



**Universidad de Valladolid**



## **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Máster: SUBESPECIALIDADES OFTALMOLÓGICAS**

**Especialidad: INMUNOLOGÍA Y SUPERFICIE OCULAR**

**2016-2017**

# **ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE DE LA MUCOSA OCULAR EN LA ALERGIA OCULAR GRAVE PEDIÁTRICA**

**Alumna: M<sup>a</sup> Soledad Rubio Martínez**

**Director: Dr. Roberto Reinoso Tapia**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor, el Dr. Roberto Reinoso, por su paciencia, ayuda, esfuerzo y supervisiones de todo este trabajo.

A la Profesora Calonge, por sus consejos y animarme a continuar con este trabajo.

A la Dra. Carmen Martín, por su apoyo, esfuerzo y enseñanzas.

A José Carlos, por su aporte en reclutar pacientes y el manejo del citómetro.

A Sonia, por enseñarme a manejar el SPSS.

Al Profesor Pastor, por su empeño en la necesidad constante de seguir formándose y de seguir investigando por y para la Oftalmología.

A todos aquellos que, de alguna manera, colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADEA	Asociación de familiares y pacientes de dermatitis atópica
BC	Beckman Coulter (Marseille, France)
CA	Conjuntivitis alérgica
CALT	Tejido linfoide asociado a la conjuntiva
CL	Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA)
DA	Dermatitis atópica
EALT	Tejido linfoide asociado al ojo
ECD	Ficoeritrina-Texas Red®-X
EGF	Factor de crecimiento epidérmico humano
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Fluoroisotiocianato de Fluoresceína
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IELs	Linfocitos intraepiteliales
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IS	Immunostep (Salamanca, Spain)
LDALT	Tejido linfoide asociado al sistema de drenaje lagrimal
LGALT	Tejido linfoide asociado a la glándula lagrimal
MALT	Tejido Linfoide asociado a las Mucosas
MBP	Proteína principal básica de los gránulos
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MPI	Índice medio de proliferación
OMIS	Sistema inmunitario de la mucosa ocular
OSDI	Ocular surface disease index
PC	Proteína catiónica
PC5	Ficoeritrina-Cianina 5
PC7	Ficoeritrina-Cianina 7
PE	Ficoeritrina
QCA	Queratoconjuntivitis atópica
QCV	Queratoconjuntivitis vernal
RD1	Rodamina
SCFPAF	Factor activador de plaquetas de stem cells
SO	Superficie ocular
T-BUT	Tiempo de ruptura de la película lagrimal
Tc	Linfocitos T citotóxicos
Th	Linfocitos T cooperadores
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VCAM	Molécula de adhesión células vascular

**ÍNDICE:**

	Página
Resumen.....	<b>1</b>
Capítulo 1. Introducción.....	<b>3</b>
1.1. Enfermedad alérgica ocular.....	3
1.2. Tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT).....	6
Capítulo 2. Justificación, hipótesis de trabajo y objetivos.....	<b>9</b>
2.1. Justificación.....	9
2.2. Hipótesis de trabajo.....	9
2.3. Objetivos.....	9
Capítulo 3. Material y métodos.....	<b>11</b>
3.1. Sujetos.....	11
3.2. Obtención de células de la superficie ocular.....	14
3.3. Caracterización de la población celular obtenida.....	15
3.4. Análisis estadístico.....	17
Capítulo 4. Resultados.....	<b>18</b>
4.1. Caracterización de la Queratoconjuntivitis atópica.....	18
4.2. Caracterización de la Queratoconjuntivitis vernal.....	20
4.3. Evaluación de marcadores de alergia ocular grave.....	21
Capítulo 5. Discusión.....	<b>27</b>
Capítulo 6. Conclusiones.....	<b>31</b>
Bibliografía.....	<b>32</b>
Anexos.....	<b>34</b>
I. Comité de Investigación del IOBA y Comité Ético de Investigación Clínica Valladolid Este	
II. Consentimiento informado para procesos alérgicos	
III. Consentimiento informado grupo control	
IV. Cuaderno de recogida de datos	
V. Gráficas del análisis por citometría de flujo	

## **RESUMEN**

### **ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE DE LA MUCOSA OCULAR EN LA ALERGIA OCULAR GRAVE PEDIÁTRICA.**

**Trabajo de Fin de Máster “Inmunología y Superficie Ocular”.**

**Alumna:** M<sup>a</sup> Soledad Rubio Martínez

**Directores:** Dr. Roberto Reinoso Tapia

**Introducción:** El tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT) forma parte del sistema inmunitario de la superficie ocular y proporciona toda una serie de mecanismos de defensa para mantener su integridad. La distribución inmunotopográfica en individuos sanos puede servir para profundizar en el conocimiento de las patologías inflamatorias de la superficie ocular (SO), como las conjuntivitis alérgicas. Este trabajo preliminar pretende iniciar el mismo tipo de análisis en dos enfermedades graves, de naturaleza inflamatoria, con una base alérgica importante, la queratoconjuntivitis atópica (QCA) y la queratoconjuntivitis vernal (QCV). A día de hoy, el diagnóstico es clínico, siendo en ocasiones difícil el diagnóstico diferencial de estas dos entidades. Este estudio podría ayudar a entender algunos aspectos de su fisiopatología.

**Material y métodos:** Se recogieron muestras mediante citología por cepillado de la conjuntiva tarsal superior de 14 niños con QCV, 12 niños con QCA y 21 niños sanos que sirvieron como control. Se analizó el porcentaje de linfocitos intraepiteliales (IELs), sus principales subtipos, el porcentaje de células viables y en apoptosis, así como el estado proliferativo celular mediante citometría de flujo.

**Resultados:** En el grupo de pacientes con QCA y QCV se observó un aumento de linfocitos T al compararlos con el grupo control, una disminución de los linfocitos B, así como un aumento del porcentaje de linfocitos NK. En el estudio de viabilidad se apreció un aumento de la apoptosis precoz de las células complejas en los pacientes con QCA y QCV al compararlos con el control, y una disminución de la apoptosis tardía de dichas células. El estudio del ciclo celular mostró una disminución de la proliferación celular en ambos grupos al compararlos con los sujetos sanos.

**Conclusiones:** El tejido linfoide asociado a la conjuntiva varía fenotípica y funcionalmente en pacientes con QCA y QCV con respecto a individuos sanos. En la fisiopatología de la enfermedad, interviene además de una respuesta inmune adquirida, una respuesta inmune innata (linfocitos NK), variable inmunológica que se podría utilizar como biomarcador diagnóstico.



# 1. INTRODUCCIÓN

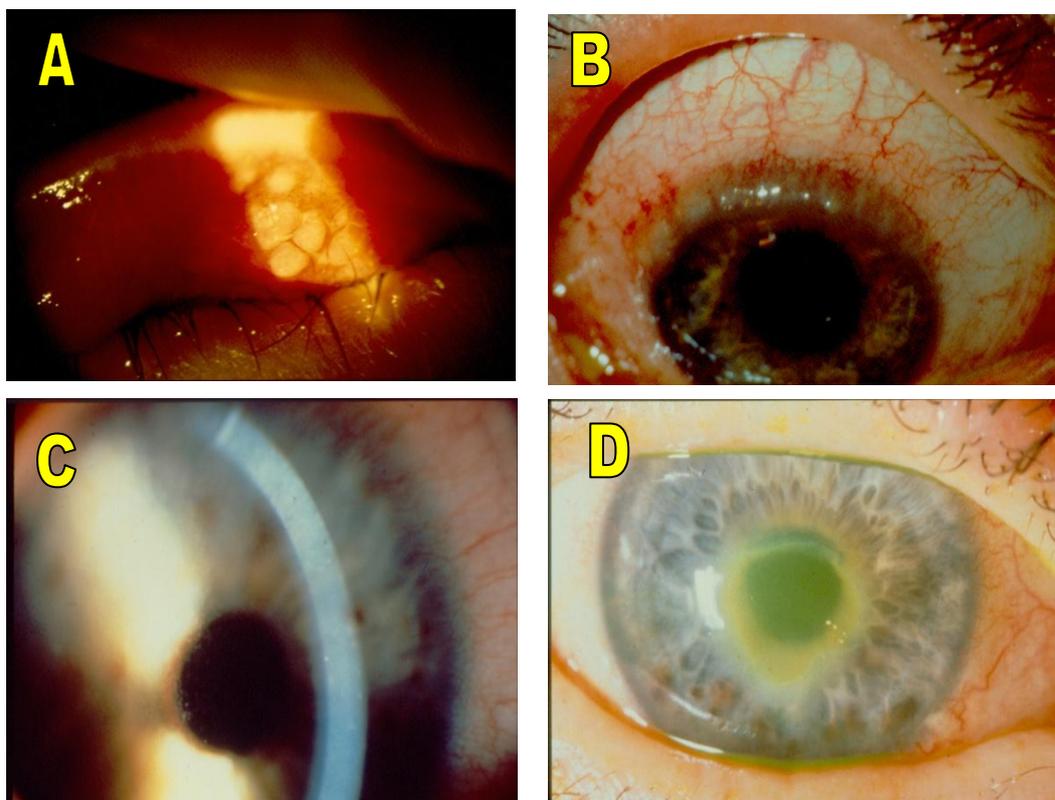
## 1.1 ENFERMEDAD ALÉRGICA OCULAR

La alergia ocular es una afección muy común que afecta a un 17-20% de la población y con perfil de incidencia creciente. Comprende entidades agudas como la conjuntivitis alérgica (CA) estacional y la perenne y otras crónicas, potencialmente más susceptibles de causar daño ocular y pérdida de la visión como la queratoconjuntivitis vernal (QCV) y la queratoconjuntivitis atópica (QCA), estas dos últimas asociadas a riesgo de ulceraciones, vascularización y cicatrización corneal<sup>1</sup>.

Tanto la QCA como las QCV están consideradas como enfermedades raras, huérfanas o poco frecuentes, entendiéndose como enfermedad rara por la Unión Europea, Reglamento (CE) nº 141/2000 1: "... son enfermedades potencialmente mortales, o debilitantes a largo plazo, de baja prevalencia y alto nivel de complejidad ...". La prevalencia de una enfermedad rara, huérfana o poco frecuente, es de unos 5 casos por cada 10.000 habitantes. A pesar de su baja incidencia en la población, la QCA y la QCV son consideradas como potencialmente graves, pudiendo llegar a generar una severa disminución de la agudeza visual del paciente con cambios oculares irreversibles en su superficie ocular.

La QCV representa tan sólo el 0,5% de la alergia ocular. Se presenta en niños, con una incidencia máxima entre los 11 y los 13 años. Normalmente se trata de una enfermedad autolimitada de entre 2-10 años de duración, resolviéndose entre la pubertad y el comienzo de la edad adulta, aunque a veces puede convertirse en una QCA en la edad adulta. Se asocia a factores climáticos, siendo más frecuente en climas cálidos como la cuenca Mediterránea, Sudamérica, África, Oriente Medio e India. La QCV es una entidad crónica y bilateral, aunque puede ser asimétrica, que se puede presentar durante todo el año con exacerbaciones. El cuadro clínico puede ir desde formas leves con los síntomas cardinales de toda alergia ocular: prurito, molestia, lagrimeo, fotofobia y secreción mucosa hasta formas graves, con la presencia de úlceras en escudo y neovascularización. Existen formas tarsales, que se caracteriza por la presencia de papilas gigantes acompañadas de abundante secreción mucosa; formas limbares, caracterizado por limbitis en forma de papilas limbares y nódulos de Horner-Tranta, y formas mixtas. En la córnea puede aparecer conjuntivalización superior, queratitis epitelial de Togby y úlceras en escudo, que son

características de la enfermedad. A diferencia de la QCA, en la QCV no se produce reacción conjuntival cicatricial<sup>2</sup>.



**Figura 1.** Signos clínicos de la queratoconjuntivitis vernal. (A) Papilas en conjuntiva tarsal superior. (B) Nódulos de Horner-Trantas. (C) Queratitis punteada difusa de Tobgy. (D) Úlcera en escudo. Imágenes cedidas por la Unidad de Inmunología Ocular del HCUV e IOBA.

La QCA representa menos del 1% de las alergias oculares. Afecta principalmente a adultos jóvenes con un pico de presentación entre los 30 y 50 años de edad. La QCA constituye la afectación ocular de la dermatitis atópica (DA)<sup>3</sup>. La DA es un desorden cutáneo que se caracteriza por la presencia de una erupción pruriginosa con eritema y descamación en sitios típicos. Se manifiesta en los primeros 18 años de vida en un 65% de los pacientes y persiste más allá de la adolescencia en un 40%. Su prevalencia está en aumento en los países desarrollados y así, en Estados Unidos es del 17% y en España según la ADEA (Asociación familiares y Pacientes de Dermatitis Atópica) aproximadamente el 10% de la población la padece. El componente ocular está presente entre un 20-40%, con evolución de la inflamación ocular independiente al grado de severidad de la afectación en piel. Cuando la presencia de DA, pasada o presente, no está clara suelen ser considerados otros subtipos de alergia ocular, lo que muchas veces retrasa el control de síntomas y genera una evolución poco satisfactoria. La QCA varía desde casos leves, que generan los síntomas

típicos de cualquier proceso alérgico ocular, hasta casos severos con fibrosis subepitelial, cicatrización conjuntival, acortamiento de los fondos de saco, neovascularización y úlceras corneales centrales o periféricas con tendencia a la sobreinfección y con posibilidad de alteraciones herpéticas bilaterales graves. A nivel palpebral puede aparecer eccema, pliegue de Dennie-Morgan o el signo de Hetoghe. Es una entidad crónica y bilateral, que se suele presentar durante todo el año sin predilección climática y ni asociación específica a la exposición de determinados alérgenos<sup>3</sup>.

Se han descrito varias manifestaciones extraoculares asociadas tanto con QCA como con QCV, como asma, rinitis alérgica, urticaria, trastornos neuro-psicóticos y migraña, entre otros<sup>3</sup>. Existe una predilección por la afectación de diferentes órganos llamados diana en las alergias: piel, pulmones, nariz y ojos; esta hiperreactividad en estos tejidos representa un reto poco explorado, ya que es difícil precisar si existe un estímulo base, apartando la reacción inflamatoria producida por la alergia, que se traduzca en tal preferencia. Dentro de otras hipótesis, se plantea que esto esté causado por una mezcla entre expresión de genes, biomarcadores, modulación nerviosa e inmunológica y por último, interacción con el medio ambiente.

