicas, antibacterianas y antivíricas, formando parte integrante de la defensa externa del globo ocular. La acumulación de tejido linfoide a nivel conjuntival junto con las capacidades fagocíticas del epitelio conjuntival explican el enorme potencial de la conjuntiva para combatir los agentes infecciosos<sup>14</sup>.

Anormalidades en la conjuntiva producirán por tanto inestabilidad de la película lagrimal, restricciones en el movimiento del globo ocular y una mayor predisposición infecciosa a nivel local. Todo ello pueden dar lugar a cambios patológicos en la córnea, con probable compromiso secundario de la función visual.

#### **2.4 IMMUNOPRIVILEGIO CONJUNTIVA.**

La conjuntiva humana es un participante activo en la defensa inmune de la superficie ocular frente a organismos exógenos. La presencia de vasos sanguíneos y canales linfáticos alimenta el tránsito de células inmunes que participan en la respuesta aferente y eferente del sistema inmune.

Las células principales del sistema inmune en la conjuntiva son las células dendríticas. Además, linfocitos B y T, mastocitos, células de Langerhans, se encuentran presentes en las distintas regiones de la conjuntiva<sup>15</sup>. Las células dendríticas actúan a nivel conjuntival como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T, así, estimulan una proliferación de linfocitos T antígeno-específica a través de la región clase II<sup>16</sup>. Los linfocitos T, la subpoblación de linfocitos predominante en la conjuntiva, se encuentran en la conjuntiva sana en el epitelio y la sustancia propia. Los linfocitos T, son las principales células efectoras de la respuesta de hipersensibilidad retardada o respuesta citotóxica. Los linfocitos B están ausentes en la conjuntiva, salvo por escasas células dispersas en la sustancia propia de los fórnices. Las Ig y linfoquinas producidas por tejido linfoide ayudan a los neutrófilos y macrófagos a destruir antígenos. A cambio, los macrófagos ayudan a los linfocitos a transportar antígenos del ojo a los ganglios linfáticos. Algunas Ig (Ig E) se unen a los

mastocitos, otras (Ig G, Ig M) se unen al complemento. Las células plasmáticas sintetizan también Ig A. La Ig A en forma dimérica se transportan a través del epitelio mucoso unidos al complejo receptor. Los dímeros de Ig A se liberan a la luz de los ductos unido al componente secretor. Este dímero, más que ser una sustancia bactericida o bacteriostática, actúa cobijando los receptores de superficie que de otra manera estarían disponibles para la fijación bacteriana o vírica<sup>17</sup>, de este modo, la Ig A tiene un papel crucial en la modulación de la flora bacteriana normal<sup>18</sup>.

Los mastocitos, el sistema del complemento y las citoquinas liberadas por las células linfoides facilitan la quimiotaxis de los neutrófilos y macrófagos. Los mastocitos se localizan principalmente a nivel perilimbar, sin embargo, también pueden encontrarse en la conjuntiva bulbar. Su degranulación, en respuesta a un alérgeno u otro estímulo, produce la liberación de sustancias vasoactivas como la histamina, heparina, factor derivado de las plaquetas, y leucotrienos; que causan vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular<sup>19</sup>.

Las lágrimas contienen sustancias con propiedades inmunológicas y antimicrobianas, incluyendo lisozima, Ig y lactoferrina, que se sintetizan en la glándula lagrimal. La lisozima es una enzima capaz de lisar la pared bacteriana de ciertas bacterias gram positivas<sup>20</sup>. Además, esta sustancia facilita también la bacteriolisis de Ig A secretora en presencia de complemento<sup>21</sup>. La Ig G de la lágrima se encarga de

neutralizar virus, lisar bacterias y también forma inmuno-complejos que se unen al complemento y estimulan la opsonización bacteriana por la vía clásica y la quimiotaxis de los fagocitos<sup>22</sup>.

## **2. 5 PENFIGOIDE OCULAR CICATRICIAL (POC)**

### **2.5.1 EVOLUCION HISTÓRICA y GENERALIDADES**

En 1965, la ya clásica monografía publicada por Walter Lever<sup>23</sup> revolucionó por completo la concepción fisiopatogénica de las enfermedades ampollas autoinmunes. Así, este dermatólogo de Boston fue el primero en diferenciar clínica e histológicamente el Pénfigo vulgaris del Penfigoide bulloso. No obstante ambas entidades se describieron ya en la época Hipocrática<sup>24,25</sup>. Wichmann fue un el primero en acuñar el termino de penfigoide cicatricial y describir afectación de mucosas, incluyendo la conjuntiva.

El **Penfigoide Membranoso Mucoso (PMM)** es una entidad que engloba un grupo heterogéneo de enfermedades crónicas inflamatorias bullosas, que pueden afectar a las mucosas oral (paladar blando), ocular (conjuntiva), faríngea, laríngea, esofágica, genital, uretral o anal. El rasgo patogénico común en este grupo de desordenes es la presencia de depósitos lineales de Ig G, Ig A y complemento en la MB



epitelial. El termino POC se refiere al PMM que clínicamente se presenta como una conjuntivitis crónica cicatricial<sup>26</sup>. Además, en el POC también puede producirse afectación de otras mucosas o la piel. Es una entidad de gran interés en el campo de la oftalmología, dado sus efectos devastadores a nivel ocular, que son de carácter bilateral en la mayoría de casos. No en vano, la enorme distorsión ocular estructural y funcional es causa de ceguera legal en un 30% de pacientes afectos.

La incidencia de POC es estima entorno a 1: 15.000 de los pacientes oftalmológicos<sup>27</sup>. Sin embargo, algunas series apuntan a que la incidencia real podría ser hasta del doble de lo publicado<sup>2,28</sup>. Tiene una predilección por las mujeres (3:1)<sup>29</sup>, sin haberse descrito una predilección racial o geográfica<sup>30</sup>. Primariamente es una enfermedad que afecta a adultos de edad avanzada, con una edad media al diagnostico de 65 años<sup>31</sup>. No obstante, se cree que la edad de presentación del POC podría ser los 40-50 años, pero que no se diagnostica hasta 10-20 años después. De hecho, un 80% aproximadamente de los pacientes con POC presentan al diagnostico un estadio avanzado de la enfermedad (estadio III y IV). Existen anecdóticas series de casos publicadas de niños con POC, aunque en realidad se cree que estos son casos de eritema multiforme.

El POC tiene un curso crónico, con exacerbaciones frecuentes entre periodos de remisión clínica<sup>34</sup>. Se tarda de 10-30 años en llegar al estadio final, no obstante existe una gran variación individual, con un amplio espectro que incluye desde formas “benignas” de muy lenta progresión a casos de progresión inexorable en pocos años, resistentes a agresivos tratamientos inmunosupresores<sup>35</sup>.

### **2.5.2 MANIFESTACIONES OCULARES Y ESTADIAJE**

A nivel ocular, la clínica depende del estadio de la enfermedad. Los síntomas son inicialmente unilaterales, bilateralizándose la enfermedad en 2-4 años. En estadios tempranos la enfermedad puede presentarse con signos de conjuntivitis crónica o recurrente, y síntomas de irritación ocular que incluyen sensación de cuerpo extraño, quemazón, lagrimeo y secreción mucosa. Generalmente, no se observan vesículas en la conjuntiva como en otras enfermedades bullosas. En ausencia de un apropiado manejo y tratamiento, la inflamación persistente y se cronifica, produciéndose una activación de los fibroblastos, que se multiplican y secretan un nuevo tipo de colágeno (tipo 3)<sup>36</sup>. Esto causa una fibrosis subepitelial progresiva, cicatrización y subsiguiente “arrugamiento” de la conjuntiva. Las adhesiones entre la conjuntiva bulbar y palpebral se denominan simblefaron, y afectan con mas frecuencia al fornix inferior. Además, como consecuencia del la retracción conjuntival, algunos pacientes pueden presentar lagofthalmos y restricción de la movilidad del globo ocular.

La primera clasificación de POC la describió Foster en 1986<sup>2</sup>. Dicha clasificación incluye 4 categorías clínicas:

- Estadio I: conjuntivitis crónica intermitente-recurrente con fibrosis subepitelial.

- Estadio II: cicatrización conjuntival con “arrugamiento” conjuntival y acortamiento de los fondos de saco.

- Estadio III: simblefaron, acompañada de alteraciones estructurales, incluyendo triquiasis, madarosis y entropion cicatricial.

- Estadio IV o estadio final: Ankiloblefarón, con severa queratinización de la superficie ocular y severo síndrome de disfunción lagrimal. Curiosamente, la xeroftalmia aparece exclusivamente en estadios avanzados (estadios III o IV). Esta se debe a una desestructuración y obstrucción de los ductos lagrimales, glándulas de meibomio y células caliciformes.

La inestabilidad lagrimal, meibomitis, triquiasis y distiquiasis producen defectos epiteliales persistentes, exposición corneal, opacificaciones corneales persistentes y neovascularización corneal que causan la profunda queratopatía que se observa en fases avanzadas de la enfermedad.

Posteriormente, han surgido otras clasificaciones como la clasificación de Tauber-Foster<sup>37</sup>. En esta versión modificada, el estadio II y III se subdividen en 4 grupos que describen el grado de afectación: a=entre 0- 25%, b= del 25-50%, c=del 50-75% y d=del 75-100%. En el estadio II, el porcentaje describe la pérdida de profundidad del fornix inferior, mientras que el estadio III describe el porcentaje de afectación horizontal del simblefaron. La clasificación de Tauber-Foster no se utiliza generalmente en la practica clínica diaria, al resultar demasiado farragosa.

### **2.5.3 MANIFESTACIONES EXTRAOCULARES y ENFERMEDADES ASOCIADAS.**

Las manifestaciones extraoculares son comunes en estos pacientes. La afectación oral concomitante puede estar presente hasta en el 40% de los pacientes<sup>28</sup>. De las manifestaciones orales, lo mas frecuente es la gingivitis erosiva, y mas raramente erosiones o vesículas en mucosa bucal, paladar, nariz, laringe, cresta alveolar y lengua<sup>38, 39</sup>.

La coexistencia de 2 o mas enfermedades autoinmunes en un mismo paciente es una característica frecuentemente descrita en la literatura. Asi, al POC se ha descrito en pacientes afectos de artritis reumatoide<sup>2</sup>, ankylosing spondylitis, lupus eritematoso sistémico<sup>39</sup>, síndrome de Stevens-Johnson<sup>40</sup>, síndrome de Lyell<sup>41</sup>.

#### **2.5.4 INMUNOPATOLOGÍA, HISTOLOGIA y DIAGNOSTICO.**

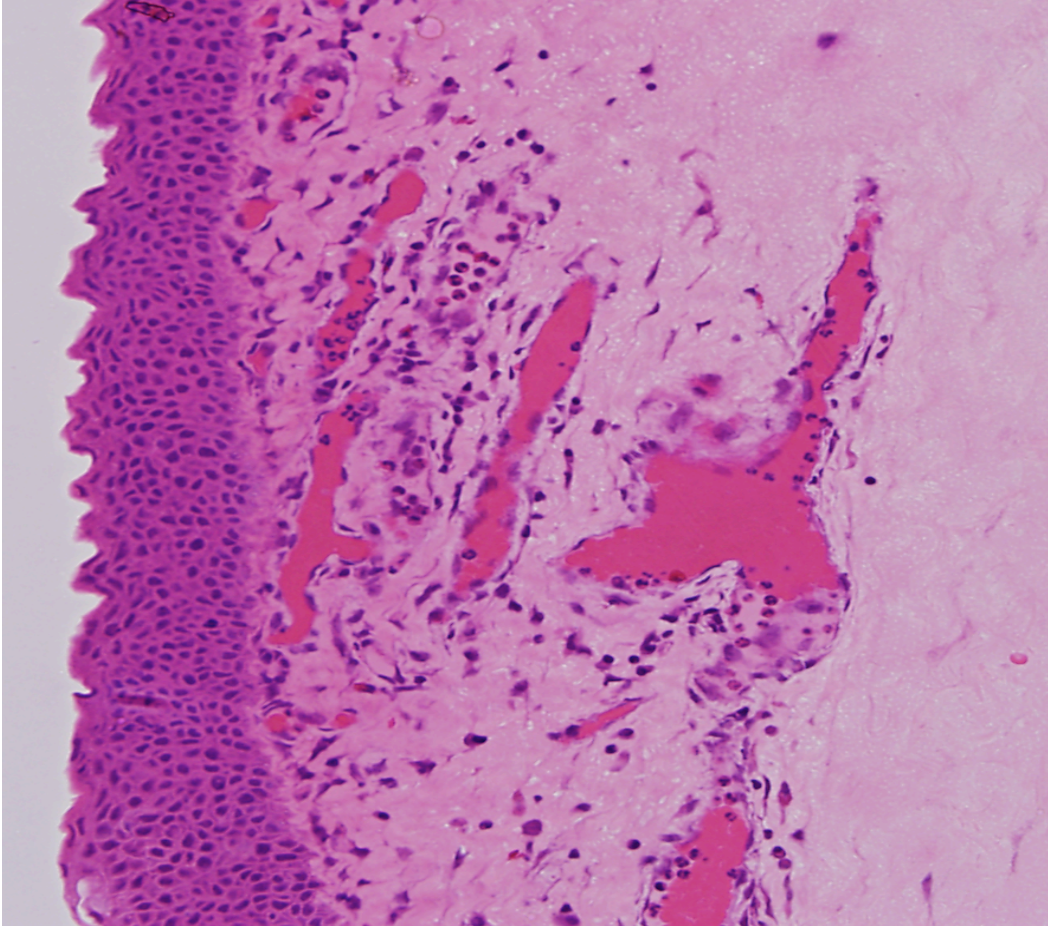
##### ***Inmunopatología***

A pesar de los enormes avances en el conocimiento de la fisiopatogenia del POC en los últimos 30-40 años, todavía existen muchas incógnitas por desvelar. La evidencia científica sugiere que el POC se desarrolla como consecuencia de la pérdida de tolerancia inmunológica frente a la zona de la MB conjuntival, concretamente un componente estructural asociado al hemidesmosoma conjuntival que media la adhesión, permeabilidad, diferenciación y organización celular. La pérdida de tolerancia inmunológica resulta en formación de autoanticuerpos (Ig G e Ig A) frente a la subunidad  $\beta 4$  de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  de la MB conjuntival y mas infrecuentemente la BP 180 o alguno de sus ectodominios solubles<sup>42-44</sup>. El depósito de autoanticuerpos en la zona de la MB conjuntival (con la subsiguiente alteracion en la señales de transduccion) elicitada una cascada de eventos a nivel celular que incluyen la generacion de una panoplia de citoquinas y quimioquinas<sup>36</sup>, como factor de crecimiento transformante (TGF)-beta 1 y 2, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), interferón (IFN)-gamma, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento de necrosis tumoral (TNF)-alfa, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

El POC o PMM es un paradigma de respuesta de hipersensibilidad tipo II o mediada por anticuerpos. Así, al igual que en muchas otras entidades autoinmunes, sujetos con una susceptibilidad genética ligada a ciertos alelos HLA y en presencia de un desencadenante ambiental (probablemente microbiano) que estimula al individuo susceptible genéticamente, podrían desarrollar POC. A pesar de que la generación de autoanticuerpos contra la MB conjuntival se considera el mecanismo fisiopatogénico principal de esta entidad, esto no explica completamente algunos rasgos característicos de esta y otras enfermedades ampollas autoinmunes<sup>45-46</sup>, como la fuerte susceptibilidad genética de esta enfermedad a complejos HLA de clase II (HLA-DQβ1\*0301)<sup>47-50</sup>.

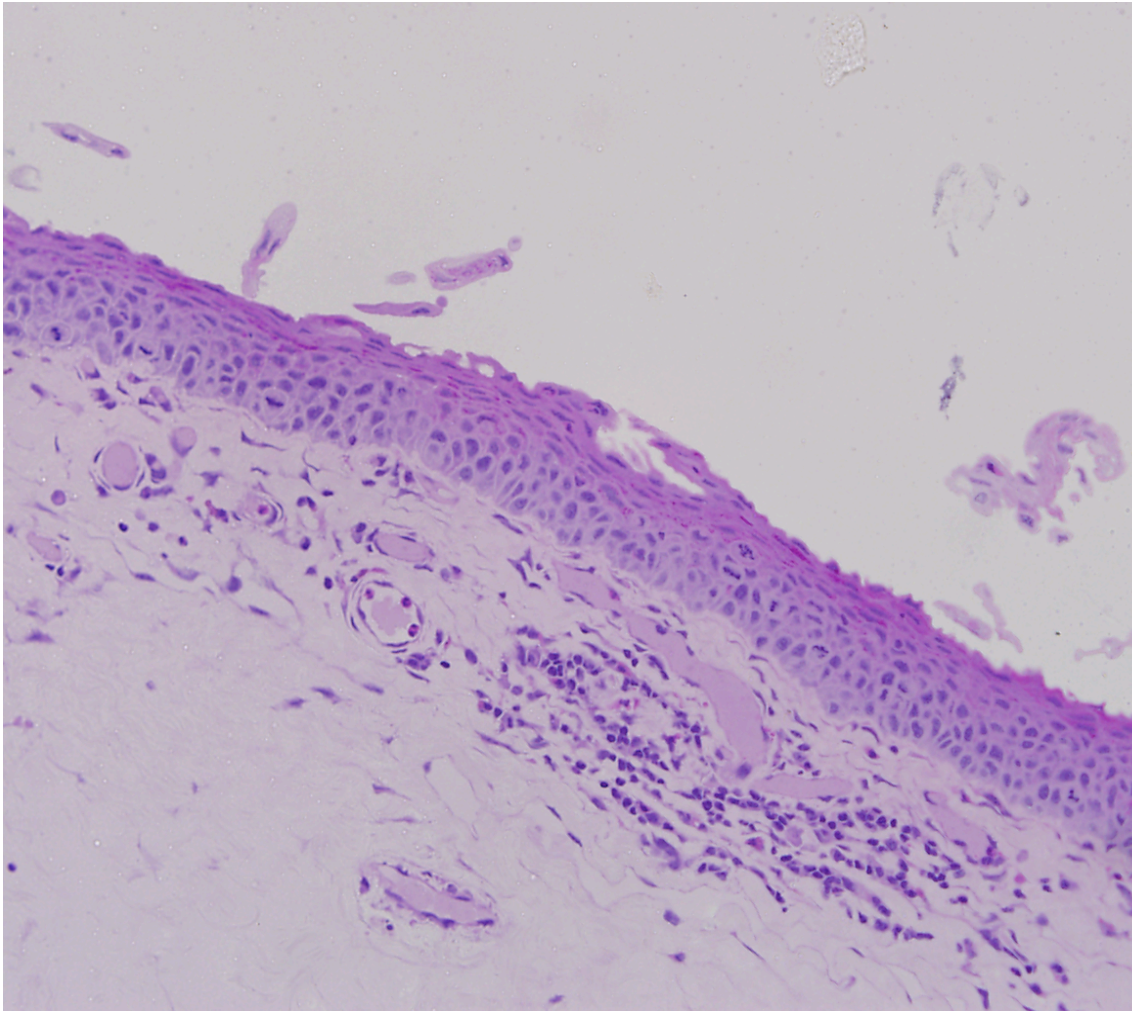
### ***Histología***

En los especímenes conjuntivales de sujetos diagnosticados de POC se puede observar un infiltrado inflamatorio crónico formado por neutrófilos, linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y células de Langerhans; además de áreas de fibrosis conjuntival, microangiopatía conjuntival, metaplasia escamosa, pérdida de células caliciformes, y sorprendentemente un aumento de mastocitos en la tinción de Giemsa<sup>2</sup>. Las figuras 4, 5 y 6 corresponden a un paciente con POC aislado.

