



Universidad de Valladolid



ioba

Instituto Universitario de
Oftalmobiología Aplicada

Estudio comparativo del uso del EYEPRIM™ frente a la citología por impresión conjuntival convencional para la obtención de material genético de las células epiteliales de la conjuntiva humana.

**Trabajo Fin de Máster Investigación en Ciencias
de la Visión**

Realizado por: Silvia Gutiérrez Gutiérrez

**Tutores: Dra. Amalia Enríquez de Salamanca y
Dr. Alberto López Miguel**

2013/14



Universidad de Valladolid

**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)

D. Alberto López Miguel

Dña. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro

en calidad de Tutores del alumno/a

D. /Dña. Silvia Gutiérrez Gutiérrez

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 **“Estudio comparativo del uso del EYEPRIM™ frente a la citología por impresión conjuntival convencional para la obtención de material genético de las células epiteliales de la conjuntiva humana “**

y estar de acuerdo con su exposición pública en la convocatoria de Septiembre.....

(indicar julio o septiembre)

En Valladolid a 29 de Agosto de 2014

Vº Bº

Fdo. Alberto López Miguel

El/La Tutor/a

Fdo. Amalia Enríquez de Salamanca

El/La Tutor/a

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

INDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	10
1.1 Introducción	10
1.2 Materiales usados para la recolección celular mediante CIC.....	10
1.3 Métodos de procesado	11
1.4 Principales aplicaciones de la CIC.....	11
1.5 Ventajas y limitaciones de la CIC.....	12
1.6 Nuevo dispositivo: EYEPRIM™.....	13
1.6.1 Elementos principales del EYEPRIM™	13
1.7 Análisis de las muestras	14
1.8 Principales aplicaciones del dispositivo EYEPRIM™	14
1.9 Ventajas del dispositivo EYEPRIM™	14
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	21
3.1 Hipótesis.....	21
3.2 Objetivo General	21
3.3 Objetivos Específicos	21
MATERIAL Y MÉTODOS	24
4.1 Sujetos.....	24
4.1.1 Criterios de inclusión.....	24
4.1.2 Criterios de exclusión	24
4.2 Método-Fases del estudio	25
4.2.1 Reclutamiento de los voluntarios, tests clínicos y recolección de las muestras.....	25
4.2.2 Extracción y cuantificación del ARN de las muestras.....	29

4.2.3 Análisis estadístico	30
RESULTADOS	33
5.1 Descriptivo de la población incluida.....	33
5.2 Cantidad de ARN obtenido con la técnica CIC y con el EYEPRIM™	33
5.3 Estudio de concordancia	34
5.4 Comparación de los valores del test subjetivo SANDE.....	35
5.5 Estudio de las correlaciones.....	37
5.6 Comparación de la cantidad de ARN obtenida con EYEPRIM™ sin anestesia y con anestesia.	39
5.7 Comparación de los valores del test subjetivo SANDE en el subgrupo de 5 sujetos.	40
5.8 Comparación entre los costes de las dos técnicas.....	41
DISCUSIÓN.....	45
6.1 Población estudiada	45
6.2 Comparación del ARN obtenido.....	46
6.3 Concordancia entre técnicas.....	47
6.4 Comparación de los valores obtenidos mediante el test de valoración visual (SANDE I).....	47
6.5 Comparación entre la cantidad de ARN obtenido mediante el dispositivo EYEPRIM™ con anestésico y sin anestésico.	48
6.6 Discusión de los costes.....	49
6.7 Limitaciones del estudio.....	50
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	61

RESUMEN

Objetivo: Determinar si la toma de citología conjuntival con el dispositivo EYEPRIM™ es más óptima en términos de cantidad de ARN obtenido y con menor molestia al paciente así como económicamente que mediante la citología convencional.

Metodología: Se reclutaron para el estudio 20 voluntarios sanos sin alteraciones de la superficie ocular. Una vez confirmado que cumplían los criterios de inclusión y exclusión se procedió a la obtención de muestras celulares mediante citología; para la recogida de las muestras se utilizaron aleatoriamente los dos ojos de cada voluntario, en uno se realizó la toma mediante CIC convencional y en el ojo contralateral se utilizó el dispositivo EYEPRIM™. Los voluntarios completaron un test subjetivo de valoración visual SANDE I para determinar el malestar producido por cada técnica (intensidad y frecuencia), tanto durante la obtención de muestra como posterior a ella. Se extrajo el ARN de las muestras mediante el RNeasy Micro Kit y se cuantificó mediante el QUANT IT RNA Assay Kit en un Qubit. Se comparó la cantidad de ARN obtenido con cada técnica, se evaluó la concordancia entre ambas técnicas de citología y se estudiaron las correlaciones entre la cantidad de ARN obtenido y los resultado del test SANDE I. Adicionalmente se compararon los costes unitarios para la realización de cada técnica.

Resultados: No hubo diferencias entre la cantidad total de ARN obtenido mediante CIC convencional y el dispositivo EYEPRIM™ (0.265 ± 0.285 vs 0.317 ± 0.277 μg , respectivamente. $p=0.45$). Normalizando la cantidad de ARN al área de las membranas, no existieron tampoco diferencias significativas (0.0040 ± 0.0043 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ vs 0.00459 ± 0.0040 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, respectivamente, $p=0.43$). Comparando los valores de los test subjetivos, no se encontraron diferencias en la frecuencia ni durante la adquisición ($p=0.17$) ni tras la adquisición ($p=0.68$). Tampoco hubo diferencias en la intensidad durante la adquisición ($p=0.81$) ni tras la adquisición ($p=0.36$) El coste unitario para la obtención de la citología resultó ser más caro para el EYEPRIM™.

Conclusiones: El dispositivo EYEPRIM™ no presenta en principio ventajas frente a la realización de la CIC convencional, ya que no recoge mayor cantidad de células, la técnica es igual de molesta y su precio es superior en comparación con la CIC convencional.

1. Introducción

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

La citología por impresión conjuntival (CIC) es una técnica de recolección de las capas más externas de la superficie ocular mediante la aplicación de diferentes dispositivos de recogida (por lo general son filtros de papel) de modo que las células son adheridas y posteriormente procesadas a través de una gran diversidad de técnicas. Además, la citología por impresión es una mínima o no invasiva biopsia, habitualmente de la conjuntiva, pero también puede ser aplicada en la córnea o en la zona limbal (1).

La primera vez que se reporta el uso de la CIC es en 1954, Larmande y Tismit en Francia (2) para diagnosticar la neoplasia escamosa de la superficie ocular (3), aunque referencias de esta técnica en la literatura inglesa no aparecieron hasta 1977 (4).

1.2 Materiales usados para la recolección celular mediante CIC

Para la realización de esta técnica se utilizan distintos tipos de pequeñas membranas como son los de acetato de celulosa (Millipore) (5), membranas de Biopore (utilizadas para el diagnóstico de infecciones virales a nivel ocular) o filtros de polietersulfona estéril, entre otros muchos.

En muchos estudios previos, se muestra como el tamaño del poro de la membrana afecta a la consistencia de las células epiteliales conjuntivales que se recogen con esta técnica. El poro ideal está entre $0,22\mu\text{m}$ - $0,44\mu\text{m}$ (5), pero las membranas para la CIC no pueden estar caracterizadas sólo por el tamaño del poro; la estructura de la membrana, la superficie asimétrica y el surfactante juegan un crítico rol en el número de células recogidas (6).



Imagen 1. Técnica de CIC. Fuente IOBA.

1.3 Métodos de procesado

Las células obtenidas pueden ser analizadas por varios métodos dependiendo del objetivo de la investigación o de la patología implicada, como son:

- Microscopio óptico: es el más usado, se visualizan las células epiteliales y caliciformes. Buena herramienta para la detección.
- Microscopio electrónico: permite la visualización de la ultra-estructura de las células.
- Reacción en cadena de polimerasa (PolymeraseChainReaction, PCR)
- Citometría de flujo

1.4 Principales aplicaciones de la CIC

- Descripción de la superficie ocular en condiciones normales: para mostrar las variaciones de cantidad de células, las variaciones en el número de células caliciformes dependiendo del género y la edad.
- Diagnóstico de enfermedades de la superficie ocular: entre otras las conjuntivitis crónicas (queratoconjuntivitis seca), la neoplasia escamosa de la superficie ocular ,la deficiencia de vitamina A, la insuficiencia limbar y las infecciones de la superficie

ocular, pero sobre todo en el síndrome de ojo seco es donde la CIC ha contribuido con significativos avances (2).

- Monitorizar el impacto que causa las lentes de contacto en la superficie ocular.
- Detección de microorganismos de la superficie ocular

Recientemente, también se ha utilizado la CIC para evaluar los cambios en la superficie ocular de usuarios habituales de ordenadores, ya que el efecto de los ordenadores en el ojo puede ser diagnosticado en un estadio asintomático y los daños en el epitelio conjuntival pueden ser prevenidos (7).

La repetición de la CIC a lo largo del tiempo en un mismo sujeto es una buena manera de percibir cambios en la superficie ocular ya sea en usuarios de lentes de contacto como para evaluar el progreso de una enfermedad (1).

1.5 Ventajas y limitaciones de la CIC

La CIC se trata de una técnica no quirúrgica, mínimamente invasiva, fácil de realizar, rápida y barata que generalmente no provoca efectos secundarios, y además no suelen existir contraindicaciones (8). Todo ello unido a que es un método que no causa excesiva incomodidad en el paciente debido a la previa administración de anestesia tópica.

También, la CIC evita los problemas de la citología por cepillado o “brush”, usada para la recolección de células de la superficie ocular, que puede originar la destrucción de mucha de la morfología celular y evitar la observación de las células en la forma que ellas están in vivo, manteniendo los contactos célula-célula (1).

La CIC es una técnica efectiva y segura aunque tiene limitaciones, como por ejemplo que solo puede evaluar las capas más superficiales de la conjuntiva, de una a tres capas (9). La aplicación de anestesia tópica puede causar cambios en la muestra tomada, también la cantidad de presión es distinta, obteniendo los mejores resultados a una presión de 60g, así como el tamaño y la forma del filtro puede variar (1), siendo otra de las mayores limitaciones de esta técnica su falta de reproducibilidad.

1.6 Nuevo dispositivo: EYEPRIM™

La técnica CIC ha ido evolucionando a lo largo del tiempo, por lo que actualmente se ha desarrollado un nuevo sistema de recolección de citología por impresión denominado EYEPRIM™ (Imagen 2): Medical Device for Conjunctival Impression. OPIA. Technologies; www.eyepri.com/ .Francia.) .



Imagen 2. Dispositivo EYEPRIM™

1.6.1 Elementos principales del EYEPRIM™

- Un cuerpo rígido con asas que permite un buen manejo.
- Una membrana flexible que se inserta en el extremo distal del dispositivo y que se aplicará sobre la conjuntiva. La membrana es de polietersulfona.
- Un botón pulsador en el otro extremo para acercar la membrana en contacto con el ojo y posteriormente expulsar la membrana.

1.7 Análisis de las muestras

- Citología: el análisis de la citología es posible con un microscopio adecuado, después de una tinción de la membrana.
- Citometría de flujo: las células recogidas con EYEPRIM™ pueden ser analizadas con citometría de flujo una vez que las células han sido separadas de la membrana. Una única membrana del dispositivo EYEPRIM™ es solamente necesaria para dicha medición.
- Reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR): permite la interpretación del ARN y la medición de muchos biomarcadores en una única membrana.
- Citología 3D: es un método de análisis patentado (OcuPharmDiagnostics) para el estudio de las células caliciformes y su secreción. Esta técnica se realiza con la muestra tomada por el EYEPRIM™ usando un microscopio de barrido laser.