El diagnóstico diferencial de las alergias oculares debe excluir otras patologías que cursen con ojo rojo con síntomas asociados de picor, quemazón y lagrimeo, como las autoinflamatorias por síndrome de ojo seco, blefaritis, y las conjuntivitis infecciosas bacterianas y víricas, ya que la presentación clínica y los síntomas pueden ser comunes entre algunos de estos cuadros. Las conjuntivitis por Chlamydia también deben tenerse en cuenta dado el aumento de las enfermedades de transmisión sexual. Además, el uso cada vez más frecuente de colirios y lentes de contacto hace que se observen cada vez más cuadros de reacciones conjuntivales asociados a estas sustancias. Otra causa de conjuntivitis crónica es el síndrome del párpado flácido.

La presencia de eosinófilos y mastocitos en la conjuntiva se considera diagnóstica de alergia ocular, si bien pueden no aparecer en fases de inactividad o tras el tratamiento en las queratoconjuntivitis. La IgE por encima de 16 UI/mL en lágrima se considera también diagnóstica de alergia ocular. Aunque existen diferencias en el perfil de citocinas/quimiocinas en lágrimas de pacientes con QCA, QCV y CA respecto a individuos sanos, hasta el momento no se ha descrito ningún biomarcador que permita diferenciar entre los diferentes tipos de alergias oculares.

Los mastocitos son los causantes primarios de la reacción de hipersensibilidad en las conjuntivitis estacionales y perennes. En el caso de las queratoconjuntivitis, hay

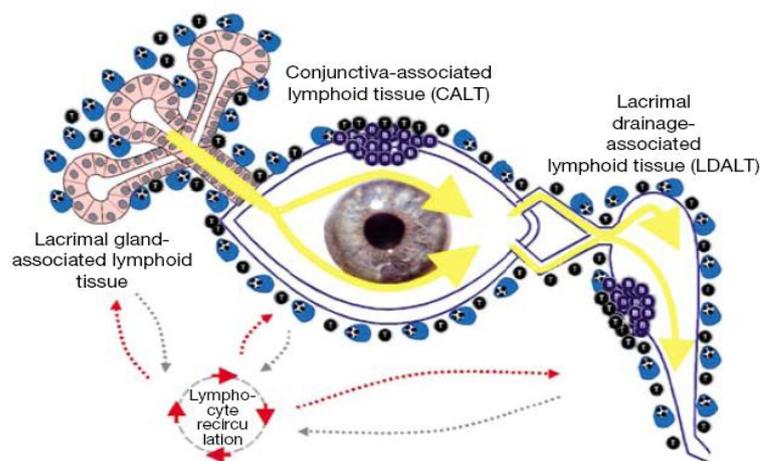
participación de linfocitos T y eosinófilos además de los mastocitos. En la QCA y QCV, se cree que el daño corneal ulcerativo puede estar desencadenado por la proteína principal básica de los gránulos (MBP) y proteína catiónica (PC) de eosinófilos<sup>4</sup>.

Los síntomas de la alergia aparecen cuando los alérgenos se unen a la IgE en los mastocitos de la conjuntiva de individuos hipersensibilizados, lo que causa degranulación, liberándose mediadores inflamatorios como la histamina, leucotrienos, prostaglandinas, triptasa y citocinas. Estos mediadores disparan la reacción alérgica y sus manifestaciones clínicas (escozor, lagrimeo, enrojecimiento, secreción mucosa y aumento de la permeabilidad vascular). La exposición a altas cantidades de antígeno puede hacer que esta respuesta aguda pase a ser una respuesta tardía tipo Th2 mediada por linfocitos T y eosinófilos. Los mediadores de esta respuesta incluyen IL4, IL-5, IL-6, IL-8, IL13, SCFPAF (factor activador de plaquetas de stem cells) y TNF, así como RANTES, MCP-1, eotaxina, ICAM-1, VCAM y p-selectina, que colaboran en el reclutamiento de eosinófilos y neutrófilos, haciendo que persistan los síntomas.

## 1.2. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA CONJUNTIVA

En términos generales, la superficie ocular (SO) está constituida por los epitelios de la conjuntiva y la córnea, por las glándulas productoras de los componentes de la lágrima y por el sistema neuro-humoral que las conecta y mantiene. Todas las células implicadas en la respuesta inmunitaria ocular están coordinadas en la protección de la SO y a todo este conjunto de células se le denomina sistema inmunitario de la mucosa ocular (*ocular mucosal immune system*, OMIS) o tejido linfoide asociado al ojo (*eye-associated lymphoid tissue*, EALT), que actuaría como una unidad anatómica y funcional y protectora de la mucosa ocular y que englobaría al tejido linfoide asociado a la conjuntiva (*conjunctiva-associated lymphoid tissue*, CALT), al tejido linfoide asociado al sistema de drenaje lagrimal (*lacrimal drainage-associated lymphoid tissue*, LDALT) y al tejido linfoide asociado a la glándula lagrimal (*lacrimal gland-associated lymphoid tissue*, LGALT)<sup>5</sup> (Figura 2).

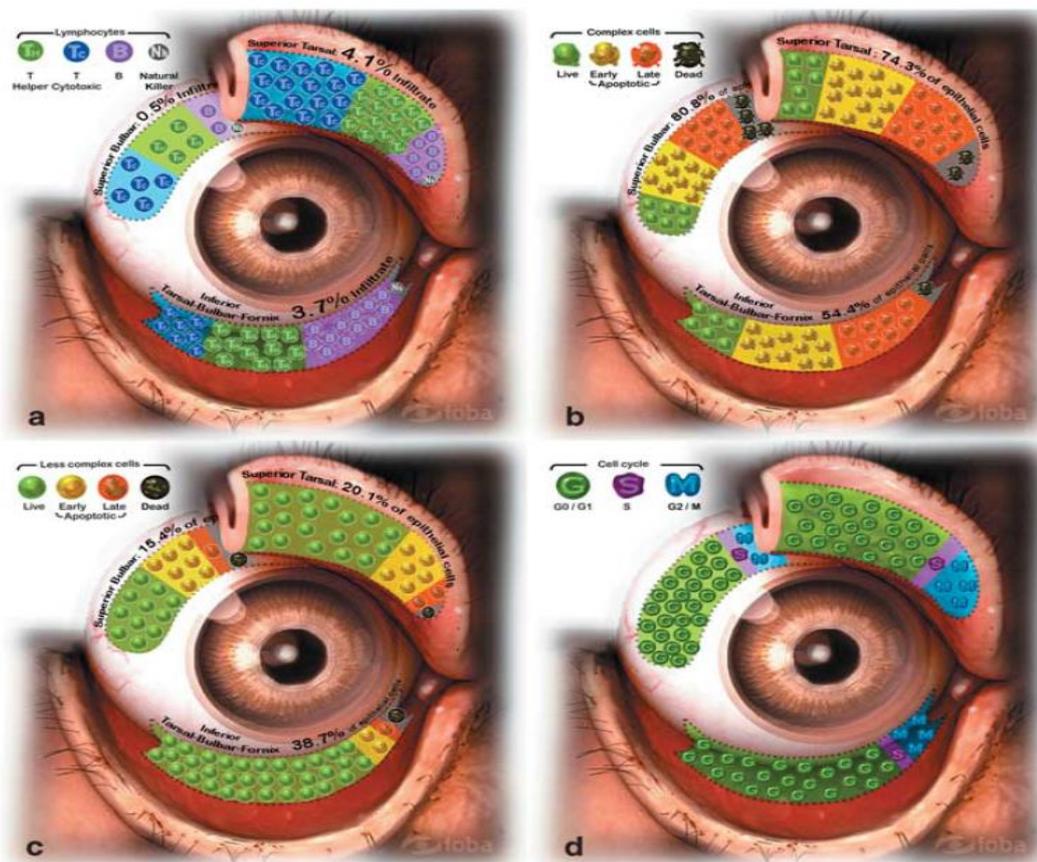
La conjuntiva es una membrana mucosa transparente cuya función principal es proteger la córnea frente a agentes externos. Para ello presenta diferentes células inmunes ligadas a esta mucosa, es decir, un tejido linfoide asociado (*mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT), o más concretamente, un CALT que le va a proporcionar toda una serie de mecanismos de defensa (innatos y adaptativos) para mantener íntegra la superficie ocular.



**Figura 2.** Sistemas inmune asociado a la mucosa ocular.<sup>5</sup>

El CALT se encuentra formado por tejido linfático organizado (folículos linfoides) donde predominan las células B, y por tejido linfático difuso, principalmente compuesto por linfocitos T y células plasmáticas productoras de IgA, distribuidos arbitrariamente entre el epitelio (linfocitos intraepiteliales) y el tejido conectivo subyacente (linfocitos de *lamina propria*)<sup>5</sup>.

Nuestro grupo de investigación estudió la mucosa ocular en individuos sanos a nivel de superficie ocular, caracterizándose la infiltración linfocitaria, viabilidad celular y proliferación celular. Esto permitió establecer diferencias en función de la zona topográfica analizada, confeccionándose un mapa inmunológico de la conjuntiva sana a partir de las células obtenidas de 63 voluntarios<sup>6</sup>. Esta caracterización inicial es de vital importancia al servir de referencia para su posterior comparación con diferentes entidades clínicas que afectan a la superficie ocular. Este y otros estudios<sup>5</sup> han hecho caer el paradigma previo de que el CALT se encontraba exclusivamente asociado a procesos inflamatorios, demostrándose que forma parte intrínseca de la conjuntiva humana sana. Se evidenció que en el fondo de saco inferior existe mayor número de linfocitos B y linfocitos cooperadores, lo que representaría la zona de activación de la respuesta inmune. Por el contrario, la zona bulbar y tarsal superior presentan mayor capacidad proliferativa, y representa la zona efectora del sistema inmune<sup>6</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Distribución topográfica de los linfocitos intraepiteliales (*intraepithelial lymphocytes*, IELs), células vivas y muertas, células en apoptosis precoz y tardía y fases del ciclo celular en tres regiones de la conjuntiva humana. **(a)** Porcentaje de linfocitos Th, Tc, B y células NK. **(b)** Porcentaje de células complejas vivas, muertas, en apoptosis precoz y en apoptosis tardía. **(c)** Porcentaje de células simples vivas, muertas, en apoptosis precoz y en apoptosis tardía. **(d)** Porcentaje de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M del ciclo celular.<sup>6</sup>

Este sistema inmunitario sufre cambios con la edad que producen las diferencias que aparecen entre las distintas regiones topográficas en individuos sanos añosos, ya que a edades más jóvenes, realmente no existen diferencias linfocitarias fenotípicas entre las distintas zonas conjuntivales, sino que éstas podrían aparecer con el paso del tiempo y la consecuente inmunosenescencia del sistema inmunitario de la SO.

Con la experiencia adquirida en estos proyectos, y teniendo como referencia los resultados obtenidos en la conjuntiva sana, nuestro grupo de investigación se propuso buscar biomarcadores para el síndrome de ojo seco, una de las patologías inflamatorias, junto con la alergia ocular, más frecuentes y prevalentes en nuestro entorno. El estudio demostró que determinadas variables inmunológicas como la viabilidad celular, la infiltración linfocitaria, el cociente CD4/CD8 y el ciclo celular son útiles en el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad<sup>7</sup>.

## **2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

### **2.1. JUSTIFICACIÓN**

Los biomarcadores pueden ser usados tanto en el diagnóstico de una enfermedad (biomarcador diagnóstico), como para determinar su grado de gravedad (biomarcador de actividad) o también para el seguimiento de un tratamiento instaurado (biomarcador terapéutico). Existe un interés creciente en la determinación de estas moléculas en alergias oculares. El adecuado conocimiento del sistema inmunitario de la mucosa ocular en individuos sanos permite comprender las patologías inflamatorias del ojo, sean estas de etiología infecciosa, autoinmune o alérgica, y localizar biomarcadores solubles o celulares/tisulares que permitan identificar diferentes situaciones inflamatorias o realizar un seguimiento de la evolución de las mismas tras diversos tratamientos sistémicos o tópicos. La experiencia acumulada en el estudio del sistema inmune de la SO y el conocimiento de los mecanismos subyacentes en las alergias, nos permitirá tener una perspectiva de los resultados potencialmente útiles en el diagnóstico y seguimiento de estas patologías.

### **2.2. HIPÓTESIS**

El sistema inmune asociado a la mucosa ocular, y más concretamente, el CALT, alérgicas varía funcional y fenotípicamente en individuos con enfermedad alérgica ocular grave (QCA y QCV), con respecto a individuos sin patologías de la SO.

### **2.3. OBJETIVOS**

- Caracterización fenotípica y funcional, mediante citometría de flujo, de las células conjuntivales obtenidas en pacientes con QCA, evaluando las subpoblaciones linfocitarias, la viabilidad y la fase del ciclo celular del epitelio conjuntival obtenido mediante cepillado.
- Caracterización fenotípica y funcional, mediante citometría de flujo, de las células conjuntivales obtenidas en pacientes con QCV, evaluando las subpoblaciones linfocitarias, la viabilidad y la fase del ciclo celular del epitelio conjuntival obtenido mediante cepillado.

- Comparación entre la conjuntiva ocular de pacientes con enfermedad alérgica ocular grave (QCA y QCV) y el grupo control, con el fin de evaluar la utilidad de los parámetros inmunológicos analizados como marcadores diagnósticos de queratoconjuntivitis alérgica.
- Evaluación de la existencia de marcadores diferenciales según el tipo de queratoconjuntivitis alérgica.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. SUJETOS**

El reclutamiento de los participantes del estudio se llevó a cabo en el servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV) y en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de Valladolid. Este estudio se realizó previa obtención del consentimiento informado según la legislación vigente en España y previa aprobación de la Comisión de Investigación del IOBA y del comité de ética del HCUV (Anexo I). Este estudio se le propuso a todos los pacientes que acudieron a consulta y cumplían con los criterios de selección requeridos para llevarlo a cabo. Cada donante fue informado de las características del estudio y del procedimiento de obtención de células, firmando el consentimiento informado que se adjunta su padre/madre/tutor legal (Anexo II y III).

Se trata de un estudio caso-control con 3 muestras poblacionales diferentes: un grupo de sujetos diagnosticados clínicamente de QCA, otro grupo de sujetos diagnosticados clínicamente de QCV, y una población de sujetos sanos de edad pediátrica.

#### **3.1.1. Sujetos diagnosticados de QCA**

Se reclutaron 12 casos con QCA, con un rango de edad de 5 a 18 años a los que se les realizó la citología por cepillado en la conjuntiva tarsal superior de un solo ojo, previo examen oftalmológico. Para ello, se tuvieron en cuenta una serie de criterios de inclusión y exclusión:

##### **a) Criterios de inclusión QCA:**

- Participación voluntaria en el estudio.
- Edad de inclusión de los participantes entre 3 y 18 años.
- Selección de sujetos con diagnóstico de queratoconjuntivitis atópica.
- Presentación de un cuadro activo.