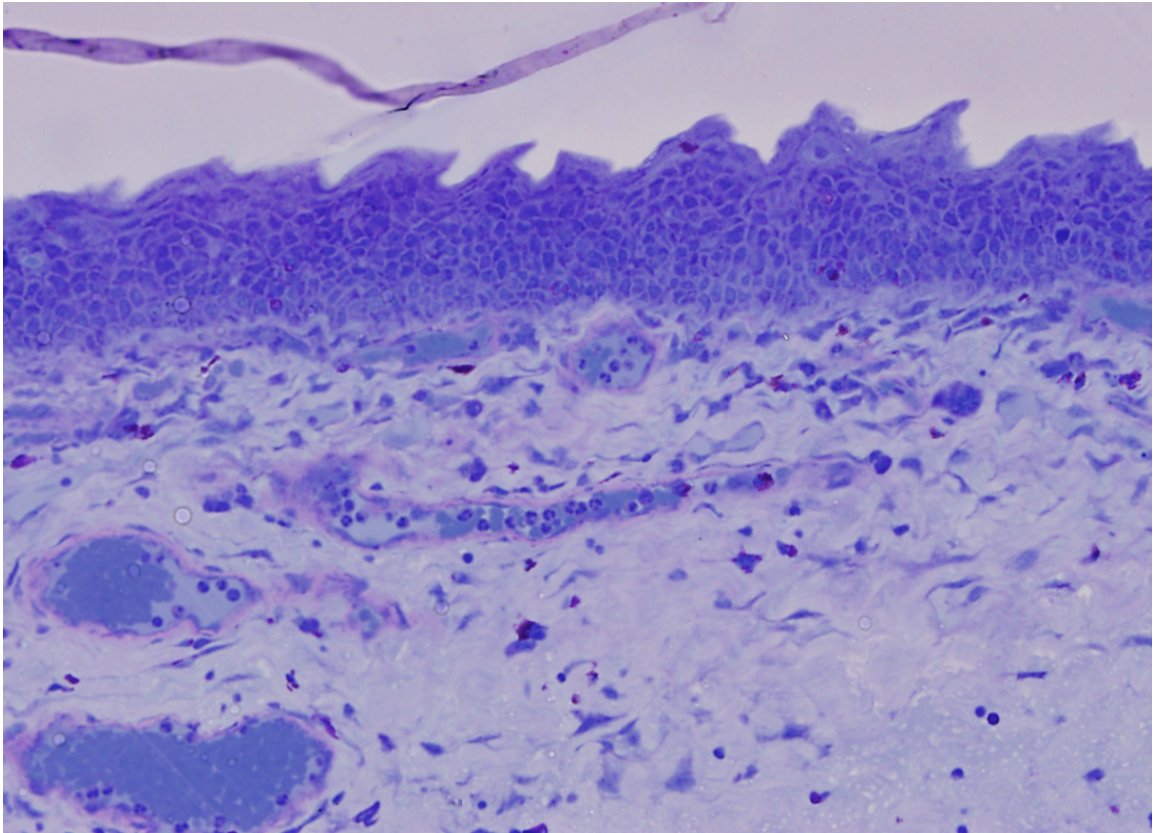


**Fig. 4 Tinción hematoxilina-eosina. Nótese el intenso infiltrado linfocitario a nivel estromal y perivascular, con neutrófilos intravasculares que están atravesando la pared del vaso.**





**Fig. 5. Tinción de PAS. Permite una optima visualización de epitelio conjuntival.**

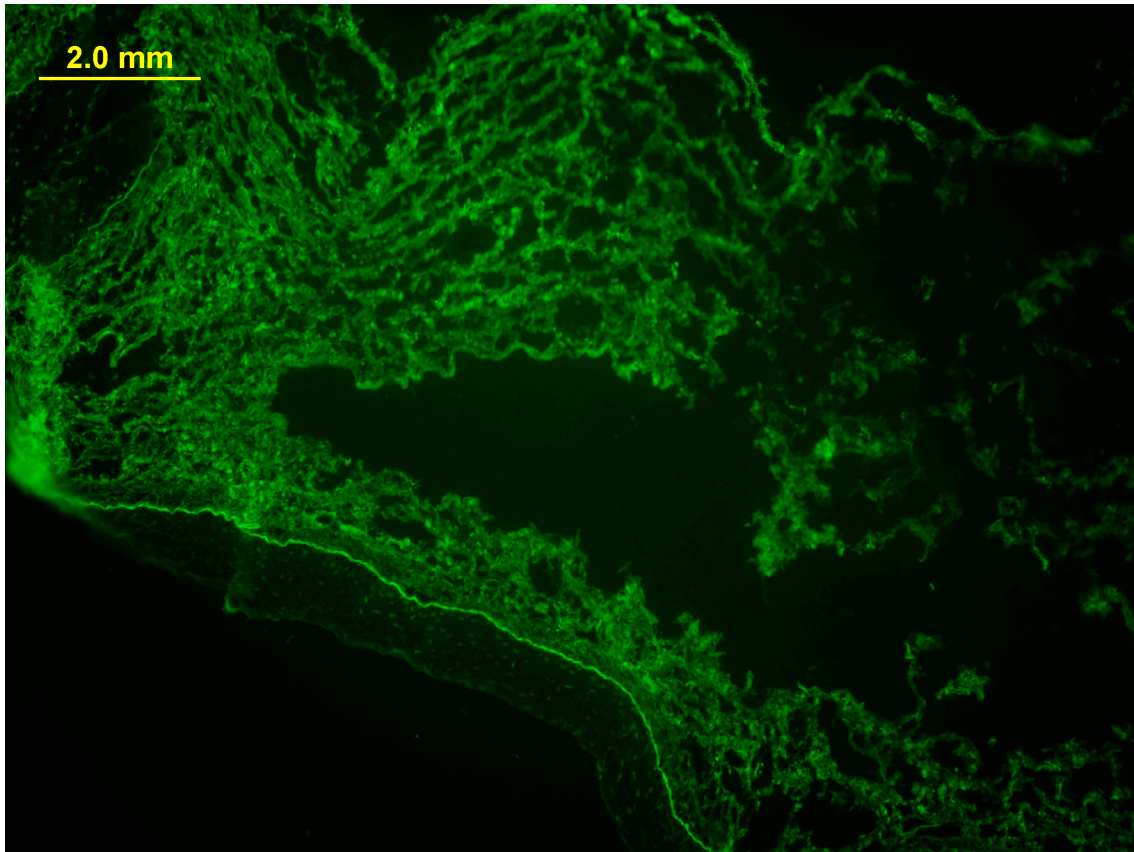


**Fig. 6 Tinción de Giemsa**

***Diagnostico***

El diagnostico de POC requiere confirmación por inmunofluorescencia (IF), dada la necesidad de tratamiento inmunosupresor sistémico de graves potenciales efectos secundarios en caso de confirmarse el diagnostico. Así, pacientes con sospecha de POC se someten a biopsia conjuntival, normalmente de la conjuntiva bulbar. Las biopsias conjuntivales se obtienen en pacientes clínicamente activos, ya que así aumenta la rentabilidad diagnostica de la biopsia<sup>51</sup>.

El “gold estándar” para el diagnostico de POC es la inmunofluorescencia indirecta donde se observa el clásico depósito lineal de inmunocomplejos Ig G, Ig M y complemento<sup>52</sup>. En caso de duda con inmunofluorescencia directa, se puede usar técnicas de inmunoperoxidasa con complejo Avidina- Biotina (ABC)<sup>2</sup>.



**Fig. 7 Detalle inmunofluorescencia: Depósito lineal de Ig A a nivel de la MB conjuntival, hallazgo diagnóstico de POC.**

### 2.5.6 TRATAMIENTO

El objetivo terapéutico en el POC es prevenir la cicatrización y consecuente afectación de la función visual. El abordaje terapéutico requiere la combinación de terapia inmunosupresora sistémica que resuelva la inflamación conjuntival, junto con medidas de soporte a nivel local. Pacientes con formas leves de la enfermedad suelen responder a terapias como dapsona<sup>53</sup>, metotrexato<sup>54</sup>, micofenolato de mofetilo<sup>55</sup> o azatioprina, mientras que casos más agresivos requieren tratamientos como la ciclofosfamida o combinación de rituximab y inmunoglobulinas intravenosas<sup>56-60</sup>.

Las medidas de soporte<sup>61</sup> y confort local incluyen: agresiva lubricación ocular<sup>62</sup>, lentes de contacto de apoyo escleral<sup>63</sup> y depilación de pestañas anómalas. Algunos pacientes pueden requerir cirugía palpebral en el curso de su enfermedad. No obstante, debe conseguirse un completo control de la inflamación conjuntival durante varios meses antes de llevar a cabo la corrección quirúrgica<sup>64</sup>.



“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”  
*Albert Einstein*

# ***MATERIAL Y MÉTODOS***

---

---





### 3.1 PARTICIPANTES y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Nuestro estudio se realizó siguiendo los principios éticos promulgados en la Declaración de Helsinki (1964)<sup>65</sup>. Todas las biopsias conjuntivales se obtuvieron en el quirófano de la Institución Massachusetts Eye Research and Surgery Institution (MERSI) en el periodo de Marzo 2009 a Diciembre 2010. Las muestras de pacientes afectados de POC se obtuvieron en el mismo momento de la obtención de muestra conjuntival para su confirmación diagnóstica por IF indirecta que se realiza de manera rutinaria en MERSI. En caso que la IF no fuese concluyente y persistiese una razonable sospecha clínica, se procedió al diagnóstico de POC mediante inmunoperoxidación (técnica del complejo ABC). Las muestras de los controles se obtuvieron previamente a la cirugía de cataratas, previo consentimiento del paciente.

DESCRIPCIÓN DE LA BIOPSIA: Los especímenes conjuntivales fueron obtenidas por 2 cirujanos (CSF y DH). Se tomó como lugar para la biopsia el margen temporal-inferior de la conjuntiva bulbar, a 2 mm del limbo, en el ojo con más inflamación objetivada clínicamente por lámpara de hendidura. El tamaño medio de las muestras conjuntivales analizadas fue de 10 mm x 5 mm.

### **3.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA IMMUNOHISTOQUÍMICA**

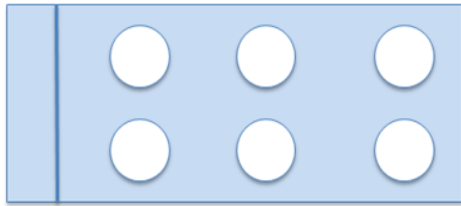
Todos los especímenes se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , inmediatamente en el momento de su obtención. Estos se guardaron sobre un soporte metálico, en fresco, sin fijación tisular previa y embebidos en gel OCT® (*optimum cutting temperature*), material que al congelarse tiene la misma densidad que el tejido congelado. Tras confirmarse el diagnóstico de POC mediante las técnicas descritas previamente, se calentó el tejido de  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el criostato durante 10 minutos, como paso previo a la criosección. De los bloques de OCT se realizaron cortes a 5 micras con un microtomo marca *Thermo Scientific*. Las muestras se colocaron sobre portas pretratados con polilisina para mejorar la adhesión tisular al porta y prevenir así la pérdida de fragmentos tisulares durante el procesamiento de las muestras. Tras la criosección, se volvieron a congelar las secciones en portas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3 TÉCNICA IMMUNOHISTOQUÍMICA POR IMMUNOPEROXIDASA**

La técnica inmunohistoquímica utilizada en este trabajo fue la técnica del complejo ABC de inmunoperoxidación en secciones congeladas. Esta técnica se considera hasta 1000 veces más sensible que la IF convencional. Fig 8. No obstante, no se utiliza de manera rutinaria al ser una técnica de mayor dificultad técnica y mucho más cara que la IF directa. En la actualidad, la indicación de la técnica del complejo ABC en el diagnóstico de POC son aquellos casos en que la IF inicial no resultó concluyente.

Las muestras congeladas ya crioseccionadas se atemperaron a temperatura ambiente durante 10-15 minutos, para permitir el secado de la muestra. Posteriormente se procedió a la fijación del tejido con acetona fría al 100% a -20 °C durante 10 minutos. La fijación tisular causa un cambio conformacional en la estructura terciaria de las proteínas, haciéndolas químicamente inactivas, mejorando así la especificidad de la técnica del complejo ABC. Tras la fijación, los especímenes se dejaron secar unos minutos a temperatura ambiente y se procedió a la incubación durante 30 minutos con suero de cabra, diluido 1:20, a temperatura ambiente en cámara húmeda. Todas las muestras se bloquearon con suero de cabra salvo la determinación de IL-13, para la que se utilizó como agente de bloqueo el suero de conejo, diluido 1:20. Debido al gran “background” de la muestra, se utilizó un kit de bloqueo Avidina/Biotina (SP-2001), para aumentar la especificidad de los resultados. Tras quitar el exceso de líquido, se procedió a la incubación con Ac primario durante 1 hora a temperatura ambiente, con posterior lavado con PBS-BSA durante 15 minutos. Ver tabla 1. Se procedió después al bloqueo en cámara húmeda durante 30 minutos con suero de rata, diluido 1: 20. Tras lo cual se lavaron las muestras de nuevo con PBS-BSA durante 15 minutos. Tras el lavado, las muestras se incubaron con Ac secundario en cámara húmeda, 1 hora. La adición del Ac secundario (biotinizado) fue variable según la IL a determinar. Ver tabla 1. Todos los especímenes se analizaron con los correspondientes controles positivos y negativos. Ver esquema 1.

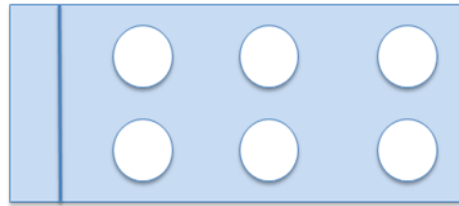
**CONTROLES**



Ac 1º:anti-IL-1/ anti-IL-6 / anti-IL-12

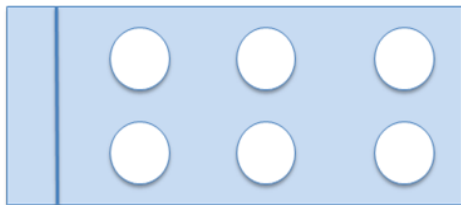
Ac 2º: Ac de conejo anti-cabra

**PACIENTES con POC**



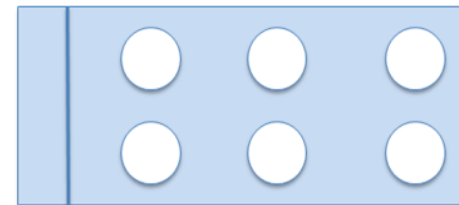
Ac 1º:anti-IL-1/ anti-IL-6 / anti-IL-12

Ac 2º: Ac de conejo anti-cabra



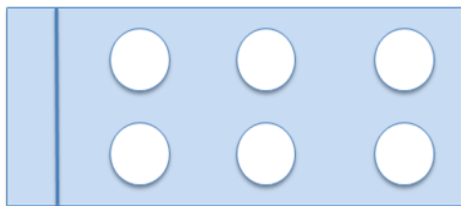
Ac 1º:anti-IL-13/ /anti-IL-17

Ac 2º:conejo anti-cabra/conejo anti-rata



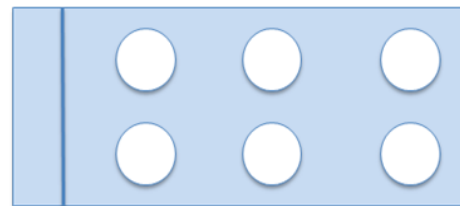
Ac 1º:anti-IL-13/ /anti-IL-1

Ac 2º:conejo anti-cabra/conejo anti-rata



PBS / PBS / Colágeno IV

/ Ac 2º /Ac anti colag IV

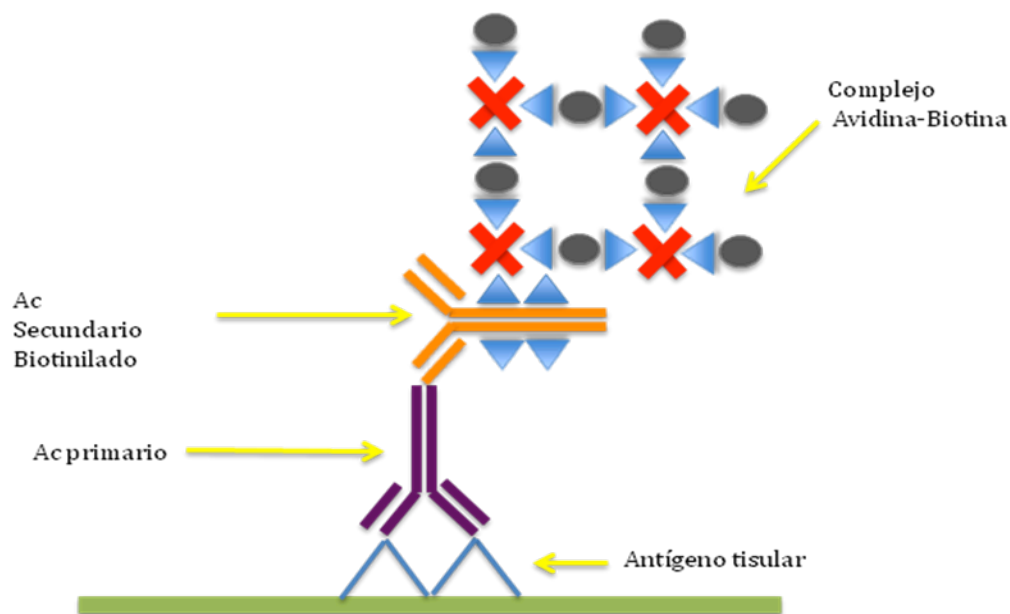


PBS / PBS / Colágeno IV

/ Ac 2º /Ac anti colag IV

**Esquema 1. Detalle de los portas utilizados para las tinciones inmunohistoquímicas.**

Posteriormente, los especímenes se lavaron con PBS-BSA durante 15 minutos, previo a la incubación con reactivo ABC durante 30 minutos. Se añadió entonces el sustrato de peroxidada preparado con agua destilada, visualizando la reacción bajo el microscopio. La reacción se detuvo introduciendo el porta en agua destilada en cuando se vislumbró una adecuada tinción de los núcleos celulares. Finalmente, los especímenes se introdujeron en la solución de Hematoxilina Gill nº 3 durante 5-10 segundos, con ulterior lavado en agua destilada hasta retirar el exceso de colorante . Tras secar bien la muestra a temperatura ambiente, se procedió al montaje con medio de montaje permanente y cubre porta protector. Tras el secado, las muestras se visualizaron bajo microscopio óptico.



**Fig.8. Detalle complejo Avidina/Biotina.**

**Tabla 1. Relación de anticuerpos utilizados en la tinción ABC.**

	<b>Ac 1º</b>	<b>Ac 2º</b>
<b>IL-1</b>	Ac policlonal no conjugado de Cabra- anti IL F8/FIL 1 beta humano (Solución trabajo: 1:100) (Catalog number: AF1099)	Ac policlonal Ig G De conejo frente H & L de Cabra (Solución trabajo: 1:750). (Catalog number: ab6740)
<b>IL-6</b>	Ac policlonal no conjugado de Cabra anti IL-6 humana (Solución trabajo: 1:400) (Catalog number: AF-206-NA)	
<b>IL-12</b>	Ac policlonal no conjugado de Cabra anti IL-12 humana (Solución trabajo: 1:100) (Catalog number: AF-219-NA)	
<b>IL-13</b>	Ac monoclonal no conjugado de Rata anti IL-13 humana (Solución trabajo: 1:100) (Catalog number: ab16219)	Ac policlonal Ig G De Conejo frente Ig G H & L de Rata (Solución trabajo: 1:750) (Catalog number: ab6733)
<b>IL-17</b>	Ac policlonal no conjugado de Cabra anti IL-17 humana (Solución trabajo: 1:1000) (Catalog number: AF-317-NA)	Ac policlonal Ig G De conejo frente H & L de Cabra (Solución trabajo: 1:750). (Catalog number: ab6740)

### 3.4 VALORACIÓN DESPUÉS DE LA BIOPSIA

En cada paciente del grupo de POC, se recogieron datos demográficos y clínicos el día de la biopsia. Estos datos incluyeron: edad, sexo, estadio de POC, presencia de comorbilidad ocular, afectación de otras mucosas y epitelios además de la conjuntiva, grado de actividad clínica conjuntival el día de la biopsia. En todos los casos se evaluó la respuesta al tratamiento de manera prospectiva.

El estadio de POC se definió según la clasificación estandarizada de Foster<sup>2</sup>. La respuesta al tratamiento se evaluó analizando el curso clínico de la afectación conjuntival (inyección conjuntival) y del resto de afectaciones mucosas en caso de estar presentes (lesiones orales, esofágicas, nasales o cutáneas). Una respuesta completa se definió como la resolución de las manifestaciones clínicas sin recurrencias. Una respuesta parcial se definió como la resolución clínica, con una o más recurrencias. Los pacientes que no cumplieron criterios de respuesta completa o parcial se clasificaron como no respondedores.

Además, en el presente estudio se exploró la relación existente entre los biomarcadores conjuntivales obtenidos por inmunoperoxidación y los diferentes patrones de respuesta clínico-terapéutica observados en nuestra serie.

### **3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La existencia de diferencias basales estadísticamente significativas entre sujetos afectos de POC y controles se examinaron mediante el test estadístico U de Mann-Whitney o test exacto de Fisher. La relación entre la expresión de IL en ambos grupos se calculó utilizando el test exacto de Fisher. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para investigar la asociación entre la edad, actividad clínica del POC en el momento de la biopsia, respuesta al tratamiento y expresión conjuntival de IL-1, IL-6, IL-12, IL-13 e IL-17 a nivel epitelial, estromal y perivascular. Para el análisis estadístico, se utilizó el programa comercial SPSS para Windows, versión. Los resultados se presentaron con un intervalo de confianza del 95% y el nivel de significancia estadística se concretó en 0,05.



