



TRABAJO FIN DE MÁSTER

CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS CONJUNTIVITIS DE ORIGEN ALÉRGICO, AUTOINMUNE E INFECCIOSO

Esteban Sánchez Márquez

Tutores: Prof. Alfredo Corell

Dra. Carmen Martín



ÍNDICE

AUTORIZACIÓN DEL TUTOR PARA LA EXPOSICIÓN PÚBLICA DEL TFM.	3
BREVE CURRICULUM VITAE	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
a) Sistema inmunitario de la mucosa ocular	6
b) Tejido linfoide asociado a la conjuntiva.	7
c) Inflamación de la conjuntiva: Conjuntivitis	10
d) Diagnóstico diferencial de las conjuntivitis.	12
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
a) Hipótesis	14
b) Objetivos	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
a) Sujetos	15
b) Procesamiento de las muestras.	16
• <i>Obtención de células de la superficie ocular</i>	16
• <i>Caracterización de la población celular obtenida</i>	17
c) Análisis estadístico.	19
• <i>Estudio estadístico descriptivo.</i>	19
• <i>Contraste de hipótesis.</i>	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
a) Caracterización de conjuntivitis alérgica estacional.	22
• <i>Linfocitos y subpoblaciones linfocitarias.</i>	23
• <i>Viabilidad/Apoptosis.</i>	23
• <i>Ciclo celular.</i>	24
b) Evaluación de marcadores de conjuntivitis alérgica estacional.	24
• <i>Linfocitos y subpoblaciones.</i>	24
• <i>Viabilidad/Apoptosis.</i>	25
• <i>Ciclo celular.</i>	25
c) Marcadores diferenciales de la conjuntivitis.	26
• <i>Screening de marcadores para el diagnóstico.</i>	26
• <i>Screening de marcadores de seguimiento.</i>	31
• <i>Screening de marcadores para el diagnóstico diferencial.</i>	37
RESUMEN DE LOS HALLAZGOS	42
5. CONCLUSIONES	47

6. BIBLIOGRAFÍA	49
7. LISTA DE ABREVIATURAS	51
8. ANEXO I	52



AUTORIZACIÓN DEL TUTOR PARA LA EXPOSICIÓN PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

(Art. 6.2 del Reglamento de la UVA sobre la Elaboración y Evaluación del Trabajo Fin de Máster)

Prof. ALFREDO CORELL ALMUZARA Y Dra. M. CARMEN MARTÍN ALONSO

en calidad de tutores del alumno

D. ESTEBAN SÁNCHEZ MÁRQUEZ

del Máster en: INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

Curso académico: 2013/2014

CERTIFICA haber leído la memoria del Trabajo de Fin de Máster titulado:

CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS CONJUNTIVITIS DE ORIGEN ALÉRGICO, AUTOINMUNE E INFECCIOSO.

y estar de acuerdo con su exposición pública en la convocatoria de **JULIO**

.....

(indicar julio o

septiembre)

En VALLADOLID a 30 de JUNIO de 2014

Vº Bº

Vº Bº

Fdo.:

Fdo.:

Prof. Alfredo Corell Almuzara

Dra. M. Carmen Martín Alonso



Esteban Sánchez Márquez

Calle Velázquez, 40
06220, Villafranca de los Barros (Badajoz)

Teléfono: (+34) 617 174 699

E-mail: esanma1@usal.es

Formación académica

2007-2009	Bachillerato de Ciencias de la Salud Matrícula de Honor I.E.S. Meléndez Valdés (Villafranca de los Barros)
2009-2013	Graduado en Biotecnología Calificación: 7,6 (sobre 10) – 1.98 (sobre 4) Universidad de Salamanca
2013-Actualmente	Máster en Investigación en Ciencias de la Visión Universidad de Valladolid

Experiencia profesional

Julio-Agosto 2012	Prácticas curriculares en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada, IOBA. (Valladolid).
Curso 2012/2013	Beca de colaboración MEC en el Centro de Enfermedades Tropicales (Univ. Salamanca).
Julio-Septiembre 2013	Prácticas Erasmus en el Anthony Nolan Table Laboratories (Londres).
2013-Actualmente	Beca lanzadera del CIBER-BBN en el grupo de Superficie Ocular del IOBA.

Comunicaciones en congresos.

- 2012 **Virtual vs. Real crossmatch in GECLID-SEI HLA interlaboratory comparison schemes.** (M. Carmen Martín, Esteban Sánchez, Roberto Reinoso, Miguel A. García Hontoria, Mario Martino, Alfredo Corell)
- 2013 **Interlaboratory comparisons in Histocompatibility: GECLID-SEI HLA typing schemes.** (M. Carmen Martín, Esteban Sánchez, Roberto Reinoso, Miguel A. García Hontoria, Mario Martino, Alfredo Corell)
- 2013 **Consensus of participants as best assignation method for interlaboratory comparisons in cell immunity.** (E. Sánchez Márquez, M.A. García Hontoria, R. Reinoso, M. Martino, A. Corell, M.C. Martín)
- 2014 **Immunoglobulins: Consensus of experts as complementary method for interlaboratory comparisons.** (Sánchez, Esteban; Martino, Mario; García, M.A.; Corell, Alfredo; Martín, M.C)
- 2014 **Evaluación de biomarcadores inmunológicos en pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica.** (Martino, Mario; Reinoso, Roberto; Martín, Carmen; Martín, Raquel; Marqués, Victoria; Sánchez, Esteban; Corell, Alfredo)

RESUMEN

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 íntegra la superficie ocular. La distribución inmunotopográfica en individuos sanos puede servir para profundizar en el conocimiento de las patologías inflamatorias de la superficie ocular, como la conjuntivitis. El diagnóstico diferencial de las conjuntivitis de distintas etiologías es un aspecto crucial para realizar un tratamiento eficaz, pero la presentación clínica puede ser inespecífica y son pocos los marcadores diferenciales propuestos.

HIPÓTESIS: El CALT varía inmunológicamente en pacientes con conjuntivitis respecto a individuos sanos y dicha variación es dependiente de la etiología de la conjuntivitis.

OBJETIVOS: Caracterizar inmunológicamente el CALT de pacientes con conjuntivitis alérgicas estacionales. Determinar la utilidad de los parámetros analizados como marcadores diagnósticos, de diagnóstico diferencial y de seguimiento en conjuntivitis de etiologías alérgicas, autoinmunes, infecciosas y medicamentosas.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se recogieron muestras mediante cepillado citológico de la conjuntiva tarsal superior de pacientes con conjuntivitis alérgicas estacionales y se analizaron los porcentajes de linfocitos intraepiteliales (IELs), células viables y en apoptosis y el estado proliferativo celular mediante citometría de flujo. Se realizaron estudios caso-control y de cohortes retrospectivos para determinar la utilidad de los marcadores estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: La población mayoritaria en el infiltrado linfocitario en tarsal superior de los pacientes con alergias estacionales es la Th. Se observa una disminución de células en la fase S y un aumento de la viabilidad global tanto en el estudio caso control como al compararlo con el resto de conjuntivitis. En los estudios caso-control con pacientes con queratoconjuntivitis vernal aumentan los linfocitos Th y la viabilidad global. En el Síndrome de Ojo Seco acuoso deficiente, aumentan los linfocitos T y la viabilidad global con respecto a controles sanos y otras conjuntivitis. En las conjuntivitis adenovirales se observa un aumento del infiltrado linfocitario T citotóxico, de la viabilidad y una disminución del porcentaje de células en reposo frente a sanos y otras conjuntivitis. En el Síndrome de Ojo Seco evaporativo disminuye el infiltrado linfocitario, aumentando la proporción de células B, disminuye la viabilidad y aumentan las células en fase quiescente. En los pacientes con hipertensión ocular que desarrollan conjuntivitis tras el tratamiento con brimonidina se observa un aumento de la quiescencia celular con respecto a controles y conjuntivitis adenovirales.

CONCLUSIÓN: El tejido linfoide asociado a la conjuntiva varía fenotípica y funcionalmente en pacientes con conjuntivitis con respecto a individuos sanos y las variaciones que se observan son diferenciales de los distintos tipos etiológicos de las conjuntivitis. Además se postulan marcadores diagnóstico, diagnóstico diferencial y de seguimiento de las conjuntivitis estudiadas.

1

INTRODUCCIÓN

a) Sistema inmunitario de la mucosa ocular

El sistema inmunitario de las mucosas (MALT, del inglés «Mucosal Associated Lymphoid Tissue») forma parte de la primera línea de defensa del organismo frente a posibles infecciones patógenas. Este sistema previene la entrada de agentes extraños al globo ocular y se caracteriza por una potente inmunoregulación. Se diferencia del sistema inmunitario sistémico en algunos aspectos como son: la ignorancia inmunológica, la tolerancia, el ambiente inmunosupresor local, la limitación de respuestas inflamatorias y su capacidad para inducir tanto respuestas inmunitarias sistémicas como locales.

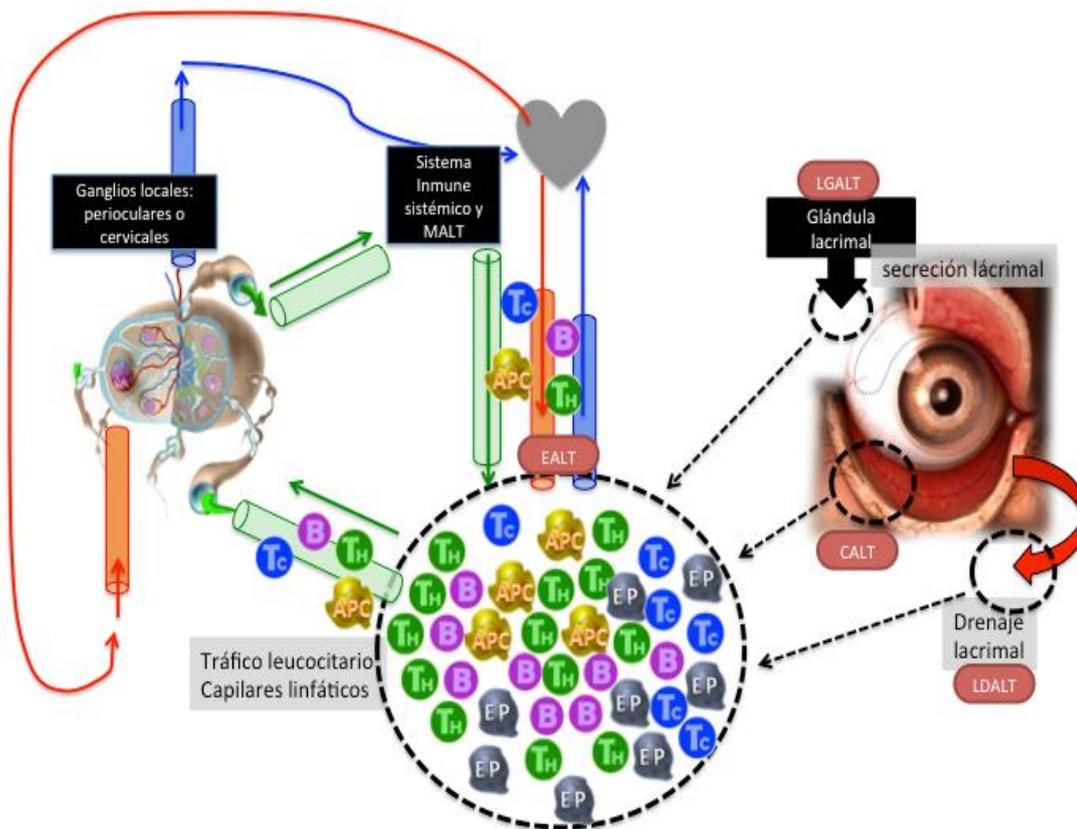


Figura 1. Sistema inmunitario asociado a la mucosa ocular (diseño del profesor Alfredo Corell (pendiente de publicación). En verde tráfico linfático; en azul y rojo tráficos venoso y arterial, respectivamente. Ha de considerarse la irrigación por capilares sanguíneos en el EALT salvo en el caso particular de la córnea. EP: células epiteliales; Th: linfocitos T cooperadores; Tc: linfocitos T citotóxicos; B: linfocitos B; APC: células presentadoras de antígeno.

Las conexiones para el tráfico de células entre el sistema inmunitario ocular y el sistémico son múltiples (capilares linfáticos aferentes y eferentes, ganglios linfáticos, capilares sanguíneos) tal y como se muestra en **Figura 1**. Respecto a las respuestas inmunitarias locales, en el MALT se han localizado sitios «inductores» (organizados) y sitios «efectores» (difusos) de las respuestas inmunitarias locales.

De modo general, la superficie ocular la constituyen los párpados, la conjuntiva, la córnea y una serie de epitelios escamosos estratificados que las recubren (corneal y conjuntival). En los últimos años, numerosos investigadores han estudiado la existencia y propiedades del sistema inmunitario de la superficie ocular^{1, 2}, denominado tejido linfoide asociado al ojo (EALT, del inglés «eye-associated lymphoid tissue»), que actúa como una unidad anatómica y funcional protegiendo la mucosa ocular y que engloba al tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT, del inglés «conjunctiva-associated lymphoid tissue»), al tejido linfoide asociado al sistema de drenaje lagrimal (LDALT, del inglés «lacrimal drainage-associated lymphoid tissue») y al tejido linfoide asociado a la glándula lagrimal (LGALT, del inglés «lacrimal gland-associated lymphoid tissue»)(**Figura 1**).

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.

b) Tejido linfoide asociado a la conjuntiva.

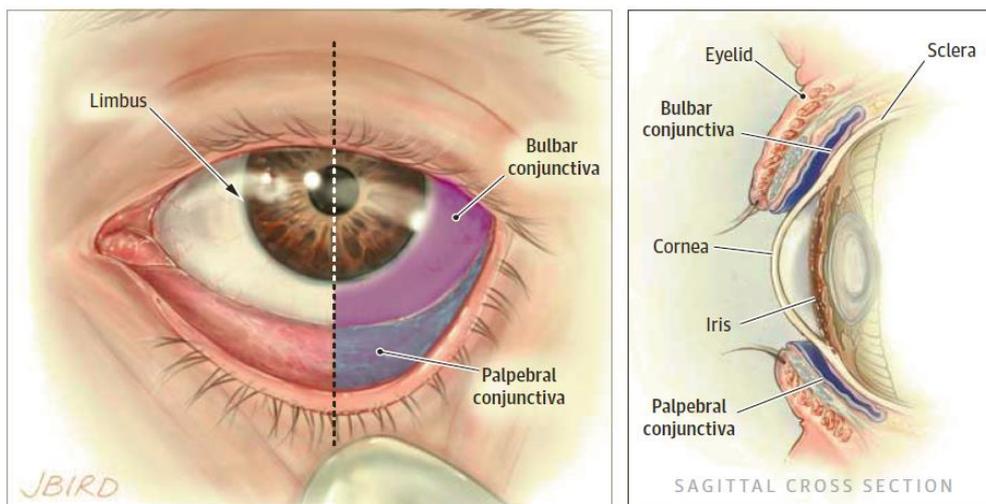


Figura 2. Anatomía de la conjuntiva.

Fuente: Azari AA, Barney NP. Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. *JAMA* 2013;310:1721-9.

La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que recubre la cara interna de los párpados (conjuntivas palpebrales o tarsal superior e inferior), la esclerótica anterior (conjuntiva bulbar), y forma un repliegue entre ambas secciones de la conjuntiva (conjuntiva de fondo de saco o fórnix). Histológicamente se compone de una capa de epitelio estratificado no queratinizado que contiene células caliciformes secretoras de mucina, intercaladas entre células epiteliales, que contribuyen a mantener la capa lagrimal de la superficie ocular. Por debajo de este epitelio se encuentra el tejido conectivo conocido como lámina propia, el cual está altamente vascularizado.

Una de las principales funciones de la conjuntiva consiste en la protección corneal frente a posibles infecciones microbianas y/o agresiones externas, para lo cual cuenta con una amplia gama de células inmunitarias, es decir, un tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), o más concretamente, un tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT), que le va a proporcionar toda una serie de mecanismos de defensa innatos y adaptativos para mantener integra la superficie ocular.

El CALT comprende tanto tejido linfoide organizado (folículos linfoides) donde predominan las células B, como tejido linfoide difuso, principalmente compuesto por linfocitos T y células plasmáticas productoras de IgA, distribuidos entre el epitelio (linfocitos intraepiteliales; IELs, del inglés «intraepithelial lymphocytes») y el tejido conectivo subyacente (linfocitos de lámina propia).³⁻⁶ La densidad de estas células varía en función de la zona conjuntival observada, como queda reflejado en un trabajo realizado por Knop (2000)¹³ en distintas zonas topográficas de la conjuntiva humana. La mayor parte de los IELs de la conjuntiva humana son linfocitos T (CD3+) con un claro predominio de los linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+) sobre los linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+), al contrario de lo que ocurre en la lámina propia.³⁻⁷

Históricamente se ha descrito que la mayor parte de estas células inmunitarias son productoras de citoquinas pro y anti-inflamatorias (Th₁: IL-2, IFN- γ ; Th₂: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). También las células epiteliales conjuntivales son capaces de secretar diversas citoquinas (IL-4, IL-13, TGF- β) implicándose directamente en la iniciación y propagación del fenómeno inflamatorio.^{8,9}

Recientemente, se ha descrito la distribución inmunotopográfica de los IELs en la conjuntiva gracias al uso de técnicas mínimamente invasivas de recolección de células de la superficie ocular, como es la citología por cepillado (BC, del inglés «brush cytology») (**Figura 3**), y a técnicas de análisis celular (fenotipo y función) por citometría de flujo.¹⁰ En el estudio se analizaron tres zonas topográficamente diferentes de la conjuntiva (tarsal superior, bulbar superior y fórnix inferior) en individuos sanos. Sobre cada una de estas tres zonas y mediante citometría de flujo analizaron la presencia de linfocitos intraepiteliales y sus subpoblaciones más características, estudiaron el estado de viabilidad o apoptosis de las células conjuntivales y determinaron en qué fases del ciclo celular se encontraban. Los resultados sugieren que en la mucosa ocular existe una especialización topográfica en cuanto a la funcionalidad del sistema inmunitario (**Figura 4**).¹⁰

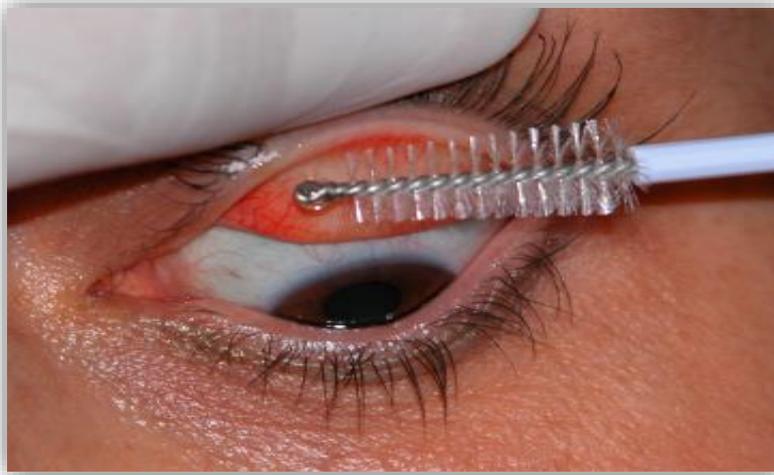


Figura 3. Toma de muestra en conjuntiva tarsal superior mediante citología por cepillado.