##### **b) Criterios de exclusión QCA:**

- Padecimiento de patologías crónicas autoinmunes o autoinflamatorias.
- Tratamiento farmacológico inmunosupresor, inmunomodulador o antiinflamatorio sistémico, o tratamiento tópico en las 6 semanas previas, excepto lágrimas artificiales.

- Cuadros inflamatorios agudos de origen no-alérgico en las dos semanas previas.
- Antecedentes personales de neoplasias hematológicas, trasplante de progenitores hematopoyéticos, radioterapia o quimioterapia.
- Uso de lentes de contacto los 3 meses previos.

### **3.1.2. Sujetos diagnosticados de QCV**

Se reclutaron 14 casos con QCV activa, con un rango de edad de 5 a 18 años a los que se les realizó la citología por cepillado en la conjuntiva tarsal superior de un solo ojo, previo examen oftalmológico. Para ello, se tuvieron en cuenta una serie de criterios de inclusión y exclusión:

#### **a) Criterios de inclusión QCV:**

- Participación voluntaria en el estudio.
- Edad de inclusión de los participantes entre 3 y 18 años.
- Selección de sujetos con diagnóstico de queratoconjuntivitis vernal, ya sea en su forma palpebral o mixta.
- Presentación de un cuadro activo.

#### **b) Criterios de exclusión QCV:**

- Padecimiento de patologías crónicas autoinmunes o autoinflamatorias.
- Tratamiento farmacológico inmunosupresor, inmunomodulador o antiinflamatorio sistémico, o tratamiento tópico en las 6 semanas previas, excepto lágrimas artificiales.
- Queratoconjuntivitis vernal en su forma limbar.
- Cuadros inflamatorios agudos de origen no-alérgico en las dos semanas previas.
- Antecedentes personales de neoplasias hematológicas, trasplante de progenitores hematopoyéticos, radioterapia o quimioterapia.
- Uso de lentes de contacto los 3 meses previos.

### **3.1.3 Sujetos del grupo control**

Asimismo, se reclutaron de 21 controles con un rango de edad de 2 a 18 años sin patología de la SO ni signos de inflamación (pacientes de cirugía de estrabismo, previamente a la misma). La decisión de incluir pacientes prequirúrgicos como controles fue, en primer lugar, porque carecen de enfermedad inflamatoria de la SO y, por tanto, son

individuos sanos desde el punto de vista inmunológico. En segundo lugar, el hecho de que fueran a ser sometidos a un procedimiento invasivo programado por su patología estrábica, ahorró al paciente de un nuevo episodio traumático para obtener las muestras para el estudio. Del mismo modo, se tuvieron en cuenta una serie de criterios de inclusión y exclusión:

**a) Criterios de inclusión grupo control:**

- Participación voluntaria en el estudio
- Edad de inclusión de los participantes entre 3 y 18 años.
- Pacientes con estrabismo que fueron intervenidos quirúrgicamente de forma programada.

**b) Criterios de exclusión grupo control:**

- Padecer enfermedad inflamatoria de la SO.
- Padecimiento de patologías crónicas autoinmunes o autoinflamatorias.
- Tratamiento farmacológico inmunosupresor, inmunomodulador o antiinflamatorio sistémico o tratamiento tópico en las 6 semanas previas.
- Cuadros inflamatorios agudos de origen no-alérgico en las dos semanas previas.
- Antecedentes personales de neoplasias hematológicas, trasplante de progenitores hematopoyéticos, radioterapia o quimioterapia.
- Uso de lentes de contacto en las dos semanas previas.
- Antecedente de cirugía ocular previa.

Todos los sujetos incluidos en el estudio fueron evaluados con el cuestionario OSDI versión española. Se les realizó una exploración oftalmológica consistente en un estudio de la agudeza visual máxima corregida en ambos ojos, un estudio de la motilidad ocular extrínseca y biomicroscopía de polo anterior, y al menos dos de los tres de los siguientes test de superficie ocular:

- Tiempo de ruptura lagrimal (TBUT)  $\geq$  10 segundos.
- Tinción corneal con fluoresceína negativa.
- Test de Schirmer con anestesia  $\geq$  5mm a los 5 minutos.

Además, se recogieron datos clínicos como síntomas y signos del paciente, tiempo de evolución y tratamientos prescritos (antivirales tópicos, antibióticos, esteroides tópicos,

inmunomoduladores, etc). Todos estos datos fueron recogidos en una cuaderno de recogida de datos (ANEXO IV).

### 3.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LA SUPERFICIE OCULAR

La obtención mínimamente invasiva de células de la SO se llevó a cabo mediante citología por cepillado en la conjuntiva tarsal superior de los donantes seleccionados. Las muestras del estudio fueron recogidas por dos residentes de Oftalmología del HCUV.

#### Citología por cepillado:

Previa anestesia tópica (0.04% oxybuprocaine), se procedió a la rotación suave del cepillo (Cytobrush® plus GT, Medscand Medical, Sweden) sobre la conjuntiva tarsal superior de los donantes enfermos. A continuación, se desprendieron las células por rotación circular del cepillo durante 30 segundos en un tubo Eppendorf que contenía 1,4 ml de medio de transporte y/o cultivo [DMEM/F12 suplementado con 1 mg/ml de insulina pancreática bovina, 2 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano (EGF), 0.1 mg/ml de toxina colérica, 5 mg/ml de hidrocortisona, suero fetal bovino (FBS) al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50mg/ml de estreptomycin y 2,5 mg/ml de anfotericina B].

Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones más, siempre realizándolo en el mismo sitio y con el mismo procedimiento. Posteriormente, se transportó al laboratorio para su posterior análisis en un periodo de tiempo inferior a 12 horas.

En el caso de los donantes del grupo control, se les practicó anestesia general por su procedimiento quirúrgico de su patología estrábica. La anestesia general se realizó con sevoflurano 1,2CAM , atropina 0,01-0,02 mg/kg, fentanilo 3µg/kg y rocuronio 0,6mg/kg. También se les administró anestesia tópica (0.04% oxybuprocaine). Al igual que en el caso anterior, se tomaron tres muestras de la misma zona topográfica con la misma técnica anteriormente descrita (Figura 4).



**Figura 4:** Toma de muestra en conjuntiva tarsal superior mediante citología por cepillado.

### 3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR OBTENIDA

La caracterización fenotípica y funcional de las células conjuntivales obtenidas se realizó mediante citometría de flujo. Para llevar a cabo dicha caracterización, se realizaron tres tipos de análisis: población celular (tubo 1y 2), viabilidad/apoptosis (tubo 3) y fase del ciclo celular (tubo 4).

Las células recuperadas de la SO fueron incubadas con diferentes anticuerpos y/o marcadores (Tabla 1) y analizadas utilizando el citómetro de flujo FC 500 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA), compuesto de 2 láseres (Argón, que excita a 488 nm, y láser de Helio-Neón que excita a 633 nm) y 5 fotomultiplicadores: FL1 (525nm), FL2 (575 nm), FL3 (620 nm), FL4 (675 nm) y FL5 (755 nm).

**Tabla 1.** Anticuerpos monoclonales y marcadores utilizados en citometría de flujo.

<b>Tubo</b>	<b>Anticuerpo/marcador</b>	<b>Clon</b>	<b>Población</b>	<b>Compañía</b>
1	CD45-PC7	J33	Leucocitos	BC
	CD3-FITC	33-2A3	Linfocitos T	IS**
	CD19-PC5	J4.119	Linfocitos B	BC
	CD16-PE	B73.1	Linfocitos NK	CL***
	CD56-PE	NCAM 16.2	Linfocitos NK	CL
2	CD45-FITC	B3821F4A	Leucocitos	BC
	CD3-PC5	UCHT1	Linfocitos T	BC*
	CD4-RD1	SFC112T4D11	Linfocitos T cooperadores (T <sub>h</sub> )	BC
	CD8-ECD	SFC121Thy2D3	Linfocitos T citotóxicos (T <sub>c</sub> )	BC
3	Anexina V-FITC	No procede	Viabilidad/apoptosis	IS
	Ioduro de Propidio	No procede	Viabilidad/apoptosis	BC
4	Ioduro de Propidio	No procede	Ciclo celular	BC

PC5: Ficoeritrina-Cianina 5; RD1: Rodamina; ECD: Ficoeritrina-Texas Red<sup>®</sup>-X; FITC: Fluoroisocianato de Fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PC7: Ficoeritrina-Cianina 7.

\*BC: Beckman Coulter (Marseille, France).

\*\*IS: Immunostep (Salamanca, Spain).

\*\*\*CL: Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA).

### **Protocolo:**

Se llevaron a cabo tres procedimientos distintos para determinar el inmunofenotipo, la viabilidad apoptosis, y el ciclo celular de las células recogidas por cepillado conjuntival. Los ensayos se realizaron en cuatro tubos distintos, cada uno con 300µl de la suspensión de células. Las células fueron lavadas con 2mL de solución de lavado (CellWASH Solution, BD biosciencias, San Jose, USA) para eliminar cualquier resto del medio de cultivo. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 500g y se descartó el sobrenadante.

#### **3.3.1. Linaje celular (estudio fenotípico)**

Tras la centrifugación, las células fueron incubadas en oscuridad con los anticuerpos correspondientes (Tabla 1) durante 15 minutos a temperatura ambiente (4 µl de la mezcla de anticuerpos para el tubo 1 y 2.5 µl de cada anticuerpo para el tubo 2). Posteriormente, las células se fijaron (15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad) con 500 µl de una solución de lisis-fijación (FACS™ Lysing solution, BD biosciencias, San Jose, USA) para posteriormente ser analizadas con el citómetro de flujo.

#### **3.3.2. Viabilidad (estudio de apoptosis)**

Las células fueron resuspendidas con 100 µl de una solución tampón (Annexin V Binding Buffer, Immunostep, Salamanca, Spain). Posteriormente, las células se incubaron en oscuridad con 2.5 µl de anexina V-FITC (25 µg/ml) y 5 µl de Ioduro de Propidio (a 250 µg/ml) durante 10 minutos a 4°C (Tabla 1). Finalmente, se añadió 400 µl de la solución tampón a la muestra celular quedando lista para su estudio por citometría de flujo.

#### **3.3.3. Ciclo celular (estudio del contenido de ADN)**

Las células fueron permeabilizadas con 50 µl de una solución detergente (DNA-prep LPR, Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA). A continuación, se añadió 1 ml de una solución con Ioduro de propidio (DNA-prep Stain, Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA) (tabla 1), se agitó suavemente y se incubó en oscuridad durante 30 minutos en una estufa, quedando listas las células para ser analizadas con el citómetro de flujo. El Índice medio de proliferación (*mean proliferative index*, MPI) se calculó como el ratio  $(S + G_2/M)/(G_0/G_1 + S + G_2/M)$ , donde S fue el porcentaje de células en fase S,  $G_2/M$  el porcentaje de  $4n$  células en fase  $G_2$  y M, y  $G_0/G_1$  el porcentaje de  $2n$  células en fase  $G_0$  y  $G_1$ .

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos fueron recogidos en un cuaderno de laboratorio en papel y trasladados a una hoja Excel (Microsoft Excel 2016<sup>®</sup>, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Los datos fueron analizados con el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 20.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Los datos recogidos del citómetro son porcentuales y además se calcularon los siguientes índices (que se indican en tanto por 1):

$$\text{Cociente } CD4^+ / CD8^+ = \frac{\% \text{ células } CD4^+}{\% \text{ células } CD8^+}$$

$$\text{Cociente } CD3^+ / CD19^+ = \frac{\% \text{ células } CD3^+}{\% \text{ células } CD19^+}$$

$$MPI = \frac{S + G_2/M}{G_0/G_1 + S + G_2/M}; \text{ donde } \left\{ \begin{array}{l} S \rightarrow \% \text{ Células en fase } S \\ G_0/G_1 \rightarrow \% \text{ Células en fase } G_0/G_1 \\ G_2/M \rightarrow \% \text{ Células en fase } G_2/M \end{array} \right\}$$

Se realizó en primer lugar un estudio descriptivo de los resultados obtenidos para ambos grupos, incluyendo n válido, mínimo, máximo, media, mediana, error estándar de la media (SD/  $\sqrt{n}$ ) y percentiles 25 y 75. Para la comparación de medias entre los diferentes grupos de estudio se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni para aquellos parámetros en los que se confirmaron la distribución normal y la similitud de sus varianzas, y la corrección de Games-Howell para aquellos parámetros con una distribución normal y pero con diferencias en sus varianzas. Para aquellos parámetros que no presentaron una distribución normal se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis. Se estableció el límite significativo en un valor  $p < 0.05$ , y se consideró  $0.05 < p < 0.2$  tendencia. Los resultados se anotan en el texto como media +/- error estándar.

## 4. RESULTADOS

En este capítulo se exponen los principales resultados obtenidos durante la realización de este trabajo. Los ejemplos representativos de los análisis de citometría de flujo (fenotipo celular, viabilidad celular y ciclo celular) se exponen al final de la memoria como ANEXO V.

### 4.1. Caracterización de la QCA:

A continuación se detallan los resultados obtenidos en este grupo de pacientes alérgicos para cada una de las variables inmunológicas analizadas.

- **Linfocitos y subpoblaciones linfocitarias:**

La mayor parte de las células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado fueron de origen epitelial (CD45-). Sin embargo, se observó una pequeña población de células CD45+, es decir, de linfocitos intraepiteliales (7,34%  $\pm$ 1,37). Estos linfocitos fueron predominantemente linfocitos T (80,88%  $\pm$ 2,07), siendo el porcentaje de linfocitos cooperadores, Th, (40,42%  $\pm$ 3,6) similar al porcentaje de linfocitos citotóxicos, Tc, (39,36%  $\pm$ 2,47). También se encontraron linfocitos B (16,17%  $\pm$ 1,22) y, en menor medida, linfocitos NK (5,56%  $\pm$ 1,36). El valor de los cocientes CD4/CD8 y CD3/CD19 fue 1,11  $\pm$ 0,95 y 5,41  $\pm$ 0,59, respectivamente. (Figura 5.a).

- **Viabilidad/Apoptosis:**

En primer lugar, se realizó forward scatter (FS) y side scatter (SS) para determinar tamaño y complejidad respectivamente. A continuación, la diferente expresión de los marcadores Anexina V-FITC y Ioduro de Propidio permitió el análisis de la viabilidad.