“Éxito es obtener lo que se desea, felicidad es aceptar lo que se consigue”  
*Dale Carnegie*

***RESULTADOS***

---

---



#### 4.1 DESCRIPCIÓN EPIDEMIOLOGÍA, CLÍNICA, RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

##### *Características de los pacientes POC versus controles.*

En esta tesis, se incluyeron 12 pacientes con POC confirmados por inmunohistoquímica y 6 sujetos normales que sirvieron como controles. Las características basales de los pacientes se resumen en la tabla 2. Los pacientes con POC (10 mujeres y 2 hombres) con edades comprendidas entre 47 y 79 años, presentaron al diagnóstico una media de 60.83 años. La media de edad entre los controles (5 mujeres y 1 hombre) fue 65 años (rango 58-75). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en edad y sexo entre los pacientes con POC versus controles ( $p= 0.291$  y  $p=1$  respectivamente). Tres pacientes con POC (25%) tenían afectación de otras membranas o mucosas además de la conjuntiva, 1 paciente presentó afectación oral y cutánea (paciente 7), otro afectación esofágica (paciente 10) y otro manifestaciones orales y nasales (paciente 2). Con el objetivo de aislar los hallazgos debidos exclusivamente a POC, los pacientes se clasificaron en 2 grupos según la presencia o ausencia de comorbilidad ocular. Los pacientes 1,2, 3, 4 y 5 presentaban exclusivamente POC, mientras que los pacientes 6, 7, 8, 9, 10, 11, y 12 presentaron otro tipo de comorbilidad ocular.

Así, queratoconjuntivitis atópica se diagnosticó en 3 de los pacientes (25%), 2 pacientes (16.7%) tenían antecedentes de conjuntivitis alérgica estacional, 1 paciente (8.3%) fue diagnosticado de conjuntivitis asociada a liquen plano y otro paciente (8.3%) presentó hallazgos clínicos e histológicos compatibles con rosácea.

Todos los pacientes con POC iniciaron tratamiento inmunosupresor tras la confirmación diagnóstica, y su respuesta al tratamiento fue monitorizada durante el periodo de seguimiento de 14 meses de media (rango 9-19). Ver tablas 3 y 4.

**Tabla 2. Características basales de los pacientes con POC en el momento de la biopsia**

<b>n</b>	12
<b>Edad en el momento de la biopsia (años)</b>	
<b>Media (DS)</b>	60.83 (10.55)
<b>Rango</b>	47-79
<b>Sexo n, %</b>	
<b>Hombres</b>	2 (16.7%)
<b>Mujeres</b>	10 (83.3%)
<b>Clasificación de Foster, n (%)</b>	
<b>Estadio I</b>	2 (16.7%)
<b>Estadio II</b>	1 (6.7%)
<b>Estadio III</b>	9 (75%)
<b>Estadio IV</b>	0 (0%)
<b>Presentación otras manifestaciones PMM, n (%)</b>	
<b>Si</b>	3 (25%)
<b>No</b>	9 (75%)
<b>Comorbilidad ocular , n (%)</b>	
<b>Queratoconjunctivitis atópica</b>	3 (25%)
<b>Conjuntivitis alérgica estacional</b>	2 (16.7%)
<b>Conjuntivitis secundaria a liquen plano</b>	1 (8.3%)
<b>Rosácea</b>	1 (8.3%)
<b>Ausencia de comorbilidad ocular</b>	5 (41.7%)
<b>Grado de inflamación conjuntiva bulbar , n (%)</b>	
<b>Grado 0</b>	0 (0%)
<b>Grado 1</b>	4 (33.3%)
<b>Grado 2</b>	3 (25%)
<b>Grado 3</b>	5 (41.7%)

**Tabla 3. Detalle de características demográficas, clínicas en el momento de la biopsia; tratamiento recibido y respuesta terapéutica.**

<b>Pac n°</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Clasificación de Foster</b>	<b>Actividad clínica</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Respuesta terapéutica</b>
1	59	M	Estadio III	1	AZA	Respuesta parcial
2	60	F	Estadio II	1	MFM	Respuesta parcial
3	78	F	Estadio III	1	MTX	Respuesta completa
4	62	F	Estadio III	2	MTX	Respuesta completa
5	79	F	Estadio III	1	MTX	Respuesta completa

**Tabla 4. Detalle de características demográficas, clínicas en el momento de la biopsia; tratamiento recibido y respuesta terapéutica.**

Pac n°	Edad	Sexo	Clasificación de Foster	Comorbilidad ocular	Actividad clínica	Tratamiento	Respuesta Terapéutica
6	53	F	Estadio III	Conjuntivitis secundaria a liquen plano	3	MTX	Respuesta completa
7	57	F	Estadio III	Conjuntivitis alérgica estacional	3	Ig IV+ Rituximab	Respuesta completa
8	49	M	Estadio I	Queratoconjuntivitis atópica	3	CsA	Respuesta parcial
9	71	F	Estadio III	Rosácea	2	MTX	Respuesta parcial
10	63	F	Estadio III	Queratoconjuntivitis atópica	3	CsA	Respuesta completa
11	52	F	Estadio I	Queratoconjuntivitis atópica	3	CsA	Respuesta completa
12	47	F	Estadio III	Conjuntivitis alérgica estacional	2	Ig IV	Respuesta completa

## **4.2 DESCRIPCIÓN BIOPSIAS: HISTOLOGÍA, PERFIL DIAGNOSTICO y PATRÓN DE INTERLEUQUINAS.**

### ***Histología***

El 41,6% los pacientes con POC presentaban metaplasia escamosa del epitelio conjuntival en el momento de la biopsia conjuntival. Uno de cada 4 pacientes presentaron ausencia de células caliciformes, especialmente esto se correspondió con pacientes pertenecientes a estadios más avanzados de la enfermedad. En el 83,3% de los especímenes se encontró presente un infiltrado inflamatorio de células mononucleares, mayoritariamente en estroma. Se encontraron células plasmáticas en el estroma conjuntival del 100% de los especímenes afectados con POC. EL 25 % de los pacientes con POC presentaron microangiopatía. Además, se observó un incremento del número de mastocitos en las muestras del 25 % de los pacientes, en los cuales existía una sospecha clínica de queratoconjuntivitis atópica y conjuntivitis alérgica estacional. El resumen de los rasgos histológicos de los especímenes conjuntivales de pacientes con POC se presenta en la tabla 5 y 6.

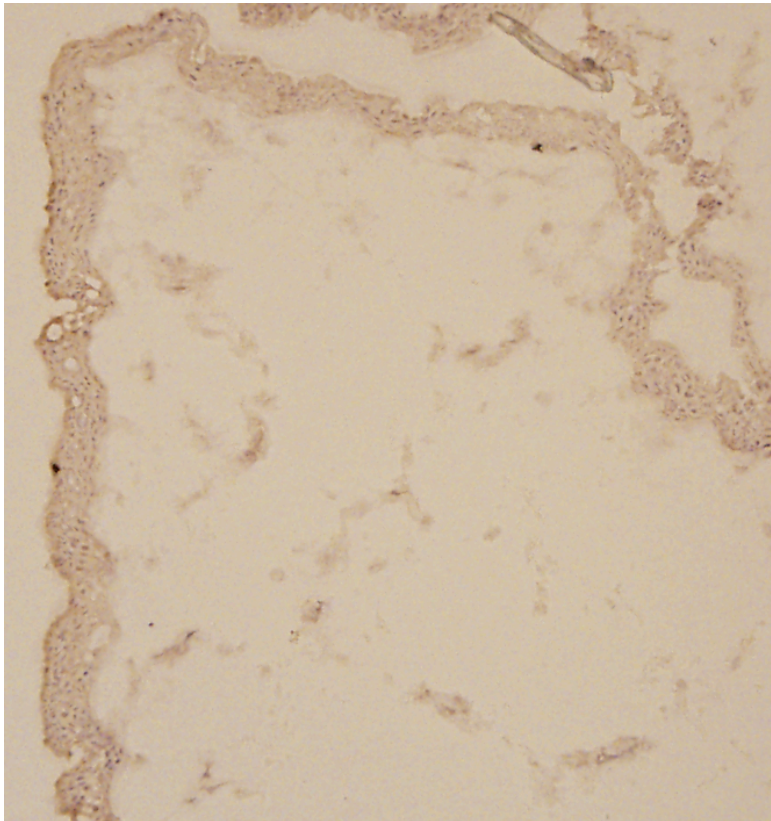
### ***Método diagnóstico***

Todos los pacientes fueron diagnosticados mediante inmunofluorescencia directa, salvo el paciente 2, 11 y 12 en los que ésta no fue concluyente, por lo que se requirió un análisis inmunohistoquímico complementario por tinción ABC que fue inequívoco para POC. Ver detalles en tablas 5 y 6.

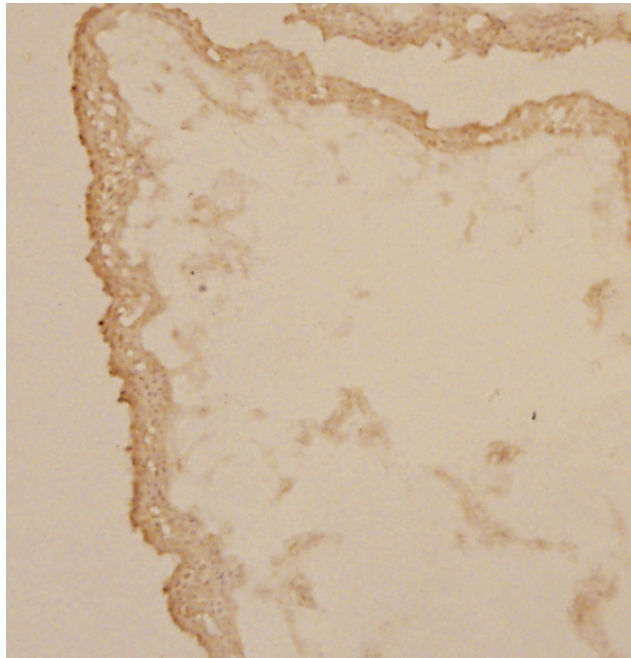


***Expresión de IL en la biopsia conjuntival***

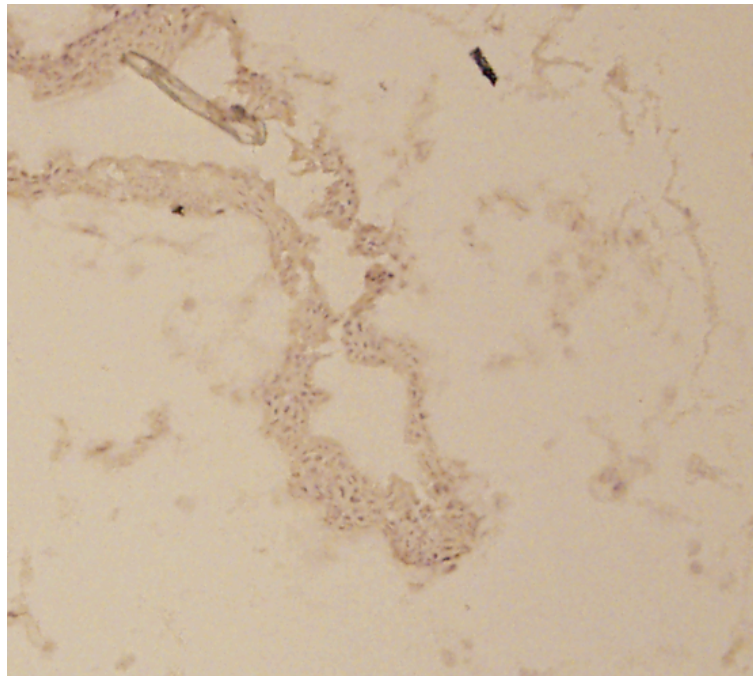
No se encontró expresión significativa de IL-1, IL-6, IL-12, IL-13 o IL-17 en epitelio, estroma o área perivascular en los especímenes de los sujetos controles. Dos especímenes conjuntivales presentaron una mínima expresión (0.5+) de IL-1 en epitelio. Un paciente presentó una leve expresión (1+) de IL-1 en estroma y otro paciente una mínima expresión (0.5+) en IL-6 en epitelio. Ver Fig 9 (A-G ) y 10.



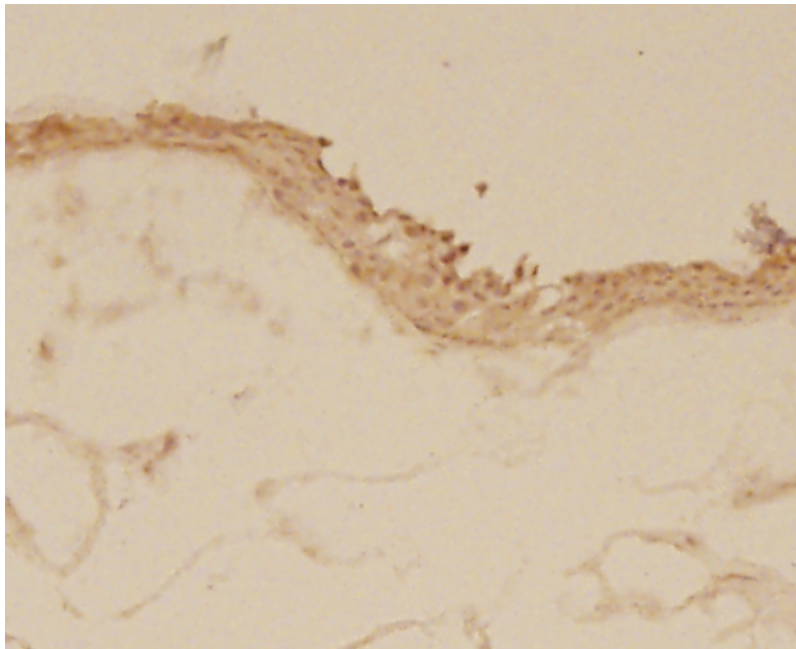
**Fig. 9A Inmunotinción en paciente control (paciente 14) utilizando el anticuerpo anti-IL-1 humana.**



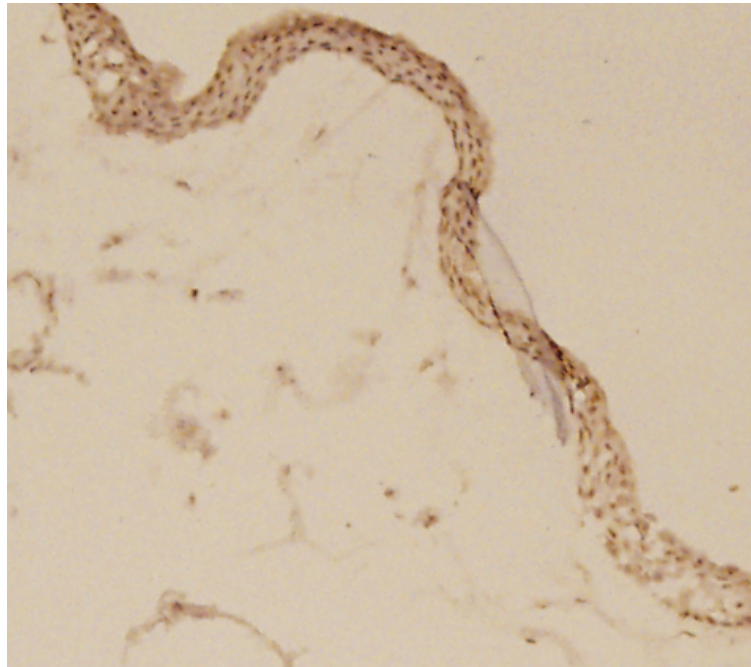
**Fig. 9B. Inmunotinción en paciente control (paciente 14) utilizando el anticuerpo anti-IL-6 humana.**



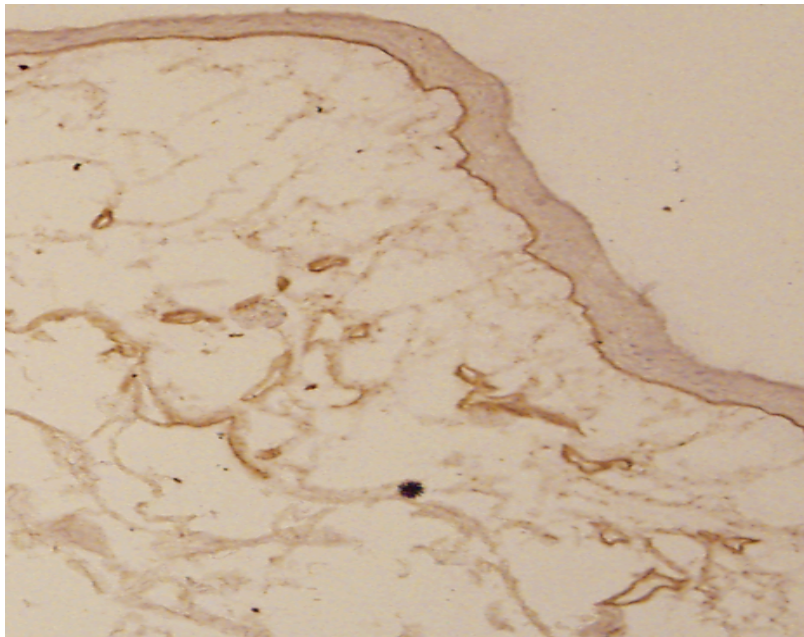
**Fig 9C. Inmunotinción en paciente control (paciente 14) utilizando el anticuerpo anti-IL-13 humana.**



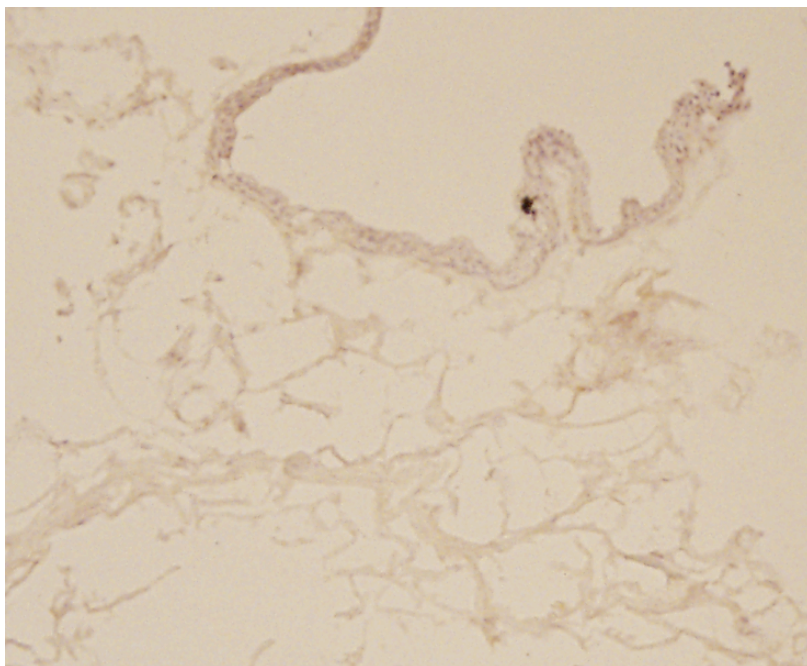
**Fig. 9D.** Inmunotinción en paciente control (paciente 14) utilizando el Ac anti-IL-12 humana.



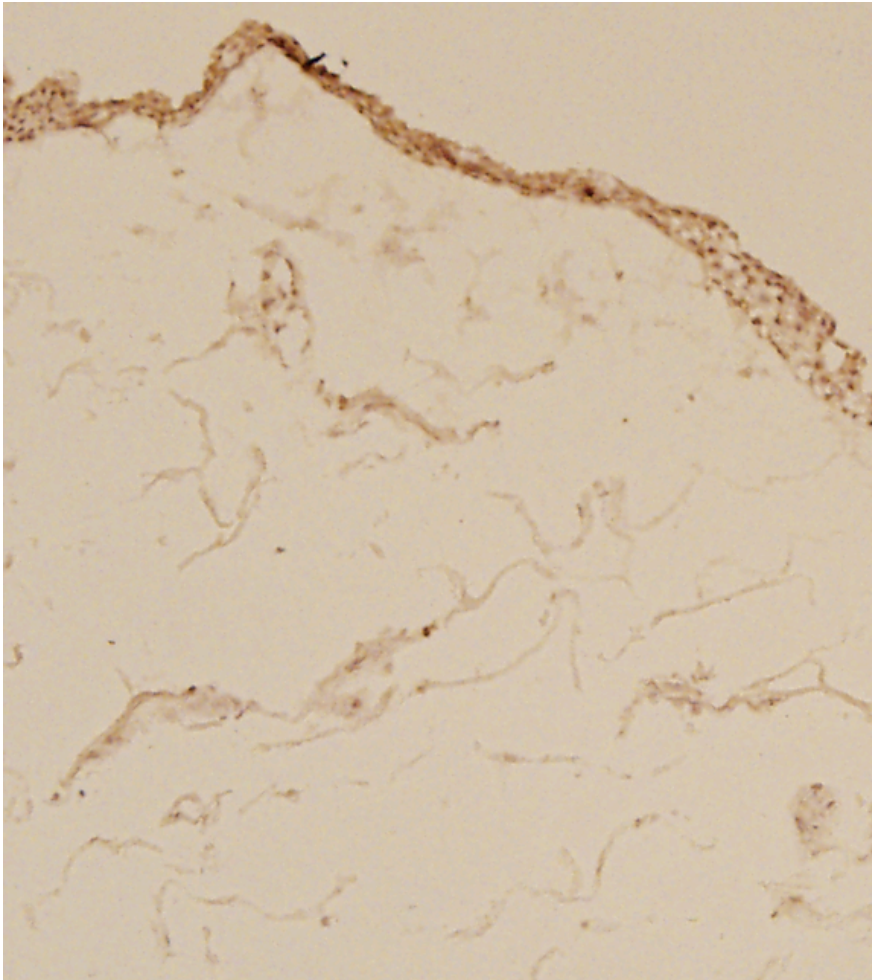
**Fig. 9E.** Inmunotinción en paciente control (paciente 14) utilizando el Ac anti-IL-17 humana.