Este mapa topográfico del componente epitelial del CALT en individuos sanos puede servir de base para profundizar en el conocimiento de las patologías inflamatorias de la superficie ocular.

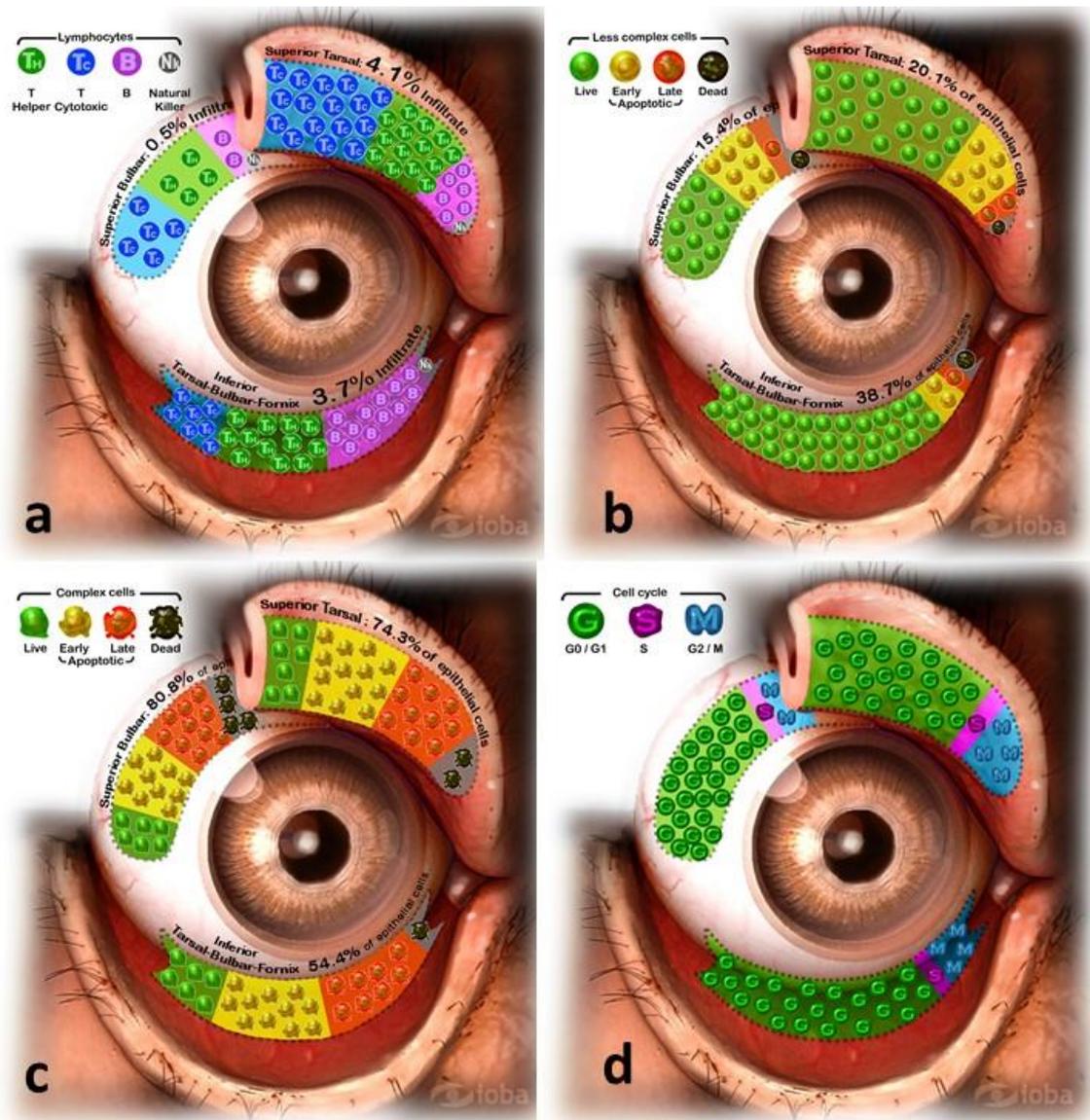


Figura 4. Caracterización de la población celular del CALT en individuos sanos. **(a)** Proporción de células Th, Tc, B y NK. **(b)** Proporción de células simples*¹ vivas, muertas y en fases tempranas y tardías de la apoptosis. **(c)** Proporción de células complejas*² vivas, muertas y en fases tempranas y tardías de la apoptosis. **(d)** Proporción de células en fase G₀/G₁, S y G₂/M.

*¹ Las células simples incluyen los IELs y las células del epitelio basal.

*² Las células complejas son las células superficiales del epitelio y las caliciformes.

Fuente: Reinoso R, Martín-Sanz R, Martino M, et al. Topographical distribution and characterization of epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in the human ocular mucosa. *Mucosal Immunol* 2012;5:455-67.

c) Inflamación de la conjuntiva: Conjuntivitis

La inflamación de la conjuntiva es conocida como conjuntivitis y se caracteriza por la dilatación de los vasos de la conjuntiva, dando lugar a hiperemia y edema de la conjuntiva y aumento de la mucosidad.¹¹ Ésta inflamación es un proceso que debemos considerar como natural y que se produce para proteger nuestra visión ante una patología. Al margen del privilegio inmunitario corneal, la inflamación ocular es similar a la que se produce en otros tejidos del organismo, con implicación tanto de células como de moléculas solubles que acuden y se concentran en el microentorno inflamatorio.

Las conjuntivitis pueden clasificarse atendiendo a varios criterios. Puede ser un signo de patología sistémica, como por ejemplo gonorrea, o una inflamación localizada, por ejemplo la provocada por el contacto con una sustancia tóxica. También se pueden clasificar según su etiología infecciosa (virales, bacterianas, eTc.) o no infecciosa. Entre las conjuntivitis no infecciosas se encuentran las mediadas por el sistema inmunitario: enfermedades autoinmunes, como el Síndrome de ojo Seco, y las de tipo alérgico, por ejemplo la estacional y la queratoconjuntivitis vernal. También se engloban dentro de las conjuntivitis no infecciosas las causadas por el contacto con sustancias tóxicas, reacciones secundarias a fármacos tópicos y sistémicos (medicamentosas) y por traumatismos. Según la etiología de la conjuntivitis que presenta un paciente habrá diferentes abordajes terapéuticos. (Figura 5)

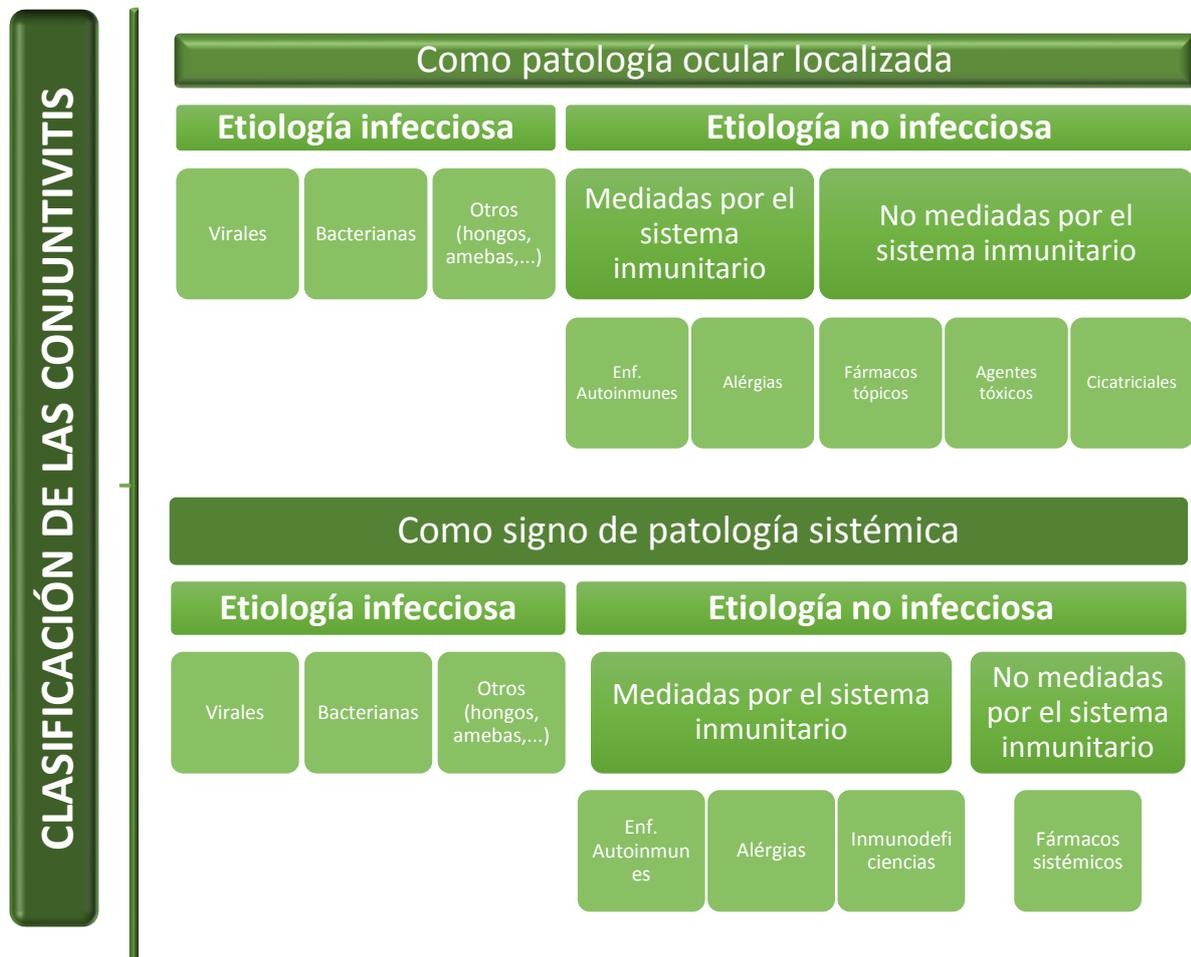


Figura 5. Clasificación de las conjuntivitis.

La conjuntivitis es un problema social y económico. En España, las conjuntivitis alérgicas estacionales y el Síndrome de ojo Seco son las dos causas más frecuentes de visita a los oftalmólogos. Se estima que afecta a 6 millones de personas anualmente en EEUU.¹¹ La mayoría de los pacientes con conjuntivitis son tratados inicialmente por médicos de atención primaria y suponen aproximadamente un 1% de todas las visitas a dichos centros en EEUU¹². Además, alrededor del 70% de los pacientes con conjuntivitis necesitan cuidados urgentes.

La prevalencia de las conjuntivitis varía según la edad del paciente y la estación del año. Las conjuntivitis virales son la causa más común de conjuntivitis infecciosas y sobre todo en población adulta en verano, ya que durante esta época existe una mayor exposición al contagio en lugares como piscinas, ríos y lagunas. Las conjuntivitis bacterianas son la segunda causa y es la responsable entre el 50-75% de las patologías en los niños, más frecuente entre diciembre y abril. En cuanto a las conjuntivitis no infecciosas, las alérgicas son las causas más habituales, afectando al 20% de la población española¹³, especialmente en primavera y verano que es cuando se liberan al ambiente la mayoría de alérgenos (polen, gramíneas,...).¹¹ Se calcula que alrededor del 30% de las personas han sufrido o sufrirán el Síndrome de ojo Seco, afectando más a las mujeres después de la menopausia.¹³ Todo ello supone que solamente el coste estimado del tratamiento de las conjuntivitis bacterianas se sitúe entre 377 y 857 millones de dólares por año en EEUU.¹¹

En resumen, es importante realizar un diagnóstico diferencial de la etiología de las conjuntivitis para realizar un manejo terapéutico óptimo y evitar pérdidas de tiempo, dinero y beneficiando la salud del paciente.

d) Diagnóstico diferencial de las conjuntivitis.

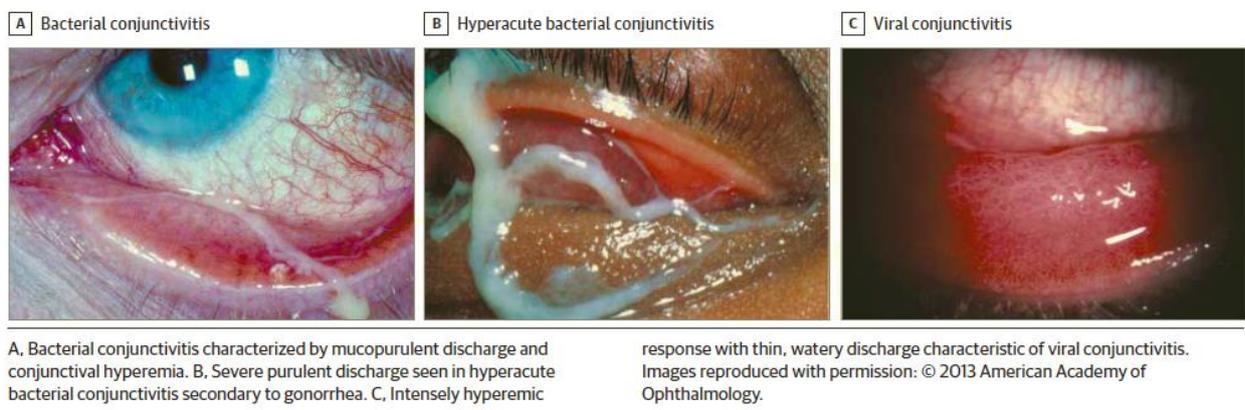


Figura 6. Apariencia característica de la conjuntivitis viral y bacteriana.

Fuente: Azari AA, Barney NP. Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. *JAMA* 2013;310:1721-9.

Hasta la fecha, el examen ocular y la historia clínica son los aspectos de mayor peso a la hora de realizar el diagnóstico y prescribir un tratamiento para las conjuntivitis.¹¹ La secreción mucopurulenta es considerada como signo de las conjuntivitis bacterianas, la secreción acuosa es más característica de las conjuntivitis virales¹¹ (**Figura 6**) y el picor es más frecuente en las conjuntivitis alérgicas.¹¹

La presentación clínica es a menudo inespecífica y el diagnóstico teniendo en cuenta sólo los aspectos anteriores no siempre es preciso. La correlación de los signos y síntomas con el origen patológico de la conjuntivitis no es fiable.¹⁴ Por ejemplo en un estudio llevado a cabo con pacientes con conjuntivitis y cuyo cultivo bacteriano fue positivo, se observó que el 58% presentaba picor, el 65% escozor y el 35% no presentaba secreción mucosa ni supuración. Es decir, a pesar de tener conjuntivitis bacteriana al menos un tercio de los pacientes presentaban un cuadro clínico de conjuntivitis no infecciosa.¹⁵

En 2003 se publicó un metanálisis en el que se intentó establecer la correlación entre signos y síntomas de las conjuntivitis según su origen patológico pero no se logró dicha correlación. Más tarde el autor de dicho metanálisis realizó un estudio de cohortes y encontró que la combinación de tres signos (afectación bilateral, ausencia de picor y no historia clínica de conjuntivitis) correlacionaban con conjuntivitis bacterianas.¹⁵ Además reveló que el tipo de secreción ocular (pus, mucus o acuosa) no era específico de ningún tipo particular de conjuntivitis.^{15, 16}

Hasta la fecha pocas son las técnicas de laboratorio desarrolladas para diferenciar el origen de las conjuntivitis. Ha tenido una gran importancia el uso de la PCR para el diagnóstico de las conjuntivitis virales y microbianas. Esta técnica consiste en la detección de ADN en muestras de conjuntiva y/o lágrima. 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, pero hasta el momento no se ha descrito ningún biomarcador que permita diferenciar entre los diferentes tipos de alergias oculares.

De modo que, aunque se postulan diferentes marcadores para el diagnóstico diferencial de la etiología inflamatoria de la superficie ocular, sigue siendo necesaria la búsqueda de nuevos marcadores celulares y/o moleculares que permitan realizar el diagnóstico diferencial las conjuntivitis, ahorrando así tiempo, dinero y esfuerzo evitando los tratamientos inadecuados.

2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

a) Hipótesis

En base a todo lo anterior, la hipótesis de este trabajo es que el tejido linfoide asociado a la conjuntiva varía fenotípica y funcionalmente en pacientes con conjuntivitis con respecto a individuos sanos y que dicha variación es dependiente de la etiología de la conjuntivitis.

b) Objetivos.

- **Caracterizar** inmunológicamente (fenotipo y función) el tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT) mediante citometría de flujo muestras obtenidas mediante cepillado conjuntival de pacientes con **conjuntivitis alérgica estacional**.
- **Evaluar** la utilidad de los parámetros inmunológicos analizados como marcadores diagnósticos de **conjuntivitis alérgica estacional**.
- **Evaluar retrospectivamente** la utilidad de los parámetros inmunológicos (fenotípicos y funcionales) de las células conjuntivales en conjuntivitis de otras etiologías:
 - Para diagnóstico de **conjuntivitis de origen autoinmune, infeccioso y medicamentoso**.
 - En el seguimiento de **conjuntivitis de origen autoinmune y por medicamento tópico**.
- Evaluar la existencia de **marcadores diferenciales según la etiología** de las diferentes conjuntivitis (alérgica, autoinmune, infecciosa y por medicamento tópico).

3

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Sujetos

El reclutamiento de los participantes del estudio se llevó a cabo en el servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV), en los servicios de Alergia y Oftalmología del Hospital Universitario Río Hortega (HURH) y en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de Valladolid en diferentes etapas. En la **Tabla 1** se muestran todos los grupos de casos y controles participantes de este trabajo, detallándose la zona de la conjuntiva de la que se ha obtenido la muestra y la distribución por sexo y edad.

Tabla 1. Sujetos participantes del estudio.

Tipo de estudio	Grupos		Zona de la conjuntiva	Sexo	N	Edad media	
Exp.	Alergias estacionales		Tarsal superior	M	3	44	
				V	4	43	
Revisión	Adenovirales		Fórnix	M	14	53	
				V	11	42	
	Síndrome de ojo Seco evaporativo (2 visitas) ^{*1}		Fórnix	M	16	58	
				V	7	54	
	Medicamentosa severa (Visitas 2-4) ^{*2}		Fórnix	M	12	67	
				V	13	65	
	Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente		Tarsal superior	M	8	48	
				V	3	56	
	Queratoconjuntivitis vernal		Tarsal superior	M	1	5	
				V	2	17	
	Pediátricos		Tarsal superior	M	1	7	
				V	4	7	
	Adultos (22M, 20V; Edad Media: 53)		Jóvenes	Tarsal superior y Fórnix	M	11	29
					V	10	30
Cataratas		Tarsal superior y Fórnix	M	11	76		
			V	10	76		
Hipertensión ocular tratada con brimonidina (Visita 1) ^{*1}		Fórnix	M	12	67		
			V	13	65		
Medicamentosa moderada (5 visitas) ^{*3}		Fórnix	M	11	70		
			V	16	70		

Abreviaturas: Exp: Experimental; N: N° sujetos.

^{*1} Para los casos en los que hay más de una visita y se realizaron estudios de seguimiento, la visita 1 en la que los pacientes aún no habían sido tratados es la utilizada como referencia.

^{*2} La conjuntivitis medicamentosa severa fue producida en pacientes con hipertensión ocular tratados con brimonidina, agonista de los receptores adrenérgicos alfa-2 (tratamiento tópico).

^{*3} Los pacientes con hipertensión ocular tratados tópicamente con brimonidina y timolol (β -bloqueante) desarrollan conjuntivitis medicamentosa más leve por lo que fue útil para contrastar en el tiempo a los pacientes con conjuntivitis medicamentosa severa en los estudios de seguimiento.

El reclutamiento de pacientes 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 Ético de Investigación Clínica de la Universidad de Valladolid. Cada voluntario fue informado de las características del estudio y del procedimiento de obtención de células, firmando el consentimiento informado ellos mismos o en el caso de menores de edad su padre/madre/tutor legal (Anexo 1). Estos estudios se les propusieron a todos los pacientes que acudieron a consulta y cumplían con los criterios de selección (**Tabla 2**).

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión de los casos y controles.

Criterios de inclusión pacientes:	Criterios de exclusión pacientes:	Criterios de inclusión grupo control:	Criterios de exclusión grupo control:
<ul style="list-style-type: none"> • Edad de inclusión de los participantes entre 3 y 65 años. • Selección de sujetos con diagnóstico de algunas de las patologías recogidas en la Tabla 1. • Presentación de un cuadro activo de alguna de las patologías recogidas en la Tabla 1. 	<ul style="list-style-type: none"> • Padecimiento de patologías crónicas (a excepción del grupo de patologías autoinmunes). • Tratamiento farmacológico sistémico inmunosupresor, o tratamiento tópico, excepto antialérgicos y/o anti-inflamatorios tópicos. • Queratoconjuntivitis vernal en su forma limbar. • Antecedentes de neoplasias hematológicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Edad de inclusión de los participantes entre 3 y 65 años, según los diferentes grupos mencionados en la Tabla 1. • Sujetos sin inflamación de la SO incluidos los que iban a ser intervenidos quirúrgicamente de forma programada de estrabismo o cataratas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Padecer enfermedad inflamatoria de la superficie ocular. • Padecer patologías crónicas • Tratamiento farmacológico sistémico inmunosupresor, o tratamiento tópico, excepto antialérgicos y/o anti-inflamatorios tópicos. • Antecedentes de neoplasias hematológicas • Menarquía en controles pediátricos.

b) Procesamiento de las muestras.

El procedimiento experimental que se presenta a continuación fue realizado antes de las 8 horas posteriores de la recogida de muestra. Si no se pudieron analizar en este tiempo, las muestras fueron desechadas.

- **Obtención de células de la superficie ocular**

La obtención mínimamente invasiva de células de la superficie ocular se llevó a cabo mediante citología por cepillado en la conjuntiva tarsal superior y/o fórnix inferior (**Figura 7**) de los donantes seleccionados, según **Tabla 1**. Las muestras del estudio fueron recogidas personal entrenado y cualificado aunque diferente en cada grupo de individuos.

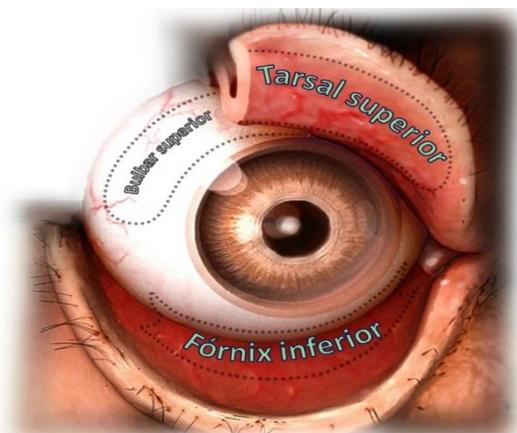


Figura 7. Zonas de la conjuntiva en las que se realizó recogida de muestras por cepillados (excepto Bulbar superior).

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 estreptomina y 2,5 mg/mL de anfotericina B].

Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones, siempre realizándolo en la misma localización y con el mismo procedimiento. Posteriormente, se transportó al laboratorio para su análisis. En el caso de los donantes del grupo control, se les practicó el mismo procedimiento descrito anteriormente a menos que fueran pre-quirúrgicos, dónde la anestesia utilizada fue la correspondiente a dicha cirugía.

- **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 para cada muestra: linfocitos y subpoblaciones (tubo 1 y 2), viabilidad/apoptosis (tubo 3) y fase del ciclo celular (tubo 4).

Las células recuperadas de la superficie ocular fueron incubadas con diferentes anticuerpos y/o marcadores (**Tabla 3**) 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 centrados en las siguientes longitudes de onda: FL1 (525nm), FL2 (575 nm), FL3 (620 nm), FL4 (675 nm) y FL5 (755 nm).

- 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 200µL de la suspensión de células. Las células fueron lavadas con 2mL de una 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.

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales y marcadores utilizados en citometría de flujo.

Tubo	Anticuerpo/marcador	Población	Compañía
1	CD45-PC7	Leucocitos	BC ^{*1}
	CD3-FITC	Linfocitos T	IS ^{*2}
	CD19-PC5	Linfocitos B	BC
	CD16-PE	Linfocitos NK	CL ^{*3}
	CD56-PE	Linfocitos NK	CL
2	CD45-FITC	Leucocitos	BC
	CD3-PC5	Linfocitos T	BC
	CD4-RD1	Linfocitos T cooperadores (Treg) y reguladores (Th)	BC
	CD8-ECD	Linfocitos T citotóxicos (Tc) y supresores (Ts)	BC
3	Anexina V-FITC	Viabilidad/apoptosis	IS
	Ioduro de Propidio (250 µg/ml)	Viabilidad/apoptosis	BC
4	Ioduro de Propidio (50 µg/ml)	Ciclo celular	BC

PC5: Ficoeritrina-Cianina 5; RD1: Rodamina; ECD: Ficoeritrina-Texas Red®-X; FITC: Fluoroisotiocianato de Fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PC7: Ficoeritrina-Cianina 7. ^{*1}BC: Beckman Coulter (Marseille, France), ^{*2}IS: Immunostep (Salamanca, Spain), ^{*3}CL: Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA).

- Subpoblaciones linfocitarias

Tras la centrifugación, las células fueron incubadas en oscuridad con los anticuerpos correspondientes (**Tabla 3**) durante 15 minutos a temperatura ambiente (4µL de la mezcla de anticuerpos para el tubo 1 y 2,5µL de cada anticuerpo para el tubo 2). Posteriormente, las células se fijaron (15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad) con 500µL de una solución de lisis-fijación (FACS™ Lysing solution, BD biosciencias, San Jose, USA) para posteriormente ser analizadas con el citómetro de flujo.

- Viabilidad (estudio de apoptosis)

Las células fueron resuspendidas con 100µL de una solución tampón (Annexin V Binding Buffer, Immunostep, Salamanca, Spain). Después las células se incubaron en oscuridad con 2,5µL de anexina V-FITC (25µg/mL) y 5µL de Ioduro de Propidio (250µg/mL) durante 10 minutos a 4°C (**Tabla 3**). Finalmente, se añadió de nuevo 300µL de la solución tampón a la muestra celular quedando lista para su estudio por citometría de flujo.

- Ciclo celular (estudio del contenido de ADN)

Las células fueron permeabilizadas con 50µL de una solución detergente (DNA-prep LPR, Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA). A continuación, se añadió 700 µL de una solución que contiene Ioduro de Propidio (DNA-prep Stain, Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA) (**Tabla 3**), se agitó suavemente y se incubó en oscuridad durante 30 minutos en una estufa (37°C), quedando listas las células para ser analizadas con el citómetro de flujo.

c) Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado utilizando todos los datos de los sujetos indicados en la **Tabla 1** utilizando el software IBM SPSS PASW Statistics v20.0. Los datos recogidos del citómetro son porcentuales y además se calcularon los siguientes índices (que se indican en tanto por 1):

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

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

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

- **Estudio estadístico descriptivo.**

Se realizó un estudio descriptivo de los resultados obtenidos para el grupo de conjuntivitis alérgica estacional y el resto de datos de la revisión (Datos no mostrados **Tabla 1**), incluyendo media, mediana y error estándar de la media. Los resultados se anotan en el texto como media +/- error estándar.

- **Contraste de hipótesis.**

Se realizaron diferentes análisis de comparación entre los distintos grupos mencionados en la **Tabla 1**. Dado que cada zona del CALT tiene unas características propias,¹⁰ los estudios estadísticos sólo fueron realizados entre los grupos en los que los cepillados conjuntivales se realizaron en la misma localización. La interpretación de los análisis estadísticos fue: p-valor<0,05 → Diferencia significativa; 0,05<p-valor<0,2 → Tendencia; p-valor>0,2 → No hay diferencias.

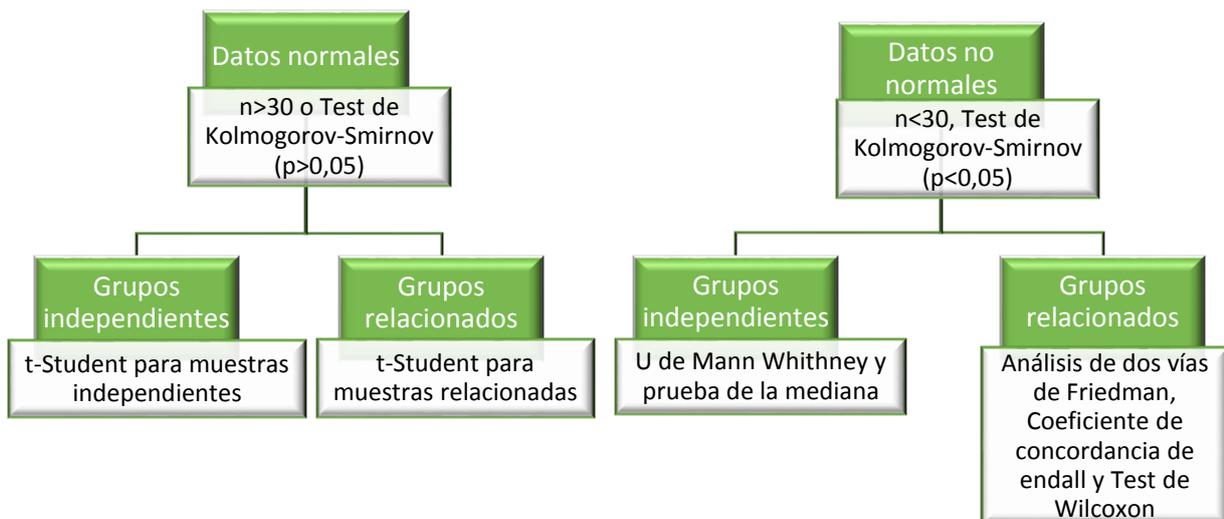


Figura 8. Pruebas estadísticas según características de los datos y grupos a comparar.

➤ Comparación de grupos independientes.

▪ Estudios Caso-Control.

Las comparaciones realizadas en este apartado (**Tabla 4**) tenían como objetivo determinar posibles marcadores diagnóstico de las conjuntivitis, independientemente de su etiología. Se realizaron estudios de grupos pareados según el sexo y edad de los sujetos siempre que fue posible.

Tabla 4. Análisis Caso-Control.

Zona	Caso	Edad (media)	Control	Edad (media)
Tarsal Superior	CA _{est}	44	Adultos	53
	SOS-Ad	51	Adultos	53
	QCV	13	Pediátricos	7
Fórnix	ADV	49	Adultos	53
	SOS-ev	57	Adultos	53
	CM _{sev}	68	Cataratas	75
	*CM _{sev}	68	CM _{mod}	70

CA_{est}: Conjuntivitis alérgicas estacionales; SOS-Ad: Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenoviral; SOS-ev: Síndrome de ojo Seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa; CM_{mod}: Conjuntivitis medicamentosa moderada.

* El objetivo de este análisis era determinar algún posible marcador diagnóstico y de seguimiento de la conjuntivitis medicamentosa provocada por la brimonidina.

▪ Estudios de Diagnóstico Diferencial. Cohortes.

Las comparaciones realizadas en este apartado (**Tabla 5**) tenían como objetivo determinar posibles marcadores de la conjuntivitis que aportaran información sobre el origen de la misma.

Tabla 5. Análisis de marcadores diferenciales.

Zona	Enfermedad 1		Enfermedad 2	
	Grupo	Edad media	Grupo	Edad media
Tarsal Superior	SOS-Ad	51	QCV	13
	SOS-Ad	51	CA _{est}	44
	QCV	13	CA _{est}	44
Fórnix	ADV	49	SOS-ev	57
	ADV	49	CM _{sev}	68
	SOS-ev	57	CM _{sev}	68

CA: Conjuntivitis Alérgicas estacionales; SOS-Ad: Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenovirales; SOS-ev: Síndrome de ojo Seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa.

➤ Comparación de grupos relacionados.

- Seguimiento de conjuntivitis por Síndrome de Ojo Seco evaporativo.

En este análisis se comparó el efecto del tratamiento con dexametasona tras 2 meses en pacientes con Síndrome de ojo Seco evaporativo con el momento en el que se realizó el diagnóstico. El objetivo era determinar la existencia de algún marcador diagnóstico y de seguimiento de este tipo de conjuntivitis.

- Seguimiento de conjuntivitis medicamentosa.

En este análisis se comparó el efecto de un tratamiento tópico, brimonidina, durante un año en pacientes con hipertensión ocular con el momento del diagnóstico y frente a otro grupo de pacientes tratados con brimonidina y timolol durante el mismo período de tiempo. El objetivo era determinar la existencia de algún marcador asociado con la aparición de síntomas más moderados o severos de conjuntivitis medicamentosa causada por brimonidina.

4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los resultados aquí recogidos son porcentajes.

a) Caracterización de la conjuntivitis alérgica estacional.

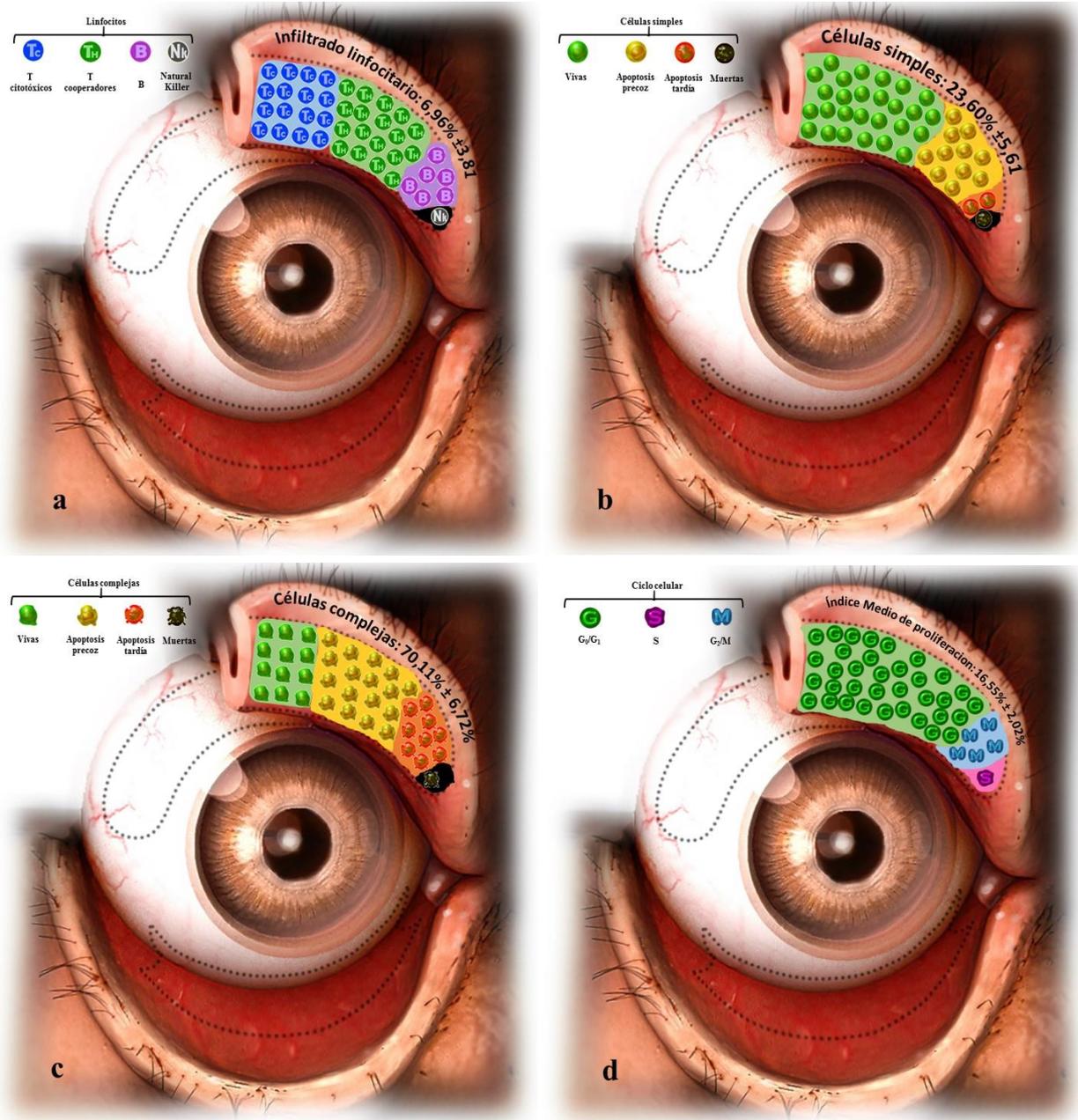


Figura 9. Caracterización de la población celular del CALT en individuos sanos. (a) Células Th, Tc, B y NK. (b) Células simples vivas, muertas y en fases tempranas y tardías de la apoptosis. (c) Células complejas vivas, muertas y en fases tempranas y tardías de la apoptosis. (d) Células en fase G₀/G₁, S y G₂/M.

- **Linfocitos y subpoblaciones linfocitarias.**

Se observó una población de linfocitos intraepiteliales ($6,96\% \pm 3,81$). Estos linfocitos fueron predominantemente linfocitos T ($80,43\% \pm 2,87$), principalmente cooperadores, Th, ($42,83\% \pm 5,67$) y citotóxicos, Tc, ($37,60\% \pm 4,29$). También se encontraron linfocitos B ($14,60\% \pm 2,79$) y, en menor medida, linfocitos NK ($0,43\% \pm 0,20$) (**Figura 9.a**). El valor de los cocientes CD4/CD8 y CD3/CD19 fue $1,30 \pm 0,25$ y $7,08 \pm 1,49$, respectivamente.

Ya se ha descrito previamente que el porcentaje de linfocitos T, especialmente el de Th, es mayoritario,¹⁷ lo cual concuerda con nuestros resultados. Los linfocitos B liberan IgE en las conjuntivitis alérgicas¹⁷ y las células NK amplifican la respuesta Th₂ necesaria para el desarrollo de las conjuntivitis alérgicas^{18, 19}.

- **Viabilidad/Apoptosis.**

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 tamaño diverso. Se piensa que en el primer grupo se incluyen los IELs y las células del epitelio basal y en el segundo las células superficiales del epitelio y las caliciformes.¹⁰

Las células simples constituían el $23,60\% \pm 5,61$ de las células totales. Estas eran mayoritariamente viables ($69,54\% \pm 5,99$), seguidas por las que se encontraban en fase temprana de la apoptosis ($25,99\% \pm 5,81$) y tardía ($3,27\% \pm 0,90$) y, por último, muertas ($0,91\% \pm 0,32$) (**Figura 9.b**). En cuanto a las células complejas, constituían el $70,11\% \pm 6,72$ de las células totales. Casi un tercio de ellas eran viables ($29,31\% \pm 7,21$), 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 9.c**).

En la bibliografía se ha descrito la efectividad de un fármaco anti-apoptótico de eosinófilos en la conjuntivitis alérgica, lo cual sugiere que dichas células son mayoritariamente viables en dicha patología.²⁰ Los eosinófilos se encuentran entre el grupo de las células simples por lo que concuerdan con los resultados de este trabajo. Otros artículos exponen que en pacientes con conjuntivitis alérgica, el epitelio se encuentra desestructurado, lo cual coincide con los resultados obtenidos ya que se observa un predominio de las células en apoptosis.²¹

- **Ciclo celular.**

Referente a las fases del ciclo celular, se encontró un mayor porcentaje de células conjuntivales en la fase quiescente G₀/G₁ (71,31% ± 2,73), seguidas de células conjuntivales en fase de mitosis G₂/M (10,83% ± 1,55) y en fase de síntesis S (3,02% ± 0,43), respectivamente (**Figura 9.c**). El índice medio de proliferación, MPI, fue 16,55% ± 2,02.

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.

b) Evaluación de marcadores de conjuntivitis alérgicas estacionales.

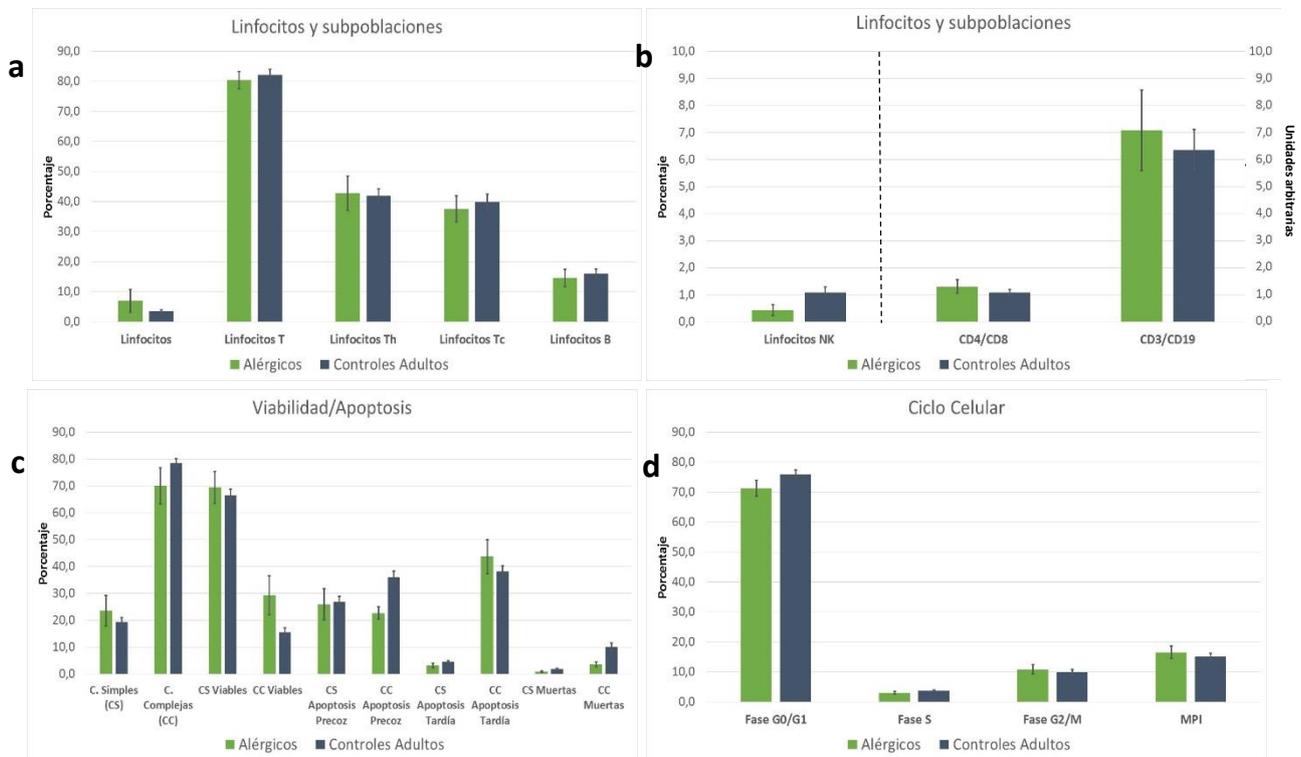


Figura 10. Comparación de la zona tarsal superior de la conjuntiva de pacientes con Conjuntivitis alérgica vs. Controles Adultos. (a), (b) Estudio de linfocitos y subpoblaciones (c) Estudio de viabilidad y apoptosis (d) Estudio de las fases del ciclo celular.

Para evaluar la utilidad de los marcadores estudiados en los pacientes alérgicos estacionales como posibles marcadores diagnósticos, se realizó una comparación de los mismos con controles adultos (**Tabla 4**). Los resultados fueron los siguientes:

- **Linfocitos y subpoblaciones.**

En comparación con los controles sanos, tan solo se observó una tendencia de disminución del porcentaje de células NK en los pacientes con conjuntivitis alérgica estacional. (**Figura 10.a, b**).

Las subpoblaciones linfocitarias juegan un papel fundamental en la conjuntivitis alérgica estacional.²² 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 efectora²³ (aparición de los signos y síntomas)¹⁸. Sin embargo, son los linfocitos Th₂ los que se encuentran mayoritariamente, puesto que tienen un papel fundamental en el desarrollo de la conjuntivitis alérgica estacional²⁴. Sobre los linfocitos NK, algunos estudios publicados no concuerdan con la tendencia estadística en este trabajo, la cual con un mayor número de pacientes podría resolverse. Por ejemplo, en modelos murinos se encontró que estas células median o amplifican la respuesta Th₂ necesaria para el desarrollo de la conjuntivitis alérgica estacional.^{18, 19} Otros estudios han comprobado en pacientes con queratoconjuntivitis vernal, conjuntivitis alérgica, que el nivel de linfocitos NK es significativamente menor en sangre pero está elevado en la conjuntiva de dichos pacientes; sin embargo, no se especifica la zona en la que se recogió la biopsia lo que es un aspecto imprescindible, como hemos visto para la interpretación, ya que la distribución varía por zonas.

- **Viabilidad/Apoptosis.**

Se identificó una disminución significativa en las células complejas en fase temprana de la apoptosis ($22,76\% \pm 2,30$ vs $36,04\% \pm 2,39$, $p < 0,05$) y muertas ($3,73 \pm 0,87\%$ vs $10,12 \pm 1,57\%$, $p < 0,05$). También se identificó una tendencia al aumento de la viabilidad de estas células. En las células simples se observó una disminución de la apoptosis tardía y muertas, sin llegar a ser estadísticamente significativa (**Figura 10.c**).

Todas las diferencias encontradas en el análisis, tendencias o significativas, tienden a un aumento de la viabilidad de las células simples y complejas. El aumento de la viabilidad podría deberse al papel fundamental que tienen las células del epitelio conjuntival en la inflamación alérgica. Estas células se engloban parte en el grupo de células complejas (células superficiales del epitelio y las caliciformes) y parte en las células simples (células del epitelio basal de la conjuntiva).

- **Ciclo celular.**

Se observó una disminución del porcentaje de células en fase de síntesis, sin llegar a ser significativa (**Figura 10.d**).

Algunos autores sugieren el estudio de la proliferación de linfocitos B en enfermedades alérgicas²⁵. También se ha descrito que el número de macrófagos y linfocitos T aumenta en pacientes con rinitis alérgica estacional²⁶. Es decir, estos estudios contradicen la disminución de células en fase de síntesis que nosotros observamos y, además sugiere que se deberían haber encontrado diferencias en el MPI.

Tabla 6. Conjuntivitis alérgica estacional vs. Controles Adultos.

Subpoblaciones	Viabilidad/ apoptosis	Ciclo celular
↓ Linfocitos NK (0,43% ±0,2 vs 1,09% ±0,19)	↓ Células complejas en fase temprana de la apoptosis (22,76% ±2,30 vs 36,04% ±2,39) ↓ Células complejas muertas (3,73 ±0,87% vs 10,12 ±1,57%) ↓ Células simples en apoptosis tardía (3,27% ±0,9 vs 4,67% ±0,48) ↓ Células simples muertas (0,91% ±0,32 vs 1,90% ±0,35) ↑ Viabilidad de las células complejas (29,31% ±7,21 vs 15,62% ±1,52)	↓ Células en fase S (3,02% ±0,43% vs 3,70% ±0,20)

En color **azul (disminución)** → Diferencias estadísticamente significativas, p-valor<0,05, entre los dos grupos.

En negro → Tendencias estadísticas, es decir, p-valor entre 0,05-0,20.

c) Marcadores diferenciales de la conjuntivitis.

En este apartado se llevará a cabo el estudio de Caso-Control y la búsqueda de posibles marcadores de diagnóstico diferencial de las conjuntivitis estudiadas. Destacar que los pacientes con hipertensión ocular que desarrollaron conjuntivitis severa por el tratamiento con brimonidina ya tenían afectados algunos parámetros de los estudiados, probablemente debido a tratamientos previos. Por ello, las diferencias encontradas en dichos parámetros en los análisis estadísticos habrán de tomarse con precaución.

- **Screening de marcadores para el diagnóstico.**

- Subpoblaciones linfocitarias

El infiltrado linfocitario se encontró aumentado en los pacientes con conjuntivitis adenovírica y disminuido en los de ojo seco y conjuntivitis medicamentosa severa. Los linfocitos T se encuentran aumentados en todas las patologías estudiadas excepto en los pacientes de ojo seco evaporativo donde disminuyó. En el caso de los pacientes con conjuntivitis adenovírica aumentaron los linfocitos Tc y en el caso de la queratoconjuntivitis vernal los Th. Los linfocitos NK disminuyeron en todas las entidades clínicas estudiadas excepto en las queratoconjuntivitis vernal y de ojo seco evaporativo. Un esquema más detallado de estos resultados se encuentra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Resultados análisis Caso-Control. Subpoblaciones linfocitarias.

Zona	Caso	Control	Subpoblaciones linfocitarias
Tarsal Superior	SOS-Ad	Adultos	↑ Linfocitos T (85,94% ±1,37 vs 71,00% ±2,86) ↓ Linfocitos NK (0,61% ±0,25 vs 0,80% ±0,15)
	QCV	Pediátricos	↑ Cociente CD3/CD19 (7,91% ±1,15 vs. 3,06% ±1,19) ↑ Linfocitos T (86,63% ±2,16 vs. 64,48% ±9,18) ↑ Linfocitos Th (58,66% ±6,34 vs. 32,58% ±4,350) ↑ Linfocitos NK (1,07% ±0,96 vs. 0,34% ±0,060) ↓ Linfocitos B (11,4% ±1,57 vs. 34,12% ±9,070)
Fórnix	ADV	Adultos	↑ IELs (13,83% ±1,67 vs. 3,29% ±0,44) ↑ Linfocitos Tc (49,74% ±3,56 vs. 32,44% ±3,45) ↓ Linfocitos Th (26,54% ±2,33 vs. 37,94% ±2,14) ↓ Linfocitos B (20,48% ±3,19 vs. 28,48% ±2,79) ↓ Linfocitos NK (0,57% ±0,08 vs. 0,8% ±0,15) ↓ Cociente CD4/CD8 (0,66% ±0,09 vs. 1,83% ±0,28) ↑ Cociente CD3/CD19 (5,66% ±0,73 vs. 3,64% ±0,52) ↑ Linfocitos T (78,13% ±3,17 vs. 70,99% ±2,860)
	SOS-ev	Adultos	↓ Infiltrado linfocitario (1,83% ±0,20 vs. 3,29% ±0,44) ↓ Linfocitos T (62,53% ±3,87 vs. 70,99% ±2,860) ↑ Linfocitos B (37,51% ±3,94 vs. 28,48% ±2,790) ↓ Cociente CD3/CD19 (1,96% ±0,31 vs. 3,64% ±0,520)
	CM _{sev}	Cataratas	↑ Linfocitos T* (79,11% ±1,96 vs. 61,28% ±3,27) ↑ Linfocitos Tc* (43,41% ±4,25 vs. 21,4% ±3,21) ↓ Linfocitos B* (20,64% ±2,02 vs. 37,29% ±3,44) ↓ Linfocitos NK (0,59% ±0,17 vs. 1,18% ±0,21) ↓ Cociente CD4/CD8 (1,00% ±0,17 vs. 2,43% ±0,37) ↑ Cociente CD3/CD19* (4,65% ±0,56 vs. 2,13% ±0,40) ↓ IELs (2,33% ±0,44 vs. 3,74% ±0,700)

Abreviaturas. SOS-Ad: Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenoviral; SOS-ev: Síndrome de ojo Seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa. En color **rojo (aumento)** y **azul (disminución)** → Diferencias estadísticamente significativas, p-valor<0,05, entre los dos grupos. En negro → Tendencias estadísticas, es decir, p-valor entre 0,05-0,20.

* Parámetros que estaban afectados en los pacientes con hipertensión ocular previamente al tratamiento con brimonidina.

La variante del Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente es la forma más grave de esta patología. Los linfocitos Th pueden tener una función protectora contra esta enfermedad, lo cual explicaría el aumento de estas células. Sobre los linfocitos NK no está claro cuál es su papel en esta patología si bien observamos su disminución.²⁷ Sin embargo, en el ojo seco evaporativo se observa lo contrario: disminución de infiltración total y de linfocitos T y B. Estas diferencias pueden relacionarse con la gravedad del Síndrome de ojo Seco aunque hay que tener en cuenta que las muestras de pacientes con ojo seco acuoso deficiente fueron tomadas en la zona tarsal superior de la conjuntiva mientras que las de pacientes con ojo seco evaporativo se recogieron del fórnix inferior.

En la queratoconjuntivitis vernal, se produce una inflamación de tipo Th2. También, el aumento de los linfocitos Th y NK ya han sido descritos por otros autores.²² Aumentan los linfocitos Th²² y los NK²². Como hablamos de proporciones, el aumento de T supone la bajada de B y el aumento del cociente CD3/CD19. Todos estos datos han de ser corroborados con un mayor número de pacientes.

Los resultados obtenidos en los pacientes con conjuntivitis adenoviral concuerdan con una respuesta inflamatoria citotóxica que nuestro sistema inmune genera ante virus de forma general: aumento de linfocitos T, concretamente de los linfocitos Tc para acabar con el agente patógeno.

El tratamiento con brimonidina, en cambio, provoca una disminución del infiltrado linfocitario y la disminución de linfocitos NK. Por tanto, estos dos parámetros podrían ser útiles como marcadores de la conjuntivitis medicamentosa por brimonidina que se produce en pacientes con hipertensión ocular y con tratamiento prolongado con colirios anti-glaucomatosos.

➤ Viabilidad/Apoptosis.

Las células simples se encuentran aumentadas en los pacientes con conjuntivitis de origen adenoviral y de Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente, mientras que en el ojo seco evaporativo se encuentran disminuidas. En las células complejas ocurre el fenómeno opuesto.

La viabilidad está aumentada en células simples y complejas de conjuntivitis adenovírica y en células complejas de conjuntivitis por ojo seco acuoso deficiente. Por otro lado, hay menos células simples viables en el ojo seco evaporativo.

Las células simples en fases de apoptosis temprana disminuyen en los pacientes con conjuntivitis adenoviral y en las complejas del ojo seco evaporativo. Por el contrario aumentan las células complejas en estas fases en la queratoconjuntivitis vernal.

Las células en fase de apoptosis tardía y muertas son menores en conjuntivitis de origen adenoviral y Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente; también ocurre lo mismo con las células complejas de los pacientes de queratoconjuntivitis vernal. Por el contrario, las células simples en fase de apoptosis tardía y muertas se encuentran aumentadas en el Síndrome de Ojo Seco acuoso evaporativo.

Un esquema más detallado de estos resultados se encuentra en la **Tabla 8**.

Los resultados obtenidos en los pacientes con Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente concuerdan con los obtenidos con lo descrito en el apartado anterior. El aumento de células simples se deberá presuntamente al aumento de linfocitos Th, que tienen un efecto protector tal y como se observa en otros estudios.²⁷ También como se ha descrito en el apartado anterior, en los pacientes con ojo seco evaporativo se observa un perfil distinto por lo que puede tener que ver con una gravedad menor de la enfermedad. Esto se debe tomar con precaución puesto que las muestras de pacientes con ojo seco acuoso deficiente fueron tomadas en la zona tarsal superior de la conjuntiva mientras que las de pacientes con ojo seco evaporativo se recogieron del fórnix inferior.

Se ha descrito que las células epiteliales, debido a la expresión de receptores de membrana como los toll-like receptors (TLRs), podrían estar implicados en la respuesta inmune innata por lo que tendrían un papel regulatorio en las enfermedades alérgicas. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los análisis de la queratoconjuntivitis vernal.²²

Con respecto a la conjuntivitis adenoviral y complementariamente con los resultados obtenidos en el apartado anterior, las células simples, entre las que se encuentra el infiltrado linfocitario, aumentan. Además, la viabilidad de todas las células aumenta, lo cual coincide con el perfil de actuación típico de los virus que es el de mantenerlas vivas para su replicación.

En los pacientes con conjuntivitis medicamentosa provocada por brimonidina se observó que las células, tanto simples como complejas, tienen una menor viabilidad. Esto concuerda con el efecto tóxico ampliamente descrito que tiene el tratamiento prolongado de la brimonidina en pacientes con hipertensión ocular.²⁸

Ciclo celular.

Se observa un aumento de las células en reposo en los pacientes con conjuntivitis medicamentosa severa y en los del ojo seco evaporativo, al contrario que en las de origen adenoviral en las que disminuyen. También se observa una disminución de células en fase G₂/M y del MPI en la conjuntivitis medicamentosa. Un esquema más detallado de estos resultados se encuentra en la **Tabla 9**.

Tabla 8. Resultados análisis Caso-Control. Viabilidad/Apoptosis.

Zona	Caso	Control	Viabilidad/Apoptosis
Tarsal Superior	SOS-Ad	Adultos	<p>↑ Células simples (27,82% ±3,63 vs 27,27% ±3,39)</p> <p>↓ Células complejas (69,87% ±3,50 vs 68,25% ±3,25)</p> <p>↑ Células complejas viables (23,52% ±3,98 vs 16,56% ±2,39)</p> <p>↓ Células complejas en apoptosis tardía (28,748% ±4,11 vs 36,48% ±3,09)</p> <p>↓ Células simples muertas (0,70% ±0,24 vs 1,05% ±0,26)</p> <p>↓ células simples en apoptosis tardía (3,48% ±0,9 vs 2,87% ±0,45)</p> <p>↓ células complejas muertas (7,20% ±2,85 vs 9,37% ±2,04)</p>
	QCV	Pediátricos	<p>↓ Células complejas muertas (0,7% ±0,15 vs. 7,94% ±2,64)</p> <p>↑ células complejas en apoptosis temprana (54,63% ±22,7 vs. 12,2% ±1,89)</p> <p>↓ células complejas en apoptosis tardía (13,8% ±7,15 vs. 40,92% ±7,27)</p>
Fórnix	ADV	Adultos	<p>↑ Células simples (52,06% ±3,47 vs. 27,27% ±3,39)</p> <p>↓ Células complejas (45,42% ±3,14 vs. 68,25% ±3,24)</p> <p>↑ Células simples viables (87,11% ±3,51 vs. 74,57% ±3,51)</p> <p>↑ Células complejas viables (54,89% ±5,91 vs. 16,55% ±2,39)</p> <p>↓ Células simples en apoptosis temprana (11,61% ±3,27 vs. 21,47% ±3,11)</p> <p>↓ Células simples en apoptosis tardía (0,872% ±0,39 vs. 2,871% ±0,45)</p> <p>↓ Células complejas en apoptosis tardía (15,58% ±3,08 vs. 36,48% ±3,09)</p> <p>↓ Células simples muertas (0,39% ±0,12 vs. 1,05% ±0,25)</p> <p>↓ Células complejas muertas (2,80% ±0,78 vs. 9,37% ±2,04)</p>
	SOS-ev	Adultos	<p>↓ Células simples (10,88% ±0,68 vs. 27,27% ±3,39)</p> <p>↑ Células complejas (85,39% ±0,75 vs. 68,25% ±3,24)</p> <p>↓ Células complejas en apoptosis temprana (21,68% ±1,44 vs. 34,29% ±2,66)</p> <p>↓ células simples viables (64,85% ±3,65 vs. 74,57% ±3,51)</p> <p>↑ células simples en apoptosis tardía (4,78% ±0,71 vs. 2,87% ±0,45)</p>
	CM _{sev}	Cataratas	<p>↓ Células simples (13% ±1,88 vs. 38,68% ±5,36)</p> <p>↑ Células complejas (85,23% ±1,93 vs. 54,39% ±4,11)</p>

SOS-Ad: Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenoviral; SOS-ev: Síndrome de ojo Seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa.

En color **rojo (aumento)** y **azul (disminución)** → Diferencias estadísticamente significativas, p-valor<0,05, entre los dos grupos. En negro → Tendencias estadísticas, es decir, p-valor entre 0,05-0,20.

*Parámetros que estaban afectados en los pacientes con hipertensión ocular previamente al tratamiento con brimonidina

Tabla 9. Resultados análisis Caso-Control. Ciclo celular.

Zona	Caso	Control	Ciclo celular
TS	SOS-Ad	Adultos	-
	QCV	Pediátricos	-
Fx	ADV	Adultos	↓ Células en fase G ₀ /G ₁ (68,98% ±2,03 vs. 77,70% ±1,36)
	SOS-ev	Adultos	↑ Células en fase G ₀ /G ₁ (80,90% ±1,38 vs. 77,70% ±1,36)
	CM _{sev}	Cataratas	↑ Células en fase G ₀ /G ₁ (82,83% ±1,35 vs. 75,59% ±1,89) ↓ Células en fase G ₂ /M* (8,33% ±0,83 vs. 12,39% ±0,99) ↓ MPI* (13,05% ±1,09 vs. 18,03% ±1,29)

Abreviaturas: SOS-Ad: Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenoviral; SOS-ev: Síndrome de ojo Seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa; TS: Tarsal superior; Fx: Fórnix inferior.

En color **rojo (aumento)** y **azul (disminución)** → Diferencias estadísticamente significativas, p-valor<0,05, entre los dos grupos. En negro → Tendencias estadísticas, es decir, p-valor entre 0,05-0,20.

* Parámetros que estaban afectados en los pacientes con hipertensión ocular previamente al tratamiento con brimonidina.

Hay pocos estudios publicados sobre ciclo celular y proliferación. Sin embargo, en las infecciones por virus suele ocurrir que las células están sintetizando ADN para la replicación del virus, por lo que dejan de estar en reposo. Esto concuerda con la tendencia encontrada de la disminución de células en fase quiescente (G₀/G₁). Se ha publicado algún estudio con una línea celular de epitelio corneal en el que se observa que la brimonidina disminuye la proliferación, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.²⁹

- **Screening de marcadores de seguimiento.**

- Seguimiento de la conjuntivitis provocada por el Síndrome de ojo Seco.

El objetivo de este análisis fue buscar posibles marcadores de seguimiento o de evolución en pacientes con conjuntivitis por Síndrome de ojo Seco evaporativo y tratada durante 2 meses con dexametasona tópica (corticoide).

Respecto a las subpoblaciones linfocitarias se observó que los linfocitos Tc aumentaban en la segunda visita (25,7% ±2,22 vs. 35,21% ±4,07, p<0,2) en detrimento de los linfocitos Th (36,87% ±4,23 vs. 27,42% ±2,33, p<0,05); como consecuencia de ambos cambios bajó sensiblemente el cociente CD4/CD8 en la segunda visita (1,577% ±0,24 vs. 0,848% ±0,11, p<0,2) (**Figura 11.a, b**). Por otro lado, la viabilidad de las células simples aumentó (64,85% ±3,65 vs. 54,55% ±4,08, p<0,2) y disminuyeron las células simples en fases iniciales de la apoptosis (26,60% ±2,92 vs. 36,41% ±3,53, p<0,05) y las complejas en fases tardías de la apoptosis (41,6% ±3,10 vs. 47,99% ±3,17, p<0,2) (**Figura 11.c**). No se observaron diferencias en el estudio del ciclo celular de las células entre las visitas al diagnóstico y tras 2 meses de tratamiento (**Figura 11.d**).

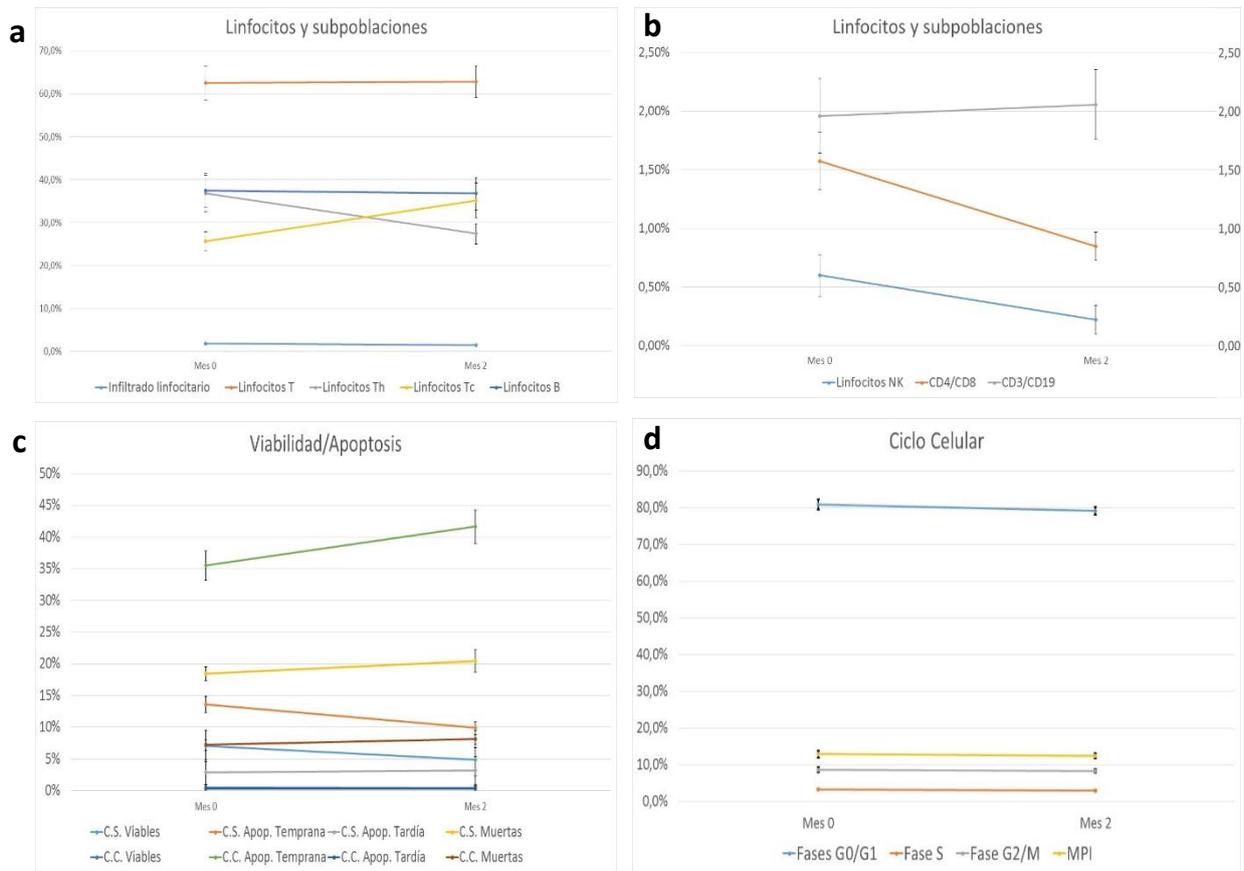


Figura 11. Comparación de la zona tarsal superior de la conjuntiva de pacientes con SOS al diagnóstico y tras dos meses de tratamiento con dexametasona. **(a), (b)** Estudio de linfocitos y subpoblaciones (cocientes CD4/CD8 y CD3/CD19 se expresan en unidades arbitrarias) **(c)** Estudio de viabilidad y apoptosis **(d)** Estudio de las fases del ciclo celular.

Como resumen, la determinación del porcentaje de linfocitos Th, Tc o su cociente (CD4/CD8), y el porcentaje de viabilidad celular podrían postularse como marcadores de seguimiento del tratamiento con corticoides del Síndrome de ojo Seco evaporativo y servir para hacer un seguimiento de la evolución de los pacientes.

➤ Estudio de seguimiento de la conjuntivitis medicamentosa.

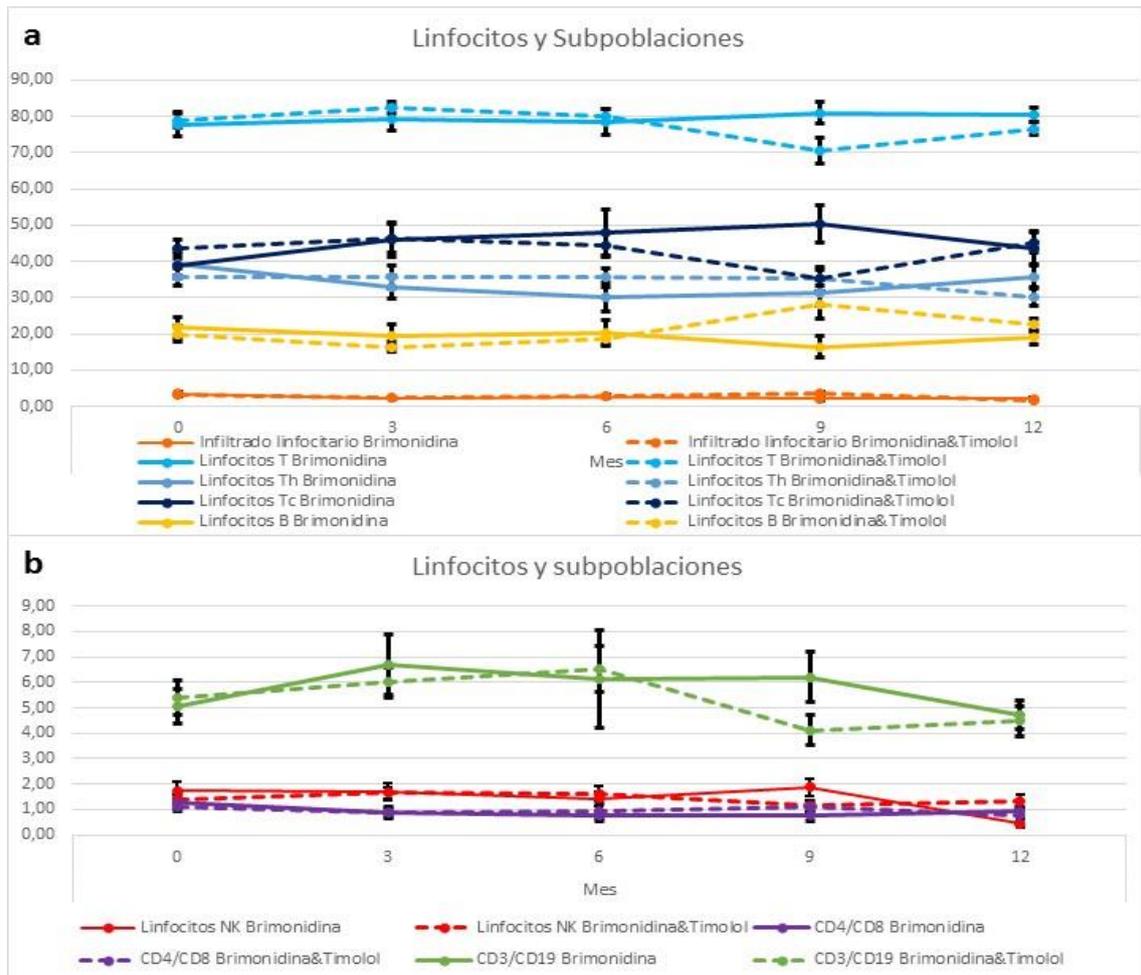


Figura 12. Comparación a lo largo de un año del fórnix de la conjuntiva de pacientes con hipertensión ocular tratados con brimonidina y pacientes tratados con brimonidina y timolol. **Linfocitos y subpoblaciones.**

En este caso, el objetivo del análisis fue encontrar un marcador en la superficie ocular que nos permitiera la detección precoz de la conjuntivitis provocada por el tratamiento con brimonidina en pacientes con hipertensión ocular. Este marcador debía tener un comportamiento distinto en el grupo de pacientes tratados con brimonidina vs. brimonidina&timolol (el timolol neutraliza parcialmente los efectos dañinos de la brimonidina sobre la superficie ocular, datos aún no publicados).

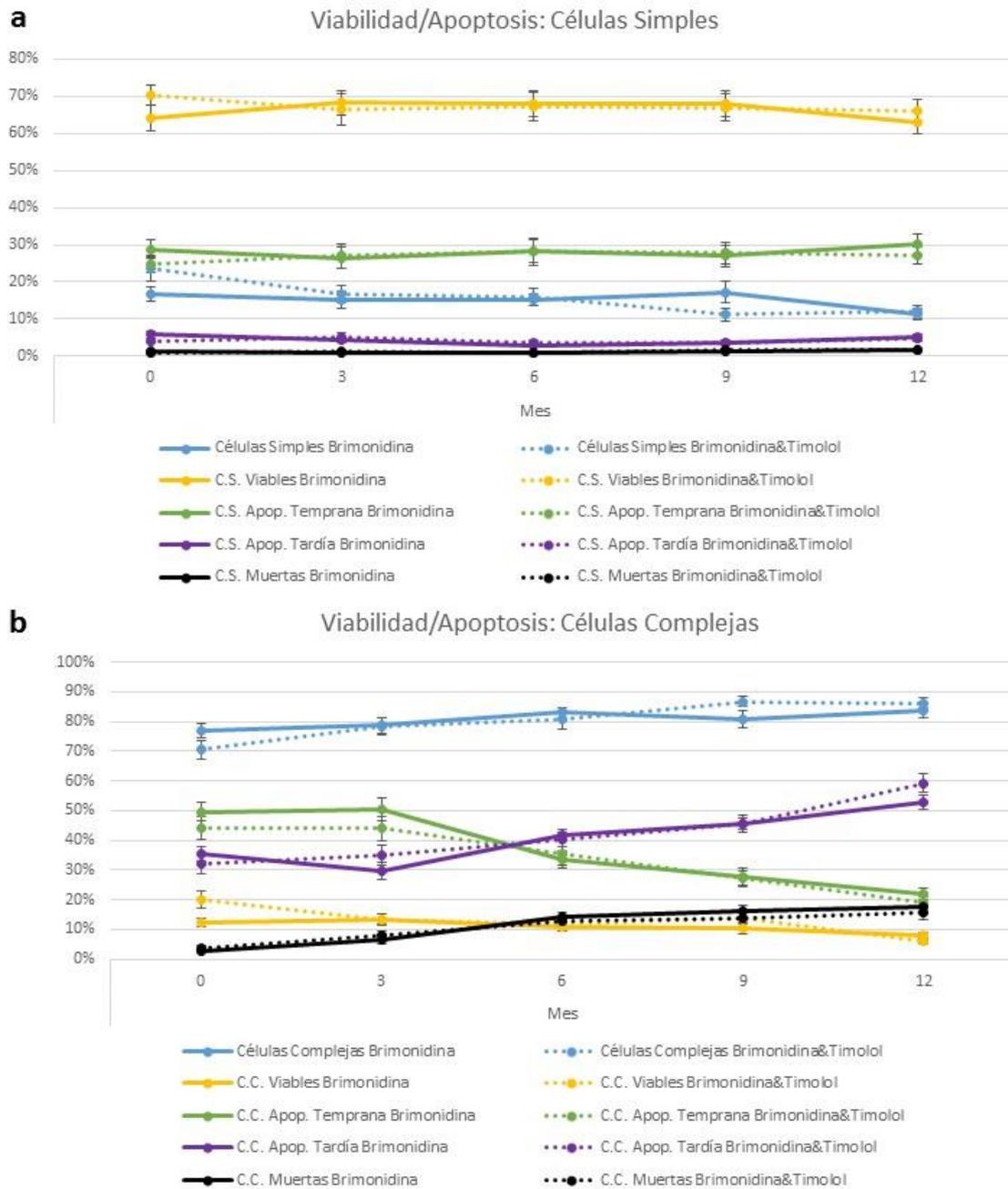


Figura 13. Comparación a lo largo de un año del fórnix de la conjuntiva de pacientes con hipertensión ocular tratados con brimonidina y pacientes tratados con brimonidina y timolol. **(a)** Estudio de viabilidad y apoptosis de células simples de la conjuntiva. **(b)** Estudio de viabilidad y apoptosis de las células complejas de la conjuntiva.

Las diferencias entre los dos tratamientos fueron máximas a los 9 y 6 meses de iniciado el mismo (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., Tabla 10; Figura 13, Tabla 11; Figura 14, Tabla 12), pero se acaban minimizando al año post-tratamiento. Esto puede ser debido a que el timolol pueda neutralizar los efectos adversos de la brimonidina sólo a medio plazo.

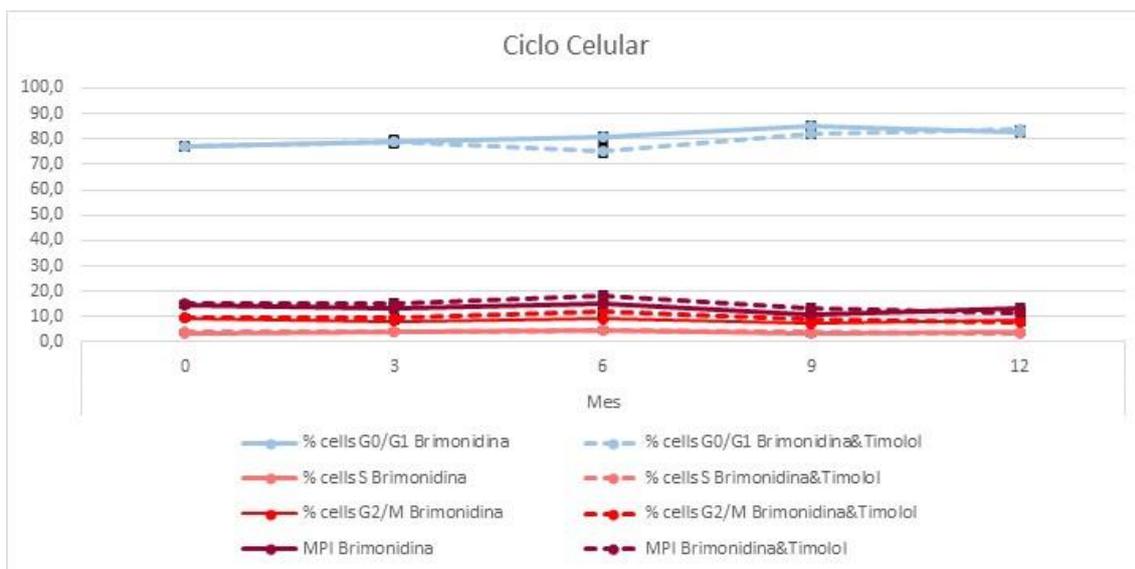


Figura 14. Comparación a lo largo de un año del fónix de la conjuntiva de pacientes con hipertensión ocular tratados con brimonidina y pacientes tratados con brimonidina y timolol. Estudio de las fases del ciclo celular de las células de la conjuntiva.

Si nos concentramos en las máximas diferencias (9 meses post-tratamiento) el tratamiento con brimonidina induce un incremento de linfocitos T infiltrantes (fundamentalmente de fenotipo Tc) y de linfocitos NK y una disminución de linfocitos B (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y **Tabla 10**). Con respecto a los estudios de apoptosis y viabilidad, se observa que disminuyen las células simples y su viabilidad (**Figura 13** y **Tabla 11**). La brimonidina también produce un aumento de la quiescencia celular del epitelio conjuntival (bien por el aumento de células en reposo y/o por la disminución de células en fase de síntesis o en mitosis) desde los primeros meses del tratamiento (**Figura 14** y **Tabla 12**).

Tabla 10. Subpoblaciones linfocitarias. Comparación del tratamiento de brimonidina vs. Brimonidina&timolol en pacientes con hipertensión ocular.

Mes	Parámetros
3	-
6	↓Linfocitos Th (30,31% ±3,94 vs. 35,57% ±2,55)
9	↑ Linfocitos T (81% ±2,93 vs. 70,57% ±3,43) ↓Linfocitos B (16,47% ±2,92 vs. 28% ±3,66)
12	↑ Linfocitos Th (35,83% ±2,90 vs. 30,05% ±2,41) ↓ Linfocitos NK (0,44% ±0,17 vs. 1,35% ±0,25)

Tabla 11. Viabilidad/Apoptosis. Comparación del tratamiento de brimonidina vs. Brimonidina&timolol en pacientes con hipertensión ocular.

Mes	Parámetros
3	↓ Células simples viables (62,45% ±4,24 vs. 72,08% ±3,00) ↑ Células simples en apoptosis temprana (30,59% ±3,14 vs. 23,21% ±2,74) ↑ Células complejas en apoptosis temprana (53,18% ±3,45 vs. 41,91% ±4,38) ↑ Células simples muertas (1,18% ±0,34 vs. 0,65% ±0,21) ↓ Células complejas muertas (4,32% ±0,95 vs. 10,04% ±1,78)
	-
6	-
9	↓ Células simples (11,94% ±2,49 vs. 16,26% ±2,57) ↑ Células complejas (85,83% ±2,37 vs. 82% ±2,48) ↓ Células simples viables (62,88% ±3,78 vs. 71,13% ±3,04) ↑ Células simples en apoptosis temprana (31,66% ±3,24 vs. 24,13% ±2,49)
	↑ Células simples (13% ±1,88 vs. 10,80% ±1,62) ↑ Células simples viables (67,23% ±3,70 vs. 63% ±2,62) ↓ Células simples en apoptosis temprana (27,07% ±2,98 vs. 29,90% ±2,25) ↑ Células complejas en apoptosis temprana (22,92% ±2,27 vs. 19,14% ±1,56)
12	-

Tabla 12. Ciclo celular. Comparación del tratamiento de brimonidina vs. Brimonidina&timolol en pacientes con hipertensión ocular.

Mes	Parámetros
3	↓ Células en fase G ₂ /M (8,23% ±0,96 vs. 9,84% ±0,94) ↓ MPI (13,36% ±1,28 vs. 15,13% ±1,29)
	↑ Células G ₀ /G ₁ (80,47% ±1,41 vs. 75,08% ±1,83)
6	↓ Células en fase G ₂ /M (9,21% ±0,79 vs. 11,85% ±0,90) ↓ MPI (14,89% ±1,12 vs. 18,28% ±1,29)
	↓ Células en fase S (3,11% ±0,23 vs. 3,81% ±0,20) ↓ MPI (10,94% ±0,85 vs. 13,42% ±0,92)
9	↑ Células en fase G ₀ /G ₁ (85,05% ±1,06 vs. 82,04% ±1,23)
	↓ Células en fase G ₂ /M (7,16% ±0,63 vs. 8,86% ±0,68)
12	-

Algunos de los parámetros de la superficie ocular se encontraban afectados en los pacientes con hipertensión ocular, independientemente del tratamiento. Se aprecia en nuestro análisis un claro incremento de la presencia de linfocitos con actividad citotóxica (Tc y NK) en el grupo de pacientes que se ha tratado exclusivamente con Brimonidina.

La adición del timolol al tratamiento neutraliza parcialmente este efecto de la brimonidina y se aprecia que disminuyen los % de linfocitos Tc y de linfocitos NK dentro de los IELs. Este último dato concuerda con lo hallado en estudios previos puesto que la brimonidina genera respuestas inflamatorias Th₂³⁰ en las que están implicados los linfocitos NK²².

- **Screening de marcadores para el diagnóstico diferencial.**

En este apartado se compararán, siempre que haya sido posible, los resultados obtenidos en pacientes con conjuntivitis de diferentes etiologías. Esto es así porque existen diferencias en sujetos sanos entre la conjuntiva tarsal superior y el fórnix inferior. En algunos casos hay que tomar con precaución los resultados obtenidos puesto que no hay siempre concordancia en sexo y edad entre los grupos comparados. También hay que tener en cuenta que el personal que realizó el cepillado citológico fue diferente en cada caso y, aunque todos eran personal entrenado y cualificado, podría afectar a los resultados.

- Linfocitos y Subpoblaciones linfocitarias.

Cuando se comparó la conjuntivitis provocada por el ojo seco acuoso deficiente con la queratoconjuntivitis vernal se observó que aumentaba el infiltrado linfocitario, los linfocitos Tc y que disminuían los Th; en cambio cuando se comparó con la conjuntivitis alérgica estacional se observó una disminución de los linfocitos T en esta última. Por último, el infiltrado linfocitario y los linfocitos Th aumentaron en los pacientes con queratoconjuntivitis vernal respecto a las conjuntivitis alérgicas estacionales.

Por otro lado, comparando los pacientes con conjuntivitis adenovírica respecto de los de ojo seco evaporativo se observó un aumento del infiltrado linfocitario, linfocitos T y linfocitos Tc y una disminución de los linfocitos Th y B. Al comparar la conjuntivitis adenovírica con la medicamentosa severa también se aprecia un aumento en el infiltrado linfocitario y los linfocitos Tc mientras que los linfocitos Th disminuyen.

Un esquema más detallado de estos resultados se encuentra en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Resultados análisis Diagnóstico Diferencial. Subpoblaciones linfocitarias.

Zona	Grupo 1	Grupo 2	Subpoblaciones linfocitarias
Tarsal superior	SOS-ad	QCV	↓ Infiltrado linfocitario (5,86% ±1,75 vs. 12,13% ±3,03)
			↓ Linfocitos Th (45,79% ±3,20 vs. 58,66% ±6,33)
	SOS-ad	CA	↑ Linfocitos Tc (39,09% ±3,23 vs. 27,43% ±7,68)
Tarsal inferior	QCV	CA	↓ Cociente CD4/CD8 (1,28 ±0,16 vs. 2,55 ±0,74)
			↑ Infiltrado linfocitario (12,13% ±3,03 vs. 6,96% ±3,80)
			↑ Linfocitos Th (58,66% ±6,33 vs. 42,82% ±5,66)

Fórnix	ADV	SOS-ev	<p style="text-align: center;">↑ Infiltrado linfocitario (13,83% ±1,67 vs. 1,84% ±0,20)</p> <p style="text-align: center;">↑ Linfocitos T (78,13% ±3,17 vs. 62,53% ±3,87)</p> <p style="text-align: center;">↓ Linfocitos Th (26,54% ±2,33 vs. 36,87% ±4,23)</p> <p style="text-align: center;">↑ Linfocitos Tc (49,74% ±3,56 vs. 25,7% ±2,22)</p> <p style="text-align: center;">↓ Linfocitos B (20,48% ±3,19 vs. 37,51% ±3,94)</p> <p style="text-align: center;">↓ Cociente CD4/CD8 (0,657 ±0,09 vs. 1,577 ±0,24)</p> <p style="text-align: center;">↑ Cociente CD3/CD19 (5,66 ±0,73 vs. 1,960 ±0,31)</p>
	ADV	CM _{sev}	<p style="text-align: center;">↑ Infiltrado linfocitario (13,83% ±1,67 vs. 2,33% ±0,44)</p> <p style="text-align: center;">↓ Linfocitos Th (26,54% ±2,33 vs. 36% ±2,90)</p> <p style="text-align: center;">↑ Linfocitos Tc (49,74% ±3,56 vs. 43,41% ±4,25)</p> <p style="text-align: center;">↓ Cociente CD4/CD8 (0,657 ±0,09 vs. 1,00 ±0,17)</p>
	SOS-ev	CM _{sev}	<p style="text-align: center;">↓ Linfocitos Tc (36,87% ±4,23 vs. 36% ±2,90)</p> <p style="text-align: center;">↓ Linfocitos T (62,53% ±3,87 vs. 79,11% ±1,96)</p> <p style="text-align: center;">↑ Linfocitos B (37,51% ±3,94 vs. 20,64% ±2,02)</p> <p style="text-align: center;">↑ Cociente CD4/CD8 (1,577 ±0,24 vs. 1 ±0,17)</p> <p style="text-align: center;">↓ Cociente CD3/CD19 (1,960 ±0,31 vs. 4,647 ±0,56)</p>

CA: Conjuntivitis alérgica estacional; SOS-Ad: Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenoviral; SOS-ev: Síndrome de ojo Seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa.

En color **rojo (aumento)** y **azul (disminución)** → Diferencias estadísticamente significativas, p-valor<0,05, entre los dos grupos. En negro → Tendencias estadísticas, es decir, p-valor entre 0,05-0,20.

➤ Viabilidad.

Si comparamos los pacientes con conjuntivitis provocada por el ojo seco acuoso deficiente con los que padecen queratoconjuntivitis se observa un aumento de las células complejas en apoptosis en fases tardías y muertas. En cambio, cuando comparamos la conjuntivitis en pacientes con Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente con la alérgica, se observa un aumento de las células complejas en fase inicial de la apoptosis y una disminución en fase tardía. Por último, cuando estudiamos las diferencias entre la queratoconjuntivitis vernal y las conjuntivitis alérgicas estacionales, se observa una disminución de las células complejas en apoptosis tardía y muertas.

En los análisis realizados en el fórnix, se observó un aumento de las células simples con respecto las complejas y un aumento de la viabilidad de todas ellas al comparar la conjuntivitis provocada por adenovirus con la que se encuentra en pacientes con ojo seco evaporativo. Por otro lado, cuando comparamos la conjuntivitis adenovírica respecto de la medicamentosa severa, además de lo que ocurría en el caso anterior se observa que disminuyen las células en apoptosis y muertas. Por último, en los estudios de comparación entre el ojo seco evaporativo y la conjuntivitis medicamentosa severa se observa que aumentan las células complejas viables, disminuyen las complejas en apoptosis tardía y muerta y aumentan las células simples muertas.

Un esquema más detallado de estos resultados se encuentra en la **Tabla 14**.

En resumen, el adenovirus aumenta la viabilidad general del epitelio conjuntival frente a otros tipos de conjuntivitis. También se puede postular que los pacientes con Síndrome de ojo seco acuoso deficiente tienen un epitelio más apoptótico que los que padecen conjuntivitis alérgica estacionales en alguna de sus formas (estacionales o queratoconjuntivitis vernal).

➤ Ciclo.

En las patologías estudiadas en zona tarsal superior, hemos encontrado que disminuyen las células en fase S, G₂/M y el MPI al comparar la conjuntivitis asociada al ojo seco acuoso deficiente y la queratoconjuntivitis vernal. Por otro lado, cuando comparamos pacientes con ojo seco acuoso deficiente con los que tienen conjuntivitis alérgica estacional se observó que aumentan las células en fase G₀/G₁. Por último, cuando se comparó la queratoconjuntivitis vernal con la conjuntivitis alérgica estacional se observó un aumento de células en fase S.

En los estudios realizados con datos de la zona del fórnix, se observó que al comparar conjuntivitis adenoviral con la medicamentosa severa y la asociada al ojo seco evaporativo, disminuían las células en fase G₀/G₁ (en ambos casos) y el MPI (en el primero). Por otro lado, al comparar las células procedentes de pacientes con SOS-evaporativo con pacientes de conjuntivitis medicamentosa se observó una disminución de las células en fase S.

Un esquema más detallado de estos resultados se encuentra en la **Tabla 15**.

Tabla 14. Resultados análisis Diagnóstico Diferencial. Viabilidad/Apoptosis.

Zona	Grupo 1	Grupo 2	Viabilidad/Apoptosis
Tarsal superior	SOS-ad	QCV	<p>↑ Células complejas muertas (7,2% ±2,85 vs. 0,7% ±0,15, p<0,05)</p> <p>↑ Células complejas en apoptosis tardía (28,73% ±4,11 vs. 13,8% ±7,15)</p>
	SOS-ad	CA	<p>↑ Células complejas en apoptosis temprana (40,50% ±3,85 vs. 22,75% ±2,30, p<0,05)</p> <p>↓ Células complejas en apoptosis tardía (28,73% ±4,11 vs. 43,77% ±6,32)</p>
	QCV	CA	<p>↓ Células complejas en apoptosis tardía (13,80% ±7,15 vs. 43,77% ±6,32, p<0,05)</p> <p>↓ Células complejas muertas (0,7% ±0,15 vs. 3,728% ±0,86, p<0,05)</p>
	ADV	SOS-ev	<p>↑ Células simples (52,06% ±3,47 vs. 10,88% ±0,68, p<0,05)</p> <p>↓ Células complejas (45,42% ±3,14 vs. 85,39% ±0,75, p<0,05)</p> <p>↑ Células simples viables (87,11% ±3,51 vs. 64,85% ±3,65, p<0,05)</p> <p>↑ Células complejas viables (54,89% ±5,91 vs. 15,90% ±1,69, p<0,05)</p> <p>↓ Células simples en apoptosis temprana (11,61% ±3,27 vs. 26,60% ±2,92, p<0,05)</p> <p>↓ Células simples en apoptosis tardía (0,87% ±0,39 vs. 4,78% ±0,71, p<0,05)</p> <p>↓ Células complejas en apoptosis tardía (15,58% ±3,08 vs. 41,6% ±3,10, p<0,05)</p> <p>↓ Células simples muertas (0,39% ±0,12 vs. 2,84% ±0,45, p<0,05)</p> <p>↓ Células complejas muertas (2,80% ±0,78 vs. 8,46% ±1,11, p<0,05)</p>
Fórnix	ADV	CM _{sev}	<p>↑ Células simples (52,06% ±3,47 vs. 13% ±1,88, p<0,05)</p> <p>↓ Células complejas (45,42% ±3,14 vs. 85,23% ±1,93, p<0,05)</p> <p>↑ Células simples viables (87,11% ±3,51 vs. 67,23% ±3,70, p<0,05)</p> <p>↑ Células complejas viables (54,89% ±5,91 vs. 7,076% ±1,11, p<0,05)</p> <p>↓ Células simples en apoptosis temprana (11,61% ±3,27 vs. 27,07% ±2,98, p<0,05)</p> <p>↓ Células simples en apoptosis tardía (0,872% ±0,39 vs. 4,461% ±0,97, p<0,05)</p> <p>↓ Células complejas en apoptosis tardía (15,58% ±3,08 vs. 53,69% ±2,56, p<0,05)</p> <p>↓ Células complejas muertas (2,80% ±0,78 vs. 15,92% ±2,03, p<0,05)</p>
	SOS-ev	CM _{sev}	<p>↑ Células complejas viables (15,90% ±1,69 vs. 7,076% ±1,11, p<0,05)</p> <p>↓ Células complejas en apoptosis tardía (41,6% ±3,10 vs. 53,69% ±2,56, p<0,05)</p> <p>↑ Células simples muertas (2,85% ±0,45 vs. 1,461% ±0,61, p<0,05)</p>

CA: Conjuntivitis alérgica estacional; SOS-Ad: Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenoviral; SOS-ev: Síndrome de ojo Seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa.

En color **rojo (aumento)** y **azul (disminución)** → Diferencias estadísticamente significativas, p-valor<0,05, entre los dos grupos. En negro → Tendencias estadísticas, es decir, p-valor entre 0,05-0,20.

Tabla 15. Resultados análisis Diagnóstico Diferencial. Ciclo celular.

Zona	Grupo 1	Grupo 2	Ciclo Celular
Tarsal superior	SOS-ad	QCV	<p>↓ Células en fase S (3,563 ±0,42 vs. 7,2% ±2,40)</p> <p>↓ Células en fase G₂/M (9,71% ±1,58 vs. 19,33% ±5,050)</p> <p>↓ MPI (14,57% ±2,09 vs. 26,53% ±6,300)</p>
	SOS-ad	CA	<p>↑ Células en fase G₀/G₁ (77,81% ±2,23 vs. 71,31% ±2,720)</p>
	QCV	CA	<p>↑ Células en fase S (7,2% ±2,40 vs. 3,02% ±0,43)</p>
Fórnix	ADV	SOS-ev	<p>↓ Células en fase G₀/G₁ (68,98% ±2,03 vs. 80,90% ±1,38)</p> <p>↑ MPI (16,32% ±1,75 vs. 12,88% ±0,990)</p>
	ADV	CM _{sev}	<p>↓ Células en fase G₀/G₁ (68,98% ±2,03 vs. 82,83% ±1,35)</p>
	SOS-ev	CM _{sev}	<p>↓ Células en fase S (3,23% ±0,19 vs. 3,88% ±0,250)</p>

CA: Conjuntivitis alérgica estacional; SOS-Ad: Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenoviral; SOS-ev: Síndrome de ojo Seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa; MPI: Índice Medio de Proliferación.

En color **rojo (aumento)** y **azul (disminución)** → Diferencias estadísticamente significativas, p-valor<0,05, entre los dos grupos. En negro → Tendencias estadísticas, es decir, p-valor entre 0,05-0,20.

De modo directo (disminución de las fases S y G₂/M) o indirecto (aumento de fase G₀/G₁), el Síndrome de ojo Seco, tanto acuoso deficiente como evaporativo, inducen una disminución de la proliferación conjuntival comparada con las conjuntivitis de etiología alérgica y medicamentosa. Los pacientes con QCV parecen tener una conjuntiva más activa que los de las conjuntivitis alérgicas estacionales. Pero de nuevo, la infección adenoviral actúa en el epitelio con una tendencia a reducir la quiescencia y aumentar la replicación celular.

Hasta la fecha la examinación ocular e historia clínica del paciente son los aspectos más relevantes para realizar el diagnóstico diferencial de las conjuntivitis. En algunos casos y según la disponibilidad del centro, se puede recurrir al diagnóstico por PCR. Sin embargo los signos y síntomas clínicos no correlacionan de modo absoluto e inequívoco con el agente causal de la inflamación conjuntival.¹⁴⁻¹⁶ Por tanto las diferencias expuestas anteriormente encontradas entre inflamación conjuntival de diferente etiología podrían ser útiles como marcadores para el diagnóstico diferencial de las conjuntivitis.

RESUMEN DE LOS HALLAZGOS.

Dada la enorme cantidad de datos analizados en el presente trabajo, y la complejidad que esto supone a veces para una correcta interpretación, nos hemos permitido realizar un resumen gráfico a modo de cartografía de las diferentes conjuntivitis estudiadas y que se presenta en forma de gráficos con porciones (**Figura 15, Figura 16 e Figura 17**). A la complejidad inicial hay que añadir otra derivada de la técnica utilizada. En algunas patologías se han utilizado muestras de conjuntiva tarsal superior (líneas superiores de los 3 paneles) y en otros casos se han utilizado muestras de fórnix inferior (líneas inferiores en los 3 paneles). Dado que se han encontrado previamente diferencias importantes en los parámetros estudiados del sistema inmune de la mucosa ocular según la zona topográfica analizada en individuos sanos¹⁰ (y otros estudios aún sin publicar), no podemos sacar conclusiones definitivas/absolutas en la comparación entre algunas patologías; ni siempre ha sido posible comparar datos entre grupos con edad equivalente.

Con estas salvedades, y revisando las **Figura 15, Figura 16 e Figura 17** (ver desplegable) se aprecian diferencias evidentes (**Tabla 16**):

Tabla 16. Resumen cartográfico de los resultados.

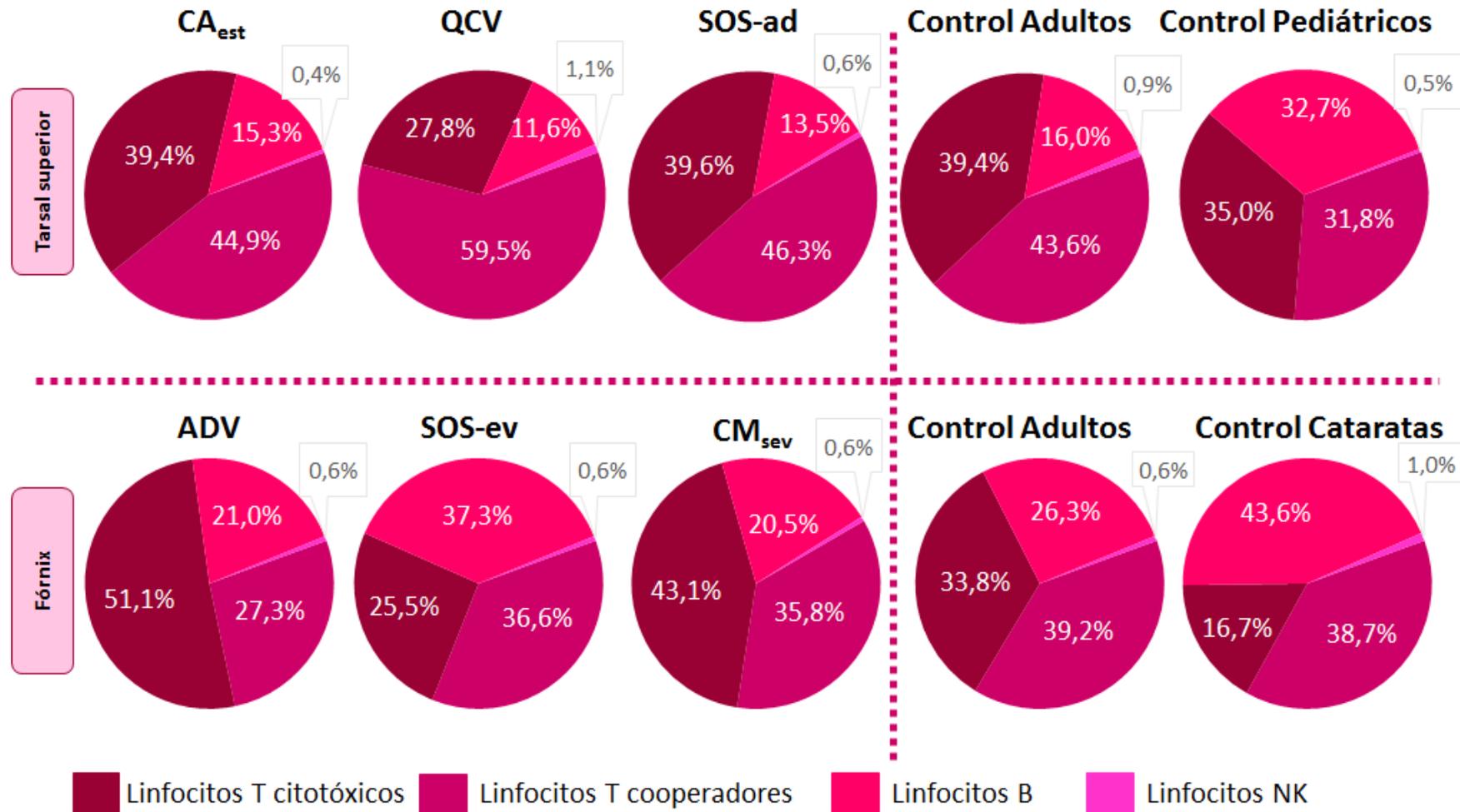
Caso	Vs.	Diferencias
CA _{est}	Control	Disminución de linfocitos NK Aumenta la viabilidad de células simples y complejas Disminución de células en fase S
	Diferencial	Disminuyen linfocitos T (vs. SOS-Ad) y Th (vs. QCV) Aumenta las células complejas en apoptosis tardía (vs. QCV y SOS-ad) y disminuyen en apoptosis temprana (vs SOS-ad) Disminución de células en fases S (vs. QCV) y G ₀ /G ₁ (vs. SOS-ad)
QCV	Control	Aumento de linfocitos Th y NK y disminución de los B. Grandes cambios en proporción simples/complejas. Aumento de la viabilidad.
	Diferencial	Aumento de linfocitos Th y disminución de linfocitos Tc (vs SOS-ev y CA _{est}) Aumenta la viabilidad de las células complejas (vs. SOS-ev y CA _{est}) Aumento de fases S y G ₂ /M (vs. SOS-ad y CA _{est})
SOS-ad	Control	Aumentan linfocitos T y disminuyen NK Aumentan las células simples, disminuyendo las complejas. Aumenta la viabilidad.
	Diferencial	Aumentan linfocitos T (vs. CA _{est}). Disminuyen Th (vs. QCV) La viabilidad aumenta vs. CA _{est}) y disminuye vs. QCV Disminuyen las células de fases S y G ₂ /M (vs. QCV) y aumentan en fase G ₀ /G ₁ (vs. CA _{est})

ADV	Control	<p>Gran aumento de IELs, principalmente linfocitos Tc</p> <p>Aumentan las células simples, disminuyendo las complejas. Aumenta la viabilidad, especialmente en las células complejas.</p> <p>Disminución de células en fases G₀/G₁</p>
	Diferencial	<p>Aumento de IELs, principalmente linfocitos Tc (vs. SOS-ev y CM_{sev})</p> <p>Aumentan las células simples, disminuyendo las complejas. Aumenta la viabilidad, especialmente en las células complejas (vs. SOS-ev y CM_{sev}).</p> <p>Disminuyen las células en fase G₀/G₁ (vs. SOS-ev y CM_{sev})</p>
SOS-ev	Control	<p>Disminución de IELs y aumento de linfocitos B</p> <p>Disminuyen las células simples, aumentando las complejas. Disminuye la viabilidad.</p> <p>Aumentan las células en fase G₀/G₁</p>
	Diferencial	<p>Disminuyen IELs y linfocitos Tc, principalmente Tc, y aumentan los B (vs. ADV y CM_{sev})</p> <p>Disminuyen células simples, aumentando complejas. Disminuye la viabilidad (vs. ADV). Aumenta viabilidad de células complejas (vs. SOS-ev)</p> <p>Aumentan las células en fase G₀/G₁ (vs. ADV) y disminuyen en fase S (CM_{sev})</p>
	Seguimiento	<p>Aumentan los linfocitos Tc, disminuyen Th. Disminuye cociente CD4⁺/CD8⁺</p> <p>Aumento de la viabilidad</p>
CM _{sev}	Control	<p>Aumentan los linfocitos T, disminuyendo los B y NK</p> <p>Aumentan las células en fases G₀/G₁</p>
	Diferencial	<p>Disminuyen IELs y linfocitos Tc (vs. ADV y SOS-ev)</p> <p>Disminuyen células simples, aumentando complejas (vs. ADV). Disminuye la viabilidad (vs. ADV). Aumenta viabilidad de células complejas (vs. SOS-ev)</p> <p>Aumentan las células en fase G₀/G₁ (vs. ADV) y en fase S (vs. SOS-ev)</p>
	Seguimiento	<p>Aumentan linfocitos Tc y NK. Disminuyen B.</p> <p>Disminuyen células simples y su viabilidad.</p> <p>Aumento de la quiescencia celular.</p>

CA: Conjuntivitis alérgica estacional; SOS-Ad: Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenoviral; SOS-ev: Síndrome de ojo Seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa

* No existen gráficos de sectores para estos resultados. Ver **Figura 11** (Seguimiento SOS-ev) y **Figura 12**, **Figura 13** y **Figura 14** (CM_{sev}).

Figura 15. Linfocitos y subpoblaciones



Abreviaturas. SOS-Ad: Síndrome de ojo seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenoviral; SOS-ev: Síndrome de ojo seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa.

Figura 16. Viabilidad/Apoptosis

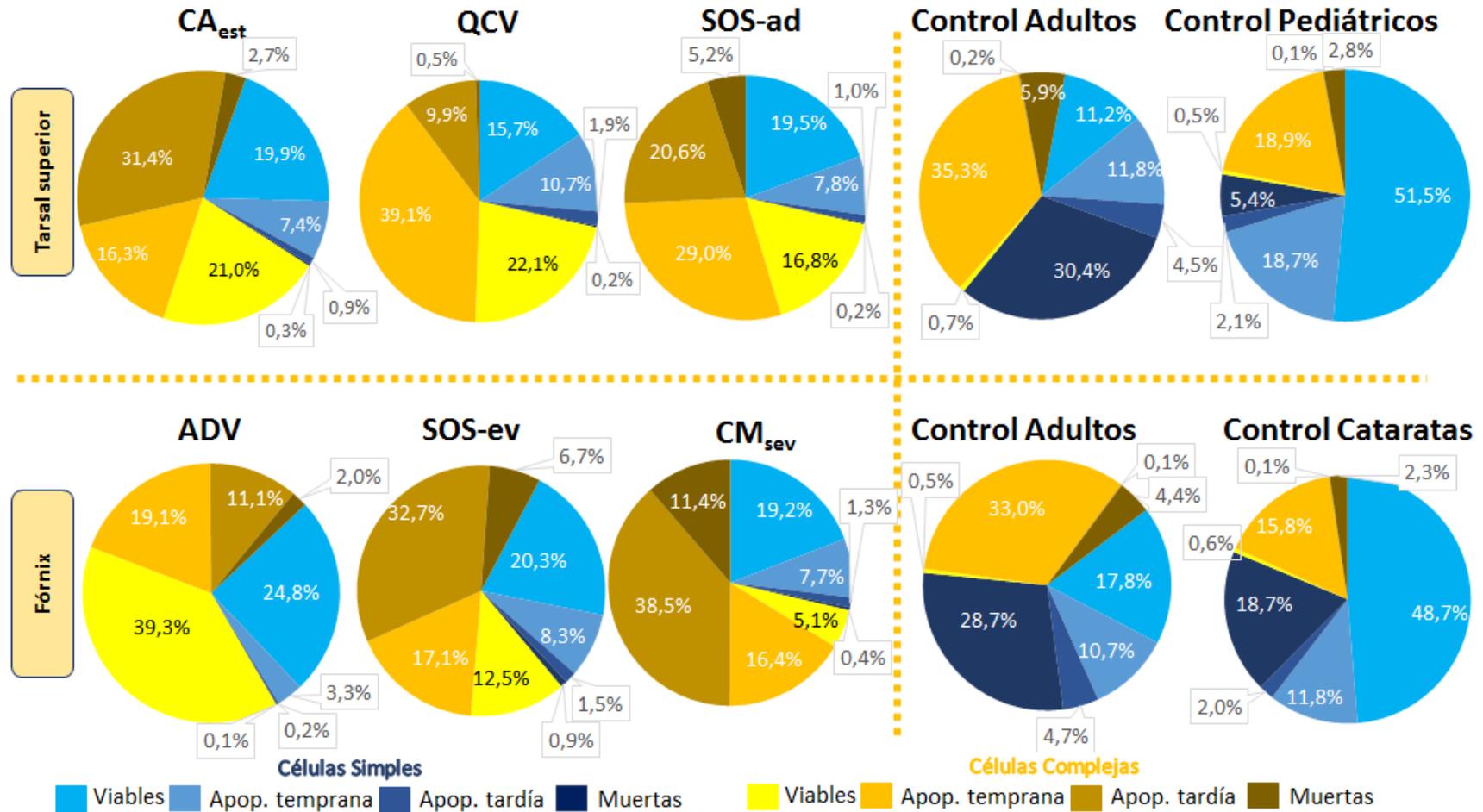
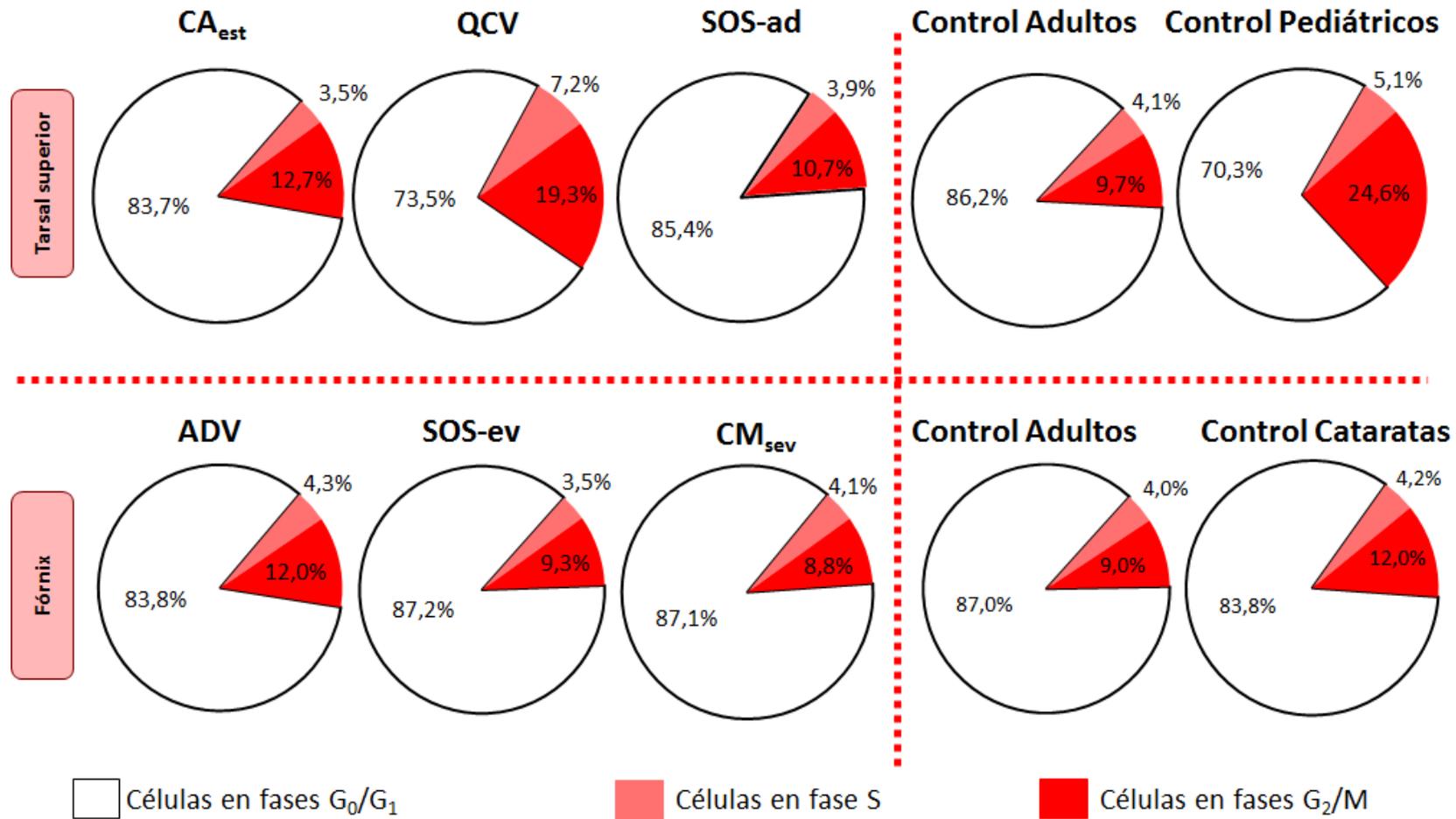


Figura 17. Ciclo celular



Abreviaturas. SOS-Ad: Síndrome de ojo seco acuoso deficiente; QCV: Queratoconjuntivitis vernal; ADV: Conjuntivitis adenoviral; SOS-ev: Síndrome de ojo seco evaporativo; CM_{sev}: Conjuntivitis medicamentosa severa.

5

CONCLUSIONES

1. El tejido linfoide asociado a la conjuntiva varía fenotípica y funcionalmente en pacientes con conjuntivitis con respecto a individuos sanos y las variaciones que se observan son diferenciales de los distintos tipos etiológicos de las conjuntivitis.
2. Entre las patologías que se han podido estudiar en muestras de conjuntiva tarsal superior se aprecia que:
 - a. En los pacientes con conjuntivitis alérgica estacional, la disminución de los linfocitos NK y de células en fase S podrían ser útiles como marcadores diagnósticos. En cuanto a su diagnóstico diferencial: la disminución de células en fase S y cambios en la apoptosis de células complejas, nos permitirían distinguirlas de las queratoconjuntivitis vernaes y del Síndrome de Ojo Seco acuoso deficiente.
 - b. En la queratoconjuntivitis vernal el aumento de linfocitos T cooperadores infiltrantes, el cambio en la proporción simples/complejas y el aumento de la viabilidad y de células en fase S podrían servir como marcadores diagnósticos y para el diagnóstico diferencial con respecto al Ojo Seco acuoso deficiente y conjuntivitis alérgicas estacionales.
 - c. En los pacientes con Síndrome de Ojo Seco acuoso deficiente, el aumento de linfocitos T, la disminución de NK y el aumento de la viabilidad podrían ser marcadores diagnósticos útiles. El aumento de viabilidad y células en fase G₀/G₁ se postularía como marcador de diagnóstico diferencial con las conjuntivitis alérgicas estacionales. La disminución de viabilidad y células en fase S y G₂/M se postularían como marcadores de diagnóstico diferencial con la queratoconjuntivitis vernal.
3. Entre las patologías que se han podido estudiar en las muestras de fórnix se aprecia que:
 - a. Las conjuntivitis por adenovirus se podrían diagnosticar con ayuda del aumento en la infiltración celular T (fundamentalmente a expensas de linfocitos T citotóxicos). El incremento inducido por adenovirus de células viables del epitelio (tanto simples como complejas) nos permitiría diagnosticarlas y diferenciarlas de otras conjuntivitis no infecciosas: Síndrome de Ojo Seco evaporativo y conjuntivitis por medicamentos.

- b. En pacientes de Síndrome de Ojo Seco evaporativo el aumento del infiltrado de linfocitos B, la disminución de la viabilidad global y el aumento de las células en fase G₀/G₁ servirían como marcadores útiles al diagnóstico y también en el diagnóstico diferencial con conjuntivitis adenovirales y por medicamentos.
 - c. En pacientes con conjuntivitis por medicamentos, el aumento de los linfocitos NK y B serían útiles para su diagnóstico. El aumento de la viabilidad y de las células en fase G₀/G₁ podrían ser útiles para el diagnóstico diferencial con las conjuntivitis adenovirales. La disminución de viabilidad y aumento de las células en fase S podrían ser útiles para el diagnóstico diferencial con Síndrome de Ojo Seco evaporativo.
- 4. Para el seguimiento de pacientes con Síndrome de Ojo Seco evaporativo y tratados con dexametasona tópica, el aumento de los linfocitos T citotóxicos y la disminución de linfocitos T cooperadores dentro de los IELs se postularían como marcadores de respuesta al tratamiento.
 - 5. El aumento de linfocitos T citotóxicos y NK, la disminución de linfocitos B y una menor actividad proliferativa epitelial serían útiles como marcadores de daño conjuntival para el seguimiento de pacientes con hipertensión ocular y conjuntivitis secundaria al uso de brimonidina, permitiendo seguir también la neutralización parcial del daño al pautar brimonidina y timolol.

6**BIBLIOGRAFÍA**

1. Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy* 2007;92:36-49.
2. Nesburn AB, Bettahi I, Zhang X, et al. Topical/mucosal delivery of sub-unit vaccines that stimulate the ocular mucosal immune system. *Ocul Surf* 2006;4:178-87.
3. Dua HS, Gomes JA, Jindal VK, et al. Mucosa specific lymphocytes in the human conjunctiva, corneoscleral limbus and lacrimal gland. *Curr Eye Res* 1994;13:87-93.
4. Hingorani M, Metz D, Lightman SL. Characterisation of the normal conjunctival leukocyte population. *Exp Eye Res* 1997;64:905-12.
5. Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat* 2005;206:271-85.
6. Knop E, Knop N, Claus P. Local production of secretory IgA in the eye-associated lymphoid tissue (EALT) of the normal human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2322-9.
7. Knop E, Knop N. A functional unit for ocular surface immune defense formed by the lacrimal gland, conjunctiva and lacrimal drainage system. *Adv Exp Med Biol* 2002;506:835-44.
8. Stern ME, Siemasko KF, Niederkorn JY. The Th1/Th2 paradigm in ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:446-50.
9. Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ, Lightman SL. The role of conjunctival epithelial cells in chronic ocular allergic disease. *Exp Eye Res* 1998;67:491-500.
10. Reinoso R, Martín-Sanz R, Martino M, et al. Topographical distribution and characterization of epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in the human ocular mucosa. *Mucosal Immunol* 2012;5:455-67.
11. Azari AA, Barney NP. Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. *JAMA* 2013;310:1721-9.
12. Høvdig G. Acute bacterial conjunctivitis. *Acta Ophthalmol* 2008;86:5-17.
13. Barcelona SL. La similitud sintomática entre alergia y sequedad ocular dificulta su diagnóstico. *El País*, 2014.
14. Rietveld RP, van Weert HC, ter Riet G, Bindels PJ. Diagnostic impact of signs and symptoms in acute infectious conjunctivitis: systematic literature search. *BMJ* 2003;327:789.
15. Rietveld RP, ter Riet G, Bindels PJ, Sloos JH, van Weert HC. Predicting bacterial cause in infectious conjunctivitis: cohort study on informativeness of combinations of signs and symptoms. *BMJ* 2004;329:206-10.
16. Tarabishy AB, Jeng BH. Bacterial conjunctivitis: a review for internists. *Cleve Clin J Med* 2008;75:507-12.
17. 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.
18. Reyes NJ, Mayhew E, Chen PW, Niederkorn JY. NKT cells are necessary for maximal expression of allergic conjunctivitis. *Int Immunol* 2010;22:627-36.
19. Fukushima A, Sumi T, Fukuda K, et al. Modulation of murine experimental allergic conjunctivitis by treatment with alpha-galactosylceramide. *Immunol Lett* 2006;107:32-40.
20. 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.
21. 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.

22. Lambiase A, Normando EM, Vitiello L, et al. Natural killer cells in vernal keratoconjunctivitis. *Mol Vis* 2007;13:1562-7.
23. 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.
24. Irkec MT, Bozkurt B. Molecular immunology of allergic conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12:534-9.
25. 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.
26. Van Cauwenberge PB. Nasal sensitization. *Allergy* 1997;52:7-9.
27. Stern ME, Schaumburg CS, Pflugfelder SC. Dry eye as a mucosal autoimmune disease. *Int Rev Immunol* 2013;32:19-41.
28. Yu FF, Liu X, Zhong YM, et al. [Protection effect of sodium hyaluronate on ocular surface toxicity induced by Benzalkonium chloride-preserved brimonidine in rabbits]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2013;49:973-80.
29. Pozarowska D, Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of cytostatic and cytotoxic effects of topical glaucoma medications on human epithelial corneal line cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:130-7.
30. Malvitte L, Montange T, Vejux A, et al. Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *Br J Ophthalmol* 2007;91:29-32.



LISTA DE ABREVIATURAS

ADV	Conjuntivitis adenovirales
BC	Beckman Coulter (Marseille, France)
CA _{est}	Conjuntivitis alérgicas estacionales
CALT	Tejido linfoide asociado a la conjuntiva
CL	Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA)
CM _{mod}	Conjuntivitis medicamentosa moderada
CM _{sev}	Conjuntivitis medicamentosa severa
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
Fx	Fórnix
IELs	Linfocitos intraepiteliales
IS	Immunostep (Salamanca, Spain)
LDALT	Tejido linfoide asociado al sistema de drenaje lagrimal
LGALT	Tejido linfoide asociado a la glándula lagrimal
M	Mujer
MALT	Tejido Linfoide asociado a las Mucosas
MPI	Índice medio de proliferación
PC5	Ficoeritrina-Cianina 5
PC7	Ficoeritrina-Cianina 7
PE	Ficoeritrina
QCV	Queratoconjuntivitis vernal
RD1	Rodamina
SOS-Ad	Conjuntivitis en Síndrome de ojo Seco acuoso deficiente
SOS-ev	Conjuntivitis en Síndrome de ojo Seco evaporativo
Tc	Linfocitos T citotóxicos
Th	Linfocitos T cooperadores
TLR	Toll Like Receptors
Treg	Linfocitos T reguladores
TS	Tarsal superior
V	Varón



ANEXO I

FORMULARIO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio	Caracterización fenotípica y funcional del sistema inmune de la mucosa ocular en procesos alérgicos.
Nº de Estudio:	IOBA622013
Coordinadores:	Dra. Margarita Calonge (Tf. 983 184 763); Dra. Carmen Martín Alonso (Tf. 983 184 755); Dr. Alfredo Corell Almuzara (Tf.)
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.

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 Cefalorraquídeo, 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.

FORMULARIO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

Nº de Estudio: IOBAXX2013

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 7 de Febrero de 2014.
- 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).