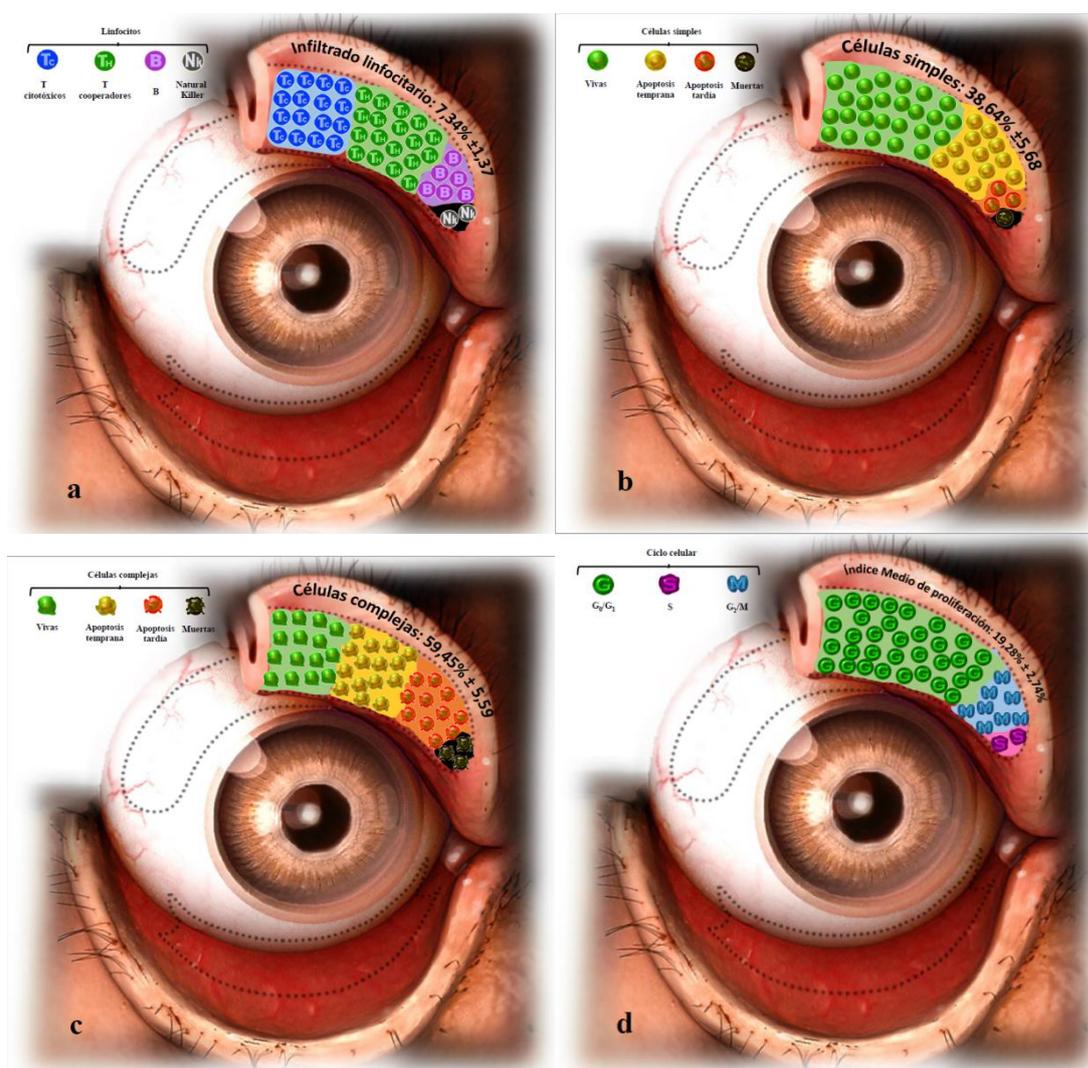
Según la granularidad del citoplasma, se observaron dos poblaciones celulares que fueron analizadas de forma independiente. Una población estaba formada por células simples o de baja complejidad y pequeñas; la segunda se trataba de células más complejas y de mayor tamaño.

Las células simples constituían el 39,18%  $\pm$ 5,56 de las células totales. Estas eran mayoritariamente viables (89,27%  $\pm$ 3,94), seguidas por las que se encontraban en fase temprana de la apoptosis (6,64%  $\pm$ 2,74) y tardía (2,64%  $\pm$ 1,25) y, por último, muertas (1,64%  $\pm$ 0,64) (Figura 5.b). En cuanto a las células complejas, constituían el 59,09%  $\pm$ 5,51 de las células totales. Casi un tercio de ellas eran viables (30,91%  $\pm$ 3,62). Poco más de la mitad de las células complejas se encontraban en apoptosis, tanto en fase precoz de la

apoptosis ( $31,91\% \pm 6,29$ ), como en fase tardía de la apoptosis ( $27,91\% \pm 5,23$ ). Por último, se encontró un pequeño porcentaje de células muertas ( $3,73\% \pm 0,87$ ) (Figura 5.c).

- **Ciclo celular:**

Referente a las fases del ciclo celular, se encontró un mayor porcentaje de células conjuntivales en la fase quiescente  $G_0/G_1$  ( $80,46\% \pm 2,72$ ), seguidas de células conjuntivales en fase de mitosis  $G_2/M$  ( $17,05\% \pm 2,55$ ) y en fase de síntesis  $S$  ( $2,35\% \pm 0,32$ ), respectivamente. El índice medio de proliferación, MPI, fue  $19,28\% \pm 2,74$ . (Figura 5.d).



**Figura 5:** Caracterización de la población celular del CALT en pacientes con QCA. (a) Células Th, Tc, B y NK. (b) Células simples vivas, muertas, y en fases tempranas y tardías de la apoptosis. (c) Células complejas vivas, muertas, y en fases tempranas y tardías de la apoptosis. (d) Células en fase  $G_0/G_1$ ,  $S$  y  $G_2/M$ .

## 4.2. Caracterización de la QCV:

A continuación se detallan los resultados obtenidos en este grupo de pacientes alérgicos para cada una de las variables inmunológicas analizadas.

- **Linfocitos y subpoblaciones linfocitarias:**

Al igual que en la QCA, la mayor parte de las células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado fueron de origen epitelial (CD45-). Sin embargo, se observó una pequeña población de células CD45+, es decir, de linfocitos intraepiteliales (9,91%  $\pm$ 1,89). Estos linfocitos fueron predominantemente linfocitos T (81,89%  $\pm$ 1,50), siendo el porcentaje de linfocitos cooperadores, Th, (39,39%  $\pm$ 4,29) similar al porcentaje de linfocitos citotóxicos, Tc, (41,28%  $\pm$ 4,76). También se encontraron linfocitos B (12,62%  $\pm$ 1,71) y, en menor medida, linfocitos NK (6,07%  $\pm$ 1,01). El valor de los cocientes CD4/CD8 y CD3/CD19 fue 1,00  $\pm$ 0,32 y 7,23  $\pm$ 0,68, respectivamente. (Figura 6.a).

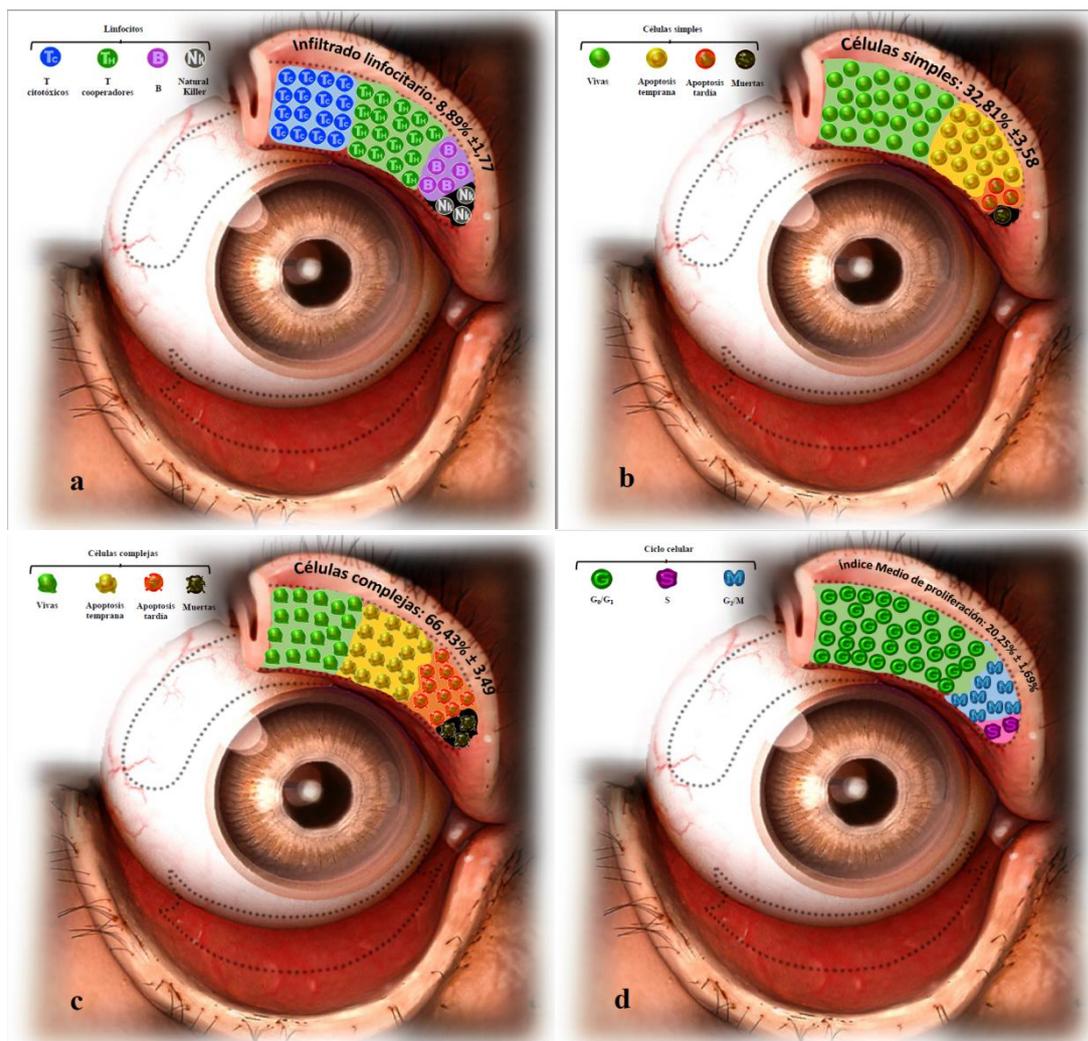
- **Viabilidad/Apoptosis:**

Del mismo modo, se observaron dos poblaciones celulares que fueron analizadas de forma independiente. Una población estaba formada por células simples o de baja complejidad y pequeñas; la segunda se trataba de células más complejas y de mayor tamaño.

Las células simples constituían el 39,18%  $\pm$ 5,56 de las células totales. Estas eran mayoritariamente viables (89,27%  $\pm$ 3,94), seguidas por las que se encontraban en fase temprana de la apoptosis (6,64%  $\pm$ 2,74) y tardía (2,64%  $\pm$ 1,25) y, por último, muertas (1,64%  $\pm$ 0,64) (Figura 6.b). En cuanto a las células complejas, constituían el 59,09%  $\pm$ 5,51 de las células totales. Casi un tercio de ellas eran viables (30,91%  $\pm$ 3,62), las que se encontraban en fase tardía de la apoptosis eran las mayoritarias (43,77%  $\pm$ 6,33) y en menor proporción se encontraban las células en fase temprana de la apoptosis (22,76%  $\pm$ 2,30) y, por último, muertas (3,73%  $\pm$ 0,87) (Figura 6.c).

- **Ciclo celular:**

Referente a las fases del ciclo celular, se encontró un mayor porcentaje de células conjuntivales en la fase quiescente G0/G1 (80,46%  $\pm$  2,72), seguidas de células conjuntivales en fase de mitosis G2/M (17,05%  $\pm$ 2,55) y en fase de síntesis S (2,35%  $\pm$ 0,32), respectivamente. El índice medio de proliferación, MPI, fue 19,28%  $\pm$  2,74. (Figura 6.d).



**Figura 6:** Caracterización de la población celular del CALT en pacientes con QCV. **(a)** Células Th, Tc, B y NK. **(b)** Células simples vivas, muertas, y en fases tempranas y tardías de la apoptosis. **(c)** Células complejas vivas, muertas, y en fases tempranas y tardías de la apoptosis. **(d)** Células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M.

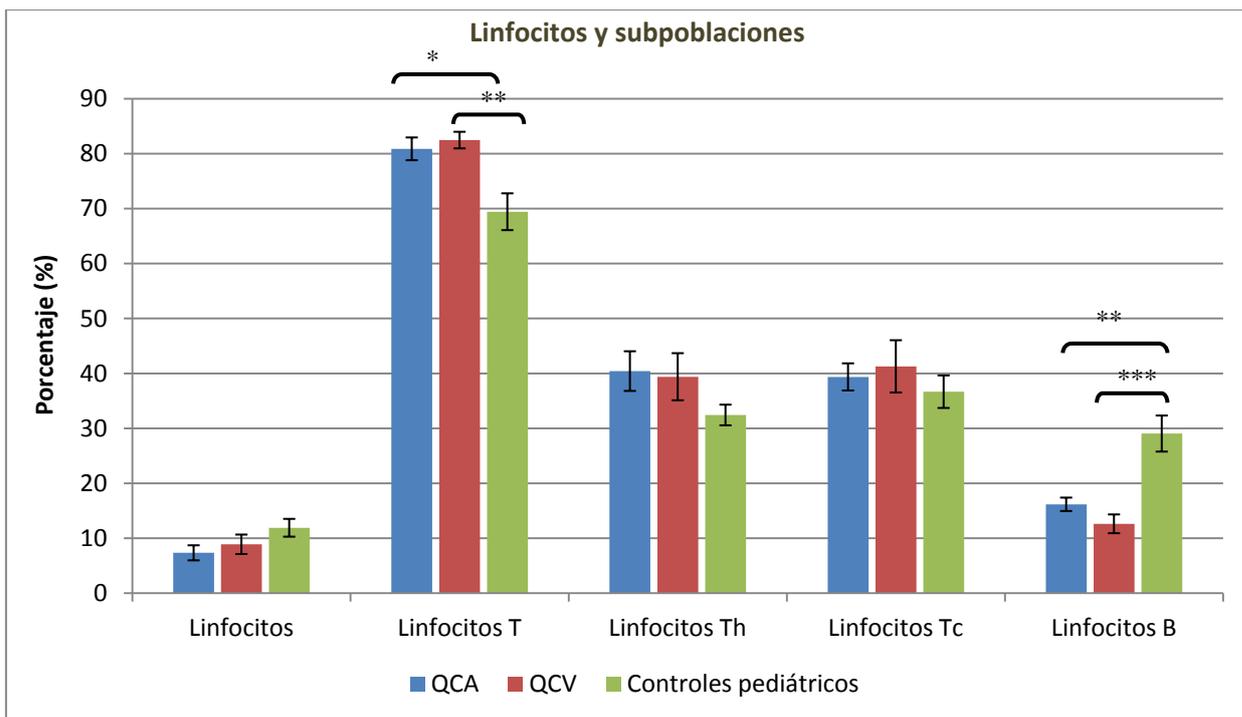
#### 4.3. EVALUACIÓN DE MARCADORES DE ENFERMEDAD ALÉRGICA OCULAR GRAVE

Para evaluar la utilidad de las variables inmunológicas estudiadas en los pacientes con QCA y con QCV como posibles marcadores diagnósticos y marcadores diferenciales, se realizó una comparación de los mismos con controles pediátricos. Los resultados fueron los siguientes:

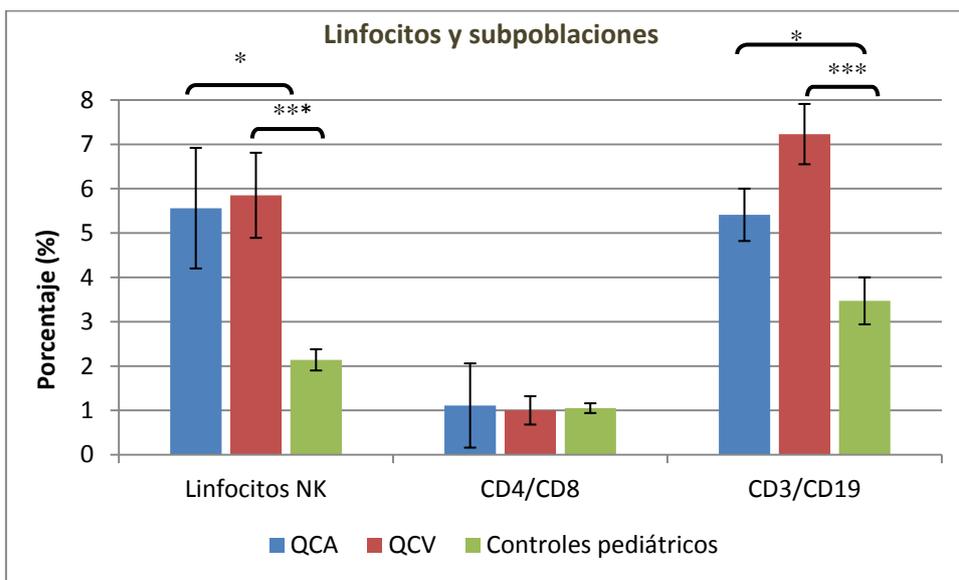
- **Linfocitos y subpoblaciones:**

La infiltración de células CD45+ fue menor en los pacientes con QCA respecto al grupo control ( $7.34\% \pm 1.37$  vs  $11.9\% \pm 1.62$ ,  $p=0.188$ ) sin llegar a ser significativo, no observándose tampoco diferencias al comparar los pacientes con QCV con el grupo control ( $8.89\% \pm 1.77$  vs  $11.9\% \pm 1.62$ ,  $p=0.579$ ). Dentro de esta población de linfocitos intraepiteliales, el porcentaje de linfocitos T fue mayor en los pacientes con QCA respecto al grupo control ( $80.88\% \pm 2.07$  vs  $69.43\% \pm 3.35$ ,  $p=0.018$ ), al igual que en los pacientes con QCV respecto al grupo control ( $82.47\% \pm 1.51$  vs  $69.43\% \pm 3.35$ ,  $p=0.004$ ). Nuestros resultados mostraron una disminución del porcentaje de linfocitos B ( $16.17\% \pm 1.22$  vs  $29.05\% \pm 3.28$ ,  $p=0.003$  y  $12.62\% \pm 1.71$  vs  $29.05\% \pm 3.28$ ,  $p=0.000$  respectivamente para QCA y QCV al compararlos con el grupo control), como queda reflejado en la proporción células T/células B (Figura 8). Aunque no se hallaron diferencias significativas en cuanto a las subclases de linfocitos T, hay que destacar que en las muestras de los pacientes con QCA se halló un incremento de los linfocitos cooperadores, Th ( $40.42\% \pm 3.61$  vs  $32.43\% \pm 1.88$ ,  $p=0.151$ ), sin ninguna variación en los linfocitos citotóxicos, Tc ( $39.36\% \pm 2.47$  vs  $36.67\% \pm 2.96$   $p=0.766$ ) respecto a los sujetos sanos. Este hecho también puede apreciarse en las muestras de los pacientes con QCV, en los que se halló un incremento no significativo de los linfocitos cooperadores, Th ( $39.39\% \pm 4.29$  vs  $32.43\% \pm 1.88$ ,  $p=0.123$ ) sin ninguna variación en los linfocitos citotóxicos, Tc ( $41.28\% \pm 4.76$  vs  $36.67\% \pm 2.96$   $p=0.692$ ) respecto a los sujetos sanos (Figura 7). Por último, se observó un incremento del porcentaje de células NK en los pacientes con QCV respecto al grupo control ( $5.85\% \pm 0.96$  vs  $2.14\% \pm 0.24$   $p=0.000$ ). En el caso de los pacientes con QCA, también se observa este aumento del porcentaje de linfocitos NK respecto al grupo control ( $5.56\% \pm 1.36$  vs  $2.14\% \pm 0.24$   $p=0.042$ ) (Figura 8).

Al comparar ambos grupos de estudio entre sí, es decir QCA con QCV, se observó menor porcentaje de linfocitos B en el grupo de QCV respecto QCA ( $12.62\% \pm 1.71$  vs  $16.17\% \pm 1.22$ ,  $p=0.080$  respectivamente), y por consiguiente aumento del cociente CD3/CD19 ( $7.23\% \pm 0.68$  vs  $5.41\% \pm 0.59$ ,  $p=0.117$  respectivamente) sin llegar a ser significativos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el resto de parámetros estudiados de subpoblaciones linfocitarias (Figuras 7 y 8).



**Figura7:** Análisis inmunofenotípico de los linfocitos intraepiteliales obtenidos de la conjuntiva de pacientes con QCA, QCV y de controles pediátricos. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

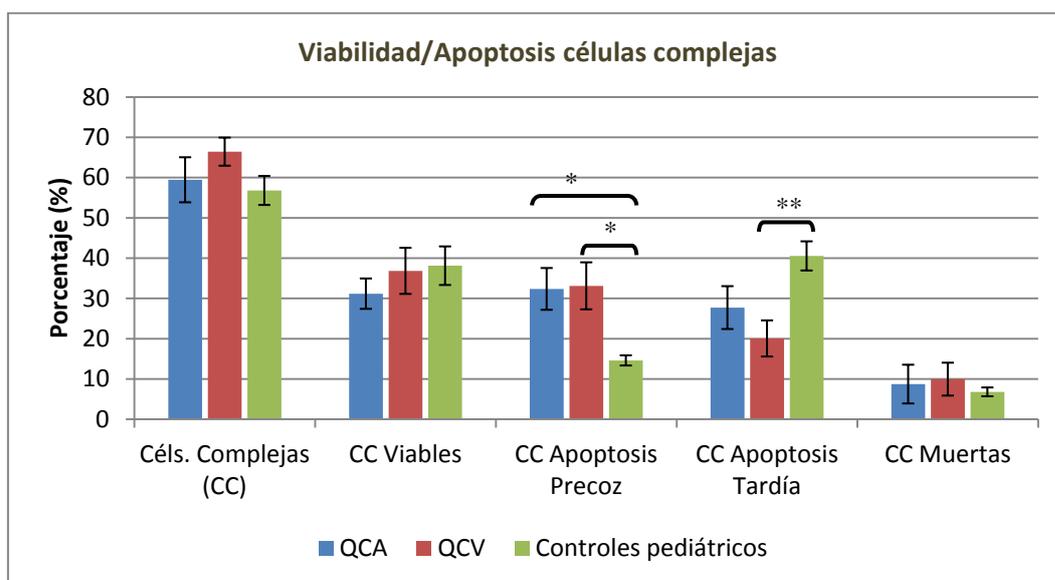


**Figura8:** Análisis inmunofenotípico de los linfocitos intraepiteliales obtenidos de la conjuntiva de pacientes con QCA, QCV y de controles pediátricos. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

- Viabilidad/Apoptosis:**

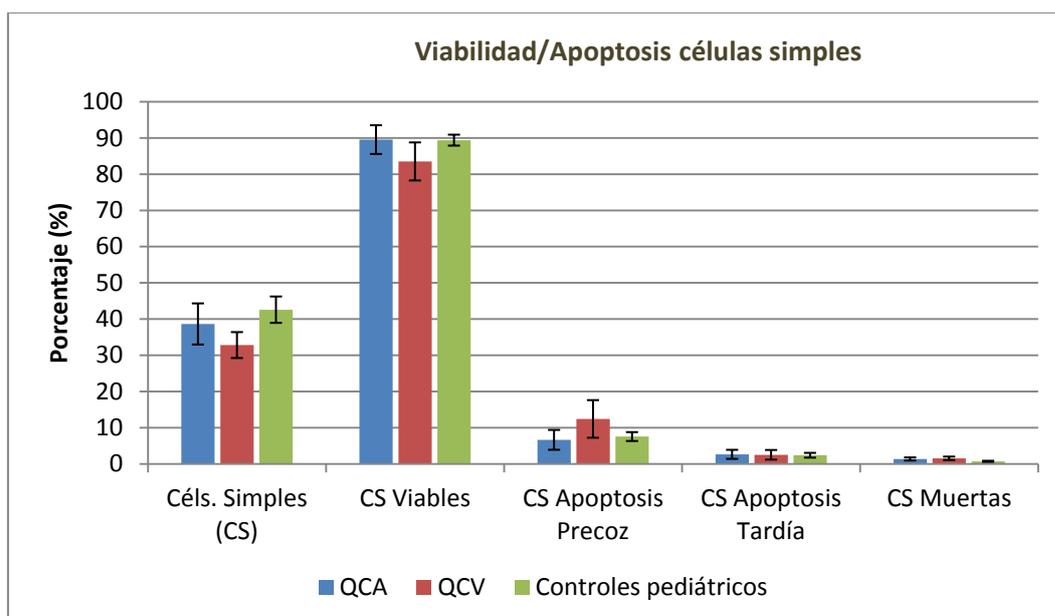
Como ya hemos comentado, en este ensayo se observaron dos poblaciones celulares independientes en ambos grupo.

En cuanto a la población de células complejas, al comparar los pacientes con QCA con el grupo control se identificó un aumento significativo de las células complejas en fase precoz de la apoptosis ( $32,36\% \pm 5,19$  vs  $14,61\% \pm 1,26$ ,  $p=0,042$ ), con una tendencia a la disminución de dichas células en fase tardía de la apoptosis ( $27,72\% \pm 5,32$  vs  $40,55\% \pm 13,62$ ,  $p=0,143$ ). No se observaron diferencias en cuanto a la viabilidad ni en el porcentaje de células muertas ( $31,18\% \pm 3,77$  vs  $38,12\% \pm 4,79$ ,  $p=0,920$  y  $8,73\% \pm 4,81$  vs  $6,8\% \pm 1,1$ ,  $p=0,739$  respectivamente). Al comparar los pacientes con QCV con respecto el grupo control, se identificó un aumento significativo de las células complejas en fase temprana de la apoptosis ( $33,12\% \pm 5,84$  vs  $14,61\% \pm 1,26$ ,  $p=0,020$ ), y una disminución de las células complejas en fase tardía de la apoptosis ( $20,06\% \pm 4,48$  vs  $40,55\% \pm 13,62$ ,  $p=0,003$ ). No se observaron diferencias en cuanto a la viabilidad ni en el porcentaje de células muertas ( $36,84\% \pm 5,72$  vs  $38,12\% \pm 4,79$ ,  $p=1,00$  y  $9,96\% \pm 4,08$  vs  $6,8\% \pm 1,1$ ,  $p=0,739$  respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros estudiados en la población de células complejas al comparar QCA y QCV entre sí. (Figura 9)



**Figura 9:** Análisis de viabilidad de células complejas obtenidas de la conjuntiva de pacientes con QCA y QCV y de controles pediátricos. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$

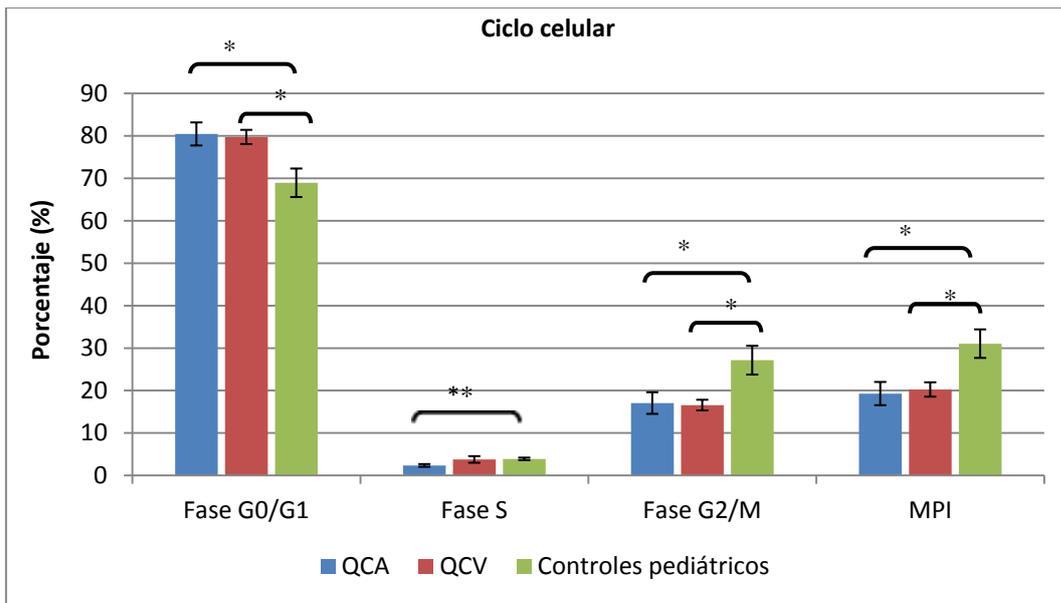
En cuanto a la viabilidad celular de la población de células simples, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros estudiados al comparar los pacientes con QCA y QCV con el grupo control. De la misma forma, al comparar QCA y QCV entre sí tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros estudiados. (Figura 10).



**Figura 10:** Análisis de viabilidad de células simples obtenidas de la conjuntiva de pacientes con QCA y QCV y de controles pediátricos.