**Fig. 9F. Control positivo en paciente control (paciente 14) utilizando Ac anti-colageno IV.**



**Fig. 9G. Control negativo en paciente control (paciente 14) utilizando exclusivamente PBS.**

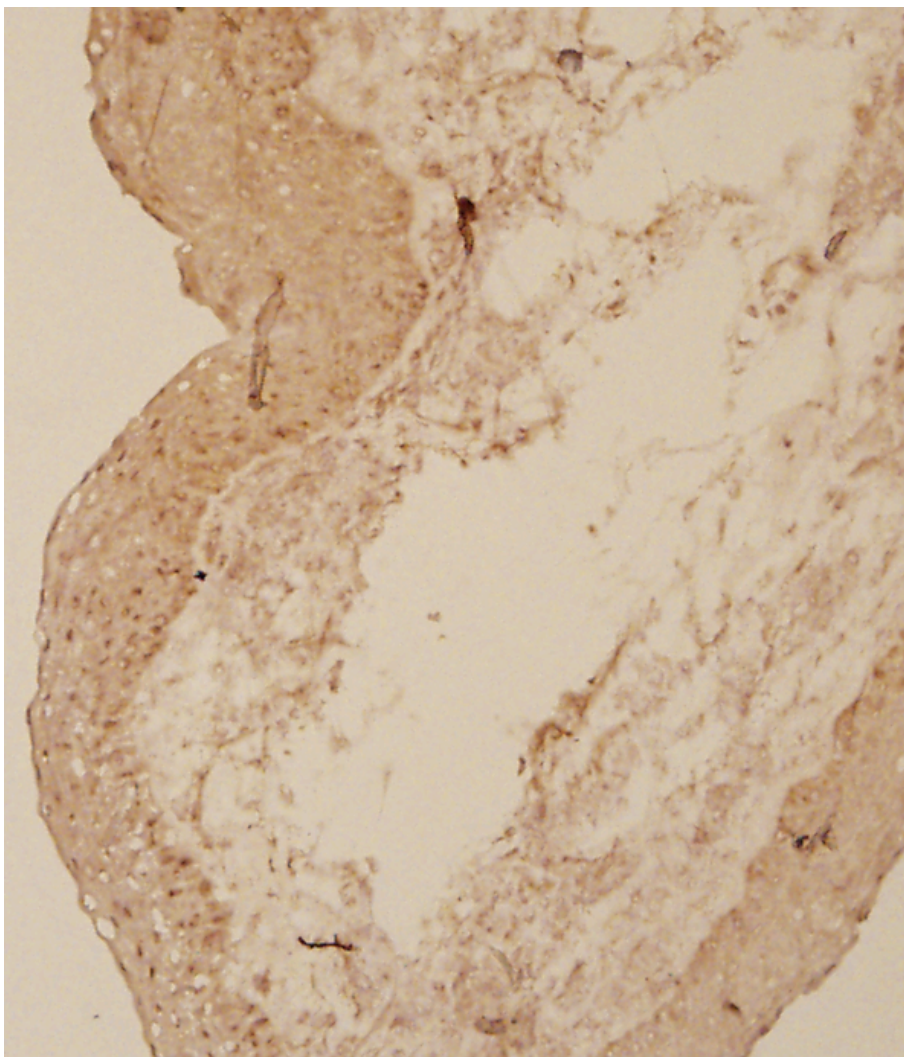


**Fig. 10. Inmunotinción en biopsia conjuntival de paciente control (Paciente 18) utilizando el Ac anti-IL-1 humana. Nótese la tinción 1+ en estroma conjuntival.**

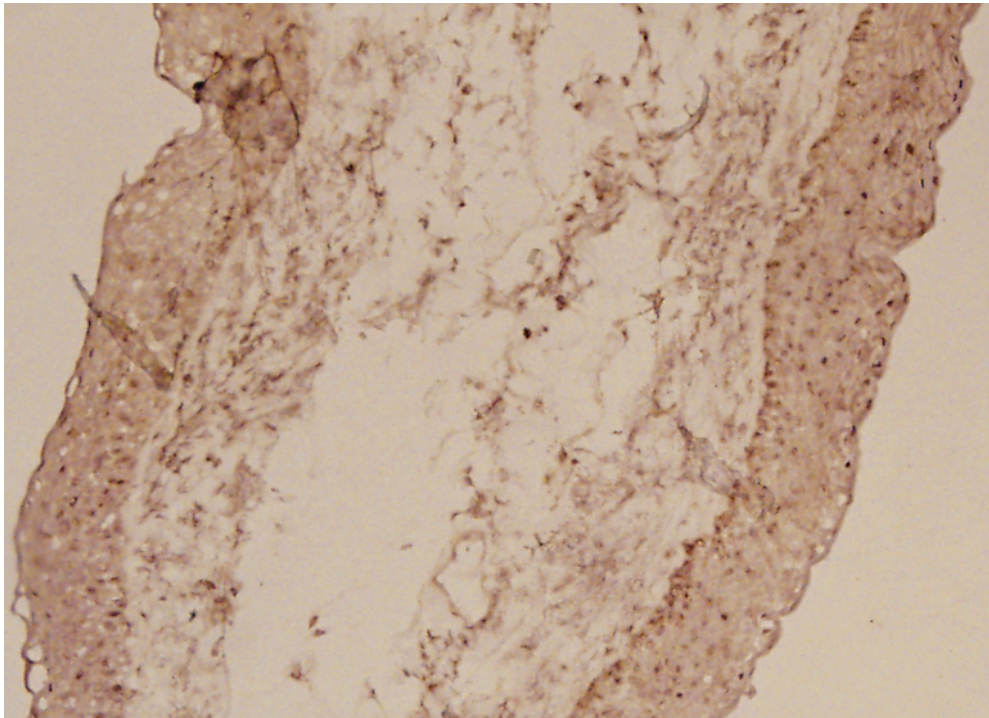
## Resultados

---

Todas las muestras con POC presentaron cantidades significativas de IL-12, IL-13 e IL-17 en epitelio, estroma y área perivascular, junto con una leve expresión de IL-1 e IL-6. Ver figuras 1 y 2. Interesantemente, en pacientes con formas clínicas más activas en el momento de la biopsia (grado 2 y 3) se objetivo una mayor expresión de IL-13, especialmente en estroma, que en aquellos con formas clínicamente más silentes (grado 1). Ver Fig. 11-14



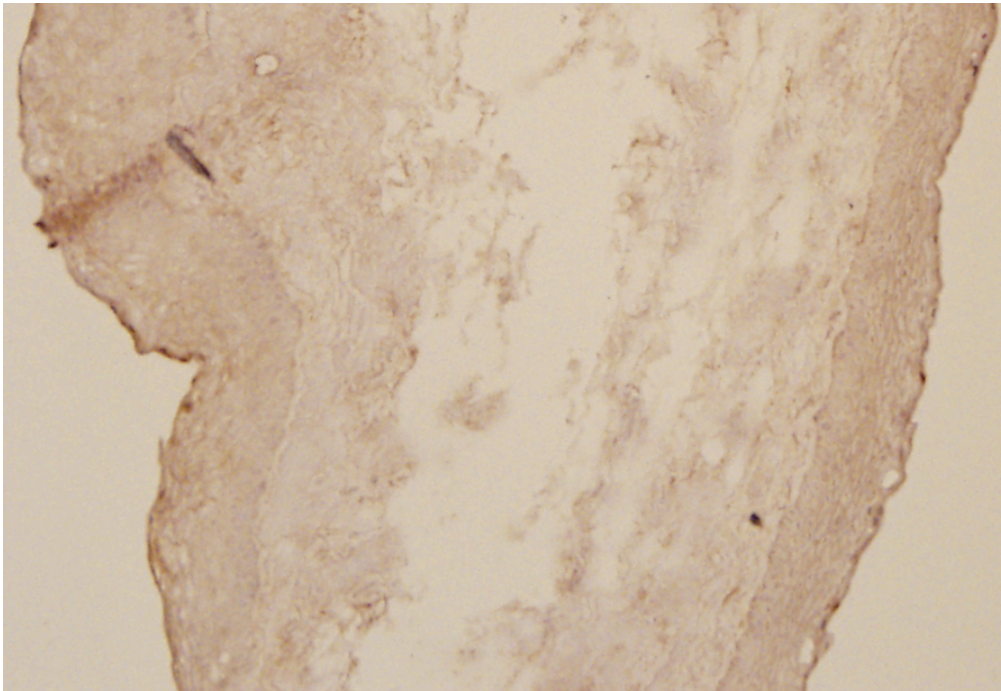
**Fig.11<sup>a</sup>.** Inmunotinción en biopsia conjuntival de paciente POC (Paciente 3) utilizando el Ac anti-IL-1 humana.



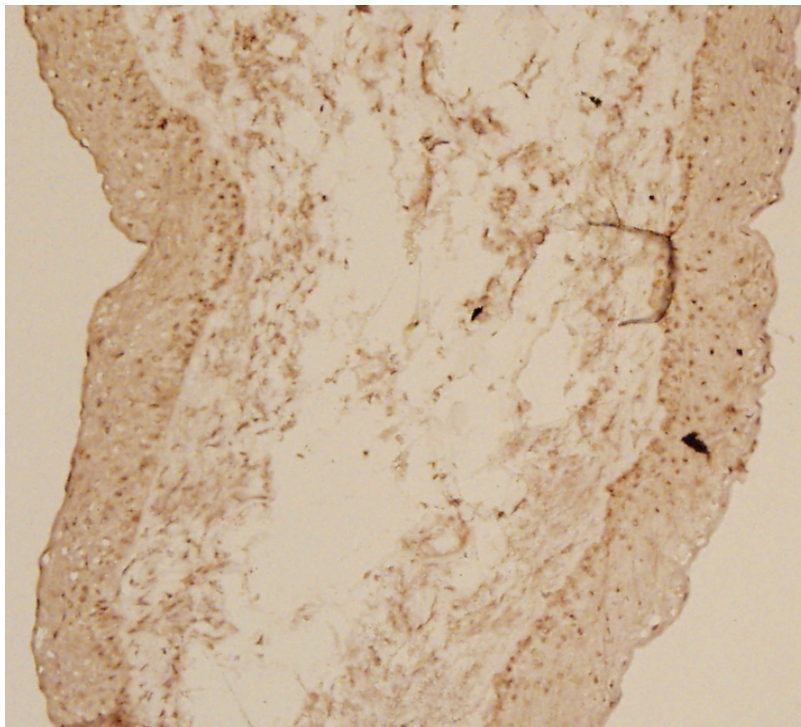
**Fig. 11B. Inmunotinción de paciente POC (Paciente 3) utilizando el Ac anti-IL-6 .**



**Fig. 11C. Inmunotinción en paciente POC (Paciente 3) utilizando el Ac anti-IL-12.**

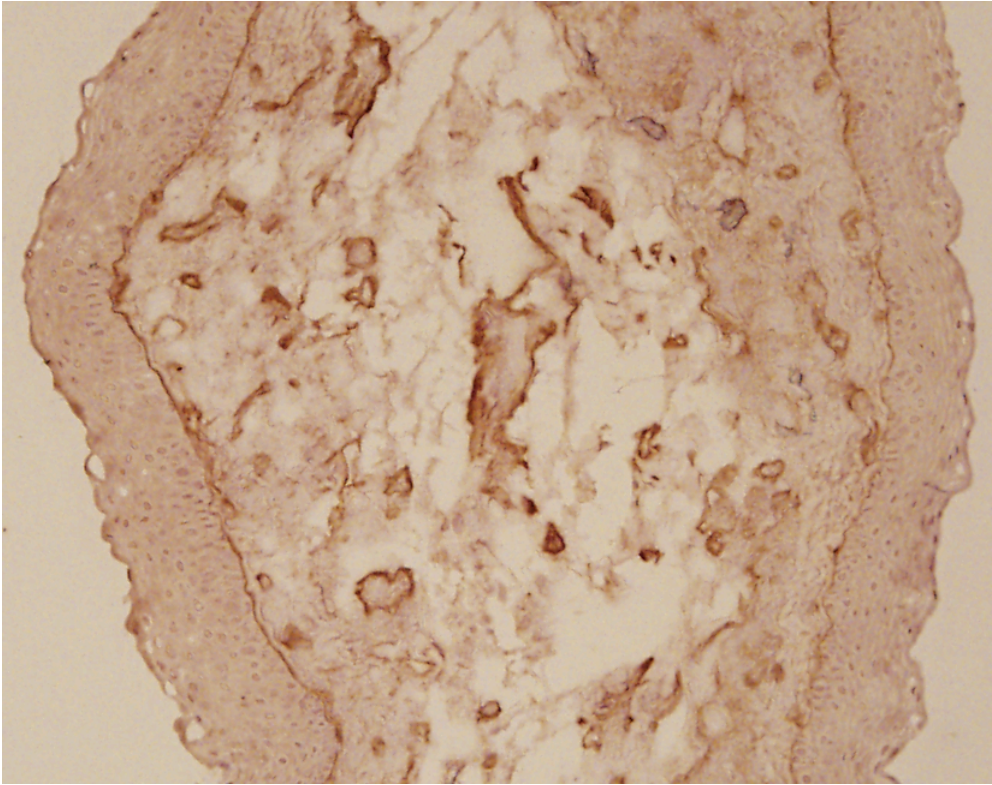


**Fig. 11D. Inmunotinción en biopsia conjuntival de paciente POC (Paciente 3) utilizando el Ac anti-IL-13 humana.**

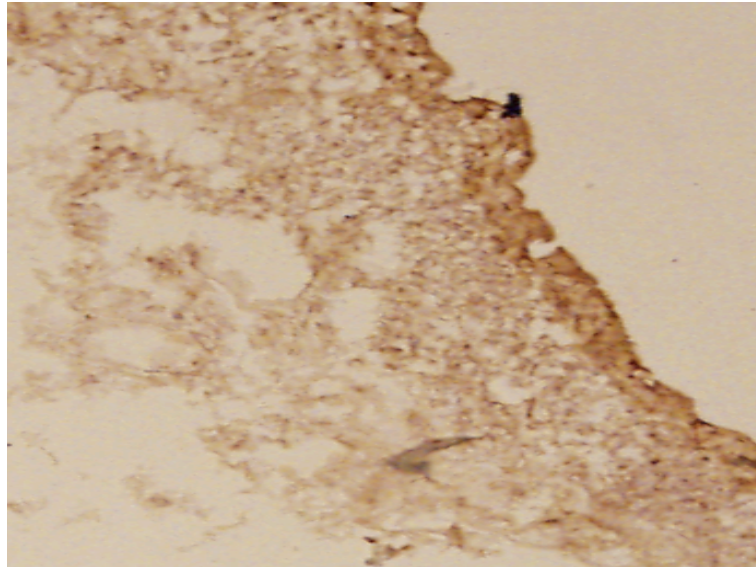


**Fig. 11E. Inmunotinción en paciente con POC (Paciente 3) utilizando el anticuerpo anti-IL-17.**

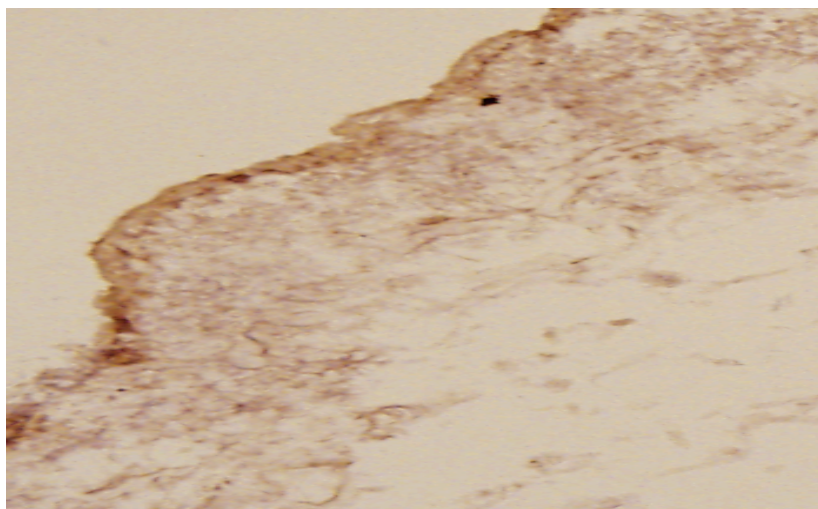




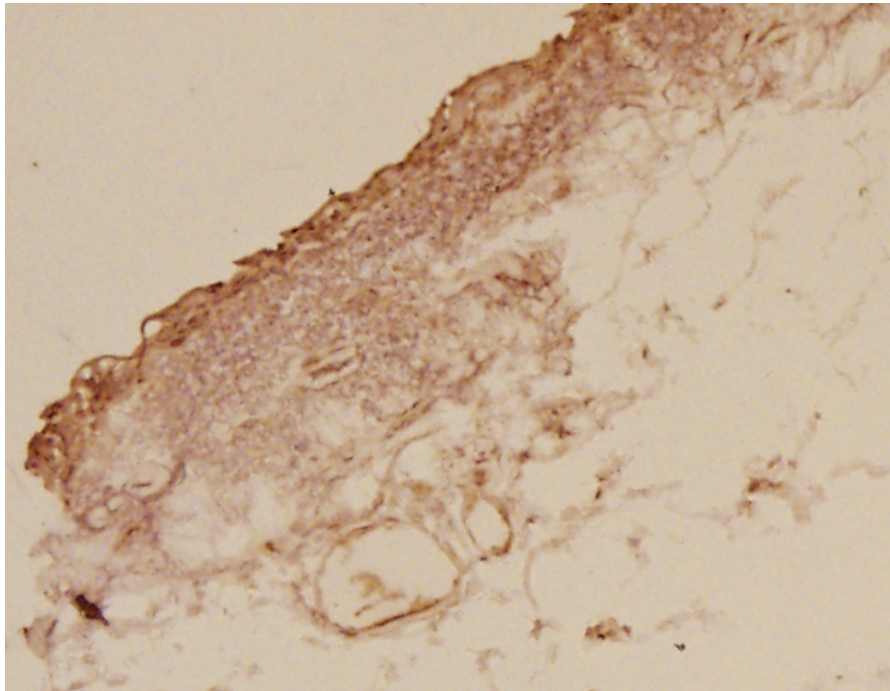
**Fig. 11D. Control positivo en paciente POC (paciente 3) utilizando Ac anti-colageno IV.**



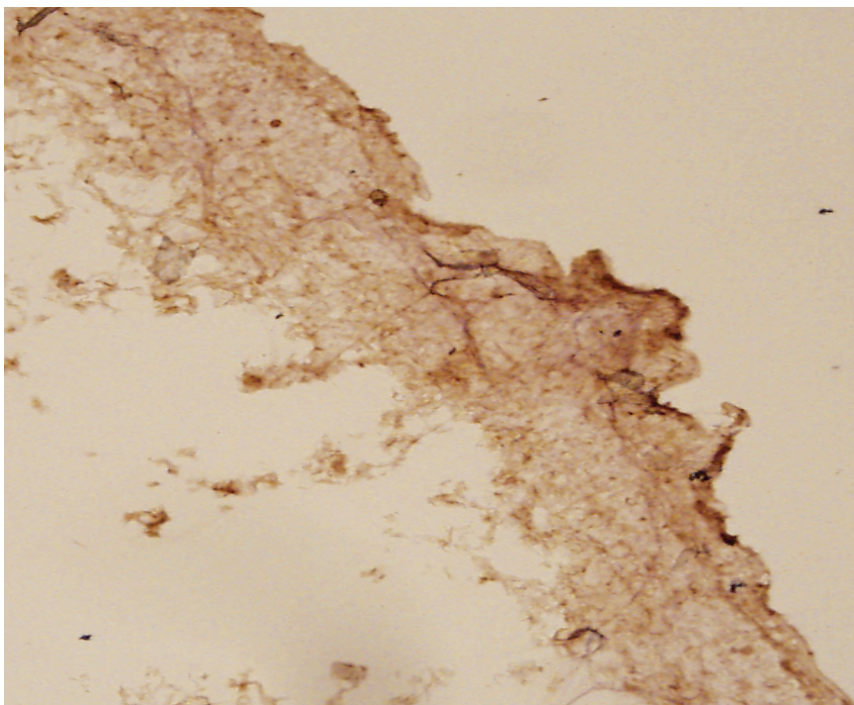
**Fig.12<sup>a</sup>.** Inmunotinción en paciente con POC (Paciente 4) utilizando el anticuerpo anti-IL-1.