1.8 Principales aplicaciones del dispositivo EYEPRIM™

Este novedoso dispositivo se ha utilizado recientemente en diversos estudios para la comparación con la CIC tradicional y usando distintos buffers (10), también usado para la recolección de células conjuntivales con el fin de evaluar el biomarcador molecular HLA-DR (11) o validando este dispositivo para cuantificar la liberación de mucinas en la superficie ocular (12).

1.9 Ventajas del dispositivo EYEPRIM™

Este dispositivo podría ayudar a la estandarización de la recolección y también llegar a permitir un mayor análisis de células y biomarcadores para ayudar a diagnosticar varios trastornos de la superficie ocular, tales como el síndrome de ojo seco, alergias o infecciones.

EYEPRIM™ es el primer dispositivo de fácil uso y estéril que no necesita anestesia para la práctica de la tradicional CIC.

Este novedoso dispositivo podría llegar a recoger un 50% más de células que el método tradicional, llegando a recoger la cantidad suficiente de células para la evaluación de varios biomarcadores al mismo tiempo.

EYEPRIM™ recoge entre 500 ng y 3000 ng de ARN purificado por membrana. Una membrana es suficiente en comparación de la utilización de 3 veces la CIC. "Francoise Brignole-Baudouin".

Además, dada su aparente facilidad para la adquisición de la muestra podría reducirse el tiempo de muestreo, facilitando la reproducibilidad de la técnica. Finalmente, la técnica de almacenado podría minimizar la posible contaminación de la muestra.

2. *Justificación*

JUSTIFICACIÓN

En el mercado actual van apareciendo nuevos dispositivos diagnósticos y terapéuticos que tienen por objetivo realizar los procedimientos habituales del clínico y del investigador de una forma menos invasiva, más sencilla y más fiable. Sin embargo, esta nueva tecnología sanitaria debe mostrar científicamente, que realmente ofrece resultados iguales o mejores que el actual “gold-standard” para cada procedimiento. Consecuentemente, en el caso del EYEPRIM™, debemos evaluar si este nuevo dispositivo puede proporcionarnos los mismos o mejores resultados que la CIC convencional para la obtención del ARN y su posterior análisis.

3. Hipótesis y Objetivos

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El dispositivo EYEPRIM™ es más eficaz que la CIC convencional para la toma de células epiteliales conjuntivales, recogiendo mayor número de células en menor tiempo, de una manera más repetitiva y con menor molestia en el paciente y más seguro debido al menor riesgo de contaminación de la muestra.

3.2 Objetivo General

Comparar los resultados obtenidos con la técnica convencional de citología de impresión conjuntival (CIC) con los ofrecidos por un nuevo dispositivo de adquisición denominado EYEPRIM™.

3.3 Objetivos Específicos

- 1) Cuantificar la cantidad de ARN obtenida de cada técnica.
- 2) Determinar el grado de acuerdo entre los datos obtenidos por cada técnica.
- 3) Identificar cual de los dos métodos produce en el paciente menor sensación de molestia subjetiva y si la magnitud de la molestia se relaciona con la cantidad de ARN obtenido.
- 4) Determinar si el uso de anestésico influye en la cantidad de ARN obtenido en las muestras tomadas.
- 5) Contrastar el coste de la obtención de la misma cantidad de ARN por ambas técnicas.

4. Material y Métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Sujetos

El estudio siguió los principios de la Declaración de Helsinki y el protocolo fue aprobado tanto por la Comisión de Investigación del IOBA como por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Anexo I).

Las personas voluntarias que formaron parte del estudio firmaron el consentimiento informado (Anexo II) y fueron libres de interrumpir su participación en el estudio en cualquier momento.

4.1.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron sujetos sanos mayores de 18 años, aquellos que entendieron el objeto del estudio y firmaron el consentimiento informado.

4.1.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron todos los sujetos usuarios habituales de lentes de contacto, pacientes con cirugía ocular o historia de enfermedad de superficie ocular previa, aquellos sujetos con enfermedad activa ocular, así como cualquier otra enfermedad sistémica, teniendo en cuenta la presencia de alergias medicamentosas o de cualquier tipo. Se excluyeron igualmente aquellos voluntarios que obtuvieron resultados compatibles con síndrome de ojo seco en los test diagnósticos de ojo seco realizados durante la visita de reclutamiento.

También fueron excluidos todos los sujetos que no estuvieron de acuerdo en participar en el estudio o en firmar el consentimiento informado.

4.2 Método-Fases del estudio

El presente estudio piloto fue de tipo prospectivo, descriptivo y transversal.

El estudio fue desarrollado en 3 fases:

1. Reclutamiento de los sujetos voluntarios sanos y recolección de las muestras mediante citología por impresión.
2. Extracción y cuantificación del ARN de las muestras.
3. Estudio estadístico y análisis de los resultados.

4.2.1 Reclutamiento de los voluntarios, test clínicos y recolección de las muestras.

Se realizó en las instalaciones del IOBA.

En la visita el sujeto fue informado del objeto del estudio y una vez hubo firmado el consentimiento informado para su participación en el mismo fue evaluado mediante distintos test diagnósticos de síndrome de ojo seco para comprobar que era un voluntario susceptible de participar en el estudio.

Así, durante la visita se realizó la historia clínica del paciente con el objetivo de conocer si cumplía los criterios de inclusión y exclusión. Además, para descartar que los sujetos incluidos tuvieran síndrome de ojo seco, se llevaron a cabo los siguientes test:

1-Cuestionario OSDI (Ocular Surface Disease Index) (Anexo III): Es un cuestionario que se utiliza en la clínica diaria y en el ámbito de la investigación. Consiste en 12 preguntas sobre situaciones relacionadas con la sintomatología experimentada por el individuo en la última semana relacionada con la sequedad ocular. Dado que el rango de normalidad para dicho cuestionario es una puntuación

menor a 13 unidades, se determinó incluir en el estudio únicamente a aquellos pacientes que obtuvieron un valor menor a 13 puntos (13).

2-Tinción corneal con fluoresceína: Es uno de los métodos más empleados para evaluar alteraciones de la superficie ocular. Mediante esta prueba realizada a todos los sujetos voluntarios fue posible detectar alteraciones de la integridad del epitelio corneal, se realizó para descartar a cualquier voluntario que padeciese síndrome de ojo seco no sintomático o descartar cualquier otra anomalía compatible con alteraciones epiteliales corneales. Para realizar el test se instiló 5 microlitros al 2% de fluoresceína sódica en el saco conjuntival inferior, y se esperaron 2 minutos para realizar la evaluación de la tinción corneal siguiendo la metodología Oxford (Anexo IV) (14), y se utilizó para ello el filtro azul cobalto de la lámpara de hendidura (SL-Z8; Topcon) y un filtro amarillo tipo Wratten. Se incluyó en el estudio sujetos que tuvieran como máximo un grado 1. Se permitió dicho grado de tinción corneal ya que según publicó Dundas et al (15), pacientes sanos sin patología de superficie ocular muestran grados menores de tinción corneal.

3-Test de rojo fenol: Es una prueba comúnmente utilizada en la clínica para detectar paciente con alteraciones en el volumen de secreción lagrimal. Este test requiere una mínima cantidad de lágrima y de tiempo. No produce molestias oculares, ni estimula la producción refleja, por lo que es un test adecuado para evaluar la cantidad de lágrima basal. El test consiste en la colocación de un hilo de algodón impregnado de rojo fenol en el fondo de saco conjuntival ínfero-temporal durante 15 segundos.

A medida que la lágrima impregna el hilo de algodón, se observa un cambio de color de amarillo a rojo, debido al cambio de pH. Es un método bastante específico y poco invasivo. Los sujetos que se incluyeron en el estudio debieron tener valores por encima de 20 mm en el test de Rojo Fenol, dado que valores inferiores puede indicar un cierto grado de hiposecreción lagrimal (16).

Una vez fueron realizados los test diagnósticos descritos anteriormente y confirmado que cumplieran los requisitos de inclusión/exclusión se procedió a la obtención de las muestras de citología conjuntival mediante ambas técnicas.

Para la recogida de las muestras se utilizaron los dos ojos en cada sujeto voluntario (n=20): en uno se realizó dicha toma mediante la técnica de CIC convencional y en el otro ojo se utilizó el dispositivo EYEPRIM™. La selección de ojo para cada técnica se realizó de forma aleatorizada. Igualmente, se aleatorizó que técnica fue la primera en realizarse.

➤ Toma de muestras por CIC mediante la técnica convencional

Posterior a la aplicación de una gota de anestésico tópico (Colircusi anestésico doble, Alcon. Oxibuprocainahidrocloruro 4 mg/1 ml + Tetracaínahidrocloruro 1 mg/1 ml), se colocó un filtro de polietersulfona estéril (Supor 200, tamaño del poro de la membrana 0.20 μ m, 13 mm de diámetro; GelmanLaboratory, Ann Arbor, MI) sobre la conjuntiva bulbar superior de uno de los ojos del individuo. El filtro se colocó en la conjuntiva bulbar superior, así que se solicitó al voluntario mirar hacia abajo, y permaneció aplicado durante 5 segundos retirándose posteriormente con cautela. Luego el filtro se suspendió en 1 ml de buffer de lisis RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) que contiene 1% 2-mercaptoethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se almacenó a -80°C para aislamiento posterior del RNA total.

➤ Toma de muestras por CIC mediante el dispositivo EYEPRIM™

La CIC mediante el dispositivo EYEPRIM™ se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. El fabricante del dispositivo EYEPRIM™ recomienda la realización de la CIC sin anestesia tópica dado lo poco invasivo

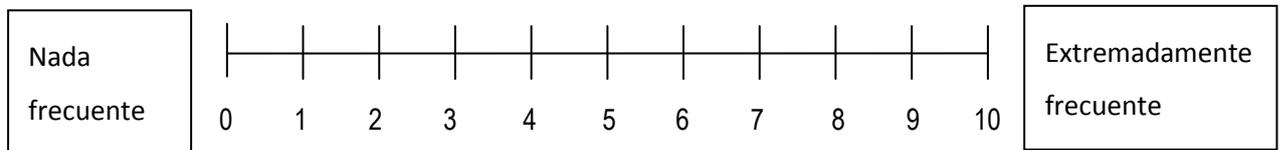
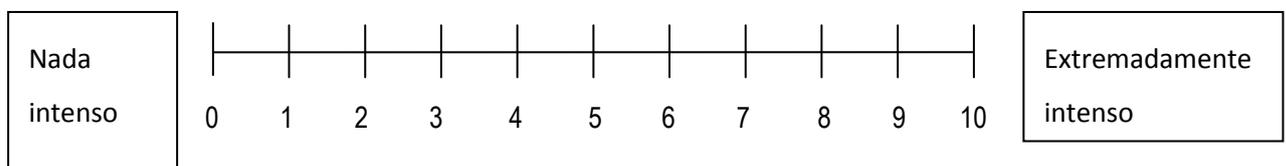
que es y su rápida adquisición, por lo que en el ojo donde se utilizó el EYEPRIM™ no se instiló anestesia tópica.

El sujeto fue colocado en vertical con la cabeza en horizontal durante la toma de la muestra. El sujeto miró hacia abajo de acuerdo con el cuadrante que fue seleccionado que es el bulbar superior. Una vez colocado el sujeto se abrió el paquete del dispositivo manteniendo la esterilidad de la membrana. Se mantuvieron los párpados abiertos sujetándolos con la mano. Se puso el dispositivo en la conjuntiva del sujeto, presionando el botón hasta que hiciera stop y la membrana entrase en contacto con la conjuntiva y se sostuvo el dispositivo de 2 a 3 segundos.