- **Ciclo celular:**

Con respecto a las fases del ciclo celular, se observó un aumento de células en fase quiescente G0/G1 tanto en los pacientes con QCA ( $80,46\% \pm 2,72$ ,  $p=0,033$ ) como en los pacientes con QCV ( $79,74\% \pm 1,68$ ,  $p=0,020$ ) respecto al grupo al control, así como en el porcentaje de células en fase de mitosis ( $17,05\% \pm 2,55$ ,  $p=0,060$  y  $16,57\% \pm 1,26$ ,  $p=0,019$  respectivamente). Además, en los pacientes se QCA se observó una disminución de la fase de síntesis al compararlos con los controles ( $2,35\% \pm 0,32$ ,  $p=0,005$ ), no observándose diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con QCV ( $3,76\% \pm 0,78$ ,  $p=0,985$ ). Como consecuencia de estos resultados, el MPI fue menor tanto para el grupo con QCA ( $19,28\% \pm 2,74$ ,  $p=0,029$ ) como para el grupo de QCV ( $20,25\% \pm 1,69$ ,  $p=0,020$ ). Al comparar ambos grupos de estudio entre sí, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las fases ni para el índice medio de proliferación (figura 11).



**Figura 11:** Análisis del ciclo celular de las células obtenidas de la conjuntiva de pacientes con QCA y QCV y de controles pediátricos. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

## 5. Discusión

Las conjuntivitis de origen alérgico representan un motivo frecuente de consulta en el servicio de oftalmología, especialmente en la edad pediátrica, donde puede desarrollar cuadros severos cuya evolución natural sin un tratamiento óptimo es hacia la pérdida de la visión. Hasta la fecha la historia clínica y la exploración oftalmológica del paciente son los aspectos más relevantes para realizar el diagnóstico diferencial con las diferentes etiologías de las conjuntivitis, así como de los diferentes procesos alérgicos oculares. En ocasiones, es difícil el diagnóstico diferencial entre Queratoconjuntivitis atópica y Queratoconjuntivitis vernal, ya que los antecedentes de dermatitis atópica a veces es dudoso. Muchas veces nos encontramos con pacientes con historia clínica negativa de dermatitis atópica, pero en la exploración se puede observar el pliegue de Denie-Morgan, sugestivo de dermatitis atópica. Sin embargo, esto no repercute de manera importante en la conducta terapéutica, ya que estos procesos tienen un escalón terapéutico semejante.

La obtención mínimamente invasiva de células de la SO ha sido una herramienta fundamental para poder investigar ciertas patologías oculares de carácter inflamatorio, como por ejemplo, el síndrome de ojo seco<sup>7</sup> y conjuntivitis alérgicas, y para evaluar el estado de la SO en poblaciones “inmunológicamente” sanas. En nuestro estudio utilizamos el cepillo Cytobrush® plus GT (Medscand Medical, Sweden) para la obtención de células. Se recogieron muestras de conjuntiva tarsal superior de 3 poblaciones diferenciadas: una de sujetos pediátricos sanos, otra de pacientes diagnosticados de QCV y otra de pacientes diagnosticados de QCA.

Una vez recogidas las células de la SO, se procedió a su posterior caracterización por citometría de flujo. La combinación de la citología por cepillado junto con el análisis por citometría de flujo constituye una herramienta útil para investigar la fisiopatología de la SO de individuos sanos<sup>6</sup>, así como para evaluar el epitelio conjuntival de patologías oculares inflamatorias<sup>7</sup>. Debido al buen resultado obtenido hemos decidido utilizarlo en la patología que nos atañe, siendo este el primer estudio que trata de caracterizar por citometría de flujo el fenotipo de las subpoblaciones linfocitarias de la SO, así como la viabilidad, la apoptosis y las fases del ciclo celular en la conjuntiva de niños con conjuntivitis alérgicas graves, como son la QCV y la QCA.

Se llevaron a cabo tres estudios comparativos. Por un lado, sujetos sanos vs QCA, por otro sujetos sanos vs QCV, y por último QCA vs QCV.

En el estudio del fenotipo celular, exactamente igual que en estudios anteriores,<sup>6,7</sup> se ha observado una pequeña población de linfocitos infiltrando el epitelio conjuntival, IELs, pero no existen diferencias en cuanto al porcentaje en los grupos de estudio, cosa que sí sucede si nos fijamos en los en los distintos tipos de IELs. Nuestros resultados muestran que el porcentaje de linfocitos T es mayor en los pacientes con QCA y QCV respecto a los controles. Como hablamos de proporciones, el aumento de linfocitos T supone la bajada de los linfocitos B. De estos resultados se deduce que el cociente linfocito T/linfocito B sea mayor en los pacientes con alguno de los tipos de queratoconjuntivitis. Además, nuestros resultados muestran un incremento del porcentaje de linfocitos NK tanto en los pacientes con QCA como con QCV al compararlos con los sujetos sanos. Este dato, junto con el cociente linfocito T/linfocito B podrían ser utilizados como biomarcadores de enfermedad ocular alérgica grave en la edad pediátrica.

Dentro de las subpoblaciones de linfocitos T, nuestros resultados muestran un porcentaje similar de linfocitos Th y Tc, si bien existe una tendencia al aumento del porcentaje de linfocitos Th con respecto a los controles pediátricos. Sería conveniente realizar estudios comparativos de la conjuntiva tarsal superior en controles pediátricos con respecto a controles adultos para establecer posibles diferencias en las subpoblaciones linfocitarias en dicha región topográfica.

Los IELs que se encuentran en el compartimento epitelial del CALT juegan un papel fundamental en las conjuntivitis alérgicas. Ya se ha descrito previamente que el porcentaje de linfocitos T es predominante en este tipo de tejido<sup>8</sup>, lo que concuerda con nuestros resultados. Los linfocitos cooperadores (Th), en concreto los linfocitos Th2, son los que se encuentran en mayores proporciones, puesto que tienen un papel fundamental en el desarrollo de la conjuntivitis alérgica<sup>9</sup>. Sin embargo, diferentes estudios han aportado evidencias de la contribución de los linfocitos T citotóxicos (Tc), en la inflamación alérgica, con una actividad citotóxica asociada con la intensidad de la patología, con especial importancia en la dermatitis alérgica<sup>10,11</sup>. En experimentos con modelos murinos de conjuntivitis alérgica estacional se observa que los linfocitos Tc promueven la conjuntivitis alérgica estacional durante la fase de inducción (tras el contacto con el alérgeno) y la suprimen durante la fase efectora<sup>12</sup> (aparición de los signos y síntomas). En el asma alérgico, los linfocitos Tc se acumulan en el pulmón tras la provocación con alérgenos y durante los episodios agudos. Otros autores dividen funcionalmente a los linfocitos Tc como células efectoras o de memoria y describen que las efectoras de tipo Tc2 contribuyen de manera importante en el asma a través de la producción de IL-13<sup>13</sup>. Estos estudios sobre el papel de los linfocitos Tc en los procesos alérgicos podrían justificar nuestros resultados.

Sobre los linfocitos NK, estudios en modelos murinos han observado que estas células median o amplifican la respuesta Th2 necesaria para el desarrollo de la conjuntivitis alérgica<sup>14</sup>. Otros estudios han comprobado en pacientes con queratoconjuntivitis vernal, que la proporción de linfocitos NK es significativamente menor en sangre pero está elevada en la conjuntiva de dichos pacientes<sup>15</sup>. Todo ello concuerda con nuestros resultados.

En cuanto al estudio de la viabilidad celular, exactamente igual que en estudio previos<sup>7</sup>, nuestros resultados demostraron en ambos grupos la existencia de dos poblaciones celulares morfológicamente diferentes basándose en la granularidad de su citoplasma: una población formada por células simples o de baja complejidad y de tamaño pequeño, y una segunda de células más complejas y de mayor tamaño. De acuerdo a estudios de microscopía láser confocal, se piensa que el primer grupo estaría formado por los IELs y las células del epitelio basal y el segundo por las células más superficiales del epitelio junto con células caliciformes.<sup>6</sup>

En cuanto a las células complejas, en la comparativa de pacientes con QCA y QCV con los sujetos sanos, se observó un aumento de células de la fase temprana de la apoptosis, con una disminución de las fases tardía, y ausencia de diferencias en cuanto al porcentaje de células muertas. Estas diferencias podrían deberse al papel fundamental que tienen las células del epitelio conjuntival (células superficiales del epitelio y caliciformes) en la inflamación alérgica.

Algunos artículos exponen que en pacientes con conjuntivitis alérgica, el epitelio se encuentra desestructurado, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo ya que se observa un predominio de las células en apoptosis precoz<sup>16</sup>. Un estudio realizado en pacientes con síndrome de ojo seco se observó que tras el tratamiento con Ciclosporina A aumentó la expresión del marcador proapoptótico APO 2.7 en las células del epitelio conjuntival.<sup>17</sup>

En cuanto a las células simples, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables estudiadas. Se cree que los eosinófilos se encuentran dentro del grupo de células simples. Estas células juegan un papel crucial en la fase tardía de la alergia, y son las responsables del daño corneal. Se sabe que la migración de los eosinófilos, el aumento de su viabilidad y la disminución de su apoptosis son importantes para su acumulación en el tejido inflamatorio<sup>18</sup>. En la bibliografía se ha descrito la efectividad de un fármaco agonista del receptor de glucocorticoides que inhibe el reclutamiento y activación de eosinófilos, promueve su apoptosis y en consecuencia

disminuye las citoquinas y quimioquinas en modelos porcinos con conjuntivitis alérgica.<sup>18</sup> Estos estudios explicarían los resultados obtenidos en esta población celular.

En relación al estudio del ciclo celular, se observó que la mayor parte de las células conjuntivales de todos los grupos se encuentran en fases de crecimiento y/o quiescencia ( $G_0/G_1$ ), seguidas de células en fase de mitosis ( $G_2/M$ ) y, por último, de células en fase de síntesis (S). Estos hallazgos coinciden con los encontrados en conjuntiva de pacientes sanos<sup>7</sup>, y en la conjuntiva de pacientes con Síndrome de Ojo Seco<sup>8</sup>. Al comparar cada grupo de alérgico con los sujetos sanos, nuestros resultados mostraron un aumento de la fase de quiescencia, una disminución de la fase de mitosis, con la consecuente disminución del índice medio de proliferación, tanto en el grupo de QCA como en el grupo de QCV. Investigadores han descrito la liberación de citoquinas necesaria para la proliferación de diferentes células de la conjuntiva implicadas en la inflamación de ésta. Sin embargo, no hay estudios de ciclo celular en los IELs en la bibliografía. Algunos autores sugieren el estudio de la proliferación de linfocitos B en enfermedades alérgicas<sup>19</sup>. También se ha descrito que el número de macrófagos y linfocitos T aumenta en pacientes con rinitis alérgica estacional<sup>20</sup>. Es decir, estos estudios contradicen la disminución de células en fase de mitosis y las diferencias en el MPI encontrada en nuestros resultados.

## CONCLUSIONES

1. El componente epitelial del sistema inmune de la mucosa ocular varía funcional y fenotípicamente en la alergia ocular grave en la edad pediátrica (QCA y QCV) respecto a los controles sanos.
2. En base a nuestros resultados, se refuerza la idea de que en la fisiopatología de la enfermedad alérgica ocular no sólo hay una respuesta inmune adquirida, sino que también interviene una respuesta innata (linfocitos NK), pudiéndose utilizar éste parámetro, junto con el cociente CD3/CD19 como posibles biomarcadores de estas patologías.
3. En base a nuestros resultados, no existen biomarcadores adecuados para el diagnóstico diferencial entre QCV y QCA.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Leonardi A, Bogacka E, Fauquert JL, Kowalski ML, Groblewska A, Jedrzejczak-Czechowicz M, Doan S, Marmouz F, Demoly P, Delgado L. Ocular allergy: recognizing and diagnosing hypersensitivity disorders of the ocular surface. *Allergy*. 2012 Nov;67(11):1327-37.
2. Bonini S, Lambiase A, Sgrulletta R, Bonini S. Allergic chronic inflammation of the ocular surface in vernal keratoconjunctivitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2003;3(5):381–387
3. Bonini S. Atopic keratoconjunctivitis. *Allergy*, 2004; 59 (78):71-73.
4. Bonini S, Ghinelli E. The early and late phase of the ocular allergic reaction. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 2000; 78:41.
5. Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. In Niederkorn JY, Kaplan HJ, eds. *Immune Response and the Eye*. 2<sup>nd</sup> ed. Basel, Switzerland: Karger; 2007;36-49.
6. Reinoso R, Martín-Sanz R, Martino M, Mateo ME, Blanco-Salado R, Calonge M, Corell A. Topographical distribution and characterization of epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in the human ocular mucosa. *Mucosal Immunol*. 2012;5(4):455-67.
7. Reinoso R, Calonge M, Castellanos E, Martino M, Fernández I, Stern ME, Corell A. Differential cell proliferation, apoptosis, and immune response in healthy and evaporative-type dry eye conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4819-28.
8. Pawankar R, Holgate S, Rosenwasser L, et al. Allergic Conjunctivitis: Update on Its Pathophysiology and Perspectives for Future Treatment. *Allergy Frontiers: Clinical Manifestations: Springer Japan*, 2009:25-48.
9. Irkec MT, Bozkurt B. Molecular immunology of allergic conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12:534-9.
10. Akdis M, Simon HU, Weigl L, Kreyden O, Blaser K, Akdis CA. Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD8 + T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *J Immunol*. 1999;163(1):466-75.
11. Yawalkar N, Schmid S, Braathen LR, Pichler WJ. Perforin and granzyme B may contribute to skin inflammation in atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol*. 2001;144(6):1133-9.
12. Fukushima A, Yamaguchi T, Fukuda K, et al. CD8+ T cells play disparate roles in the induction and the effector phases of murine experimental allergic conjunctivitis. *Microbiol Immunol* 2006;50:719-28.
13. Miyahara N, Swanson BJ, Takeda K, Taube C, Miyahara S, Kodama T, et al. Effector CD8 + T cells mediate inflammation and airway hyper-responsiveness. *Nat Med*. 2004;10(8): 865-9.
14. Reyes NJ, Mayhew E, Chen PW, Niederkorn JY. NKT cells are necessary for maximal expression of allergic conjunctivitis. *Int Immunol* 2010;22:627-36
15. Lambiase A, Normando EM, Vitiello L, et al. Natural killer cells in vernal keratoconjunctivitis. *Mol Vis* 2007;13:1562-7.
16. Baiula M, Bedini A, Baldi J, Cavet ME, Govoni P, Spampinato S. Mapracorat, a selective glucocorticoid receptor agonist, causes apoptosis of eosinophils infiltrating the conjunctiva in late-phase experimental ocular allergy. *Drug Des Devel Ther* 2014;8:745-57.
17. Pauly A, Brasnu E, Riancho L, Brignole-Baudouin F, Baudouin C. Multiple endpoint analysis of BAC-preserved and unpreserved antiallergic eye drops on a 3D-reconstituted corneal epithelial model. *Mol Vis* 2011;17:745-55.
18. Giebel J, Woenckhaus C, Fabian M, Tost F. Age-related differential expression of apoptosis-related genes in conjunctival epithelial cells. *Acta Ophthalmol. Scand*. 83, 471 – 6 (2005).
19. Aguilar Angeles D, Rojo Gutiérrez MI, López Valladares KE, Sandoval T, Bermejo Guevara MA, González Ibarra M. Lymphocytes B and NK in respiratory allergy. *Rev Alerg Mex* 2005;52:183-7.
20. Van Cauwenberge PB. Nasal sensitization. *Allergy* 1997;52:7-9.