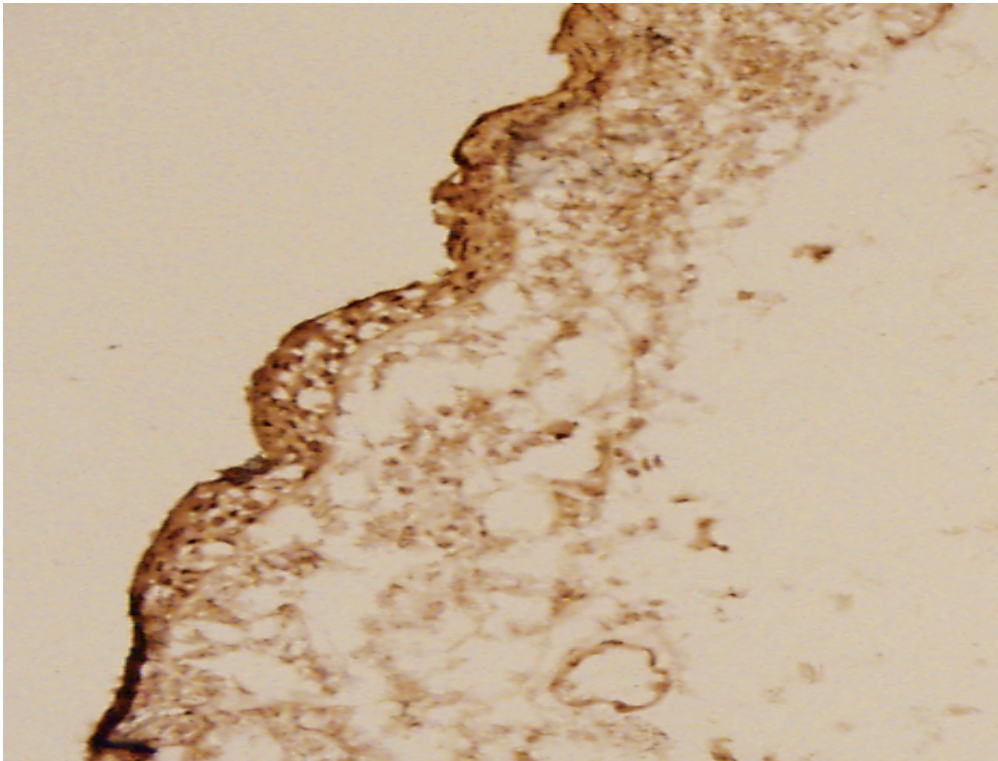
**Fig.12B.** Inmunotinción en paciente con POC (Paciente 4) utilizando el anticuerpo anti-IL-6.



**Fig. 12C** Inmunotinción en paciente con POC (Paciente 4) utilizando el Ac anti-IL-12.



**Fig.12D** Inmunotinción en paciente con POC (Paciente 4) utilizando el Ac anti-IL-13.



**Fig.12E Inmunotinción en paciente con POC (Paciente 4) utilizando el Ac anti-IL-17.**

**Tabla 5. Hallazgos histológicos, inmunofluorescencia y perfil de IL en la biopsia conjuntival de pacientes exclusivamente con POC.**

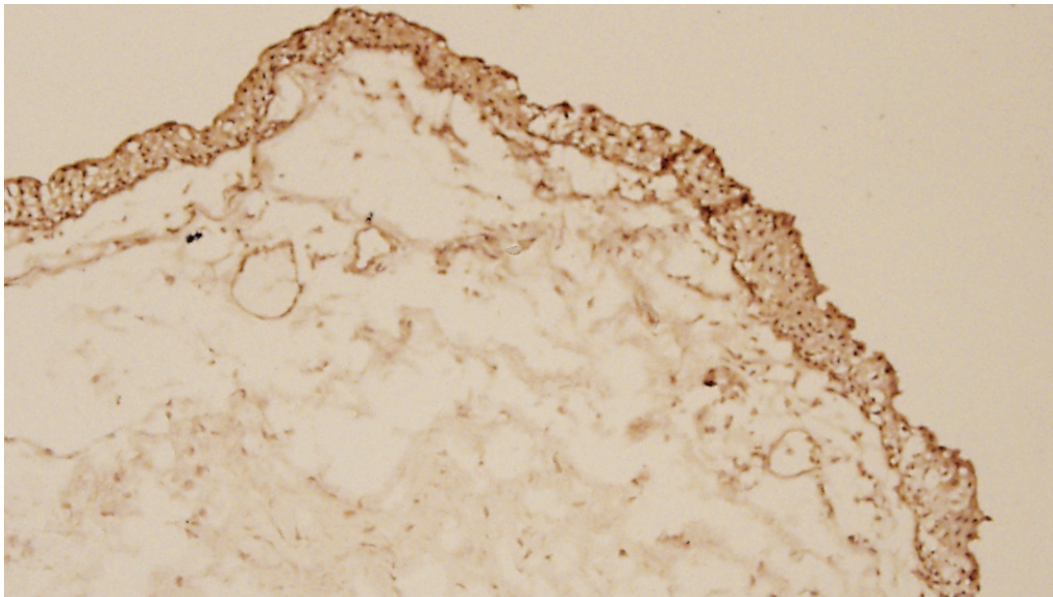
Pts N°	IF	Histología	Perfil IL
1	Depósito lineal Ig G e Ig A en MB en IF directa	Epitelio engrosado Infiltrado extenso mononucleares Presencia de células plasmáticas Células caliciformes normales No microangiopatía	*IL-1 (epit & estroma) *IL-6 (epit & estroma) *IL-12 (epit & estroma) IL-13 (epit & estroma) *IL-17 (epit & estroma)
2	IF directa no concluyente, Depósito lineal Ig A en MB con tinción ABC	Metaplasia escamosa Infiltrado células mononucleares Presencia de células plasmáticas Disminución células caliciformes Microangiopatía	IL-1 (estroma) IL-6 (estroma) *IL 12 (epit & estroma) IL-13 (estroma) *IL 17 (epit,estroma, perivasc)
3	Depósito lineal Ig G, Ig A, Ig M, Ig D en MB en IF directa	Epitelio engrosado, irregular Infiltrado células mononucleares Presencia de células plasmáticas Células caliciformes normales Microangiopatía	IL-1 (epit, estroma, perivasc) *IL-6 (estroma) IL-12 (estroma) *IL 17 (estroma, perivasc)
4	Depósito lineal Ig G, Ig A, Ig M en MB en IF directa	Epitelio adelgazado Impresionante infiltrado mononucleares Presencia de células plasmáticas Aumento células caliciformes Microangiopatía	*IL-1 (epit & estroma) *IL-6 (epit, estroma, perivasc) *IL-12 (epit,estroma, perivasc) *IL-13 (epit,estroma, perivasc) *IL-17 (epit,estroma, perivasc)
5	Depósito lineal Ig G, Ig A, C4 en MB en IF directa	Metaplasia escamosa Reducido infiltrado mononucleares Presencia de células plasmáticas Ausencia células caliciformes No microangiopatía	*IL-12 (epit & estroma) *IL-17 (epit & estroma)

\* Expresión mayor de 2+

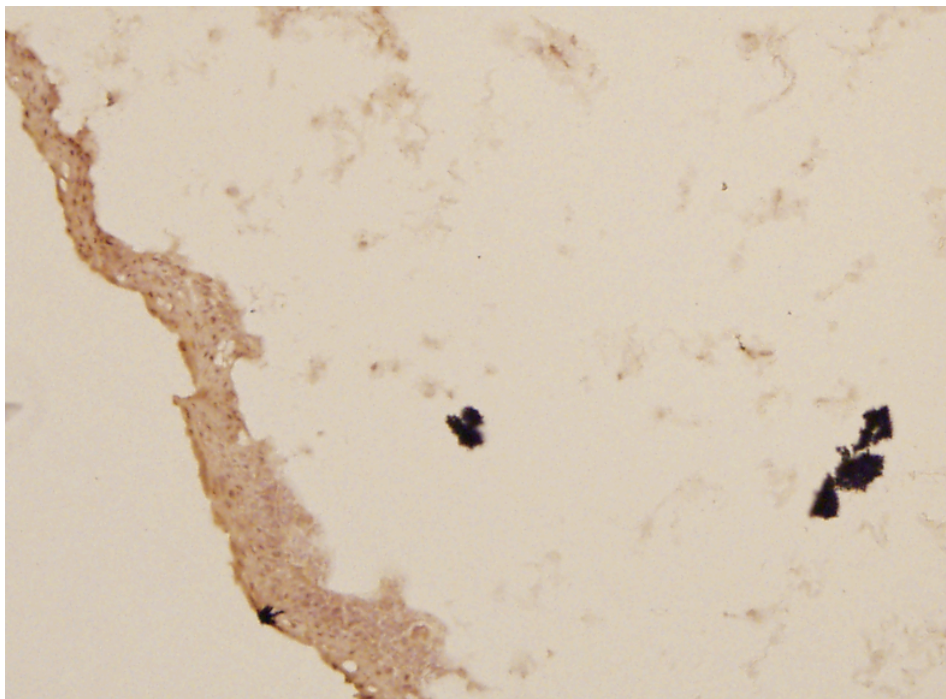
**Tabla 6. Hallazgos histológicos, Inmunofluorescencia y perfil de IL en la biopsia conjuntival de pacientes con POC y otra comorbilidad ocular.**

Pts	IF	Histología	Perfil IL
6	Deposito lineal Ig G en MB en IF directa	Metaplasia escamosa	
		Moderado-extenso infiltrado mononucleares	* IL-1 (epit, estroma, perivasc) IL-6 (epit, estroma, perivasc)
7	Deposito lineal Ig G en MB en IF directa	Ausencia células caliciformes	*IL-12 (epit, estroma, periv)
		Presencia de células plasmáticas	IL-13 (estroma)
8	Deposito lineal Ig G e Ig A en MB en IF directa	Microangiopatía	*IL-17 (epit, estroma, perivas)
		Epitelio normal	* IL-1 (epit, estroma, perivasc)
9	Deposito lineal Ig G e C3 en MB en IF directa	Vasto infiltrado mononucleares	* IL-6 (epit, estroma, perivasc)
		Células caliciformes normales	* IL-12 (epit, estroma, perivasc)
10	Deposito lineal Ig G e Ig A en MB en IF directa	Presencia de células plasmáticas	* IL-13 (epit, estroma, perivasc)
		Microangiopatía severa	* IL-17 (epit, estroma, perivasc)
11	Deposito lineal Ig G e C3 en MB en IF directa	Epitelio conservado	
		Moderado infiltrado mononucleares	* IL-1 (epit, estroma, perivasc) IL-6 ( estroma, perivasc)
12	Deposito lineal Ig G e Ig A en MB en IF directa	Aumento células caliciformes	* IL-12 (epit, estroma, perivasc)
		Aumento mastocitos	IL-13 (estroma)
13	Deposito lineal Ig G e C3 en MB en IF directa	Presencia de células plasmáticas	* IL-17 (epit, estroma, perivasc)
		Microangiopatía severa	
14	Deposito lineal Ig G e C3 en MB en IF directa	Epitelio conservado	
		Infiltrado mononucleares	IL-1 (epit, estroma, perivasc)
15	Deposito lineal Ig G, Ig A e C3 en MB en IF directa	Células caliciformes normales	*IL-6 (epit, estroma, perivasc)
		Presencia de células plasmáticas	* IL-12 (epit, estroma, perivasc)
16	Deposito lineal Ig G, Ig A e C3 en MB en IF directa	Microangiopatía	* IL-17 (epit, estroma, perivasc)
		Metaplasia escamosa, epitelio engrosado	* IL-1 (epit, estroma, perivasc) IL-6 (epit, estroma)
17	Deposito lineal Ig G, Ig A e C3 en MB en IF directa	Extenso infiltrado mononucleares	* IL-12 (epit, estroma, perivasc)
		Células caliciformes normales	IL-13 (estroma, perivasc)
18	Deposito lineal Ig G, Ig A e C3 en MB en IF directa	Eosinófilos, aumento mastocitos	IL-17 (estroma, perivasc)
		Presencia de células plasmáticas	
19	Deposito lineal Ig G, Ig A e C3 en MB en IF directa	Microangiopatía	
		Metaplasia escamosa	* IL-1 (epit, estroma)
20	Deposito lineal Ig G, Ig A en MB en tinción ABC	Degeneración elastótica estroma	IL-6 (epit, estroma)
		Ausencia células caliciformes	* IL-12 (epit, estroma)
21	Deposito lineal Ig G, Ig A en MB en tinción ABC	Presencia de células plasmáticas	* IL-13 (epit, estroma)
		No microangiopatía	* IL-17 (epit, estroma)
22	Deposito lineal Ig G, Ig A, Ig M y C4, en MB en tinción ABC	Epitelio normal	* IL-1 (epit, estroma, perivasc)
		Infiltrado mononuclear moderado	* IL-6 (epit, estroma, perivasc)
23	Deposito lineal Ig G, Ig A, Ig M y C4, en MB en tinción ABC	Aumento células caliciformes	* IL-12 (epit, estroma, perivasc)
		Presencia de células plasmáticas	IL-13 (estroma)
24	Deposito lineal Ig G, Ig A, Ig M y C4, en MB en tinción ABC	Microangiopatía	IL-17 (epit, estroma, perivasc)

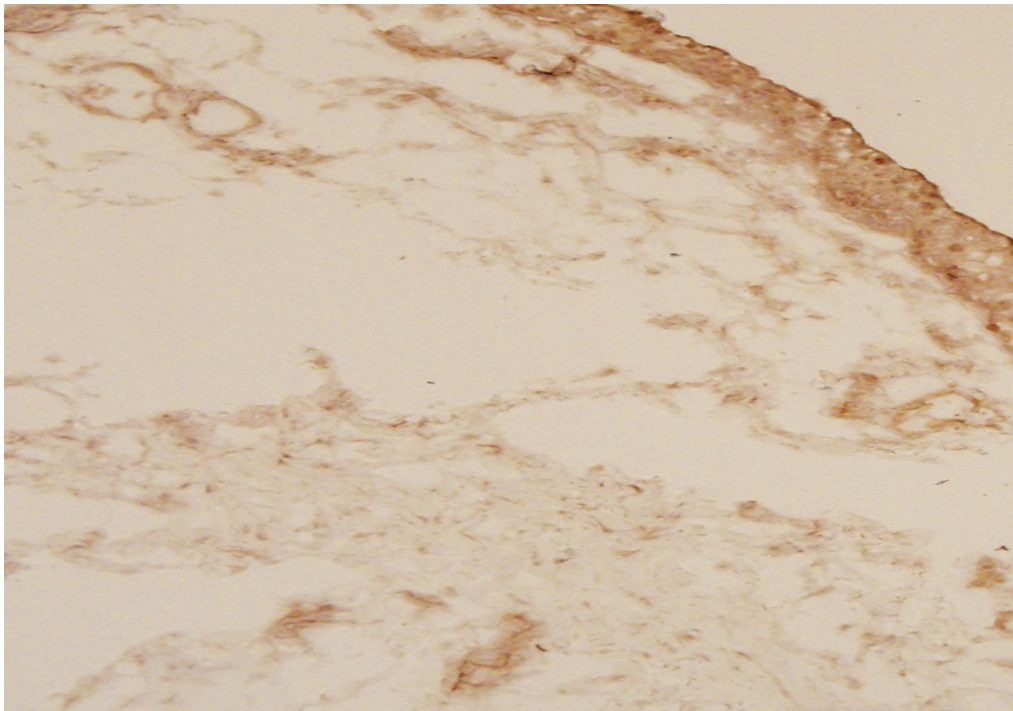
\* Expresión mayor de 2+.



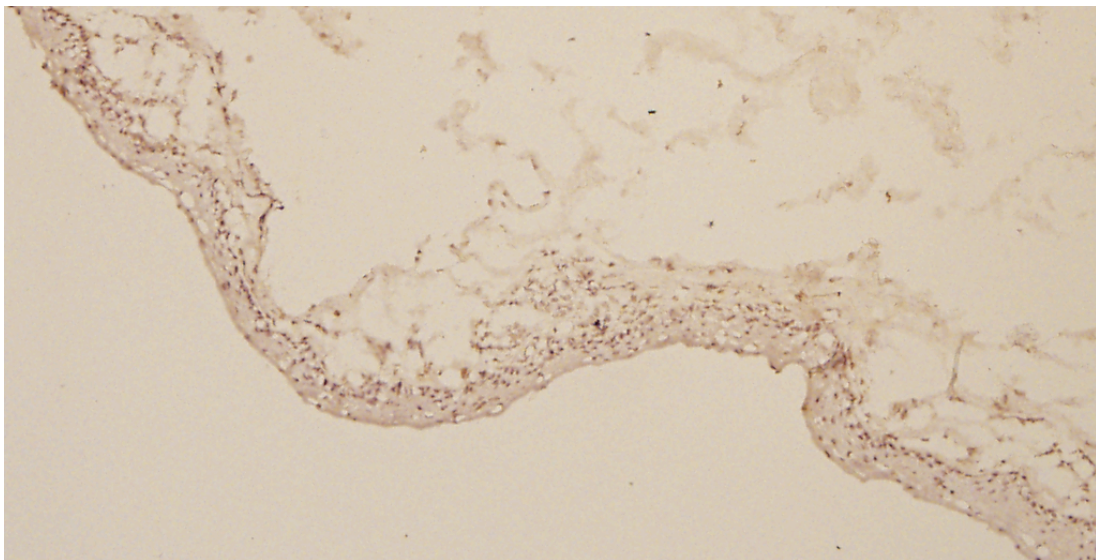
**Fig.12A** Inmunotinción utilizando el Ac anti-IL-1 en paciente POC y liquen plano (Paciente 6)



**Fig.12B** Inmunotinción utilizando el Ac anti-IL-6 en paciente POC y liquen plano (Paciente 6)

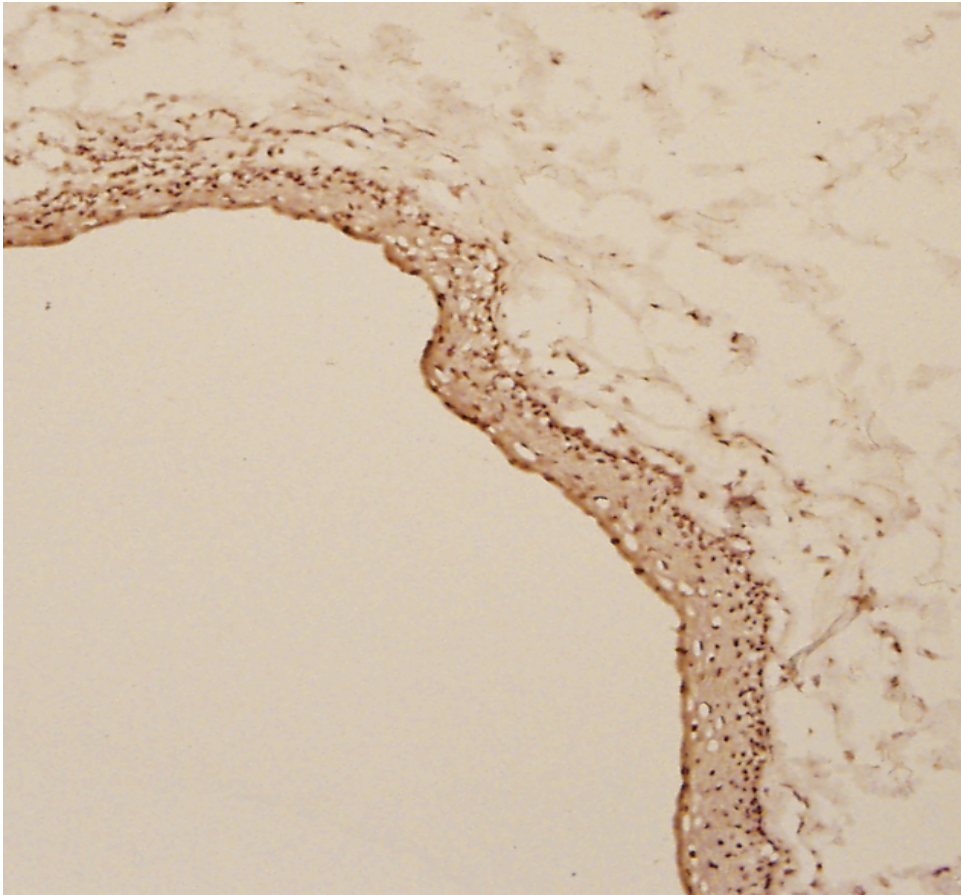


**Fig.12C** Inmunotinción utilizando el Ac anti-IL-12 en paciente POC y liquen plano (Paciente 6)

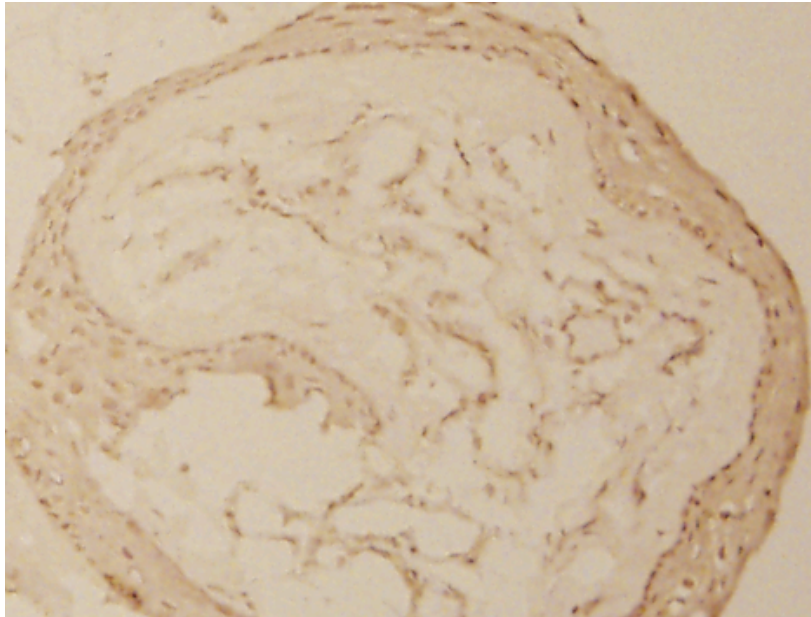


**Fig.12D** Inmunotinción utilizando el Ac anti-IL-13 en paciente POC y liquen plano (Paciente 6)

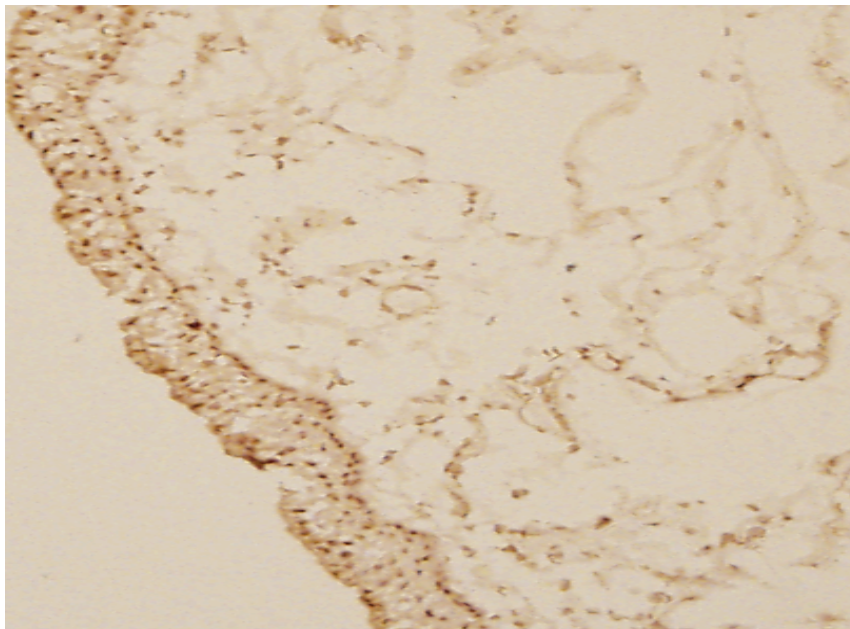




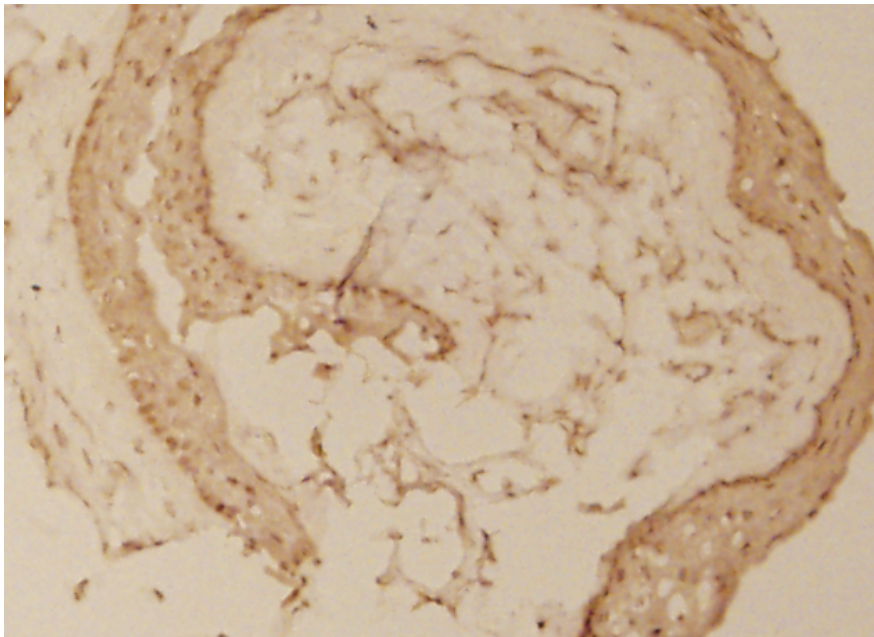
**Fig.12E** Inmunotinción utilizando el Ac anti-IL-17 en paciente POC y liquen plano (Paciente 6)



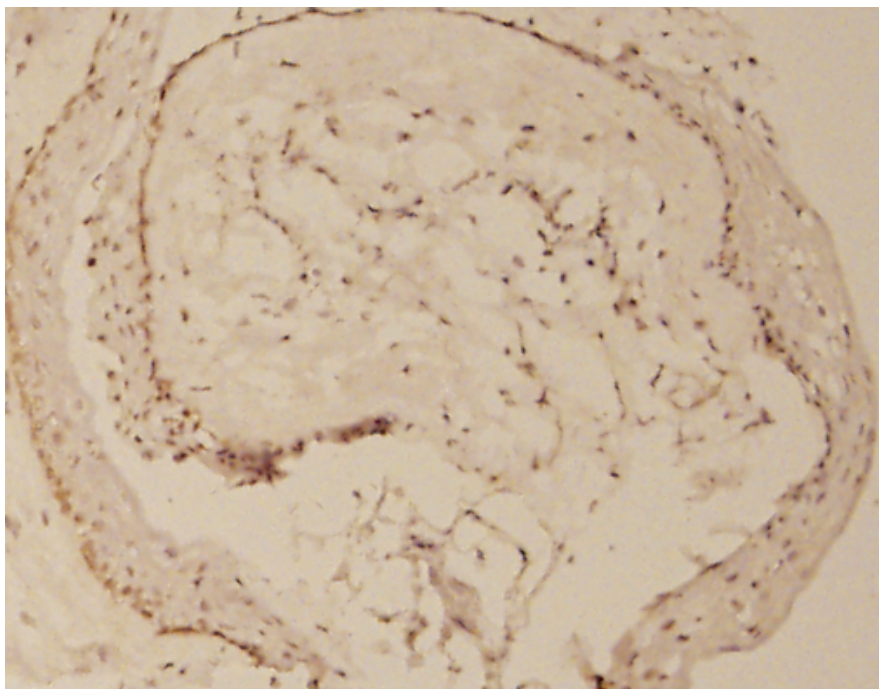
**Fig. 13A** Inmunotinción de paciente con POC y rosácea ocular (Paciente 9) utilizando el Ac anti-IL-1.



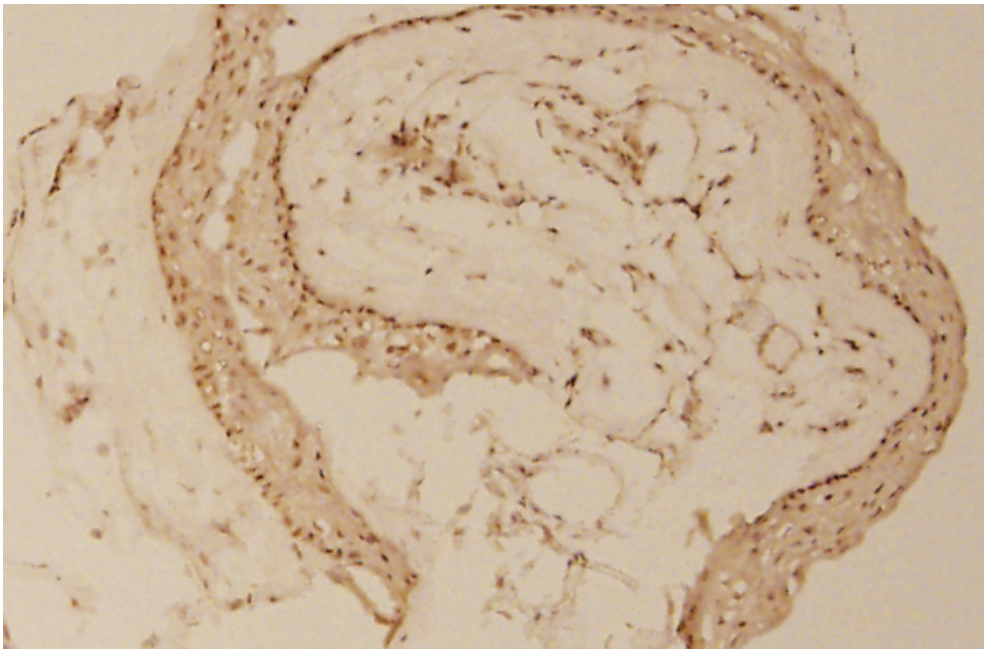
**Fig. 13B** Inmunotinción de paciente con POC y rosácea (Paciente 9) utilizando el Ac anti-IL-6.



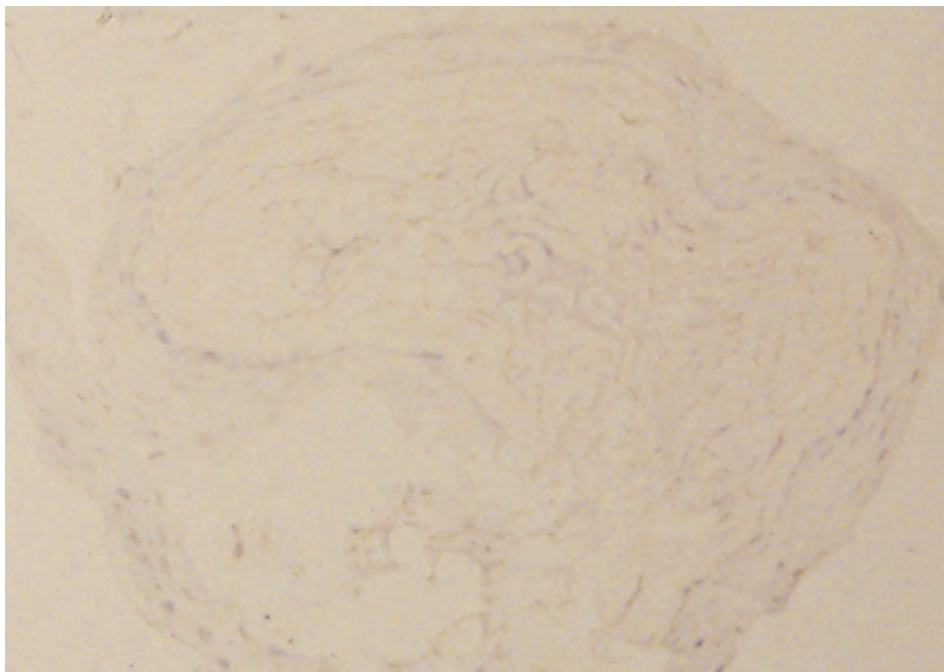
**Fig. 13C** Inmunotinción de paciente con POC y rosácea ocular (Paciente 9) utilizando el Ac anti-IL-12.



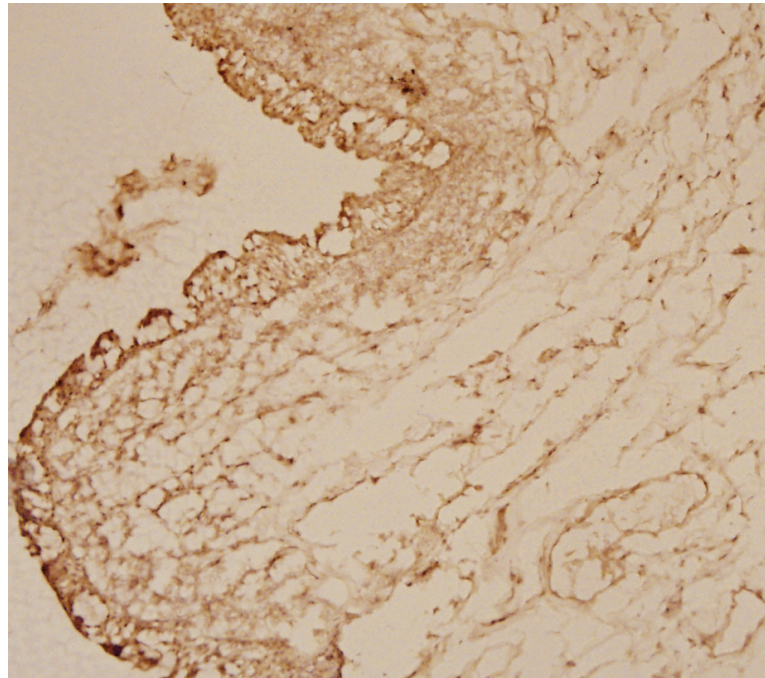
**Fig.13 D** Inmunotinción de paciente con POC y rosácea ocular (Paciente 9) utilizando el Ac anti-IL-13.



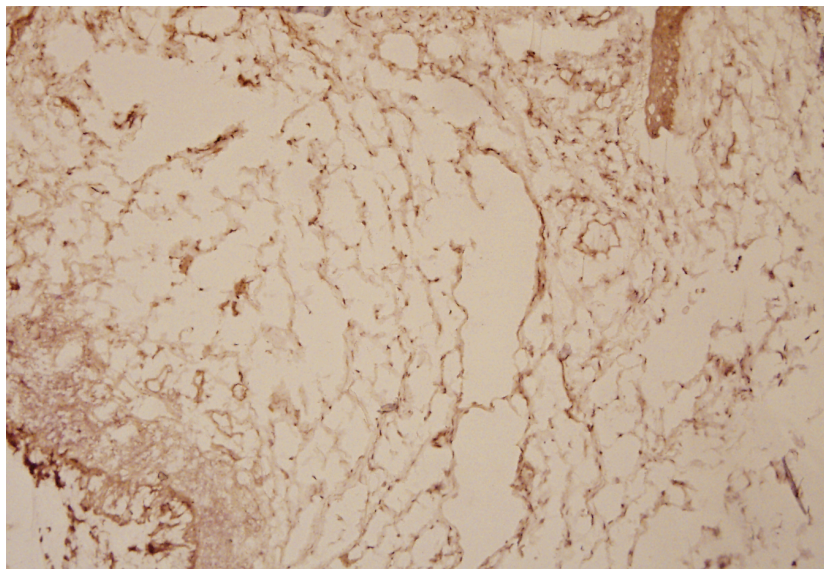
**Fig. 13E** Inmunotinción de paciente con POC y rosácea ocular (Paciente 9) utilizando el Ac anti-IL-17.



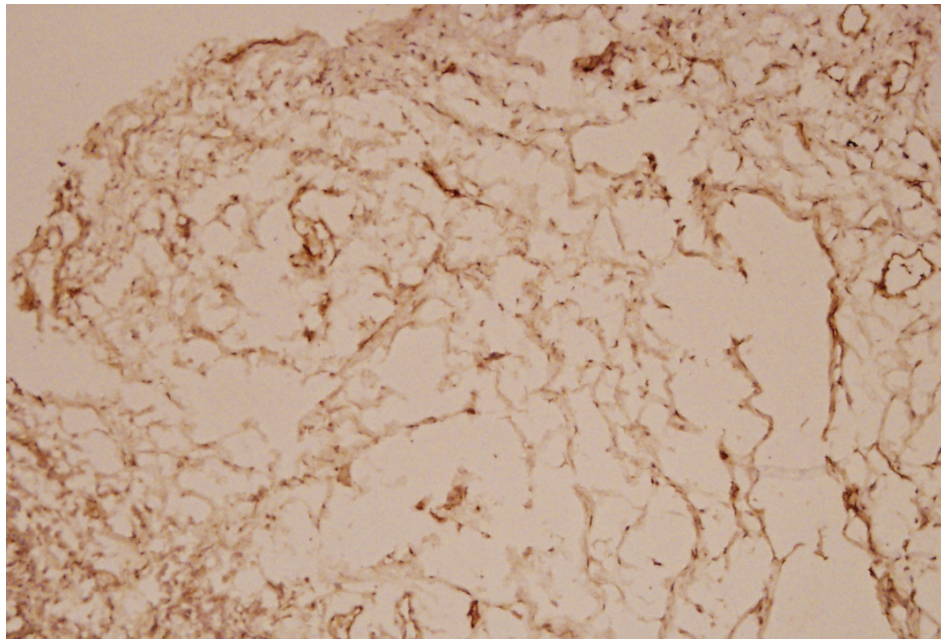
**Fig. 13F** Control negativo de Paciente 9.



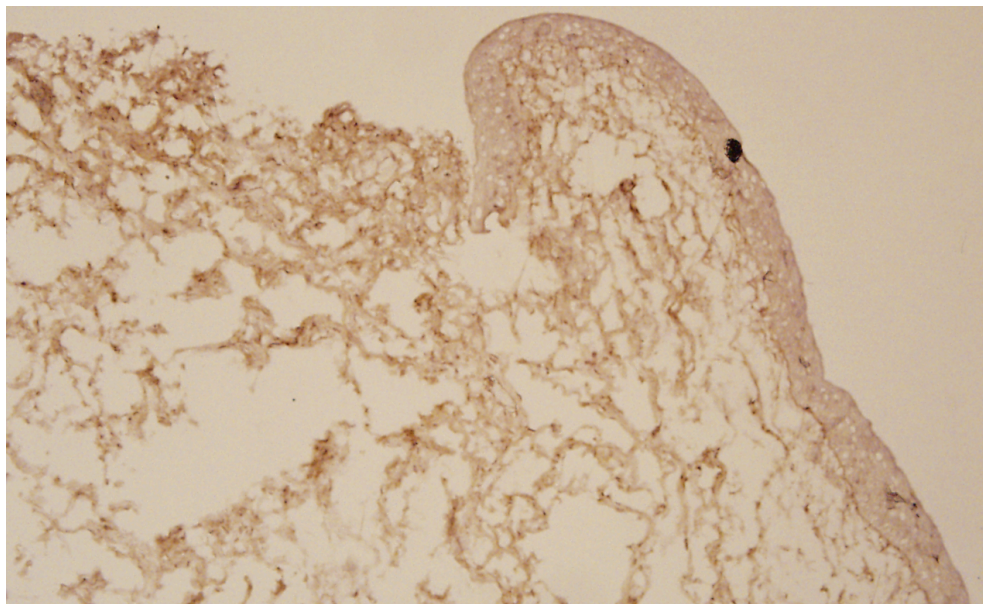
**Fig.14A Inmunotinción en paciente con POC y conjuntivitis alérgica estacional utilizando el Ac anti-IL-1 (Paciente 7).**



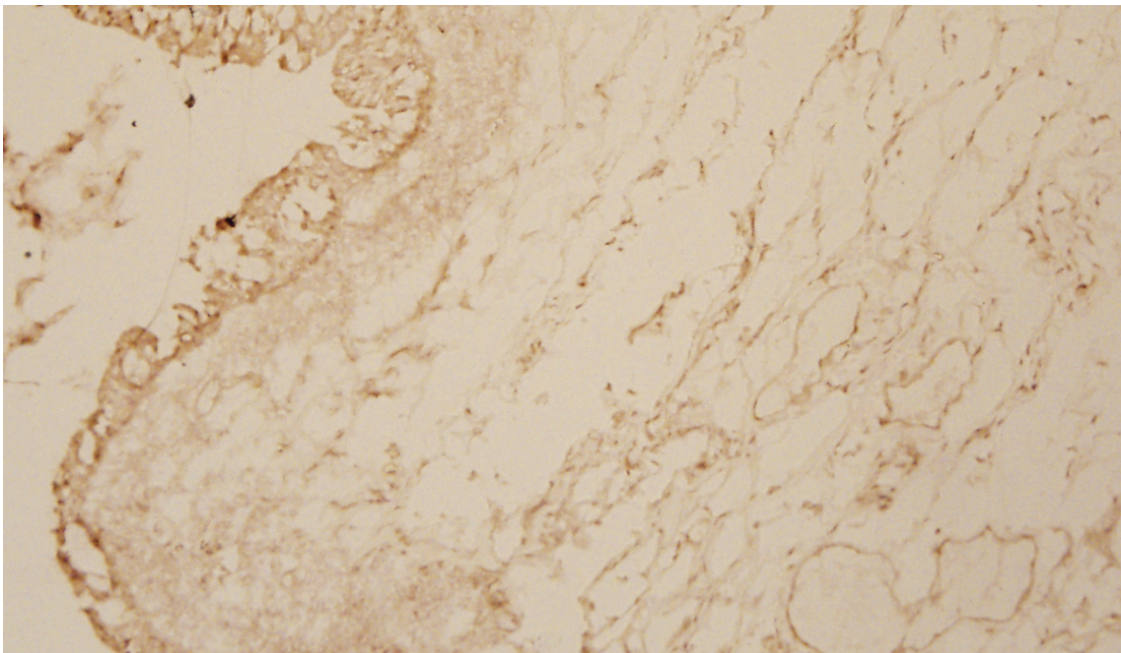
**Fig. 14B Inmunotinción en paciente con POC y Conjuntivitis alérgica estacional (Paciente 7) utilizando el Ac anti-IL-6.**



**Fig.14C** Inmunotinción en paciente con POC y conjuntivitis alérgica estacional utilizando el Ac anti-IL-12 (Paciente 7).