Se retiró la presión antes de quitar el dispositivo del ojo para proteger la muestra del medioambiente. Se expulsó la membrana del dispositivo pulsando fuertemente el botón, hasta que fue desprendida del dispositivo. Luego la membrana se suspendió en 1 ml de buffer de lisis RLT (Qiagen) que contiene 1% 2-mercaptoethanol (Merck) y se almacenó a -80°C para aislamiento posterior del ARN total.

Test subjetivo de valoración de molestia.

Una vez se finalizó la toma de citologías mediante ambos procedimientos se dispuso al paciente a rellenar un test subjetivo (SANDE I) (Figura 1) que utiliza una escala de valoración visual. El voluntario debía determinar el grado de molestia de las dos técnicas realizadas, analizando la frecuencia y la intensidad de la molestia durante la técnica y 2 minutos posteriormente a la técnica. El voluntario debía marcar con una línea vertical en cada escala de valoración visual el grado de malestar.

FRECUENCIA DE MALESTAR OCULAR**INTENSIDAD DE MALESTAR OCULAR****Figura 1.** Test SANDE I

Adicionalmente, de esos 20 sujetos voluntarios en los que se comparó las dos técnicas, a 5 de ellos se los invitó a participar en una segunda visita en la que se obtuvieron muestras en ambos ojos con el sistema EYEPRIM™, instilando aleatoriamente en uno de los dos ojos anestésico tópico, para conocer si la utilización del mismo alteraba la recolección de ARN y/o mejoraba el posible malestar causado al sujeto durante el procedimiento de CIC.

4.2.2 Extracción y cuantificación del ARN de las muestras.

El ARN total de cada muestra obtenida previamente tanto por CIC convencional como mediante el EYEPRIM™ fue extraído de las membranas mediante el kit comercial RNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden, Alemania) bajo condiciones estándar y bajo las instrucciones del fabricante y tratado con ADNasa libre de ARNasa, siguiendo el protocolo de extracción de ARN (Anexo V).

El ARN se cuantificó espectrofotométricamente utilizando el kit comercial QUANT-IT RNA ASSAY KIT (Invitrogen) en un Qubit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo VI).

4.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico del estudio se realizó usando el programa SPSS para Windows (versión 20). Los datos se expresaron en términos de media \pm desviación estándar, independientemente de la normalidad de los mismos. Se comprobó la normalidad de cada variable utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Dependiendo de la existencia o no de distribución normal para cada variable, se aplicó estadística paramétrica y no paramétrica. Para evaluar la concordancia entre ambas técnicas (CIC y EYEPRIMTM) se realizó el análisis Bland-Altman donde se muestran los límites de concordancia entre ambas técnicas. Clínicamente, los límites de concordancia (o acuerdo) significan que para el 95% de las muestras, las diferencias entre la técnica CIC y EYEPRIMTM tendrán un valor de 1.96 veces la desviación estándar de la diferencia media entre técnicas.

Para estudiar la correlación existente entre las distintas variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson y la Rho de Spearman en función de la normalidad de cada variable.

5. *Resultados*

RESULTADOS

5.1 Descriptivo de la población incluida

En este estudio se reclutaron un total de 20 sujetos, 8 hombres (40%) y 12 mujeres (60%). La edad media del grupo seleccionado fue de 24.7 ± 5.8 años (rango 41-18 años).

Los resultados obtenidos en los test realizados para conocer si los sujetos cumplían con los criterios de inclusión se detallan en la tabla 1. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ojos asignados a ambos grupos para la tinción corneal ($p= 1.0$) ni para el test de rojo fenol ($p= 0.65$).

Tabla 1. Media y desviación estándar de los test detallados en los criterios de inclusión.

	MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTANDAR	
	CIC	EYEPRIM
OSDI	4.47 \pm 3.25	
TINCIÓN CORNEAL	0.10 \pm 0.30	0.10 \pm 0.30
ROJO FENOL	28.70 \pm 2.49	28.60 \pm 1.87

Adicionalmente, de esos 20 voluntarios sanos, se escogieron 5 voluntarios, 3 hombres (60%) y 2 mujeres (40%) en los que se comparó el dispositivo EYEPRIMTM con y sin uso previo de anestésico. La edad media de este subgrupo de 5 voluntarios fue 27.8 ± 8.78 años (rango 41-18 años).

5.2 Cantidad de ARN obtenido con la técnica CIC y con el EYEPRIMTM

La cantidad media total de ARN obtenida con la técnica CIC fue de 0.265 ± 0.285 μ g frente a los 0.317 ± 0.277 μ g obtenido por el EYEPRIMTM. La diferencia media fue -0.061

± 0.328 (95% intervalo confianza (IC): $-0.2299 / 0.1074$) μg , no siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.45$). En el grupo CIC hubo dos muestras en las que no se pudo obtener RNA, mientras que en el grupo EYEPRIMTM solo hubo una muestra en la que no se pudo obtener RNA.

Dado que el área de recolección de cada dispositivo usado en cada técnica es distinta, (la técnica CIC posee un área de 66.37 mm^2 y el EYEPRIMTM 69 mm^2), calculamos igualmente la magnitud de ARN recogido una vez estandarizada al valor del área de recogida. Hecho esto, la técnica CIC obtuvo una media de $0.0040 \pm 0.0043 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ y el dispositivo EYEPRIMTM $0.00459 \pm 0.0040 \mu\text{g}/\text{mm}^2$.

No existiendo tampoco diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.43$) entre la cantidad de ARN recogido por unidad de área para ambas técnicas

5.3 Estudio de concordancia

Para evaluar la concordancia entre ambas técnicas (CIC y EYEPRIMTM) se utilizó el análisis estadístico tipo Bland-Altman.

Este análisis estadístico consiste en representar gráficamente la diferencia entre cada pareja de valores frente a la media de cada pareja de valores.

La diferencia media entre ambas técnicas fue 0.00073 ± 0.0048 (95% IC: $-0.0032 / 0.00175$), μg , no siendo la diferencia entre cada técnica estadísticamente significativa ($p= 0.54$). La diferencia media está representada en el gráfico como la línea central continua. El límite de concordancia superior fue de $0.0941 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, mientras que el inferior fue de $-0.01022 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Ambos límites están representados como líneas discontinuas en el gráfico 1. La anchura de los límites de concordancia fue de $0.0189 \mu\text{g}/\text{mm}^2$.

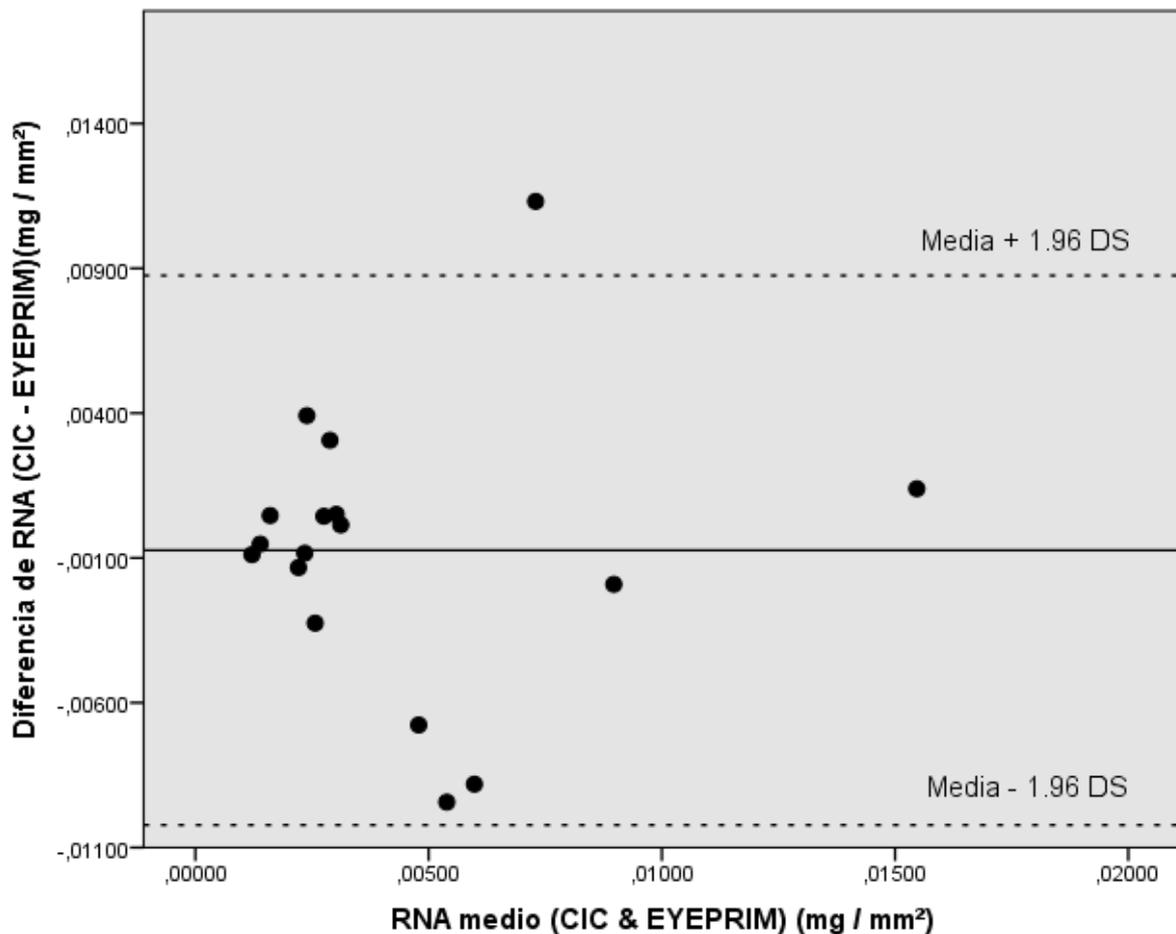
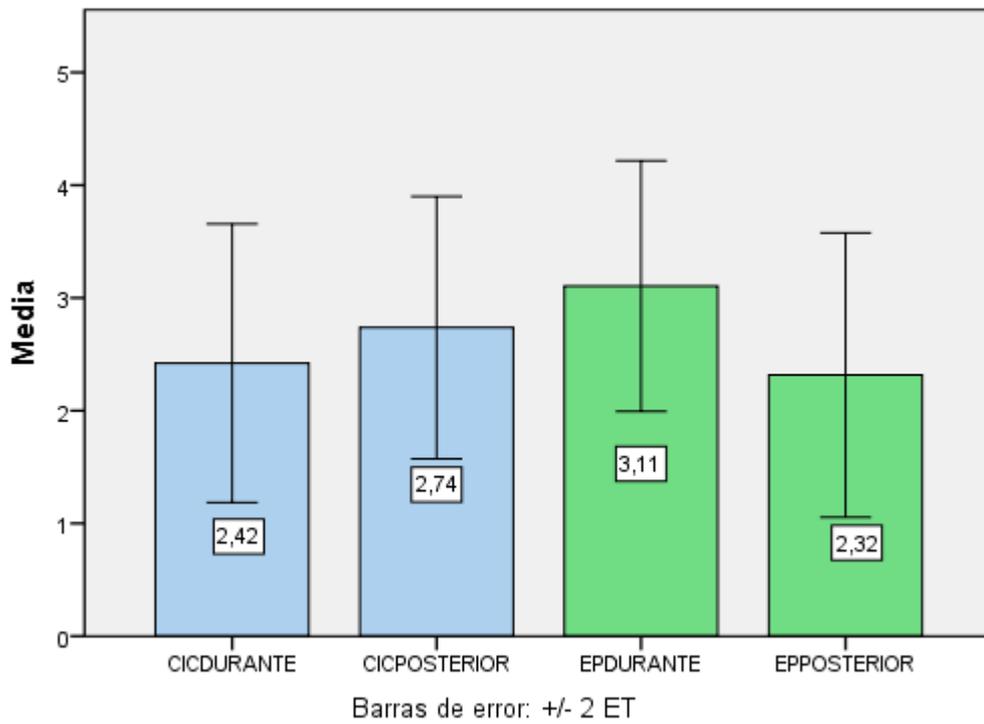


Figura 2. Análisis Bland-Altman mostrando el grado de acuerdo entre CIC y EYEPRIMTM

5.4 Comparación de los valores del test subjetivo SANDE

Los valores correspondientes a los resultados de los test subjetivos evaluando la molestia ocular causada durante y posterior a la técnica realizada se detallan en el gráfico 2 y 3. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para la frecuencia del malestar ni durante la adquisición ($p=0.17$) ni tras la adquisición ($p=0.68$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para la intensidad del malestar ocular ni durante la adquisición ($p=0.81$) ni posterior a la adquisición ($p=0.36$).