# Anexos



**Universidad de Valladolid**



**COMISION DE INVESTIGACION**

Dña. M<sup>a</sup> Paz García García como **Secretaria de la Comisión de Investigación** del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid,

**CERTIFICA**

Que el proyecto de TFM “**Alteraciones del sistema inmune de la mucosa ocular en la alergia ocular grave pediátrica**” de la alumna Soledad Rubio Martínez con número de registro: 001/2013, ha sido revisado en la última reunión de la Comisión de Investigación de 31.01.2013.

Y para que así conste expido el presente certificado.

En Valladolid, a 2 de febrero de 2014

Fdo.: M<sup>a</sup> Paz García García  
Secretaria de la Comisión de Investigación



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

Valladolid a 20 de Marzo de 2014

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

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

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

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

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

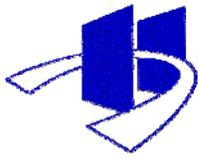
Considerando que el Proyecto contempla los Convenios y Normas establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética, se hace constar el **informe favorable** y la **aceptación** del Comité Ético de Investigación Clínica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

Un cordial saludo.



F. Javier Álvarez

Dr. F. Javier Álvarez.  
CEIC Área de Salud Valladolid Este –  
Hospital Clínico Universitario de Valladolid  
Farmacología  
Facultad de Medicina,  
Universidad de Valladolid,  
c/ Ramón y Cajal 7,47005 Valladolid  
[alvarez@med.uva.es](mailto:alvarez@med.uva.es)  
[jalvarezgo@saludcastillayleon.es](mailto:jalvarezgo@saludcastillayleon.es)  
tel: 983 423077



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

Valladolid a 21 de Febrero de 2013

En la reunión del CEIC del Área de Valladolid – Este de 21 de Febrero de 2013, se procedió a la evaluación del Proyecto de Investigación que a continuación se señala:

Código en el HCUV PI-13-62	ALTERACIONES DEL COMPARTIMENTO EPITELIAL DEL SISTEMA INMUNE DE LA MUCOSA OCULAR EN QUERATOCONJUNTIVITIS VERNAL ACRONIMO SI LO TIENE (no tiene)	IP: CARMENMARTÍN ALONSO - MARGARITA CALONGE CANO Otros Investigadores en IOBA: Dra. Amalia Enríquez de Salamanca, Dra. Ana Isabel Vallelado Dra. Soledad Rubio  Recibido 21-02-2013
-------------------------------	---	--

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

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

Un cordial saludo.



Prof. F. Javier Álvarez.  
CEIC Área de Valladolid Este - Hospital Clínico Universitario de Valladolid  
Farmacología  
Facultad de Medicina,  
Universidad de Valladolid,  
c/ Ramón y Cajal 7,  
47005 Valladolid  
alvarez@med.uva.es  
jalvarezgo@saludcastillayleon.es  
tel: 983 423077

## FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del Estudio:** Caracterización fenotípica y funcional del sistema inmune de la mucosa ocular en procesos alérgicos.

**Nº de estudio:** IOBA62-2013

**Coordinadores:** Dra. Margarita Calonge (Tf. 983 184 763); Dra. Carmen Martín Alonso (Tf. 983 186399); Dr. Alfredo Corell Almuzara (Tf. 983423187)

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

Se le ha invitado (a Ud. o a su hijo/a) a participar en un estudio clínico coordinado por el IOBA para pacientes que padecen procesos alérgicos oculares, ya sea queratoconjuntivitis vernal (QCV), queratoconjuntivitis atópica (QCA) y/o conjuntivitis alérgica aguda/crónica.

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

### 1. Objetivo del estudio

El objetivo de este estudio clínico es la caracterización fenotípica y funcional, mediante citometría de flujo, de las células conjuntivales obtenidas, evaluando el linaje celular, la viabilidad y la fase del ciclo celular del epitelio, y la comparación de la función inmunológica entre la conjuntiva ocular de pacientes con QCV, QCA y/o conjuntivitis alérgica aguda/crónica, y la de individuos sanos y su posible correlación con las poblaciones celulares en sangre periférica. Se realizarán también estudios de función celular con los linfocitos y basófilos obtenidos para evaluar la respuesta inmune.

### 2. Participación voluntaria

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

### 3. Descripción general del estudio. Procedimiento.

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

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

### 4. Manejo de las muestras

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

Las muestras obtenidas para este estudio son perecederas, por lo cual queda descartado su uso posterior.

Iniciales del Paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

## 5. Confidencialidad

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

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

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

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

En ninguno de los informes del programa aparecerá su nombre. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada por medios informáticos bajo condiciones de seguridad (en un fichero registrado en la ANPD), con el propósito de determinar los resultados del estudio. Toda la información, incluido el mantenimiento de su anonimato, se tratará conforme a la legislación vigente. Su nombre no figurará en ningún informe relacionado con esta evaluación y su identidad no se revelará a ninguna otra persona en ninguna circunstancia. De acuerdo con la ley vigente tiene Vd. derecho al acceso de sus datos personales; asimismo, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al responsable o responsables del programa. Asimismo, en cumplimiento del RD1716/2011, le informamos de que los posibles excedentes de las muestras que Vd. cede, serán destruidos en el plazo de 1 mes tras finalizar el estudio.

## 6. Otra información relevante

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

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

## 7. Riesgos

El cepillado conjuntival puede provocar alguna molestia o alguna irritación leve local también transitoria. La extracción de sangre periférica puede provocar algunas molestias, ansiedad transitoria o un hematoma o una hemorragia leves locales. No obstante, la cantidad de sangre extraída no causará ninguna otra molestia ni anemia, ni será perjudicial para su salud. La extracción de otros tipos de muestras (Líquido Ceforraquídeo, Médula ósea) tiene los riesgos que le han sido ya explicados por su médico para realizar el proceso diagnóstico. La recogida de muestras de orina no conlleva ningún riesgo asociado.

Iniciales del Paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

## DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

**Título del Estudio:** Caracterización fenotípica y funcional del sistema inmune de la mucosa ocular en procesos alérgicos.

**Nº de estudio:** IOBA62-2013

**Coordinadores:** Dra. Margarita Calonge (Tf. 983 184 763); Dra. Carmen Martín Alonso (Tf. 983 186399); Dr. Alfredo Corell Almuzara (Tf. 983423187)

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

Al firmar abajo, yo declaro que:

- 1) He leído, o me han leído, y entiendo completamente el contenido del formulario de información adjunto, Versión 2 Final de 28 de Enero de 2013.
- 2) He tenido la oportunidad de preguntar y obtener respuestas satisfactorias a cada una de mis preguntas
- 3) Acepto de forma voluntaria participar en este estudio de investigación y sé que puedo retirarme del estudio en cualquier momento sin que se vea afectada la continuidad de mi tratamiento
- 4) Responsables: Dra. Margarita Calonge, Dra. Carmen Martín Alonso y/o Dr. Alfredo Corell Almuzara Dirección: Instituto Universitario de Oftalmología Aplicada – Paseo de Belén17 – 47011 - Valladolid; Número de Teléfono : 983 184 750/4755; me ha explicado la información para el paciente y el formulario de consentimiento y comprendo lo que implica la investigación.
- 5) He comprendido completamente que los representantes del patrocinador, el Comité Ético Independiente o los representantes de las autoridades regulatorias pueden examinar mis registros médicos donde aparece mi nombre para verificar la exactitud de la información obtenida y entiendo que estas personas tendrán el deber de manejar esta información con confidencialidad utilizándola solamente con un objetivo legítimo para la salud pública.
- 6) Se me entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para mis propios archivos.

\_\_\_\_\_  
**Nombre del Paciente**

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

\_\_\_\_\_  
**Nombre del representante legalmente autorizado**

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

\_\_\_\_\_  
**Nombre del Investigador**

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

Nombre de la persona que participó en la discusión del CI

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

Iniciales del Paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

# ANEXO III

---

## FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del Estudio:** Caracterización del componente epitelial del CALT en niños sanos

**Nº de estudio:** IOBAXXX-2013

**Coordinadores:** Dra. Margarita Calonge (Tf. 983 184 763); Dr. Roberto Reinoso Tapia (Tf. 983 42 3238).

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

Se le ha invitado (a Ud. o a su hijo/a) a participar en un estudio clínico coordinado por el IOBA para pacientes que van a ser sometidos a cirugía de corrección de estrabismo o inyección de toxina botulínica.

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

### 1. Objetivo del estudio

El objetivo de este estudio clínico es la caracterización del componente epitelial del tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT), así como el análisis de los niveles de moléculas inflamatorias presentes en la lágrima obtenida en niños sanos. Una vez recabada esta información se procederá a comparar los datos obtenidos con los ya existentes en adultos.

### 2. Participación voluntaria

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

### 3. Descripción general del estudio. Procedimiento.

Para este procedimiento NO se le administrará tratamiento extraordinario alguno. Si acepta la participación mediante la firma de este documento, se le recogerá lágrima momentos previos a la cirugía de corrección de estrabismo (bajo anestesia general) y posteriormente bajo anestesia tópica, se le tomarán muestras de la conjuntiva de un ojo. Para la toma de lágrima se utilizarán capilares de 5 µl (glass capillary micropipettes; Drummond, REF DRUM1-000-0040, 5 µl, 32 mm; VWR 53440-067). Este capilar se colocará suavemente sobre el menisco lagrimal temporal sin tocar la conjuntiva, mientras se observa el ascenso de la columna de lágrima hasta que se llene el tubo completamente y así obtener un volumen exacto de 5 µl. Para la obtención de células conjuntivales, se utilizará una técnica mínimamente invasiva como es la citología por cepillado. Previa anestesia tópica (0.04% Oxybuprocaine), se procederá a la rotación suave del cepillo (Cytobrush® plus GT, Medscand Medical, Sweden) sobre la conjuntiva tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior. Esta maniobra se repetirá en 3 ocasiones más, siempre realizándolo en el mismo sitio y con el mismo medio.

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

Iniciales del Paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

#### **4. Manejo de las muestras**

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

#### **5. Confidencialidad**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

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

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

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

En ninguno de los informes del programa aparecerá su nombre. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada por medios informáticos bajo condiciones de seguridad (en un fichero registrado en la ANPD), con el propósito de determinar los resultados del estudio. Toda la información, incluido el mantenimiento de su anonimato, se tratará conforme a la legislación vigente. Su nombre no figurará en ningún informe relacionado con esta evaluación y su identidad no se revelará a ninguna otra persona en ninguna circunstancia. De acuerdo con la ley vigente tiene Vd. derecho al acceso de sus datos personales; asimismo, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al responsable o responsables del programa. Asimismo, en cumplimiento del RD1716/2011, le informamos de que los posibles excedentes de las muestras que Vd. cede, serán destruidos en el plazo de 1 mes tras finalizar el estudio.

#### **6. Otra información relevante**

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

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

#### **7. Riesgos**

El cepillado conjuntival puede provocar alguna molestia o alguna irritación leve local también transitoria.

Iniciales del Paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

## DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

**Título del Estudio:** Caracterización del componente epitelial del CALT en niños sanos

**Nº de estudio:** IOBAXXX-2013

Al firmar abajo, yo declaro que:

- 1) He leído, o me han leído, y entiendo completamente el contenido del formulario de información adjunto, Versión 2 Final de 28 de Enero de 2013.
- 2) He tenido la oportunidad de preguntar y obtener respuestas satisfactorias a cada una de mis preguntas
- 3) Acepto de forma voluntaria participar en este estudio de investigación y sé que puedo retirarme del estudio en cualquier momento sin que se vea afectada la continuidad de mi tratamiento
- 4) Responsables: Dra. Margarita Calonge y/o Dr. Roberto Reinoso, Dirección: Instituto Universitario de Oftalmología Aplicada – Paseo de Belén17 – 47011 - Valladolid; Número de Teléfono : 983 184 750/4755; me ha explicado la información para el paciente y el formulario de consentimiento y comprendo lo que implica la investigación.
- 5) He comprendido completamente que los representantes del patrocinador, el Comité Ético Independiente o los representantes de las autoridades regulatorias pueden examinar mis registros médicos donde aparece mi nombre para verificar la exactitud de la información obtenida y entiendo que estas personas tendrán el deber de manejar esta información con confidencialidad utilizándola solamente con un objetivo legítimo para la salud pública.
- 6) Se me entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para mis propios archivos.

\_\_\_\_\_  
**Nombre del Paciente**

Firma \_\_\_\_\_

(Debe ser firmado y fechado por el paciente)

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Nombre del representante legalmente autorizado**

Firma \_\_\_\_\_

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

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Nombre del Investigador**

Firma \_\_\_\_\_

(Debe ser firmado y fechado por el investigador)

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre de la persona que participó en la discusión del CI

Firma \_\_\_\_\_

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

Fecha \_\_\_\_\_

Iniciales del Paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

## ANEXO IV

### CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

Patología:

- |  |  |   |
|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> Queratoconjuntivitis vernal           |  | <input type="checkbox"/> Diagnosticado (Prick test)     |
| <input type="checkbox"/> Queratoconjuntivitis atópica          |  |   |
| <input type="checkbox"/> Conjuntivitis alérgica                |  |   |
| <input type="checkbox"/> <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> | <input type="checkbox"/> Soja                      | <input type="checkbox"/> <i>Aspergillus fumigatus</i>   |
| <input type="checkbox"/> <i>Dermatophagoides farinae</i>       | <input type="checkbox"/> Avellana                  | <input type="checkbox"/> <i>Alternaria alternata</i>    |
| <input type="checkbox"/> Gato                                  | <input type="checkbox"/> Gambas                    | <input type="checkbox"/> Anisakis                       |
| <input type="checkbox"/> Perro                                 | <input type="checkbox"/> Kiwi                      | <input type="checkbox"/> Betula verrucosa               |
| <input type="checkbox"/> Clara de huevo                        | <input type="checkbox"/> Melocotón                 | <input type="checkbox"/> Olea europea                   |
| <input type="checkbox"/> Leche de vaca                         | <input type="checkbox"/> Lentejas                  | <input type="checkbox"/> <i>Ambrosia artemisiifolia</i> |
| <input type="checkbox"/> Bacalao                               | <input type="checkbox"/> Garbanzos                 | <input type="checkbox"/> <i>Artemisa vulgaris</i>       |
| <input type="checkbox"/> Trigo                                 | <input type="checkbox"/> <i>Dactylis glomerata</i> | <input type="checkbox"/> Parietaria judaica             |
| <input type="checkbox"/> Cacahuete                             | <input type="checkbox"/> Otros:                    |   |

Sujeto Control:

Nº muestra:

Paciente:

Nº historia:

Edad:

Sexo:  V  M

Raza:

Fecha de recogida:

Lugar de recogida:

Ojo:

**EVALUACIÓN DEL PACIENTE.****ANAMNESIS****Hábitos de vida (tache lo que proceda):**

1. ¿A qué tipo de población pertenece?  Rural  Urbana  Semiurbano
2. ¿Consume usted alcohol?  
 Nunca  Una vez por semana  2-4 veces por semana  5 o más veces por semana
3. ¿Fuma usted?  Sí  No
4. ¿Consume usted estupefacientes?  
 Nunca  Una vez por semana  2-4 veces por semana  5 o más veces por semana
5. ¿Realiza usted actividad física?  
 Nunca  Una vez por semana  2-4 veces por semana  5 o más veces por semana  
 En caso afirmativo, dónde practica la actividad física:  Aire libre  Recinto cerrado  
 Cuál es la intensidad:  Moderada (<180ppm)  Intensa (>180ppm)
6. Cuáles de las siguientes comidas realiza:  
 Desayuno  Tentempie  Almuerzo  Merienda  Cena  Otras
7. ¿Cuántas horas duerme al día?  
 Menos de 8 horas  Entre 8 y 10 horas  Más de 10 horas
8. ¿Toma usted suplementos nutricionales?:  
 Sí. Indique cuál/es:  No

**Salud general (tache lo que proceda):**

1. ¿Padece alguna alergia medicamentosa?  Sí  NO  
 ¿Cuál? \_\_\_\_\_
2. ¿Padece alguna alergia a alimentos?  Sí  NO  
 ¿Cuál? \_\_\_\_\_

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

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

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

5. ¿Tiene o ha padecido algún cuadro inflamatorio agudo de origen no-alérgico en las dos semanas previas?