**Fig.14D** Inmunotinción en paciente con POC y conjuntivitis alérgica estacional utilizando el Ac anti-IL-13 (Paciente 7).



**Fig.14E Inmunotinción en paciente con POC y conjuntivitis alérgica estacional utilizando el Ac anti-IL-17 (Paciente 7).**

**Tabla 7. Perfil de IL en biopsias de grupo control.**

<b>Pts N°</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Perfil IL</b>
13	72	F	Ausencia total expresión IL
14	60	M	Ausencia total expresión IL
15	58	F	IL-6 (epit)
16	61	F	IL-1 (epit)
17	64	F	Ausencia total expresión IL
18	75	F	IL-1 (epit & estromal)



### 4.3. COMPARACION ENTRE PACIENTES POC VERSUS CONTROLES

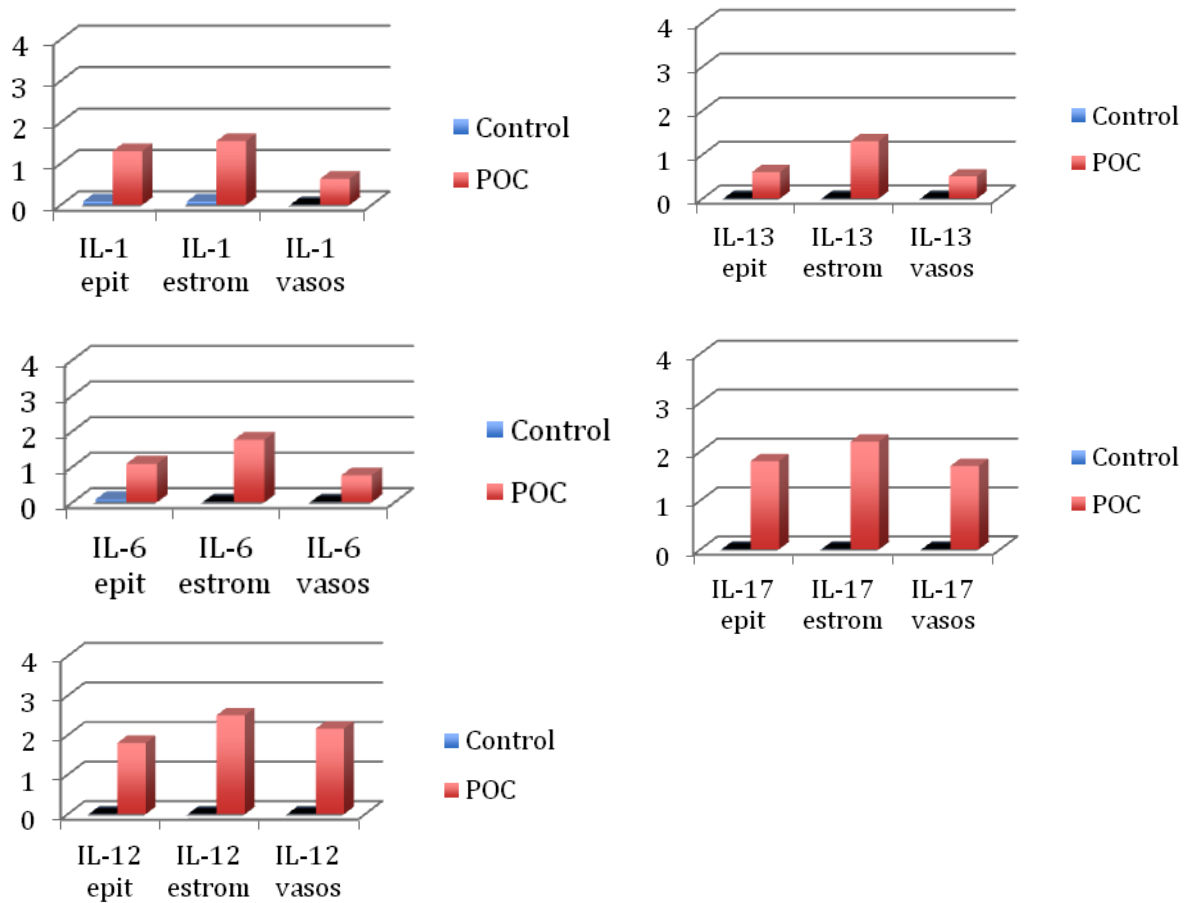
Al comparar los 12 pacientes afectados de POC con los controles se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión estromal de IL-1, IL-6, IL-12, IL-13 e IL-17, y en expresión epitelial y perivascular de IL-12 e IL-17, mediante el test exacto de Fisher. Ver tabla 8 y figura 15 adjuntas.

**Tabla 8. Perfil de IL entre los 12 pacientes con POC comparado con 6 controles**

Variable	<i>P</i>
IL-1 epitelio	<i>P</i> = 0.107
IL-1 estroma	<i>P</i> = 0.004*
IL-1 vasos	<i>P</i> = 0.054
IL-6 epitelio	<i>P</i> = 0.131
IL-6 estroma	<i>P</i> < 0.001*
IL-6 vasos	<i>P</i> = 0.054
IL-12 epitelio	<i>P</i> < 0.001*
IL-12 estroma	<i>P</i> < 0.001*
IL-12 vasos	<i>P</i> = 0.038*
IL-13 epitelio	<i>P</i> = 0.245
IL-13 estroma	<i>P</i> = 0.009*
IL-13 vasos	<i>P</i> = 0.515
IL-17 epitelio	<i>P</i> = 0.002*
IL-17 estroma	<i>P</i> < 0.001*
IL-17 vasos	<i>P</i> = 0.009*

\* Asociación estadísticamente significativa.

**Fig. 15. Histograma mostrando la expresión relativa expresión de IL-1, IL-6, IL-12, IL-13 y IL-17 en especímenes conjuntivales de 12 sujetos con POC versus 6 sujetos controles.**



#### 4.4. COMPARACION ENTRE PACIENTES POC “PUROS” VERSUS CONTROLES.

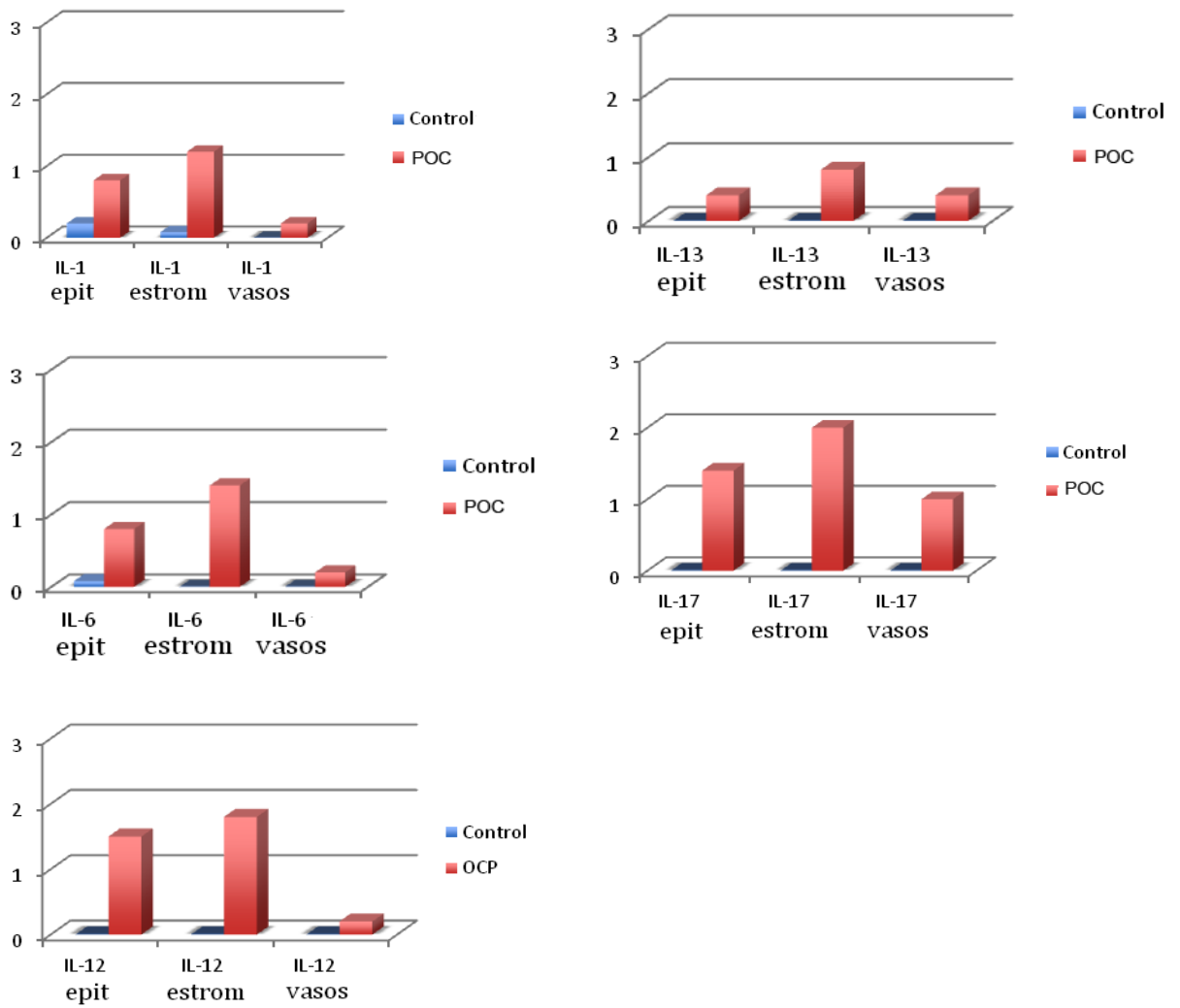
Al comparar la expresión de IL entre pacientes POC puros versus controles, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la expresión estromal de IL-6, IL-12 e IL-17, además de a nivel epitelial en IL-12 e IL-17. Ver tabla 9 y figura 16.

**Tabla 9. Perfil de IL entre los 5 pacientes con POC “puro” comparado con 6 controles.**

<b>Variable</b>	<b>P</b>
IL-1 epitelio	$P = 0.567$
IL-1 estroma	$P = 0.080$
IL-1 vasos	$P = 0.455$
IL-6 epitelio	$P = 0.545$
IL-6 estroma	$P = 0.015^*$
IL-6 vasos	$P = 0.455$
IL-12 epitelio	$P = 0.015^*$
IL-12 estroma	$P = 0.002^*$
IL-12 vasos	$P = 0.455$
IL-13 epitelio	$P = 0.182$
IL-13 estroma	$P = 0.061$
IL-13 vasos	$P = 0.455$
IL-17 epitelio	$P = 0.015^*$
IL-17 estroma	$P = 0.002^*$
IL-17 vasos	$P = 0.061$

\* Asociación estadísticamente significativa.

**Fig. 16. Histograma mostrando la expresión relativa de IL-1, IL-6, IL-12, IL-13 y IL-17 en especímenes conjuntivales de 5 sujetos con POC "puro" versus 6 sujetos controles.**



#### 4.5 COMPARACION ENTRE PACIENTES POC “PUROS” VERSUS PACIENTES POC CON OTRA COMORBILIDAD OCULAR.

Al comparar los subgrupos de pacientes con POC según si presentaban o no otra patología ocular, se observó que los pacientes con otras patologías además de POC, tenían una mayor actividad clínica en el momento de la biopsia ( $p= 0.005$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en edad, sexo, estadio de la enfermedad o respuesta al tratamiento ( $p= 0,073$ ,  $p=1$ ,  $p= 0,149$  respectivamente). Ver tabla 10. Respecto a las diferencias de expresión de IL, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión local de IL-12 a nivel perivascular ( $p=0,018$ ).

**Tabla 10. Características basales entre pacientes exclusivamente con POC y pacientes con POC y otras patologías.**

Variable	POC (n=5)	POC + otras patologías (n=7)	P
Edad (años)	67.7	56	$P= 0.073$
Hombres (%)	20	14.3	$P = 1$
Estadio POC	2.6	2.43	$P = 1$
Actividad	1.2	2.71	$P = 0.005^*$

\* Asociación estadísticamente significativa.

**Tabla 11. Perfil de IL entre los 5 pacientes con POC “puro” comparado con 7 pacientes con POC y otras patologías oculares.**

<b>Variable</b>	<b>P</b>
IL-1 epitelio	<i>P</i> = 0,432
IL-1 estroma	<i>P</i> = 0,268
IL-1 vasos	<i>P</i> = 0,106
IL-6 epitelio	<i>P</i> = 0,343
IL-6 estroma	<i>P</i> = 0,202
IL-6 vasos	<i>P</i> = 0,106
IL-12 epitelio	<i>P</i> = 0,432
IL-12 estroma	<i>P</i> = 0,432
IL-12 vasos	<i>P</i> = 0,018*
IL-13 epitelio	<i>P</i> = 1
IL-13 estroma	<i>P</i> = 0,432
IL-13 vasos	<i>P</i> = 0,876
IL-17 epitelio	<i>P</i> = 0,876
IL-17 estroma	<i>P</i> < 0,639
IL-17 vasos	<i>P</i> = 0,432

\* Diferencia estadísticamente significativa.

#### 4.6. CORRELACIÓN ENTRE 4.1 Y 4.2.

Se utilizó un coeficiente de correlación de Spearman para determinar si existía una relación lineal o no entre cada par de variables analizadas. Los factores de interés fueron sexo, edad, estadio de POC, comorbilidad ocular, afectación de piel u otras mucosas por PMM, actividad de POC en el momento de la biopsia, respuesta al tratamiento y la expresión conjuntival de IL.

El análisis evidenció que la actividad clínica en el momento de la biopsia se correlaciona directamente con la presencia de microangiopatía mediada por IL-12, IL-13 e IL-17 en los especímenes conjuntivales ( $p = 0.018$ ,  $p = 0.026$ ,  $p = 0.016$  respectivamente). Adicionalmente, una mayor actividad clínica previa a la biopsia (grado 2, 3) se asoció de manera independiente a una mejor respuesta al tratamiento ( $p = 0.011$ ). La expresión elevada de IL-1 en estroma conjuntival y de IL-12 y IL-17 perivascular en el momento de la biopsia se correlacionaron con una mejor respuesta terapéutica ( $p = 0.045$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.026$  respectivamente). En contraste, no se encontró correlación entre el resto de las variables (genero, edad, estadio de POC, comorbilidad ocular y presencia de otras manifestaciones de MMP) entre si o con una mejor respuesta al tratamiento. Ver tabla 12.

**Tabla 12: Asociación entre variables**

Variables	r	IC (95%)	P
Actividad clínica y expresión perivascular de IL 12	0,664	(0,15- 0,90)	0,018*
Actividad clínica y expresión perivascular de IL 13	0,638	(0,10- 0,89)	0,026*
Actividad clínica y expresión perivascular de IL 17	0,667	(0,17- 0,90)	0,016*
Actividad clínica y respuesta al tratamiento	0,699	(0,21- 0,91)	0,011*
Expresión estromal de IL-1 y respuesta al tratamiento	0,588	(0,02- 0,87)	0,045*
Expresión perivascular de IL 12 y respuesta al tratamiento	0,843	(0,52- 0,95)	0,001*
Expresión perivascular de IL 12 y respuesta al tratamiento	0,638	(0,10- 0,89)	0,026*

r: Coeficiente de correlación de Spearman

IC: intervalo de confianza

\* Asociación estadísticamente significativa.



“Nada hay que temer a la vida, sólo hay que entenderlo todo”  
Marie Curie

***DISCUSIÓN***

---



### 5.1 PAPEL DE LAS IL Y CELULAS T EN LA FISIOPATOGENIA DEL POC.

La evidencia científica sugiere que el POC se desarrolla como consecuencia de la pérdida de tolerancia inmunológica frente a la subunidad estructural beta 4 ( $\beta 4$ ), a nivel del hemidesmosoma de la MB conjuntival. Esta pérdida de tolerancia se traduce en el desarrollo de auto Ac circulantes Ig G e Ig A, que se unen al dominio intracitoplasmático del péptido  $\beta 4$  de la integrina humana  $\alpha 6\beta 4$ . El depósito local de anticuerpos, que es el verdadero centro de la inmunopatogénesis del POC, desencadena una cascada de eventos. Estos incluyen la generación de citoquinas y quimioquinas, resultando en el reclutamiento de una panoplia de células inflamatorias, que activan los fibroblastos, éstos a su vez se multiplican y generan un nuevo tipo de colágeno (tipo 3), produciendo la fibrosis conjuntival y arrugamiento de la conjuntiva<sup>66,67</sup>.

Algunos autores, sin embargo, han apuntado que la hipótesis de una inmunopatogenia basada exclusivamente en la generación de autoanticuerpos, no explica todas las características observadas en el POC y otras enfermedades bullosas autoinmunes similares<sup>68,69</sup>, como por ejemplo la gran susceptibilidad a esta entidad unida al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (HLA-DQ $\beta 1$ \*0301)<sup>70-74</sup>.

Con el objeto de explorar el microambiente subyacente en los pacientes con POC, el papel de diferentes citoquinas ha sido determinado tanto en suero como en conjuntiva. Así, Foster y asociados demostraron que existe una sobreexpresión de IL-1<sup>74</sup>, IL-5<sup>75</sup> y Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>76</sup> en sangre periférica de estos pacientes, mientras que IL-6 se encontró disminuida al compararse con sujetos sanos. Otras moléculas inflamatorias como el TNF- $\alpha$ <sup>77,78</sup>, el factor de inhibición de migración de macrófagos<sup>79</sup>, el factor estimulante de colonias de granulocitos<sup>79</sup> y la IL-4<sup>80</sup> se han demostrado implicadas en la activación del sistema inmune limitada a la conjuntiva, por el grupo de Foster y colaboradores.

Mas tarde, Saw y asociados hipotetizaron que la IL-13<sup>81</sup> podría jugar un rol clave en estos pacientes, induciendo la activación de los fibroblastos y linfocitos T que resultaría en la inducción de fibrosis conjuntival. Recientemente, Lambiase señaló que a nivel conjuntival existía un reclutamiento de Linfocitos T colaboradores del subtipo 17 (Th17) en pacientes con POC<sup>82</sup>.

En los estudios que se presentan en esta tesis, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión estromal de IL-1, IL-6, IL-12, IL-13 e IL-17, junto a una sobreexpresión epitelial y perivascular de la IL-12 y la IL-17 en conjuntiva de pacientes diagnosticados de POC comparado con el grupo control. Además, los pacientes con POC en los que se objetivó un estatus clínicamente más activo a nivel conjuntival (inflamación conjuntival grado 2 y 3) en el momento de la biopsia, presentaban una mayor expresión de IL-13, mayoritariamente en estroma conjuntival, respecto a aquellos sujetos con enfermedad clínicamente menos activa en el momento de la biopsia. Nuestros hallazgos están en línea con los resultados previos reportados por los grupos de Saw y Lambiase, pero sugieren además que la autoinmunidad conjuntival en el POC está mediada por otras citoquinas inflamatorias como la IL-1, IL-6 e IL-12.

Interesantemente, nuestros datos sugieren que los pacientes con una conjuntiva más inflamada clínicamente en el momento de la biopsia, podrían presentar una mayor expresión de IL-13, lo que se correspondería con los pacientes con historia de atopia o conjuntivitis alérgica en nuestra serie. No obstante, las enfermedades alérgicas han demostrado ser auténticos perturbadores de la autoinmunidad, llevando por ejemplo a un mayor riesgo de rechazo del Alotransplante corneal<sup>83,84</sup>

La sobreexpresión de IL-1, IL-6, IL-12, IL-13 e IL-17 demostrada en nuestros especímenes apoya que los linfocitos T juegan un rol en la autoinmunidad del POC. EN línea con esta teoría, Razzaque y colaboradores hipotetizaron que los linfocitos T podrían reconocer epítomos específicos de la MB conjuntival y unirse a DQ $\beta$ 1\*0301, estimulando la activación antígenoespecífica de linfocitos B, que producirían Ac específicos frente la MB conjuntival<sup>85</sup>.

La disparidad de las observaciones en la IL-6, disminuida en el suero e incrementada a nivel conjuntival en pacientes con POC, enfatiza la expresión local de una autoinmunidad sistémica en esta entidad.

Los hallazgos histológicos en la serie de pacientes mostrada en la presente tesis muestran que el 100% de los pacientes con POC presentaban células plasmáticas en los especímenes conjuntivales. Este hecho apoya el hecho de que los Auto Ac circulantes son probablemente el rasgo inmunopatológico clave en esta entidad. No obstante, terapias dirigidas frente a estas células, como el Rituximab y/o Ig intravenosas se han mostrado efectivas en la detención de la progresión en casos recalcitrantes<sup>86-89</sup>. Curiosamente, terapias dirigidas frente a células T, como los inhibidores de la calcineurina, se han demostrado relativamente ineficaces como tratamiento del POC<sup>90</sup>.

Son necesarios más estudios para determinar qué células son las responsables de la producción local de las citoquinas observadas en esta tesis, la relevancia de las células T en la patogénesis de la enfermedad y los mecanismos exactos que subyacen a la fibrosis y cicatrización conjuntival.

## **5.2 BIOPSIA CONJUNTIVAL COMO GUÍA TERAPÉUTICA**

A día de hoy, el gold estándar y realmente el único método definitivo para diagnosticar el POC continua siendo el análisis inmunohistoquímico de los especímenes conjuntivales, con la demostración de uno o más inmunoreactantes frente a la MB conjuntival. Sin embargo, no existe ningún parámetro clínico, analítico o histológico que se correlacione directamente con el pronóstico, evolución de la enfermedad o respuesta al tratamiento en pacientes con POC. Se conoce por estudios previos que la presencia y niveles de Auto Ac en plasma no es un parámetro útil para monitorizar estos pacientes<sup>91</sup>.

Como objetivo secundario en la presenta tesis, se intentó explorar la relación existente entre biomarcadores conjuntivales y los diferentes patrones de respuesta clínico-terapéutica observados en la práctica clínica.



Nuestros datos demuestran la actividad clínica antes de la biopsia podría correlacionarse directamente con la respuesta terapéutica en pacientes con POC. Además, la expresión estromal de IL-1, la presencia de microangiopatía mediada por IL-12 e IL-17 podrían ser predictores de una respuesta favorable al tratamiento. En nuestra serie, la actividad conjuntival clínica se correlacionó directamente con la presencia de microangiopatía mediada por IL-12, IL-13 e IL-17 en especímenes conjuntivales.

Este estudio proporciona firme evidencia que la biopsia conjuntival podría ser usada no sólo para diagnosticar POC, sino también para anticipar qué pacientes presentarán una respuesta terapéutica más favorable. Lo que contribuiría a clasificar de una manera mas adecuada a los pacientes afectados de POC y mejorar las actuales guías clínicas de esta entidad.

Los autores de este estudio reconocen que el número moderado de pacientes incluidos en el estudio (12) y la falta de largo periodo de seguimiento, limitan la fuerza de nuestras observaciones. Estudios prospectivos en poblaciones mayores, con periodos de seguimiento más prolongados son necesarios para establecer la validez de la biopsia conjuntival pretratamiento como predictor de la respuesta al tratamiento.

En resumen, la presente tesis proporciona evidencia de que las citoquinas IL-1, IL-6, IL-12, IL-13 e IL-17 están envueltas en la patogénesis del POC. Hemos demostrado por primera vez que IL-1, IL-6, IL-12 e IL-17 pueden estar sobreexpresadas a nivel local en especímenes conjuntivales de pacientes con POC, al compararse con sujetos sanos. Además, la combinación de escores clínicos y de datos inmunohistoquímicos iniciales, podría proporcionar una valiosa información pronóstica.

“Muchos hombres no se equivocan jamás, porque nunca en sus vidas se proponen nada”

*Unamuno*

***CONCLUSIONES***

---



1. Las IL-1, IL-6, IL-12, IL-13 e IL-17 están sobreexpresadas en la conjuntiva de sujetos afectados de POC. El presente estudio demuestra por primera vez que IL-1, IL-6, IL-12 e IL-17 están envueltas en la patogénesis del POC.
2. En pacientes con POC, la actividad clínica conjuntival se correlaciona directamente con una mayor expresión de IL-13, lo que se corresponde en nuestra serie con pacientes con antecedentes de enfermedad alérgica ocular. La actividad conjuntival clínica se correlaciona también directamente con la presencia de microangiopatía mediada por IL-12, IL-13 e IL-17 en especímenes conjuntivales afectados de POC.
3. Los parámetros de respuesta más favorable al tratamiento observados en nuestra serie fueron una mayor actividad clínica conjuntival pre-biopsia, la expresión estromal de IL-1, la presencia de microangiopatía local mediada por IL-12 e IL-17.
4. Los pacientes con POC que presentan microangiopatía tienen un mayor riesgo de riesgo de sufrir una progresión inexorable y rápida de la enfermedad.

## Conclusiones

---

5. La combinación de *scores* clínicos y hallazgos inmunohistoquímicos pretratamiento proporciona una valiosa información pronóstica en los pacientes con POC.

## *BIBLIOGRAFÍA*

---

1. **Mondino BJ**, Brown SI. Ophthalmology 1981;88: 95-100.
2. **Foster CS**. Cicatricial pemphigoid. Trans AM Ophthalmol Soc. 1986;84:527-663.
3. **Langman**: Embriologia medica. 11ª edición. T. W. Sadler, Lippincott Williams and Wilkins. Wolters kluwer Elath, 2009.
4. **Sutphin JE**, ed. Enfermedades externas de la cornea. Barcelona: Elsevier. 2007.
5. **Takahashi Y**, Watanabe A, Matsuda H, Nakamura Y, Nakano T, Asamoto K, Ikeda H, Kakizaki H. Anatomy of secretory glands in the eyelid and conjunctiva: A photographic review. Ophthal. Plast. Reconstr. Surg 2013. Feb 1.
6. **Foster CS**, Azar DT, Dohlman CH. Smolin and Thoft's The Cornea: Scientific Foundations and Clinical Practice. Lippincott Williams & Wilkins. 2005
7. **Bhol KC**, Dans MJ, Simmons RK, Foster CS, Giancotti FG, Ahmed AR. The autoantibodies to  $\alpha 6\beta 4$  integrin of patients affected by ocular cicatricial pemphigoid recognize predominantly epitopes within the large cytoplasmic domain of human  $\beta 4$ . J Immunol 2000;165; 2824-9.
8. **Srivinivasan BD**, Jakoviec FA, Iwamoto T. Conjunctiva. In: Jakoviec FA, ed. Ocular anatomy, embryology, and teratology. Philadelphia: Harper & Row, 1982: 733-766.
9. **De Pereda JM**, Ortega E, Alonso-García N, Gómez-Hernaández M, Sonnenberg A. Advances and perspectivas of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology. Cell Adh Migr. 2009;3:361-4.
10. **Zhang H**, Labouesse M. The making of hemidesmosome structures in vivo. Dev Dyn. 2010;239:1465-76.
11. **Tsuruta D**, Hashimoto T, Hamill KJ, Jones JC. Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous disease and wound healing. J Dermatol Sci. 2011;62:1-7.
12. **Chan LS**. Ocular and oral membrane pemphigoid (cicatricial pemphigoid). Clin Dermatol. 2012;30:34-7.
13. **Srivinivasan BD**, Jakoviec FA, Iwamoto T. Conjunctiva. In: Jakoviec FA, ed. Ocular anatomy, embryology, and teratology. Philadelphia: Harper & Row, 1982: 733-766.



14. **Jakobiec FA**, Iwamoto T. Ocular Anexa: introduction to lids, conjunctiva and orbit. In: Jakobiec FA, ed. Ocular anatomy, embryology, and teratology. Philadelphia: Harper & Row, 1982: 677-731.
15. **Sacks E**, Rutgers J, Jakoviec FA, et al. A comparison of conjunctival and monocular dendritic cells utilizing a new monoclonal antibody. *Ophthalmology* 1986; 93: 1089.
16. **Murphy GF**: Cell membrane glycoproteins and Langerhans cells. *Hum Pathol* 1985; 16: 103.
17. **Tomasi TB**. The immune system of secretion. Englewood Cliffs, Prentice Hall, 1976.
18. **Gibbons RJ**. Bacterial adherence to the mucosal surface and its inhibition by secretory antibodies. *Adv Exp Med Biol* 1974; 45: 315.
19. **Allansmith MR**. The Eye and Immunology. St Louis, CV Mosby, 1982.
20. **Allansmith MR**. Defense of the ocular surface. *Int Ophthalmol Clin* 1979; 12: 93.
21. **Fleming A**: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc Lond (Biol)* 1922: 93:306.
22. **Strober W**, Hague HE, Lum LG, et al: IgA-Fc receptors on mouse lymphoid cells. *J Immunol* 1978; 121:2140.
23. **Lever WF**. Pemphigus. *Medicine* 1953;32:1-123.
24. **Hippocrates**: Hippocrates popularium liber sextus, in JA vander Linden (ed): Opera Omnia. Apud Gaasbeekius, 1665, vol.1, p 798.
25. **Lever WF**, Talbott JH: Pemphigus: A historical study. *Arch Dermatol Syph* 1942;00:800-823.
26. **Chan LS**, Ahmed AR, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooped KD, Elder MJ, Fine JD, Foster CS, Ghohestani R, Hashimoto T, Hoang-Xuan T, Kirtschig G, Korman NJ, Lightman S, Lozada-Nur F, Marinkovich MP, Mondino BJ, Prost-Squarcioni C, Rogers RS 3rd, Setterfield JF, West DP, Wojnarowska F, Woodley DT, Yancey KB, Zillikens D, Zone JJ. The first international consensus on mucous membrane

- pemphigoid definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol*. 2002;138:370-9.
27. **Bettelheim H**, Kraft D, Zehetbauer G: Uber den sogenannten Augenpemphigus (pemphigus ocularis; pemphigus conjunctivae). *Klin Auggenheilkd* 1972; 160:65-75.
28. **Bedell AJ**: Ocular pemphigus: A clinical presentation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1964; 62:109-122.
29. **Klauder JV**, Cowan A. Ocular pemphigus and its relation to pemphigus of the skin and mucus membranas. *Am J Ophthalmol* 1942;25:643-62.
30. **Hardy KM**, Perry HO, Pingree GC, et al. Benign mucous membrane pemphigoid. *Arch Dermatol* 1971;104:467-75.
31. **Chalkely TH**. Chronic cicatricial conjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1969;67:526-539.
32. **Neumann R**, Tauber J, Foster CS. Remission and recurrence after withdrawal of therapy for ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology*. 1991;98(6):858.
33. **Ahmed M**, Zein G, Khawaja F, Foster CS. Ocular cicatricial pemphigoid: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Prog Retin Eye Res* 2004;23:579-92.
34. **Neumann R**, Tauber J, Foster CS. Remission and recurrence after withdrawal of therapy for ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology*. 1991;98(6):858.
35. **Ahmed M**, Zein G, Khawaja F, Foster CS. Ocular cicatricial pemphigoid: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Prog Retin Eye Res* 2004;23:579-92.
36. **Suelves AM**, Zhao TZ, Siddique SS, Foster CS. Profile of local interleukin expresión in a cohort of ocular cicatricial pemphigoid patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012;53:8112-7.
37. **Tauber J**, Jabbur N, Foster CS. Improved detection of disease progression in ocular cicatricial pemphigoid. *Cornea*. 1992;11:446.
38. **Fleming TE**, Korman NJ. Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 2000;43: 571-91.

39. **Redman RS**, Thorne EG. Cicatricial pemphigoid in a patient with systemic lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 1981;117:109-110.
40. **Chan LS**, Soong HK, Foster CS, Hammerberg C, Cooper KD. Ocular cicatricial pemphigoid occurring as a sequela of Stevens-Johnson syndrome. *JAMA*. 1991;266(11):1543.
41. **Fleming TE**, Korman NJ. Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 2000;43: 571-91.
42. **Bhol KC**, Dns MJ, Simmons RK, Foster CS, Giancotti FG, Ahmer AR. The autoantibodies to alpha 6 beta 4 integrin of patients affected by ocular cicatricial pemphigoid recognize predominantly epitopes within a large cytoplasmatic domain of huma beta 4. *J Immunol* 2000;165:2824-9.
43. **Oyama N**, Setterfield JF, Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Albert S, Bhogal BS, Vaughan RW, Kaneko F, Challacombe SJ, Black MM. Bullous pemphigoid antigen II (BP 180) and its soluble extracellular domains are major autoantigens in mucous membrane pemphigoid: the pathogenic relevance to HLA clas II alleles and disease severity. *Br J Dermatol* 2006;154:90-8.
44. **Schmidt E**, Skrobek C, Kromminga A, Hashimoto T, Messer G, Bröcker EB, Yancey KB, Zillikens D. Cicatricial pemphigoid: Ig A and Ig G autoantibodies target epitopes on both intra-and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol* 2001;145: 778-83.
45. **Bernauer W**, Wright P, Dart JK, Leonard JN, Lightman S. The conjunctiva in acute and chronic mucous membrane pemphigoid. An immunohistochemical analysis. *Ophthalmology*. 1993;100:339-46.
46. **Black AP**, Seneviratne SJ, Jones L, King AS, Winsey S, Arsecularatne G, Wojnarowska F, Ogg GS. Rapid effector function of circulating NC16A-specific T cells in individuals with mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol* 2004;151:1160-4.
47. **Zakka LR**, Reche P, Ahmed AR. Role of MCH Class II genes in the pathogenesis of pemphigoid. *Autoimmun Rev*. 2011;11:40-7.

48. **Yunis JJ**, Mobini N, Yunis EJ, Alper CA, Deulofeut R, Rodriguez A, et al. Common major histocompatibility complex class II markers in clinical variants of cicatricial pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:47–51.
49. **Chan LS**, Hammerberg C, Cooper KD. Significantly increased occurrence of HLA-DQB1\* 0301 allele in patients with ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1997;108:129–32.
50. **Ahmed AR**, Foster S, Zaltas M, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ. Association of DQw7 (DQB1\*0301) with ocular cicatricial pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:11579-82.
51. **Foster CS**, Sainz de la Maza M. Ocular cicatricial pemphigoid review. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:435-9.
52. **Kirzhner M**, Jakoviec FA. Ocular cicatricial pemphigoid: a review of clinical features, immunopathology, differential diagnosis and current management. *Semin Ophthalmol*. 2011;26:270-7.
53. **Kirtschig G**, Murrell D, Wojnarowska F, Khumalo N. Interventions for mucous membrane pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003: CD004056.
54. **McCluskey P**, Chang JH, Singh R, Wakefield D. Methotrexate therapy for ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology*. 2004;111(4):796-801.
55. **Saw VP**, Dart JK, Rauz S, Ramsay A, Bunce C, Xing W, Maddison PG, Phillips M. Immunosuppressive therapy for ocular mucous membrane pemphigoid strategies and outcomes. *Ophthalmology*. 2008;115:253-61.
56. **Foster CS**, Chang PY, Ahmed AR. Combination of rituximab and intravenous immunoglobulin for recalcitrant pemphigoid: a preliminary report. *Ophthalmology* 2010;117:861-9.
57. **Foster CS**, Ahmed AR. Intravenous immunoglobulin therapy for ocular cicatricial pemphigoid: a preliminary study. *Ophthalmology* 1999;106:2136–43.

- 
58. **Sami N**, Letko E, Androudi S, et al. Intravenous immunoglobulin therapy in patients with ocular-cicatricial pemphigoid: a long-term follow-up. *Ophthalmology* 2004;111:1380-2.
59. **Ross AH**, Jaycock P, Cook SD, et al. The use of rituximab in refractory mucous membrane pemphigoid with severe ocular involvement. *Br J Ophthalmol* 2009;93:421-2, 548.
60. **Shetty S**, Ahmed AR. Critical analysis of the use of rituximab in mucous membrane pemphigoid: a review of the literature. *J Am Acad Dermatol*.2013;68:499-506.
61. **Srikumaran D**, Akpek EK. Mucous membrane pemphigoid: recent advances. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012;23:523-7.
62. **Dart J**. Cicatricial Pemphigoid and dry eye. *Semin Ophthalmol* 2005;20:95-100
63. **Romero-Rangel T**, Stavrou P, Cotter J, Rosenthal P, Baltatzi S, Foster CS. Gas permeable scleral contact lenstherapy in ocular surface diseases. *Am J Ophthalmol*.2000;130:25-32.
64. **Palioura S**, Kim B, Dohlman CH, Chodosh J. The Boston Keratoprosthesis Type I in Mucous Membrane Pemphigoid. *Cornea*. 2013 Mar 27.
65. **Rickham PP**. Human experimentation. Code of Ethics of the world medical association. Declaration of Helsinki. *Br Med J*. 1964;2: 177.
66. **Rice BA**, Foster CS. Immunopathology of cicatricial pemphigoid affecting the conjunctiva. *Ophhtalmology*. 1990;11:1476-83.
67. **Bernauer W**, Wright P, Dart JK, Leonard JN, Lightman S. THE conjunctiva in acute and chronic mucous membrane pemphigoid. An immunohistochemical análisis. *Ophthalmology* 1993;100:339-46.
68. Black AP, Seneviratne SL, Jones L, King AS, Winsey S, Arsecularatne G, Wojnarowska F, Ogg GS. Rapid effector function of circulating NC16A-specific T cells in individuals with mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol* 2004;151:1160-4.

69. **Hertl M**, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1159-66.
70. **Zakka LR**, Reche P, Ahmed AR. Role of MHC Class II Genes in the pathogenesis of pemphigoid. *Autoimmun Rev.* 2011;11:40-7.
71. **Yunis JJ**, Mobini N, Yunis EJ, Alper CA, Deulofeut R, Rodriguez A, et al. Common major histocompatibility complex class II markers in clinical variants of cicatricial pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7747–51.
72. **Chan LS**, Hammerberg C, Cooper KD. Significantly increased occurrence of HLA-DQB1\*0301 allele in patients with ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1997;108:129–32.
73. **Ahmed AR**, Foster S, Zaltas M, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ. Association of DQW7 (DQB1\*0301) with ocular cicatricial pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 15;88(24):11579-82.
74. **Kumari S**, Bhol KC, Rehman F, Foster CS, Ahmed AR. Interleukin-1 components in cicatricial pemphigoid. Role in intravenous immunoglobulin therapy. *Cytokine.* 2001;14:218-24.
75. **Letko E**, Bhol K, Colon J, Foster CS, Ahmed AR. Biology of interleukin-5 in ocular cicatricial pemphigoid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002; 240:565-9.
76. **Lee SJ**, Li Z, Sherman B, Foster CS. Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:3522-5.
77. Saw VP, Dart RJ, Galatowicz G, Daniels JT, Dart JK, Calder VL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in ocular mucous membrane pemphigoid and its effect on conjunctival fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:5310-7.
78. Cordero Coma M, Yilmaz T, Foster CS. Tumour necrosis factor- $\alpha$  in conjunctivae affected by ocular cicatricial pemphigoid. *Acta Ophthalmol Scand.* 2007;85:753-5.

79. Razzaque MS, Foster CS, Ahmed AR. Role of macrophage migration inhibitory factor in conjunctival pathology in ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:1174-81.
80. **Razzaque MS**, Ahmed BS, Foster CS, Ahmed AR. Effects of IL-4 on conjunctival fibroblasts: possible role in ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Aug;44(8):3417-23.
81. **Saw VP**, Offiah I, Dart RJ, Galatowicz G, Dart JK, Daniels JT, Calder VL. Conjunctival interleukin-13 expression in mucous membrane pemphigoid and functional effects of interleukin-13 on conjunctival fibroblasts in vitro. *Am J Pathol.* 2009;175:2406-15.
82. **Lambiase A**, Micera A, Mantelli F, Moretti C, Di Zazzo A, Perella E, Bonini S, Bonini S. T-helper 17 lymphocytes in ocular cicatricial pemphigoid. *Mol Vis.* 2009;15:1449-55.
83. **Beauregard C**, Stevens C, Mayhew E, et al. Cutting edge: atopy promotes Th2 responses to alloantigens and increases the incidence and tempo of corneal allograft rejection. *J Immunol* 2005; 174:6577–6581.
84. **Flynn TH**, Ohbayashi M, Ikeda Y, et al. Effect of allergic conjunctival inflammation on the allogeneic response to donor cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:4044–4049.
85. **Zakka LR**, Reche P, Ahmed AR. Role of MHC Class II Genes in the pathogenesis of pemphigoid. *Autoimmun Rev.* 2011 Nov;11(1):40-7.
86. **Foster CS**, Chang PY, Ahmed AR. Combination of rituximab and intravenous immunoglobulin for recalcitrant ocular cicatricial pemphigoid: a preliminary report. *Ophthalmology.* 2010 May;117:861-9.
87. **Foster CS**, Ahmed AR. Intravenous immunoglobulin therapy for ocular cicatricial pemphigoid: a preliminary study. *Ophthalmology* 1999;106:2136–43.
88. **Sami N**, Letko E, Androudi S, et al. Intravenous immunoglobulin therapy in patients with ocular-cicatricial pemphigoid: a long-term follow-up. *Ophthalmology* 2004;111:1380 –2.

89. **Ross AH**, Jaycock P, Cook SD, et al. The use of rituximab in refractory mucous membrane pemphigoid with severe ocular involvement. *Br J Ophthalmol* 2009;93:421–2, 548.
90. **Kaçmaz RO**, Kempen JH, Newcomb C, Daniel E, Gangaputra S, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT, Suhler EB, Thorne JE, Jabs DA, Levy-Clarke GA, Foster CS. Cyclosporine for ocular inflammatory diseases. *Ophthalmology*. 2010;117:576-84.
91. **Yeh SW**, Usman AQ, Ahmed AR. Profile of autoantibody to basementmembrane zone proteins in patients with mucous membrane pemphigoid: long-term follow up and influence of therapy. *Clin Immunol* 2004;112:268–72.