EP: EYEPRIM™

Figura 3. Frecuencia de molestia ocular para las técnicas CIC y EYEPRIM™.

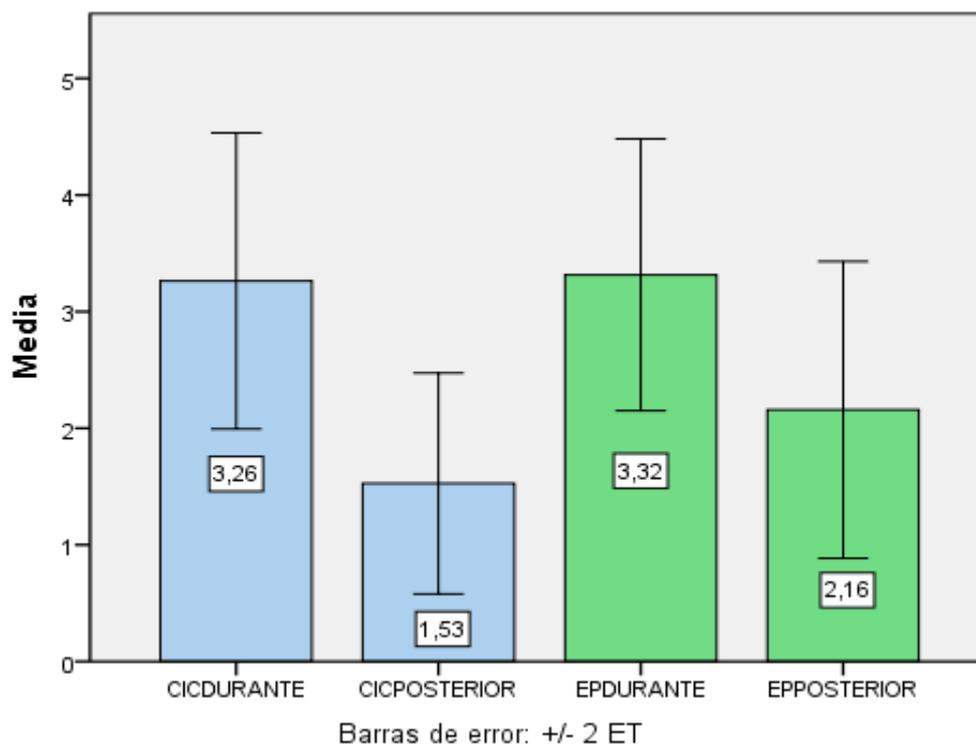


Figura 4. Intensidad de molestia ocular para las técnicas CIC y EYEPRIM™

5.5 Estudio de las correlaciones

Se analizó la posible relación existente entre la magnitud de ARN obtenido, tanto de forma total como por unidad de área, con la magnitud de malestar ocular reportado por los pacientes tanto en términos de intensidad como de frecuencia durante el procedimiento y tras el procedimiento (tabla 4). Solo se encontraron correlaciones significativas para el ARN obtenido (total y por área).con la intensidad para el EYEPRIM™ posterior a la recogida de la muestra.

Tabla 4. Correlaciones entre la magnitud de ARN obtenido por cada técnica y las molestias

	Dispositivo utilizado	Momento		ARN/area ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)		ARN (μg)	
				CIC	EP	CIC	EP
FRECUENCIA	CIC	Durante	Rho	-0,241	-0,097	-0,241	-0,086
			P	0,336	0,703	0,336	0,735
		Posterior	Rho	-0,139	-0,078	-0,139	-0,074
			P	0,583	0,76	0,583	0,771
	EP	Durante	Rho	0,142	-0,393	0,142	-0,383
		P	0,575	0,107	0,575	0,117	
Posterior	Rho	0,116	0,036	0,116	0,034		
	P	0,648	0,886	0,648	0,893		
INTENSIDAD	CIC	Durante	Rho	-0,142	-0,071	-0,142	-0,058
			P	0,573	0,778	0,573	0,820
		Posterior	Rho	0,000	0,292	0,000	0,302
			P	1,000	0,240	1,000	0,223
	EP	Durante	Rho	0,396	-0,292	0,396	-0,281
			P	0,104	0,239	0,104	0,258
		Posterior	Rho	0,473	-0,056	0,473	-0,056
			P	0,047	0,824	0,047	0,824

Rho: coeficiente de correlación de Spearman.

P: valor de la significación de la correlación.

A fin de comprobar si existía alguna correlación significativa en función del sexo del sujeto, se segmentó la base de datos evaluando en grupos separados hombres y mujeres; (Tablas 5 y 6) en este caso tampoco se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas entre la cantidad de ARN, normalizado al área de la membrana y sin normalizar, con los valores obtenidos en los test de valoración visual subjetiva.

Tabla 5. Correlaciones entre la magnitud de ARN obtenido por cada técnica y las molestias reportadas en el grupo de los hombres.

			ARN/area ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)		ARN (μg)		
	Dispositivo utilizado	Momento		CIC	EP	CIC	EP
FRECUENCIA	CIC	Durante	Rho	0,177	-0,029	0,177	-0,029
			P	0,738	0,956	0,738	0,956
	Posterior	Rho	0,058	0,147	0,058	0,147	
		P	0,913	0,781	0,913	0,781	
EP	Durante	Rho	0,273	-0,213	0,273	-0,213	
		P	0,600	0,686	0,600	0,686	
INTENSIDAD	CIC	Durante	Rho	0,617	0,177	0,617	0,177
			P	0,192	0,738	0,192	0,738
	Posterior	Rho	0,617	0,309	0,617	0,309	
		P	0,192	0,552	0,192	0,552	
EP	Durante	Rho	0,232	0,000	0,232	0,000	
		P	0,658	1,000	0,658	1,000	
Posterior	Rho	0,676	0,213	0,676	0,213		
	P	0,140	0,686	0,140	0,686		

Tabla 6. Correlaciones entre la magnitud de ARN obtenido por cada técnica y las molestias reportadas en el grupo de las mujeres.

	Dispositivo utilizado	Momento		ARN/area ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)		ARN (μg)	
				CIC	EP	CIC	EP
FRECUENCIA	CIC	Durante	Rho	-0,406	0,171	-0,406	0,198
			P	0,191	0,595	0,191	0,538
		Posterior	Rho	-0,234	0,018	-0,234	0,027
			P	0,465	0,956	0,465	0,935
	EP	Durante	Rho	0,234	-0,345	0,234	-0,317
			P	0,463	0,273	0,463	0,316
Posterior	Rho	0,022	-0,076	0,022	-0,080		
	P	0,946	0,814	0,946	0,805		
INTENSIDAD	CIC	Durante	Rho	-0,282	0,152	-0,282	0,180
			P	0,374	0,638	0,374	0,575
		Posterior	Rho	-0,215	0,426	-0,215	0,447
			P	0,503	0,168	0,503	0,146
	EP	Durante	Rho	0,446	-0,453	0,446	-0,428
			P	0,146	0,139	0,146	0,165
Posterior	Rho	0,447	-0,168	0,447	-0,169		
	P	0,146	0,601	0,146	0,600		

5.6 Comparación de la cantidad de ARN obtenida con EYEPRIM™ sin anestesia y con anestesia.

A fin de comprobar la influencia del uso o no de anestésico en la toma de muestra mediante el dispositivo EYEPRIM™ se llevó a cabo el estudio en una subpoblación de 5 sujetos de entre aquellos que ya habían participado en el primer estudio. En este subgrupo de 5 sujetos solo fue posible obtener muestras viables en tres sujetos (nº 1, 4 y 5) en el grupo correspondiente a los ojos a los que se les instiló anestésico, mientras que en el grupo correspondiente a los ojos que no se les instiló anestésico no fue posible obtener la muestra en el sujeto nº4.

La media de la cantidad total de ARN obtenida en el grupo al que se le instiló anestésico fue de $0.0011 \pm 0.00075 \mu\text{g}$, mientras que la del grupo al que no se le instiló anestésico fue de $0.0015 \pm 0.00069 \mu\text{g}$.

5.7 Comparación de los valores del test subjetivo SANDE en el subgrupo de 5 sujetos.

Los siguientes gráficos muestran los valores medios obtenidos para la frecuencia y la intensidad de la técnica con EYEPRIM™ con y sin anestésico, durante y posterior a la adquisición de células conjuntivales. Se observó que la puntuación para la frecuencia y en la intensidad del dolor durante la toma sin anestesia era mayor en comparación a la obtenida con anestesia (1,8 vs 0.6 para frecuencia y 2,2 vs 0,8 para intensidad) Sin embargo, no se pudo hacer una comparación estadística de los valores del test de SANDE, debido al bajo número de participantes en este subgrupo.

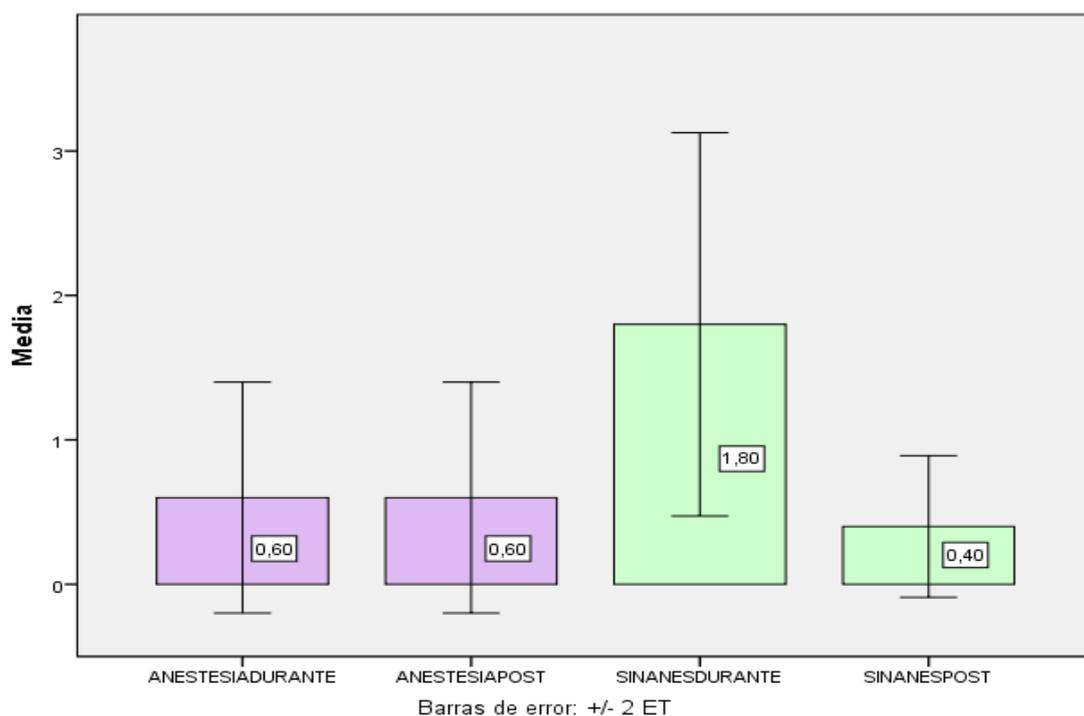


Figura 5. Frecuencia de molestia ocular para la técnica EYEPRIM™ con y sin anestésico.

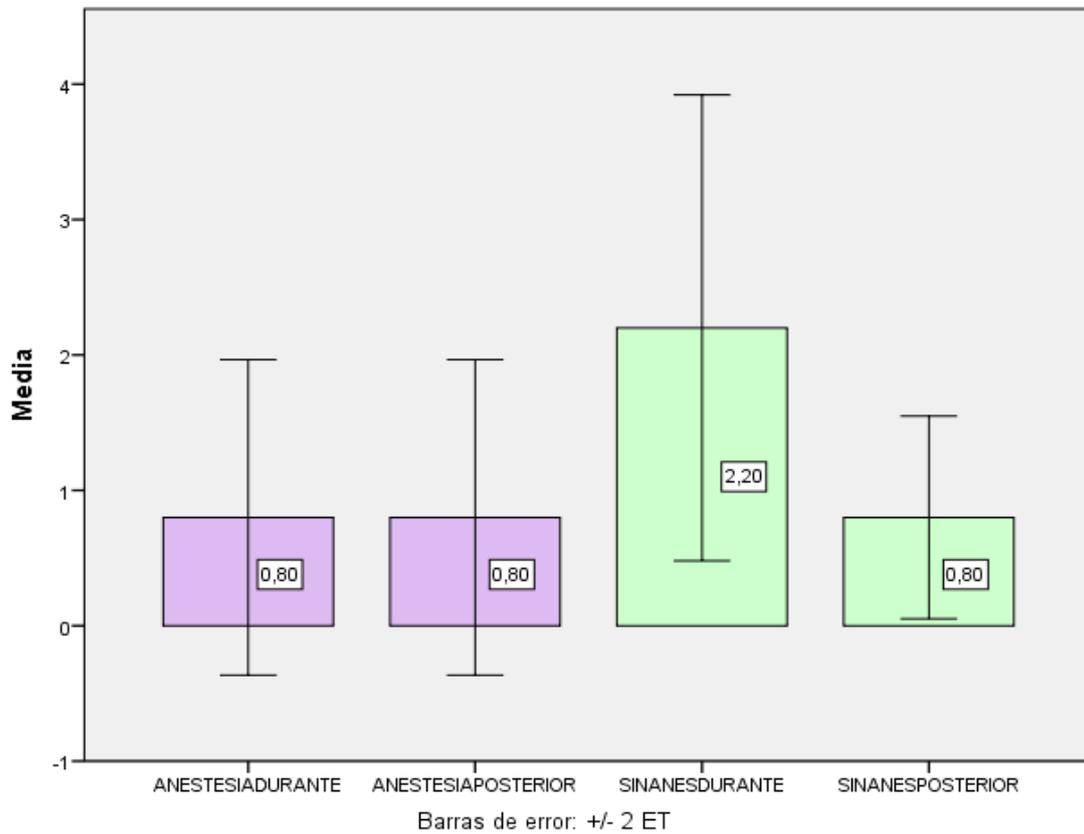


Figura 6. Intensidad de molestia ocular para la técnica EYEPRIM™ con y sin anestésico.

5.8 Comparación entre los costes de las dos técnicas

Se muestra en las siguientes tablas los precios respectivos para los materiales empleados en ambas técnicas.

MATERIAL	PRECIO	CANTIDAD	TOTAL
Filtros polietersulfona (CIC)	100U - 123,9 €	1 filtro	1,24 €
Anestésico	1U- 4,57€	1 bote	4,57 €
EYEPRIM™	20U – 198 €	1 dispositivo	9.9 €

Se observó que el precio unitario para la realización de la técnica EYEPRIM™ es más caro aún sin el uso de anestésico en la toma con el EYEPRIM™ (9.9 € EYEPRIM™ vs aproximadamente 2.38 € de la CIC con anestésico).

El coste del procesamiento de las muestras en ambas técnicas es el mismo:

MATERIAL	PRECIO	CANTIDAD	TOTAL
Tubos Eppendorf	1000 tubos- 28€	1tubos	0,028€
Buffer RLT	220ml- 192.02€	1 ml	0,87€
Beta-mercaptoethanol	250ml- 40.13 €	1ml	0,16 €
DNAsa	133€		
RNeasy Micro Kit; Quiagen Reactivos Extracción ARN	50muestras-513€	1 muestra	10,26 €
Quan-it RNA assay Kit	500 muestras- 225.03€	1muestra	0,45€
TOTAL			11,77€

6. *Discusión*

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue la comparación de la técnica de CIC convencional y el nuevo dispositivo “EYEPRIM™” a fin de estimar cual de los dos es más aconsejable para su uso en futuros estudios del grupo. Para ello analizamos no solo la cantidad de ARN obtenida con cada técnica sino que también el malestar causado por cada una de ellas durante la realización de la técnica y tras la finalización de la misma. Igualmente, analizamos en un pequeño subgrupo de voluntarios si existían diferencias entre la instilación o no de anestésico utilizando el dispositivo EYEPRIM™. Adicionalmente se valoró la diferencia en coste entre ambas técnicas.

6.1 Población estudiada

Los 20 voluntarios que participaron en este estudio tuvieron una edad media de $24,7 \pm 5,8$ con un rango de entre 18-41 años. Esto cumplió uno de los criterios de inclusión que era que todos los voluntarios fueran igual o mayores de 18 años.

Mediante las puntuaciones de los siguientes tres test diagnósticos de síndrome de ojo seco se pudo justificar que todos los sujetos voluntarios eran sanos desde el punto de vista de superficie ocular.

- La media de los valores del test de OSDI fue de $4,47 \pm 3,25$, lo cual muestra que los voluntarios tienen puntuaciones menores de 13 que es el rango de normalidad de dicho cuestionario y por lo tanto su sintomatología ocular es mínima.
- En la tinción corneal con fluoresceína, los valores medios en ambos ojos de los voluntarios es menor a 1, por lo que es un determinante de que no existe daño en la superficie ocular.
- También, los valores medios del test rojo fenol en los ojos utilizados CIC es de $28,7 \pm 2,5$ y en los ojos utilizados EYEPRIM™ es de $28,6 \pm 1,87$. En ambos ojos la cantidad de lágrima obtenida es $> 20\text{mm}$, por lo que los sujetos voluntarios vuelven a confirmar que no poseen síndrome de ojo seco.

6.2 Comparación del ARN obtenido

Realizadas las citologías con ambas técnicas, se extrajo y cuantificó la cantidad de ARN que se obtenía con cada una de ellas.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de microgramos de ARN obtenidos con la técnica de CIC y la técnica realizada con el dispositivo EYEPRIM™.

Igualmente se ajustó al área de la membrana, siendo el área de la CIC (66.37 mm²) ligeramente inferior a la del EYEPRIM™ (69 mm, por lo que pudo suponerse que se obtiene un mayor número de células y una mayor cantidad de ARN con el último; sin embargo en este estudio no se obtuvieron tampoco diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de ARN obtenido tras ajustar los microgramos al área de cada membrana. En contraposición a los datos obtenidos en este estudio, autores de otros estudios afirman que con el dispositivo EYEPRIM™ se recoge un 50% más de células que con la CIC tradicional (12) y en otro estudio los autores afirman que se recogió suficiente cantidad de ARN usando el dispositivo EYEPRIM™, con un promedio de 1µg por cada citología realizada (11). En la propia página web www.eyepri.com afirman que el dispositivo EYEPRIM™ recoge entre 500 ng y 3000 ng de ARN purificado por cada membrana, datos obtenidos de 126 membranas analizadas en un estudio clínico (fuente no revelada), en comparación con la cantidad de ARN por membrana obtenida en este estudio, que es de aproximadamente 300 ng. La diferencia en la cantidad de ARN que se obtiene en este estudio en comparación con el rango que la casa comercial da en su web, puede ser debido a la utilización de distintos tipos de buffer. Dependiendo del tipo de buffer utilizado se pueden obtener mayor o menor número de células; en un estudio realizado, muestra como varios buffer son evaluados y como resultado obtiene que utilizando DIGE-Buffer se obtiene la mayor cantidad de proteínas en comparación con otros buffer como PBS-T, PBS-ASB14 y MLB. También obtiene mayor número de proteínas con el dispositivo EYEPRIM™ que con la CIC convencional (10).

También, es posible que no se hayan alcanzado las magnitudes medias previamente reportadas debido a que el examinador era novel.

Es importante apuntar que en nuestro estudio, de las 20 muestras obtenidas mediante CIC en dos de ellas no se obtuvo ninguna cantidad de ARN, en cambio en el dispositivo EYEPRIM™ sólo en una de las muestras no se pudo cuantificar la cantidad de ARN.

6.3 Concordancia entre técnicas

Para evaluar la concordancia entre la técnica CIC convencional y el dispositivo EYEPRIM™ se realizó el análisis de Bland-Altman comparando las magnitudes normalizadas de ARN obtenido con cada técnica. La diferencia media entre la cantidad de microgramos obtenidos en ambas técnicas no fue estadísticamente significativa ($p=0.54$). Sin embargo, en el gráfico de dispersión podemos comprobar que la anchura entre los límites de concordancia superior e inferior es moderada por lo que parece que ambas técnicas no podrían ser plenamente intercambiables.

6.4 Comparación de los valores obtenidos mediante el test de valoración visual

(SANDE I)

Analizando los resultados obtenidos de los test subjetivos que valoran la molestia ocular causada durante y posterior a la toma de muestras mediante las técnicas de citología realizadas, se puede observar que la frecuencia de la molestia ocular durante la técnica EYEPRIM™ tiene una media ligeramente superior que el resto, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para la frecuencia de molestia ocular, ni durante la adquisición de la muestra ($p=0.17$) ni posterior a la adquisición de la muestra ($p=0.68$). También se obtuvo una media mayor en la puntuación del SANDE para la intensidad subjetiva de la molestia ocular durante la técnica EYEPRIM™. Esto puede ser debido a que durante la realización de la técnica con este dispositivo no se instila anestésico por recomendación del fabricante, en contraposición a la CIC convencional donde si es necesario el uso previo de anestésico para realizar el procedimiento de forma fiable.

Correlaciones entre muestra de ARN y test SANDE I

En base a la posible hipótesis de que una mayor cantidad de ARN obtenida, correspondiera a una mayor molestia ocasionada (provocada por diversos factores, principalmente la presión ejercida a la hora de realizar la toma) se estudió también la relación existente entre la cantidad de ARN (normalizada al área y sin normalizar) obtenida en cada técnica, con la magnitud de malestar ocular reportado por los pacientes tanto en términos de frecuencia como de intensidad durante y tras el procedimiento. Se encontró una única correlación significativa entre los microgramos obtenidos con la CIC, tanto normalizado al área como sin normalizar, en relación con la intensidad del EYEPRIM™ posterior a la realización de la técnica ($p=0,047$).

Posterior a esto, se agrupó por separado a hombres y mujeres, para comprobar por grupos la molestia ocasionada durante y posterior a la toma de muestras. Se supuso que el grupo de los hombres obtuviera mayores puntuaciones en el test de molestia subjetiva, debido a su mayor sensibilidad al dolor, pero en este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre técnicas.

6.5 Comparación entre la cantidad de ARN obtenido mediante el dispositivo EYEPRIM™ con anestésico y sin anestésico.

Para realizar esta comparación, reclutamos 5 voluntarios sanos de los que anteriormente habían participado en la toma de citologías mediante CIC y EYEPRIM™. En esta fase puede encontrarse un sesgo de selección, ya que volvieron a participar aquellos individuos a los que la realización de citologías no los había resultado muy molesta.

Si bien se encontró que la cantidad media de ARN obtenido era ligeramente mayor en el grupo en el que no se instilo anestésico, No obstante estos datos podrían no ser fiables debido a la pequeña cantidad de muestras con ARN obtenido en este subgrupo de estudio, por lo cual no pudo realizarse estudio estadístico.

También, en esos 5 voluntarios se realizó el test subjetivo de valoración visual donde puntuaron la frecuencia y la intensidad durante y posterior a las citologías con el dispositivo EYEPRIM™ con y sin instilación de anestésico.

Se obtuvo una frecuencia de molestia ocular mayor, en el momento posterior a la realización de la técnica con el dispositivo EYEPRIM™ sin anestésico, (con un rango de entre 0-4) y la intensidad de molestia ocular también fue mayor posteriormente a la realización de la técnica con el dispositivo EYEPRIM™ sin anestésico, (con un rango de entre 0-5). Durante la realización de la técnica con el dispositivo EYEPRIM™, los niveles de molestia ocasionados tanto usando anestésico como sin ello, parecen ser similares. Aun teniendo en cuenta que la muestra de individuos es muy pequeña, podemos concluir que el uso de anestésico no influyó en la cantidad de ARN que se obtuvo mediante la membrana del dispositivo EYEPRIM™, sin embargo el uso de anestésico evita el malestar del sujeto en el momento posterior a la técnica.

6.6 Discusión de los costes

En este estudio, para la realización de la técnica CIC convencional, se usaron 5 botes de anestésico y 20 filtros de polietersulfona, lo que da un coste total de 47,63 € para llevar a cabo la toma de veinte citologías.

Por otro lado, en su comparación se usaron 20 dispositivos EYEPRIM™ con un coste de 198 €. A la toma de muestras con este dispositivo no se le suma el coste del anestésico ya que no lo requiere, pero aun así es mucha la diferencia de precio entre la técnica convencional y el nuevo dispositivo.

Lo que en la realización de una sola CIC convencional gastamos 2,38 €, en la realización de la citología con el dispositivo EYEPRIM™ gastamos 9,9 €, sumando a ambos los mismos costes del procesamiento de extracción y cuantificación de ARN.

La realización de la citología con el dispositivo EYEPRIM™ es más caro, aunque podría compensar aun así, si con este nuevo dispositivo se obtuviera mayor cantidad de ARN y fuera menos molesto para los sujetos, ya que siempre se busca el máximo bienestar y

beneficio para el paciente. Sin embargo, en este estudio, no se obtuvieron diferencias significativas entre la cantidad de ARN obtenida con el dispositivo EYEPRIM™ y la CIC convencional y valorando los resultados del test realizado por los sujetos voluntarios obtenemos que la frecuencia e intensidad de la molestia ocular es mayor durante la realización de la técnica con el dispositivo EYEPRIM™, por lo tanto no es rentable económicamente en base a los resultados obtenidos en nuestro estudio.

6.7 Limitaciones del estudio

Este estudio presenta algunas limitaciones

- 1) Número relativamente bajo de sujetos participantes en el estudio: esto fue debido a que el número de dispositivos EYEPRIM™ era limitado, teniendo únicamente 30 dispositivos cedidos, de los cuales 20 se utilizaron en la comparación de la técnica mediante EYEPRIM™ y CIC convencional, y los otros 10 en la comparación de toma de muestras mediante EYEPRIM™ con y sin instilación de anestésico. Esto ocasionó la falta de un periodo de aprendizaje en la toma de muestras con el dispositivo EYEPRIM™, lo cual pudo influir en el estudio.
- 2) El bajo número de dispositivos utilizados en la comparación del dispositivo EYEPRIM™ con y sin anestésico, hizo que se obtuviera material insuficiente para hacer una comparación en la que se mostraran resultados clínicamente significativos. Esto requiere futuros estudios en los que se comparen ambas variables con un número de muestras mayor.
- 3) No obtención de ARN en todas las citologías realizadas. Esto es una limitación dado que por motivos desconocidos, ya sea por la presión ejercida durante la toma de la citología o su procesamiento, en las muestras tomadas mediante CIC convencional, en dos membranas no se pudo cuantificar ARN y en las muestras tomadas con

EYEPRIM™ en una membrana no se obtuvo ninguna magnitud de ARN; esto hace que se reduzca aun más el número de muestras válidas para realizar la comparación.

- 4) No tener un número suficiente de mujeres para poder subdividir por el ciclo menstrual. En el estudio solo participaron 12 mujeres: este número no permitió tener un “n” suficientemente grande como para poder subdividir en grupos en función de la fase de ciclo menstrual. Esto puede influir en la variación del número de células caliciformes, donde se obtienen menos alrededor del tiempo de ovulación, mientras que el consumo de anticonceptivos aumenta el número de células, sugiriendo una influencia de las hormonas reproductivas en la densidad de las células caliciformes de la conjuntiva (1). También influye en lo relacionado con la sensibilidad al dolor, teniendo en cuenta que son más sensibles al dolor aquellas mujeres que se encuentran en el periodo premenstrual.

Con un número mayor de mujeres hubiéramos podido subdividir los datos obtenidos en tres grupos, según la fase del ciclo menstrual en el que se encontraran: etapa premenstrual, menstruación y etapa postmenstrual y así comprobar si hay concordancia entre el número de células obtenidas y la sensibilidad al dolor durante y posterior a la realización de las técnicas.

- 5) No se pudo estudiar la reproducibilidad de la técnica: porque no se logró tener muestra suficiente de un mismo sujeto dos veces en el subgrupo de los 5 voluntarios, por lo tanto no es posible comparar las muestras obtenidas en dos días distintos y además el “n” del que partíamos ya era bajo.

7. *Conclusiones*

CONCLUSIONES

Con todos los datos y resultados obtenidos podemos concluir que en este estudio el dispositivo EYEPRIM™ no presenta en principio ventajas frente a la realización de la CIC convencional, ya que:

- 1) no existen diferencias significativas en la cantidad de ARN obtenido con la CIC convencional.
- 2) la técnica es más molesta para el sujeto.
- 3) su precio es bastante superior a la técnica tradicional.

Sin embargo, dadas las limitaciones del estudio, en particular el bajo número de sujetos que han participado, unido a la falta de curva de aprendizaje en la toma de muestras, es posible que un estudio con mayor cantidad de muestras, pudiera aportar resultados más cercanos a los que la literatura actual refiere.

8. *Bibliografía*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Calonge M, Diebold Y, Sáez V, Enríquez de Salamanca A, García-Vázquez C, Corrales RM, Herreras JM. **Impression cytology of the ocular surface: a review.** *Exp Eye Res.* 2004; 78: 457-472.
- (2) Larmande A, Tismit E. **Importance of cytodagnosis in ophthalmology: preliminary report of 8 cases of tumors of the sclera-corneal limbus.** *Bull SocOphtalmol Fr.* 1954; 19: 415-9.
- (3) Lopin E, Deveney T, Asbell PA. **Impression cytology: recent advances and applications in dry eye disease.** *The Ocular Surface.* 2009; 7: 93-110.
- (4) Thatcher RW, Darougar S, Jones BR. **Conjunctival impression cytology.** *Arch Ophthalmol.* 1977; 95: 678-81.
- (5) Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint NL, Dua HS. **Impression cytology of the ocular surface.** *Br J Ophthalmol.* 2005; 89: 1655-1659.
- (6) Roy P, Cimbolini N, Feraille L, Kechad M, Elena PP. **Evaluation of Membrane Material for Impression Cytology.** ARVO Meeting Abstracts April 22, 2011 52:1937.
- (7) Kumar S, Bansal R, Khare A, Malik KPS, Malik VK, Jain C. **Conjunctival impression cytology in computer users.** *Nepal J Ophthalmol.* 2013; 5: 33-37.
- (8) Dart J. **Impression cytology of the ocular surface-research tool or routine clinical investigation.** *Br J Ophthalmol.* 1997; 81: 930.
- (9) Kojima T, Matsumoto Y, Dogru M, Tsubota K. **The Application of in vivo laser scanning confocal microscopy as a tool of conjunctival in vivo cytology in the diagnosis of dry eye ocular surface disease.** *Mol Vis.* 2010; 16:2457-2464.
- (10) Roy P, Soria J, Etxebarria J, Suarez T. **Optimization of a protein extraction method compatible with proteomic approaches using new device for conjunctival impression.** ARVO Meeting Abstracts April 30, 2014 55:2763.
- (11) Kessal K, Riancho L, Rabut G, Liang H, Boucher C, Melik-Parsadaniantz S, Brignole-Baudouin F. **Correlations between mRNA and protein expression profiles of**

- HLA-DR in Conjunctival Impression Cytology using a new device for collecting epithelial cells.** ARVO Meeting Abstracts April 30, 2014 55:3679.
- (12) Colligris B, Martin-Gil A, Fonseca B, Carracedo G, Pintor J. **Improving 3D mucin visualization by a new device to make impression cytology comparing normal and muco-deficient subjects.** ARVO Meeting Abstracts April 30, 2014 55:4874.
- (13) Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. **Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index.** Arch Ophthalmol 2000; 118:615–621.
- (14) Bron AJ. **The Doyne Lecture. Reflections on the tears.** Eye. 1997; 11:583–602.
- (15) Dundas M, Walker A, Woods RL. **Clinical grading of corneal staining of non-contact lens wearers.** Ophthalmic Physiol Opt. 2001; 21:30-5.
- (16) Sakamoto R, Bennett ES, Henry VA, et al. **The phenol red thread tear test: a crosscultural study.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993; 34:3510–3514.

9. *Anexos*

ANEXOS

- **ANEXO I: Aprobación comisión de investigación del IOBA y Comité Ético.**



Universidad de Valladolid



COMISION DE INVESTIGACION

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

CERTIFICA

Que el TFM titulado **“ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA”** con número de registro 03/2014 de Dña. Silvia Gutiérrez, se encuentra en el momento de la última reunión de la Comisión de Investigación de 12 de febrero de 2014

- Aprobado
 Pendiente de

Y para que así conste expido el presente certificado.

En Valladolid, a 13 de febrero de 2014

Fdo.: M^ª Paz García García
Secretaria de la Comisión de Investigación



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

Valladolid a 20 de Marzo de 2014

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

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

PI 14-148	ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA.	IOBA I.P.: AMALIA ENRÍQUEZ DE SALAMANCA, ALBERTO LOPEZ MIGUEL. OTROS: MARGARITA CALONGE CANO, SILVIA GUTIERREZ GUTIERREZ, CARMEN GARCIA VAZQUEZ RECIBIDO: 06-02-2014
-----------	---	---

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

Un cordial saludo.

F. Javier Álvarez

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

- **ANEXO II: Consentimiento informado.**



IOBA Consentimiento Informado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA



Hoja de información al paciente

Le ofrecemos participar en el estudio titulado:

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA

Promotor del Estudio:	Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA)
Duración del estudio:	01-Enero 2014 hasta 31-Diciembre de 2014.
Responsables del Estudio:	<ul style="list-style-type: none"> • Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro, (Investigador bioquímico; IP del estudio) • Dr Alberto López-Miguel (Óptico-optometrista; IP del estudio) • Dra Margarita Calonge (Médico Oftalmólogo), • Dra. Itziar Fernández (Bioestadístico) • Silvia Gutiérrez Gutiérrez (Enfermera) • Carmen García Vázquez (Técnico de laboratorio)
	Tf. 983 18 4750; Fax 983-18 47 62
Centro:	Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Propósito del estudio

Está invitado a participar en un estudio de investigación en el que se pretende comparar el uso del dispositivo Eyeprim™ (Opia, Francia) frente a la citología conjuntival convencional para la obtención de material genético (ARN) de las células epiteliales de la conjuntiva humana.

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.

Condiciones del estudio

Si se decide a participar, usted accede a que se le realicen pruebas oftalmológicas La realización de las pruebas requiere la instilación de colirios (tinciones vitales). Además accede a que se le realice en cada ojo una citología por impresión conjuntival. La toma de muestras la hace un/a oftalmólogo/a, un/a enfermero/a o un optometrista, y si bien es una prueba mínimamente invasiva se realizará con anestesia tópica a fin de evitar posibles molestias. No obstante es posible que se le realice la toma en ausencia de anestésico, siempre que Ud. acceda a ello, a fin de evaluar el posible efecto del uso dicho anestésico en la cantidad ARN extraído.

Pruebas y toma de muestras que se realizarán durante el estudio



IOBA Consentimiento Informado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA



Las pruebas serán las siguientes:

Para confirmar que usted es un voluntario sin síndrome de ojo seco se le realizarán los siguientes test diagnósticos:

- 1) Evaluación de la sintomatología de Ojo Seco:
 - Cuestionario denominado "Ocular Surface Disease Index, OSDI".
- 2) Evaluación de la integridad de la superficie ocular:
 - Test de tinción corneal con fluoresceína y test de Rojo Fenol.

Se le recogerán como muestra para su análisis posterior células epiteliales conjuntivales. Se tomará una citología en cada ojo en la zona bulbar temporal superior, una en un ojo mediante CIC convencional y la otra en el otro ojo mediante el dispositivo EYEPRIM; la elección de los ojos para cada técnica se hará de manera aleatorizada:

Las citologías por impresión conjuntival para la obtención de células conjuntivales son pruebas mínimamente invasivas y sin riesgo que se realizarán normalmente bajo el efecto de anestésico tópico. En el caso de la citología por impresión conjuntival convencional se procederá a aplicar un pequeño fragmento de filtro en la superficie conjuntival superior del ojo. En el caso del Eyeprim se aplicará el dispositivo con la membrana de recolección sobre la conjuntiva directamente. En ambos casos, el filtro se retirará posteriormente y las células adheridas se utilizarán para el aislamiento y cuantificación del ARN obtenido.

Todas las muestras serán recogidas bajo un código alfanumérico para asegurar la protección de sus datos personales.

El material recogido estará bajo la custodia del IOBA y del personal investigador del estudio. El material no será comercializado ni manipulado por personal no autorizado, y será sólo utilizado para los ensayos descritos más adelante.

La extracción del ARN se llevará a cabo mediante el uso de kits comerciales desarrollados para tal efecto. La cantidad de ARN extraído se cuantificará mediante el uso de técnicas espectrofotométricas.

El material recogido para este estudio será utilizado posiblemente en su totalidad, si bien en cumplimiento del Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, le informamos que en caso de tener resto sobrante de muestras a la finalización del proyecto, éste será conservado durante seis (6) meses después de finalizado el estudio, con el propósito de ser utilizado solo si hubiese que repetir alguno de los análisis.

Pasados seis (6) meses, se destruirá el material que no haya sido utilizado salvo que Ud. nos autorice a poder guardarlo para su uso posterior en estudios posteriores a este, pero de igual naturaleza, relacionados con la investigación en la línea de investigación de la Inflamación de la Superficie Ocular.

Si así nos autoriza esas muestras pasarán a formar parte de la Colección de muestras número 1417 denominada "Investigación en Ciencias de la Visión" dada de alta por el IOBA en el registro nacional de Biobancos. Esta autorización es totalmente voluntaria, y es independiente a su consentimiento de participación en este proyecto



IOBA Consentimiento Informado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA



concreto; su negativa al uso posterior de la muestra en otros proyectos no condicionará en absoluto su participación o no en el presente proyecto.

Riesgos que entraña el presente estudio

Usted será tratado siempre según las normas de Buena Práctica Clínica y la Declaración de Helsinki. El estudio no tiene como objetivo evaluar ni comparar la eficacia de ningún fármaco o tratamiento. En ningún momento se le administrará ninguna medicación o se le realizará prueba alguna que no pertenezca a la rutina médica mejor para su caso. No se trata pues, de un ensayo clínico, sino de un estudio de recogida de datos y muestras de manera sistematizada, que permitirá conocer e intentar solucionar mejor sus posibles problemas oculares.

No ha sido reportado ningún daño derivado de los procedimientos diagnósticos que se le van a realizar, sin embargo, todos los productos tienen el potencial de causar efectos secundarios en algunos individuos. Es posible que al día siguiente de la toma de la citología tenga una pequeña sensación de molestia en el ojo.

Confidencialidad y protección de los datos

La muestra se recogerá empleando un procedimiento de codificación. Sólo el investigador responsable y colaboradores directos podrán relacionar estos datos con Vd. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Según la Ley Orgánica 15/99, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD) y el Real Decreto, 1720/2007 por el que se aprueba el Reglamento de Desarrollo de la LOPD, le informamos que sus datos van a formar parte de un fichero automatizado y manual denominado Pacientes cuyo responsable es el IOBA (Fundación General de la Universidad de Valladolid). Sus datos serán tratados para la finalidad de prestarle la asistencia sanitaria necesaria, para realizar la gestión administrativa y también, para fines de investigación y docencia médica. Atendiendo al artículo 14.2 del R.D. 1720/2007, le informamos que si en el plazo de 30 días no manifiesta su oposición, entenderemos que consiente a que podamos notificarle información sobre nuestras actividades y servicios por vía electrónica o postal; usted podrá revocar este consentimiento en cualquier momento. Y podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición dirigiéndonos una solicitud con copia de su DNI a La Fundación General de la Universidad de Valladolid en Plaza de Santa Cruz, 5 bajo del 47002 de Valladolid o al mail protecciondatos@funge.uva.es.

Destino de la muestra

En cumplimiento del Real Decreto 1716/2011 de 18 de noviembre, la muestra será incluida en la colección de muestras biológicas indicada que el IOBA tiene dada de alta en el Registro Nacional de Biobancos:

1417 | Investigación en Ciencias de la Visión

y estará disponible para los investigadores involucrados en la línea de investigación:

Inflamación de la Superficie Ocular.



IOBA Consentimiento Informado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA



Podrá solicitar que se destruyan sus muestras dirigiéndonos una solicitud con copia de su DNI a La Fundación General de la Universidad de Valladolid en Plaza de Santa Cruz, 5 bajo del 47002 de Valladolid o al mail protecciondatos@funge.uva.es.

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 del 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 así como la eliminación de sus datos personales. También debe saber que puede ser excluido del programa si los responsables del estudio lo consideran oportuno.



IOBA Consentimiento Informado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA



Consentimiento informado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA".

Promotor del Estudio: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA),.
 Duración del estudio: 01-Enero 2014 hasta 31-Diciembre de 2014.
 Responsables del Estudio:

- Dra. Amalia Enriquez de Salamanca Aladro, (Investigador bioquímico; IP del estudio)
- Dr Alberto López-Miguel (Óptico-optometrista; IP del estudio)
- Dra Margarita Calonge (Médico Oftalmologo),
- Dra. Itziar Fernández (Bioestadístico)
- Silvia Gutiérrez Gutiérrez (Enfermera)
- Carmen García Vázquez (Técnico de laboratorio)

Tf. 983 18 4750; Fax 983-18 47 62

Centro: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Centro donde se realiza la recogida de muestra:

Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA),

Yo

Nombre y apellidos del paciente:

He hablado con,

Nombre y apellidos del facultativo:

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Además de lo anterior, autorizo a que la muestra sobrante caso de que la haya pueda ser incluida en la Colección de muestras nº 1417 (denominada "Investigación en Ciencias de la Visión" dada de alta por el IOBA en el registro nacional de Biobancos) y que sea utilizada en estudios posteriores de naturaleza similar dentro de la línea de investigación en Inflamación de la Superficie Ocular.

Paciente:	NHC:	Representante Legal del Paciente(1):
Nombre: _____		Nombre: _____
NIF: _____		NIF: _____
		En calidad de: _____
Firma _____		Firma _____
		(1) La representación legal deberá ser acreditada.
Facultativo		
Nombre: _____		
Nº de Colegiado: _____		
Centro recogida: _____		
Firma _____		

Copia para el Paciente



IOBA Consentimiento Informado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA



Consentimiento informado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA

Promotor del Estudio: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA),
Duración del estudio: 01-Enero 2014 hasta 31-Diciembre de 2014
Responsables del Estudio:

- Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro, (Investigador bioquímico; IP del estudio)
- Dr Alberto López-Miguel (Óptico-optometrista; IP del estudio)
- Dra Margarita Calonge (Médico Oftalmólogo),
- Dra. Itziar Fernández (Bioestadístico)
- Silvia Gutiérrez Gutiérrez (Enfermera)
- Carmen García Vázquez (Técnico de laboratorio)

Tf. 983 18 4750; Fax 983-18 47 62
Centro: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Centro donde se realiza la recogida de muestra:

Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA),

Yo

Nombre y apellidos del paciente:

He hablado con,

Nombre y apellidos del facultativo:

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.
- Además de lo anterior, autorizo a que la muestra sobrante caso de que la haya pueda ser incluida en la Colección de muestras nº 1417 (denominada "Investigación en Ciencias de la Visión" dada de alta por el IOBA en el registro nacional de Biobancos) y que sea utilizada en estudios posteriores de naturaleza similar dentro de la línea de investigación en Inflamación de la Superficie Ocular.

Paciente:		NHC:	Representante Legal del Paciente(1):	
Nombre:	_____		Nombre:	_____
NIF:	_____		NIF:	_____
Firma	_____		En calidad de:	_____
			Firma	_____
			(1) La representación legal deberá ser acreditada.	
Facultativo				
Nombre:	_____			
Nº de Colegiado:	_____			
Centro recogida:	_____			
Firma	_____			

Copia para el Centro



IOBA Consentimiento Informado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA



Consentimiento informado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DEL EYEPRIM FRENTE A LA CITOLOGÍA POR IMPRESIÓN CONJUNTIVAL CONVENCIONAL PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA HUMANA

Promotor del Estudio: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA),
 Duración del estudio: 01-Enero 2014 hasta 31-Diciembre de 2014
 Responsables del Estudio:

- Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Aladro, (Investigador bioquímico; IP del estudio)
- Dr Alberto López-Miguel (Óptico-optometrista; IP del estudio)
- Dra Margarita Calonge (Médico Oftalmólogo),
- Dra. Itziar Fernández (Bioestadístico)
- Silvia Gutiérrez Gutiérrez (Enfermera)
- Carmen García Vázquez (Técnico de laboratorio)

 Tf. 983 18 4750; Fax 983-18 47 62
 Centro: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Centro donde se realiza la recogida de muestra:

Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA),

Yo

Nombre y apellidos del paciente: _____

He hablado con,

Nombre y apellidos del facultativo: _____

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.
- Además de lo anterior, autorizo a que la muestra sobrante caso de que la haya pueda ser incluida en la Colección de muestras nº 1417 (denominada "Investigación en Ciencias de la Visión" dada de alta por el IOBA en el registro nacional de Biobancos) y que sea utilizada en estudios posteriores de naturaleza similar dentro de la línea de investigación en Inflamación de la Superficie Ocular.

Paciente:	NHC:	Representante Legal del Paciente(1):
Nombre: _____	Nombre: _____	Nombre: _____
NIF: _____	NIF: _____	NIF: _____
Firma _____	Firma _____	En calidad de: _____
		Firma _____
		(1) La representación legal deberá ser acreditada.
Facultativo		
Nombre: _____		
Nº de Colegiado: _____		
Centro recogida: _____		
Firma _____		

Copia para el Responsable del Estudio

- ANEXO III: Cuestionario OSDI

Ocular Surface Disease Index[®] (OSDI[®])²

Ask your patient the following 12 questions, and circle the number in the box that best represents each answer. Then, fill in boxes A, B, C, D, and E according to the instructions beside each.

HAVE YOU EXPERIENCED ANY OF THE FOLLOWING DURING THE LAST WEEK:

	All of the time	Most of the time	Half of the time	Some of the time	None of the time
1. Eyes that are sensitive to light?	4	3	2	1	0
2. Eyes that feel gritty?	4	3	2	1	0
3. Painful or sore eyes?	4	3	2	1	0
4. Blurred vision?	4	3	2	1	0
5. Poor vision?	4	3	2	1	0

Subtotal score for answers 1 to 5

HAVE PROBLEMS WITH YOUR EYES LIMITED YOU IN PERFORMING ANY OF THE FOLLOWING DURING THE LAST WEEK:

	All of the time	Most of the time	Half of the time	Some of the time	None of the time	
6. Reading?	4	3	2	1	0	N/A
7. Driving at night?	4	3	2	1	0	N/A
8. Working with a computer or bank machine (ATM)?	4	3	2	1	0	N/A
9. Watching TV?	4	3	2	1	0	N/A

Subtotal score for answers 6 to 9

HAVE YOUR EYES FELT UNCOMFORTABLE IN ANY OF THE FOLLOWING SITUATIONS DURING THE LAST WEEK:

	All of the time	Most of the time	Half of the time	Some of the time	None of the time	
10. Windy conditions?	4	3	2	1	0	N/A
11. Places or areas with low humidity (very dry)?	4	3	2	1	0	N/A
12. Areas that are air conditioned?	4	3	2	1	0	N/A

Subtotal score for answers 10 to 12

ADD SUBTOTALS A, B, AND C TO OBTAIN D
(D = SUM OF SCORES FOR ALL QUESTIONS ANSWERED)

TOTAL NUMBER OF QUESTIONS ANSWERED
(DO NOT INCLUDE QUESTIONS ANSWERED N/A)

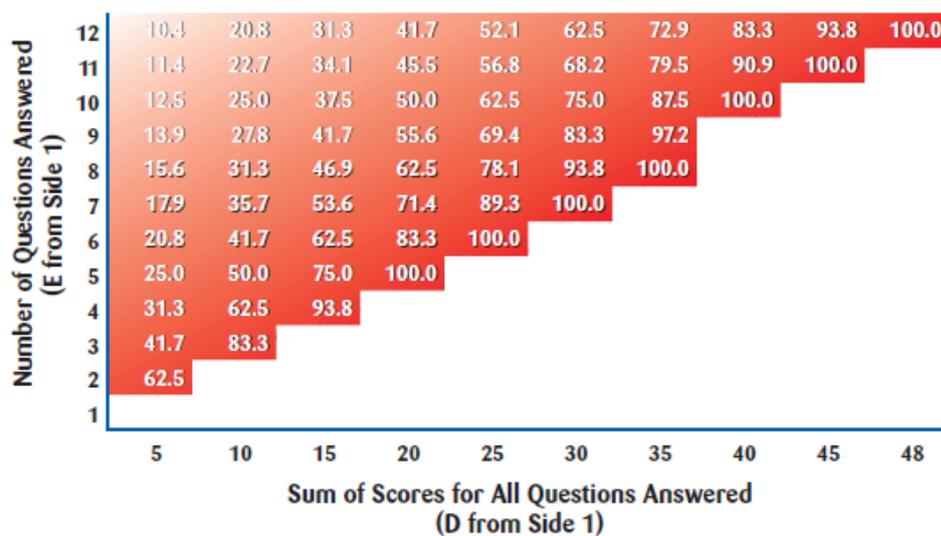
Please turn over the questionnaire to calculate the patient's final OSDI[®] score.

Evaluating the OSDI[®] Score¹

The OSDI[®] is assessed on a scale of 0 to 100, with higher scores representing greater disability. The index demonstrates sensitivity and specificity in distinguishing between normal subjects and patients with dry eye disease. The OSDI[®] is a valid and reliable instrument for measuring dry eye disease severity (normal, mild to moderate, and severe) and effect on vision-related function.

Assessing Your Patient's Dry Eye Disease^{1,2}

Use your answers **D** and **E** from Side 1 to compare the sum of scores for all questions answered (**D**) and the number of questions answered (**E**) with the chart below.* Find where your patient's score would fall. Match the corresponding shade of red to the key below to determine whether your patient's score indicates normal, mild, moderate, or severe dry eye disease.



Normal Mild Moderate Severe

*Values to determine dry eye disease severity calculated using the OSDI[®] formula:

$$OSDI^{\circ} = \frac{(\text{sum of scores}) \times 25}{(\# \text{ of questions answered})}$$

Patient's Name: _____ Date: _____

How long has the patient experienced dry eye? _____

Eye Care Professional's Comments: _____

Tear and place in patient's chart for follow-up care on next visit.

Reference: 1. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol.* 2000;118:615-621. 2. Data on file, Allergan, Inc.

ALLERGAN **INSPIRE**

©2004 Allergan, Inc., Irvine, CA 92612

Re-order: 4941843

- **ANEXO IV: ESCALA OXFORD PARA LA EVALUACIÓN DE TINCIÓN CORNEAL CON FLUORESCÉINA.**

- A  Grado 0: Tinción igual o menor a figura A.
- B  Grado 1: Tinción mayor a figura A y menor o igual que B.
- C  Grado 2: Tinción mayor a figura B y menor o igual que C.
- D  Grado 3: Tinción mayor a figura C y menor o igual que D.
- E  Grado 4: Tinción mayor a figura D y menor o igual que E.

- **ANEXO V: PROTOCOLO EXTRACCIÓN ARN.**

Extracción RNA

- Descongelar el tubo que tiene 1ml de RTL+10ul de B-mercaptoetanol + las citologías
 - Vortexear el tubo tiene 1ml de RTL+10ul de B-mercaptoetanol + las citologías
 - Pasar el lisado por una columna QIA shredder (**VIOLETA**), a un tubo de 2 ml.
 - Centrifugar 2 min a 13.000 rpm.
 - Tirar la parte superior y nos quedamos con el eluido.
 - Añadir tantos μ l de EtOH (70%) como antes de Buffer (en nuestro caso 1ml). Pipetear para mezclar, evitando la formación de burbujas. No centrifugar. Pasar rápidamente al siguiente paso.
 - Coger 350 μ l de muestra, incluyendo el precipitado, en una columna RNeasyMinElute spin column (**ROSA**).
 - Centrifugar a 8.000rpm 15 seg.
 - Desechar el eluido y reutilizar el mismo tubo recolector.
 - Recoger el resto de la muestra que queda en la columna anterior y repetir el proceso, pasándolo por la columna **ROSA** y centrifugando 15 seg a 10.000rpm.
 - Desechar el eluido y colocar el mismo tubo colector.
 - Añadir 350 μ l de RWI Buffer en la MinElute spin column **ROSA**.
 - Centrifugar a 8000rpm 1015 seg.
- Desechar el eluido
- Hacer un Mix con 10 μ l de DNase I stock solution y 70 μ l de RDD Buffer, por muestra. (lypophilizedDNase I in 550 μ l de RNase-free water)
 - Mezclar invirtiendo el tubo, NO CON EL VORTEX.
 - Añadir 80 μ l de este Mix en MinElute spin column **ROSA**.
 - Incubar 15 min a T.A.
 - Añadir 350 μ l de RWI Buffer en MinElute spin column **ROSA**.
 - Centrifugar 15 seg a 8.000rpm.
 - Desechar el eluido y transferir la columna **ROSA** a un tubo colector diferente.
 - Añadir 500 μ l de RPE Buffer sobre MinElute spin column **ROSA**.
 - Centrifugar 15 seg a 10.000rpm.
 - Tirar el eluido.

Sólo si hubiera más de 350 μ l de muestra.

X2

- Añadir 500µl de etanol al 80% y pasar por MinElute spin column ROSA
- Centrifugar 2 min a 8.000rpm.
- Colocar la columna ROSA en el mismo tubo colector y centrifugar a velocidad máxima durante 5 min, para secar la columna.
- Pasar la columna ROSA a un Eppendorf con la tapa cortada
- **.(REPETIR 2 VECES)**
- Añadir 14 µl de RNase free water sobre la membrana
- Centrifugar 1 min a 10.000rpm.
- Recoger el eluido y congelar a -80° hasta su utilización.

- **ANEXO VI: PROTOCOLO CUANTIFICACIÓN ARN.**

**QUANT-iT RNA HS ASSAY KITS (general)
(2-1000ng)****MATERIALES**

- Reagent
- Buffer
- Standard 1
- Standard 2
- Muestras

El ensayo debe hacerse a temperatura ambiente, y es estable durante 3 horas.

El volumen de muestra es aceptable entre 1 y 20 μl .

Mantener las muestras de RNA en hielo.

PROTOCOLO

1. Preparar los tubos necesarios para las muestras y los Standard (hay 2 Standard).
2. Marcar los tubos.
3. Hacer la solución de trabajo :**dilución 1:200** de Quant-iT RNA reagent , en QuantiT RNA buffer.
Usar un tubo limpio cada vez que se prepara la solución de trabajo.
Cada tubo Standard necesita 190 μl de Solución de trabajo.
Cada tubo de muestra necesita entre 180- 199 μl de solución de trabajo, dependiendo el volumen de muestra que vayamos a utilizar. Calcularlo para obtener un **volumen final de 200 μl** .
Preparar la solución de trabajo μl o en 1 Falcon calculando la cantidad necesaria para todos los tubos que necesitemos (unos 200 μl por tubo).
4. Poner **190 μl** de solución de trabajo en los 2 tubos de Estándar.
5. Añadir **10 μl** de Quan-iT Standard 1 y 2 a los tubos correspondientes, y vortex 2-3 sg.
6. En los tubos de las muestras poner entre **180-199 μl** de solución de trabajo dependiendo el volumen de muestra que queramos añadir.
7. Añadir la muestra, entre **1-20 μl** , obteniendo una solución final de 200 μl . Vortex 2-3 sg.

8. Incubar todos los tubos 2 min a T^a ambiente.
9. Encender el Qubit-fluorómetro (se enciende solo al enchufarlo).
10. Pulsar HOME y usar las flechas hasta que aparezca Quant-I RNA. Presionar GO para empezar.
11. En la pantalla elegir RUN NEW CALIBRATOR, o USE LAST CALIBRATION, y pulsar GO.
12. Si pulsas RUN NEW CALIBRATOR:
 - Insertar el tubo Standard 1, cerrar y presionar GO.
 - Insertar el tubo Standard 2, cerrar y presionar GO.
13. Insertar el tubo de muestra, cerrar y pulsar GO.
14. Apuntar la lectura que hace el fluorómetro.
15. Continuar leyendo todas las muestras.
16. Calcular la concentración real de las muestras multiplicando por el factor de dilución, usando la ecuación:

Concentración = valor del fluorómetro x volumen total/ volumen muestra