- Infección de oído,  Infección de vías respiratorias,  Sinusitis,  Gastroenteritis aguda,  
 Otra

6. ¿Toma normalmente o está tomando alguna medicación sistémica? (incluyendo los tres últimos meses)

Sí  NO

- ¿Cuál?
- ¿Para qué?
- ¿Desde cuándo?

#### Historia Oftalmológica:

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

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

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

3. ¿Se ha sometido a algún procedimiento ocular quirúrgico/láser, cómo por ejemplo cirugía refractiva?

Sí  NO

Especifique cuál.

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

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

5. ¿Usa lágrimas artificiales?

¿Cuántas veces al día? \_\_\_\_\_

¿A qué hora se ha puesto la última gota? \_\_\_\_\_

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

Blandas;  Desechables;  Semirígidas;  Duras.

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

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

**Test OSDI-Ojo Seco**

El Test OSDI (ocular surface disease index) es un test sencillo creado para establecer una gravedad y clasificación del ojo seco según su sintomatología.

Conteste a las siguientes preguntas marcando la casilla que mejor represente su respuesta:

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

	FRECUENCIA				
	En todo momento	Casi en todo momento	El 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento
Sensibilidad a la luz					
Sensación de arenilla en los ojos					
Dolor de ojos					
Visión borrosa					
Mala visión					

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

	FRECUENCIA					
	En todo momento	Casi en todo momento	El 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	No Se
Leer						
Conducir de noche						
Trabajar con un ordenador o utilizar un cajero automático						
Ver la televisión						

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

	FRECUENCIA					
	En todo momento	Casi en todo momento	El 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	No Se
Viento						
Lugares con baja humedad (muy secos)						
Zonas con aire acondicionado						

Puntuación total OSDI:

### EVALUACIÓN CLÍNICA

Segmento anterior	OD	OI
Hiperemia conjuntival		
Hipertrofia papilar		
Córnea		
Neovascularización corneal		
Cicatrización		
Blefaritis		

**Nombre de la persona que lo realiza y fecha:**

T-BUT	OD	OI
Hora instilación FINa T-BUT#1 T-BUT#2 T-BUT#3		

**Nombre de la persona que lo realiza y fecha:**

TOSS		OD		OI	
Córnea	Hora lectura				
	Grado				
Conjuntiva	Hora instilación				
	Hora lectura				
	Grado	Nasal	Temporal	Nasal	Temporal

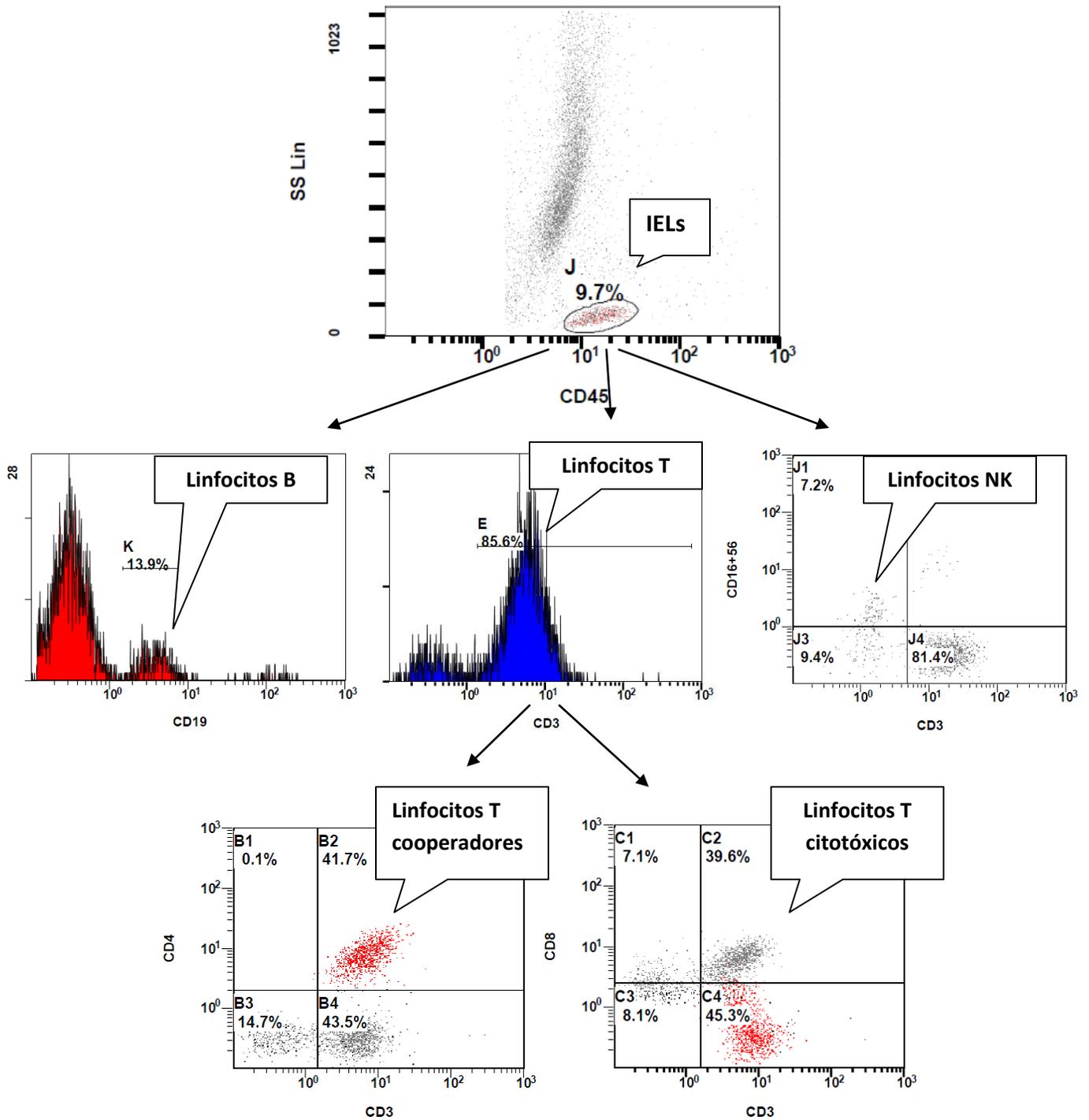
El paciente cumple con los criterios de inclusión/exclusión:  SI  NO

Firma el consentimiento informado:  SI  NO

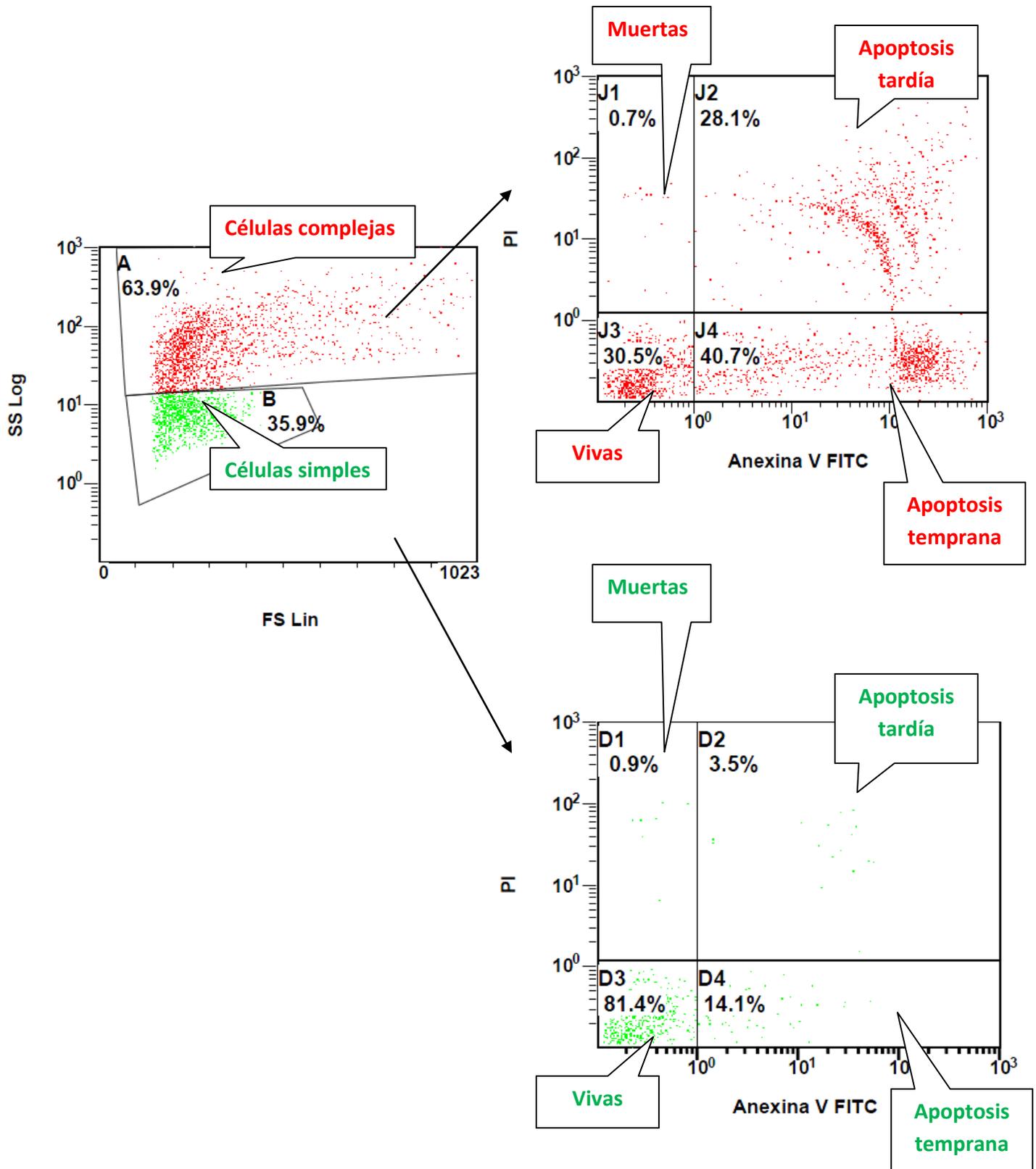
Fecha:

<b>BRUSH</b>	- Fecha y hora de recogida:
	- Fecha y hora del análisis:

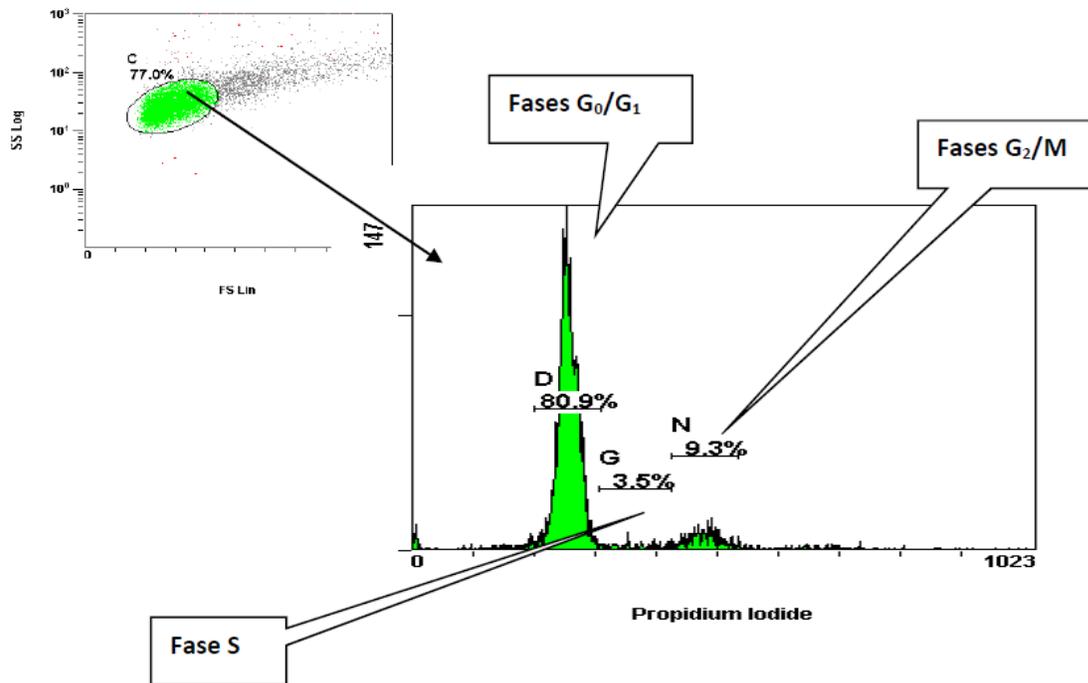
## ANEXO V



**Figura 1:** Ejemplo representativo de un análisis fenotípico de células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado



**Figura 2:** Ejemplo representativo de un análisis de viabilidad de células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado.



**Figura 3:** Ejemplo representativo de un análisis del ciclo celular de células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado.