



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

Interacción *in vitro* de lentes de contacto
usadas con células epiteliales de la córnea

Presentado por: Saray Ramos Palenzuela

Tutelado por: Dra. Yolanda Diebold Luque

Tipo de TFG: Investigación

En Valladolid a 25 de Mayo de 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad de Valladolid, por realizar la propuesta de trabajo fin de grado para el grado en Óptica y Optometría, y al coordinador de la asignatura, el Dr. Raúl Martín Herranz, encargado de organizar la adjudicación de los trabajos.

Desde el primer momento yo quise realizar un trabajo de investigación y por esa razón, acudí a la Dra. Yolanda Diebold Luque con el fin de que ella me lo tutelase. Tengo, por lo tanto, que agradecerle su disposición desde el principio a aceptar dirigirme en este camino; su dedicación a mí, siendo muchas horas las que hemos pasado reunidas en este tiempo; su ingenio para idear este TFG que tanto me ha gustado, con el que he disfrutado haciéndolo y sobre todo, con el que he aprendido y crecido no solo a nivel académico, sino también a nivel personal.

Al ser un trabajo de investigación necesitaba de un laboratorio y de material apropiado para poder llevarlo a cabo. Por este motivo quiero agradecer al IOBA y al Grupo de Superficie Ocular (GSO) el que me hayan permitido realizarlo en sus instalaciones.

Quiero dar las gracias especialmente a Antonio López García, técnico superior de anatomía patológica y citología del Grupo de Superficie Ocular del IOBA, que ha estado enseñándome todas las técnicas que he tenido que llevar a cabo, ocupando también parte de su tiempo; y, además, a todos los componentes del Grupo de Superficie Ocular del IOBA, porque pese a que no tenían por qué, siempre que he tenido alguna duda respecto a algo cualquiera de ellos ha estado dispuesto a ayudarme, independientemente de que estuviesen implicados en el proyecto o no.

Quiero dar las gracias también a Multiópticas (Cerrada 6, Valladolid) y a la optometrista encargada de tutelar mis prácticas en empresa, Cristina Gómez Rosa, por haber cedido de manera desinteresada las lentes de contacto usadas como control en este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que, desinteresadamente, han hecho posible este estudio donándome sus lentes de contacto.

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	1
1.Introducción	2
2.Justificación	3
3.Hipótesis	3
4.Objetivos	3
5.Material y Métodos	4
5.1 Reactivos y Materiales	4
5.2 Equipos yLaboratorios	4
5.3 Lentes de contacto donadas	4
5.4 Lentes de contacto control	5
5.5 Células del epitelio corneal	5
5.6 Tinción con azul de Coomasie	6
5.7 Medida de la viabilidad celular mediante el método del XTT	7
5.8 Cuantificación de las interleucinas en el medio de cultivo mediante ELISA	8
6.Resultados	10
6.1 Datos demográficos	10
6.2 Tinción con azul de Coomasie de las LCH	10
6.3 Medida de la viabilidad celular tras la exposición a la LCH	11
6.4 Cuantificación de los niveles de IL-6 y de IL-8 producidos por las células HCE tras su exposición a la LCH	12
6.4.1 Producción de IL-6	12
6.4.2 Producción de IL-8	14
7.Discusión	17
8.Conclusiones	19
9.Bibliografía	20

ANEXOS

ANEXO I: Autorización de la Comisión de Investigación del IOBA

ANEXO II: Autorización del Comité Ético de Investigación Clínica

ANEXO III: Modelo de Consentimiento Informado

RESUMEN

La interleuquina 6 (IL-6) y la IL-8 son moléculas involucradas en los procesos inflamatorios. Una lente de contacto hidrofílica (LCH) es un cuerpo extraño para la superficie ocular y se sabe que en usuarios de LCH se produce un aumento de la producción basal de estas citoquinas.

En este trabajo se expusieron células de epitelio de córnea humano de la línea HCE a LCH usadas durante 24 y 48 horas y se midió si se producía un aumento de la producción de IL-6 y de la IL-8. También se valoró si ese aumento estaba relacionado con un uso mayor del tiempo recomendado (un mes). Además, se tiñeron las LCH donantes con el colorante azul de Coomassie con el fin de estudiar los depósitos de éstas. También se midió la viabilidad de la línea celular HCE tras haber sido expuestas a las LCH donantes.

Se determinó que la línea celular HCE incrementa la producción de IL-6 y de IL-8 tras la exposición a una LCH donante; que los depósitos proteicos en las LCH aumentan con el tiempo de uso; y que la el porcentaje de viabilidad celular no varía tras la exposición a una LCH donante. Sin embargo, este aumento en los niveles de IL-6 y de IL-8 no parece estar relacionado con un uso de las LCH mayor del recomendado.

PALABRAS CLAVE

IL-6; IL-8; lente de contacto hidrofílica; células de epitelio de córnea humana; línea HCE.

SUMMARY

Interleukin 6 (IL-6) and IL-8 are molecules involved in inflammatory processes. A hydrophilic contact lens (HCL) is a foreign body for the ocular surface, and it is known that in contact lens wearers an increased IL-6 and IL-8 production occurs.

Epithelial cells of the human corneal line HCE were exposed to used LCH for 24h and 48 hours. Then, IL-6 and IL-8 production was measured.

Furthermore, donor LCH were stained with Coomassie blue dye in order to study protein deposits, and the viability of HCE cell line was measured after being exposed to donor LCH.

It was determined that the cell line HCE increases the production of IL-6 and IL-8 upon exposure to a donor LCH; that the protein deposits in the LCH increase with time of use, and that the percentage of cell viability remains unchanged after exposure to an LCH donor. However, the increase in IL-6 and IL-8 production is not related to LCH use longer than recommended.

KEY WORDS

IL-6; IL-8; hydrophilic contact lens; corneal epithelial cells; HCE cell line.

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación de la superficie ocular está mediada por diferentes moléculas inflamatorias como son las citoquinas y las quimioquinas. Ciertas citoquinas pueden ser usadas como marcadores de inflamación. La interleuquina 6 (IL-6) y la IL-8 son ejemplos de ese tipo de moléculas. Son citoquinas involucradas en los procesos inflamatorios oculares que se sabe tienen niveles de expresión alterados en diversas enfermedades de la superficie ocular.

Son varios los problemas inflamatorios que pueden ser causados por las lentes de contacto (LC) y además, el aumento en los últimos años del número de usuarios de LC hace que esos problemas se estén incrementando.

Las LC son “cuerpos extraños” para el ojo y, por lo tanto, deben seguirse una serie de precauciones o de pautas en su uso. Distintas pruebas con LC han demostrado que existen ciertas combinaciones que predisponen a sufrir determinadas alteraciones en la superficie ocular. Un uso por encima del tiempo límite recomendado o una mala limpieza de las mismas son algunos de esos ejemplos.

Las LC hidrofílicas (LCH) de uso mensual, como su nombre indica, tienen un tiempo de porte recomendado de un mes, y es por ello que el usuario no debería extender su uso por encima de este tiempo. Se conoce desde hace un tiempo que en la lágrima de usuarios de LC están presentes diversas moléculas inflamatorias, como la IL-6 [1] o la IL-8 [2]. Recientemente se ha publicado que determinadas LC de hidrogel de silicona de uso diario inducen un aumento en los niveles de IL-6 al cabo de dos semanas de uso [3]. Sin embargo, en la búsqueda bibliográfica realizada para preparar este trabajo no se han encontrado publicaciones que pongan de manifiesto una relación directa entre un uso prolongado de una LCH y la mayor producción de citoquinas inflamatorias, como la IL-6 o la IL-8.

Teniendo en cuenta lo anterior y el riesgo conocido que supone el porte de LC para padecer Síndrome de Ojo Seco [4] una de las principales enfermedades inflamatorias de la superficie ocular, este trabajo propone estudiar *in vitro* el efecto de LCH que han sido usadas por un tiempo prolongado en cuanto a la estimulación de la producción de IL-6 y de IL-8 por parte de las células epiteliales de la córnea.

2. JUSTIFICACIÓN

Es conocido que en usuarios de LC se produce un aumento de IL-6 y de IL-8, y que tras el cese del uso de las mismas, el nivel de estas moléculas inflamatorias disminuye tras diez días, volviendo a los niveles normales.

Se han publicado estudios [5 y 6] en los que se usa como modelo de estudio una línea celular humana de epitelio de córnea a la que le coloca una LC *in vitro*. Además, el grupo de Superficie Ocular del IOBA (GSO) tiene cierta experiencia con ese modelo de estudio *in vitro* al haber realizado un trabajo fin de Máster usándolo [7].

Lo que se pretende estudiar en este trabajo es si el uso de LCH durante al menos un mes aumenta la producción de IL-6 y/o de IL-8 por parte del epitelio de la córnea, y si tras usar las LCH más tiempo del recomendado, se produce un mayor incremento en la producción de estas moléculas. Si eso ocurriese, podría ser recomendable un asesoramiento y seguimiento de los usuarios en esas circunstancias.

3. HIPÓTESIS

Para este trabajo se han planteado dos hipótesis:

1. Es posible comprobar *in vitro* si la exposición a una LCH usada por un donante al menos un mes aumenta la producción basal de las citoquinas IL-6 e IL-8 en las células epiteliales de la córnea.
2. La producción basal *in vitro* de las citoquinas IL-6 e IL-8 en las células epiteliales de la córnea aumenta de forma directa con el tiempo de uso que tengan las LCH.

4. OBJETIVOS

Para desarrollar este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

1. Identificar posibles depósitos proteicos en LCH usadas durante al menos un mes mediante tinción con azul de Coomassie.
2. Valorar si la exposición de una línea celular de epitelio de córnea humano a LCH usadas durante al menos un mes induce cambios en la viabilidad celular.
3. Determinar si la exposición de una línea celular de epitelio de córnea humano a LCH usadas durante al menos un mes induce cambios en la producción de IL-6 y de IL-8 y si esos cambios son mayores cuando el tiempo de uso de la LCH está por encima del recomendado.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 REACTIVOS Y MATERIALES

- Medio de cultivo DMEM/F12 con GlutaMAX®
- Tampón fosfato salino (PBS)
- Medio sin rojo fenol RPMI 1640
- Suero fetal bovino (FBS)
- Tripsina
- Colorante azul Tripán al 0,4%
- Reactivo XTT®
- Cloruro de benzalconio (BAC)
- Colorante azul Coomassie
- Kits de ELISA para cuantificar IL-6 e IL-8
- Pinzas estériles de plástico con punta roma
- Placas de poliestireno para cultivo celular de 12, de 24 y de 96 pocillos
- Botes de plástico esterilizados en autoclave

5.2 EQUIPOS Y LABORATORIOS

Para el cultivo de las células y la realización de los experimentos con ellas se usaron una cabina de flujo laminar de seguridad tipo II, Gelaire BSB 4A de ICN Biomedicals, FlowLaboratories (Sidney, Australia) y un incubador de CO₂Touch 190S de LEEC (Nottingham, Reino Unido).

Para realizar el seguimiento de las células y fotografiarlas se usó el microscopio invertido (Nikon Eclipse TS 100, Tokio, Japón) ubicado en el laboratorio de cultivos celulares del IOBA.

La realización de las tinciones de las LCH y los ELISA se efectuó en el laboratorio del GSO del IOBA.

El multilector de placas empleado para la lectura de los ELISA y de los XTT fue el SpectraMax® M5 de Molecular Devices Corporation (CA, Estados Unidos), que usa el software SoftMaxPro.

5.3 LENTES DE CONTACTO DONADAS

Antes del inicio del estudio se presentó el proyecto y el consentimiento informado a la Comisión de Investigación del IOBA (Anexo I) y al Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Anexo II) para su correspondiente revisión y autorización. Las LCH usadas en este estudio se obtuvieron de donantes que iban a desecharlas, por haber pasado su mes de uso, y que habían firmado, previamente, un consentimiento informado (Anexo III).

Los criterios de inclusión en este estudio fueron:

- Usuarios habituales de LCH jóvenes (menores de 30 años) asintomáticos en el momento de la recogida
- Usuarios de LCH mensuales

Se excluyeron del estudio usuarios de LCH mayores de 30 años, usuarios de LCH que no fueran mensuales, de materiales distintos a los seleccionados, y usuarios que, aún cumpliendo los criterios de inclusión, refiriesen no prestar atención al correcto mantenimiento y limpieza de las LCH.

Las LCH usadas que se recogieron fueron de los tipos de hidrogeles de silicona de última generación disponibles actualmente, de uso mensual y que más se comercializan en nuestro entorno: Comfilcon A y Enfilcon D.

A los donantes se les entregaron dos botes de plástico, previamente esterilizados (procedimiento realizado en el IOBA) y marcados, cada uno de ellos respectivamente con: OD (ojo derecho) y OI (ojo izquierdo). Se les explicó a todos ellos que en el momento de retirada de sus LCH por fin de uso de las mismas (momento que sería el que habitualmente estuviesen acostumbrados a realizar) llenarían los botes que se les había entregado hasta algo menos de la mitad con la solución única o de mantenimiento que acostumbrasen a usar e introducirían sus LCH directamente en ellos. Tras ello, tendrían que avisarnos para la recogida de los botes. En el momento de la recogida, los donantes nos comunicaban el tiempo exacto de uso de sus LCH.

De cada donante se recogieron los siguientes datos:

- Género
- Edad
- Material y marca comercial de las LCH
- Marca del líquido de mantenimiento LCH
- Graduación
- Día de inicio de uso de la pareja de LCH
- Día de finalización de uso de la pareja de LCH
- Problemas sufridos con esas lentes o con lentes anteriores
- Información sobre cómo limpia sus LCH

5.4 LENTES DE CONTACTO CONTROL

Se usaron como LCH control (LCC) lentes de Comfilcon A sin estrenar. La elección de este material en concreto vino determinada porque era el material que más se repetía entre los usados por los pacientes.

Las potencias de las LCH usadas como controles fueron desde -1,00 hasta -3,25 dioptrías. Todas ellas tenían un radio base de 8,60 mm y un diámetro total de 14,00 mm.

Antes de colocar las LCH en contacto directo con la línea celular usada en el estudio se sumergieron durante 5 minutos en medio de cultivo, debido a que las LCH vienen inmersas en una solución salina que podría afectar a las células.

5.5 CÉLULAS DEL EPITELIO CORNEAL

Se utilizaron células de epitelio corneal humano (línea HCE). Se cultivaron en medio de cultivo DMEM/F-12 con GlutaMAX®, suplementado con 15% de FBS, 10ng/mL de EGF, 4 mg/mL de insulina, una mezcla de penicilina

(100 U/mL) – estreptomina (0,1 mg/mL) y 0,5 µg/mL de antibiótico antimicoplasma. Las células se incubaron a 37°C y con un 5% CO₂.

Para disponer de suficiente cantidad de células para realizar las pruebas las células se subcultivaron a través de una solución de tripsina al 0,25%, se contaron y se midió su viabilidad en una cámara de Neubauer, para lo que se empleó azul Tripán al 0,4%. Sólo fueron sembradas en la concentración adecuada en placas de poliestireno de 24 pocillos aquellas que superaron el 80% de viabilidad inicial. Se trabajó con células entre los pases 48 y 55.

Para tener un grado de confluencia de la monocapa celular de en torno al 80% (Figura 1) se sembraron entre 80.000 y 100.000 células por pocillo para hacer los experimentos a las 24 horas o a las 48 horas de contacto de las LCH con las células.

Tras llegar al grado de confluencia celular idóneo por pocillo, se dispusieron las LCH ya usadas sobre esos cultivos. Se colocó la cara cóncava sobre el cultivo, simulándose así la colocación real de la LCH en el ojo (Figura 2), ya que en el ojo humano la LCH no está directamente en contacto con la córnea, sino que se forma un menisco lagrimal entre ambos.

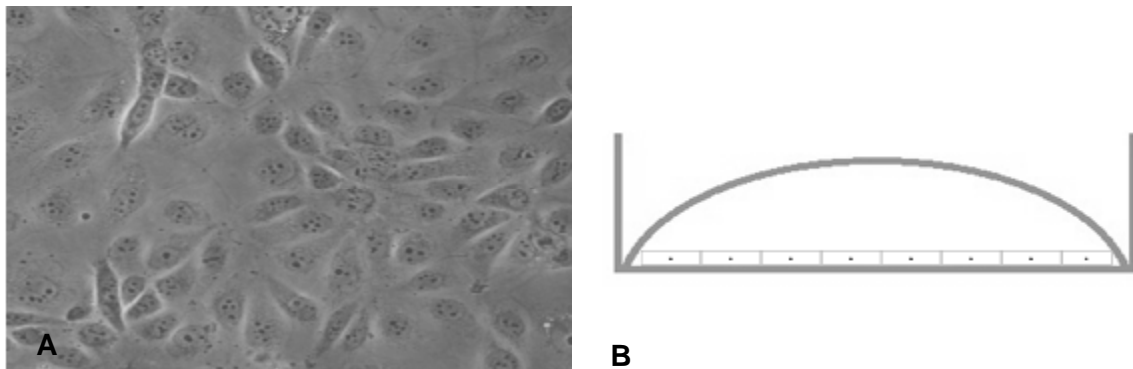


Figura 1: Microfotografía de contraste de fases de una monocapa de células HCE a 40X (A). Esquema representativo de cómo se colocaron las LCH sobre las células de la línea HCE (B).

Se analizó el efecto de las LCH del mismo donante a dos tiempos distintos de contacto con las células corneales y colocadas de dos formas diferentes:

- Ojo izquierdo (OI) a las 24 horas y en posición cóncava y derecha (como el paciente la colocaría en su ojo)
- Ojo derecho (OD) a las 48 horas y en posición cóncava pero del revés (volteada), es decir, con la cara que estuvo en contacto con el epitelio corneal del paciente hacia arriba

5.6 TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

El azul de Coomassie es un colorante usado sobre todo para la tinción de geles en los que se ha realizado una electroforesis con el fin de estimar la concentración de proteínas que hay en ellos.

Se llevó a cabo la tinción de las LCH con azul de Coomassie [8] para identificar los posibles depósitos presentes en las LCH tras la exposición de las

mismas a las células a dos tiempos, 24 y 48 horas. El propósito de realizar esta tinción fue intentar correlacionar si aquellas LCH donde se identifican más depósitos proteicos inducían un mayor aumento de la producción de IL-6 e IL-8 en las células del epitelio de la córnea.

Para llevar a cabo la tinción se siguió el siguiente procedimiento:

1. Se retiraron las LCH de la placa de 24 pocillos donde se encontraban en contacto con las células de epitelio corneal humano y se colocaron en una placa de 12 pocillos (una por pocillo) inmersas en medio de cultivo para que no se deshidratasen.
2. Se lavaron las LCH con agua destilada y se añadió azul de Coomassie, previamente filtrado, hasta que quedasen cubiertas. Se mantuvo esta condición durante 5 minutos.
3. Se retiró el colorante y se realizaron tres lavados con agua destilada para que las LCH quedasen limpias del mismo.
4. Tras esos lavados, se mantuvieron las LCH en los pocillos con agua destilada para evitar su deshidratación hasta el momento de realizar las fotos.
5. Se realizaron fotografías de las LCH teñidas macroscópicas y microscópicas (llevadas a cabo en el microscopio invertido localizado en el laboratorio de cultivos celulares del IOBA).

5.7 MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR CON EL MÉTODO DEL XTT

Se trata de un ensayo colorimétrico que sirve para la cuantificación no radiactiva de la proliferación celular, la viabilidad y la citotoxicidad. Se llevó a cabo este análisis en todas las placas donde se realizaron experimentos; en ellas se tuvieron en cuenta:

Controles negativos: pocillos solo con células en los que no había habido exposición a LCH y a los que no se les añadió nada más que el reactivo del XTT al 0,001%.

Controles positivos: pocillos solo con células en los que no había habido exposición a LCH y a los que se les añadió cloruro de benzalconio al 0,001% con el fin de provocar la muerte de las mismas.

Muestras a estudiar: pocillos con las siguientes situaciones experimentales:

- Lentes de contacto controles (LCC) (sin usar) a 24 horas
- LCH usadas a 24 horas
- LCC a 48 horas
- LCH usadas a 48 horas

El procedimiento que se siguió para realizar este ensayo fue el siguiente:

1. Una vez retiradas las LCH y ya recogido el sobrenadante correspondiente tanto de 24 como de 48 horas se añadió en los pocillos medio de cultivo fresco.
2. Tras eso, se realizaron lavados de todos los pocillos solo con medio puro sin rojo fenol, ya que éste puede dar falsos resultados interviniendo en la lectura en el espectrofotómetro.
3. A continuación se añadió cloruro de benzalconio al 0,001% en aquellos pocillos que fueron usados como controles positivos; se mantuvo unos segundos y se retiró.
4. Posteriormente, se añadió el reactivo XTT al 20% (en este caso se preparó un vial con 5 ml de PBS y 1 ml de XTT). Se añadieron 400 µl por pocillo de esa mezcla.
5. Se envolvió la placa en papel de aluminio y se mantuvo aproximadamente 24 horas en el incubador de CO₂.
6. Tras ese tiempo se hizo a la lectura de la placa en el espectrofotómetro primero a 620 nm y después a 450 nm (Figura 2 A).

5.8 CUANTIFICACIÓN DE LAS INTERLEUCINAS EN EL MEDIO DE CULTIVO MEDIANTE ELISA

El ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con un enzima e insolubilizado sobre un soporte de tal forma que la reacción puede revelarse fácilmente. Para ello es necesario añadir un substrato específico que, al actuar la enzima, produce un color, bien observable a simple vista, o bien cuantificable con un espectrofotómetro.

Se llevó a cabo la técnica ELISA con kits comerciales con el fin de cuantificar la producción de la IL-6 y de la IL-8 por parte de las células HCE expuestas a LCH. Se pretendía valorar si la exposición a LCH usadas durante al menos un mes incrementaba la producción natural de estas citoquinas en las células.

El procedimiento que se siguió fue el indicado por el fabricante de cada kit de ELISA. También, se usó como método de análisis cuantitativo una curva patrón usando diluciones seriadas de IL-6 o de IL-8, de concentración conocida, que venía incluido en el kit; de esta forma, se normalizaron los valores obtenidos con los valores de los controles (Figura 2 B).

La lectura de la cantidad de cada citoquina presente en todas las condiciones experimentales se realizó usando un multilector de placas en modo absorbancia con software específico.

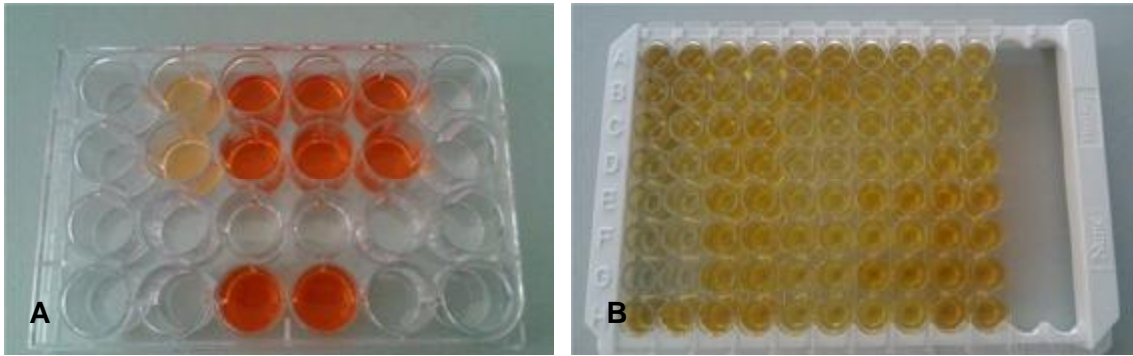


Figura 2: Se pueden observar las diferencias de color según la viabilidad celular en cada pocillo medida por el XTT (A). Las diferencias de color según la concentración de IL-6 en los pocillos medida por ELISA (B).

6. RESULTADOS

6.1 DATOS DEMOGRÁFICOS

En la siguiente tabla se recogen los datos obtenidos de los donantes en el momento en que hacían entrega de sus LCH.

Tabla 1: Tabla representativa de los datos recogidos de cada LCH donada.

Donante	Edad	Género	Tipo LCH	Marca LCH	Graduación		Líquido Mantenimiento	Tiempo Uso (días)
					OI	OD		
1	26	Mujer	COMFILCON A	Multilens,MO	-2,75	-3,00	HIDROHEALTH DISOP	58
2	25	Mujer	COMFILCON A	Vista Soft-Lens Bio, Opticalia	-5,75	-5,50	MULTIGOP PLUS SOLU ÚNICA	45
3	24	Mujer	COMFILCON A	Free Lens High oxygen, General Óptica	-3,00	-3,00	MULTIGOP PLUS SOLU ÚNICA	35
4	22	Mujer	ENFILCON A	Modelo Horizon Tonic, Westcon	-5,50 (-2,25)170	-6,50 (-1,25)180	BIOTURE B&L	27
5	21	Hombre	COMFILCON A	Hydrolens silicone toric, CooperVision	-7,5 (-0,75)180	-7,5 (-0,75)160	OPTI FREE PURE MOIST	44
6	22	Mujer	COMFILCON A	Dublan, Dublan	-5,5	-5,75	DUBLAN	33
7	20	Mujer	COMFILCON A	Lens Farma Gel, Farmaoptics	-4,75	-4,75	FARMAOPTICS	62
8	21	Hombre	COMFILCON A	Biofinity, CooperVision	-1,75	-1,75	VERALENT	41
PROMEDIO	22,625 ± 2	6 Mujeres 2 Hombres	-----		-----	-----	-----	43,125 ± 12

6.2 TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE DE LAS LCH

Esta tinción identifica los depósitos proteicos de las LCH. Se observó que las LCC sin usar no se teñían (Figura 3 A y B). En las LCH donadas, aunque los depósitos no fueron iguales en todos los casos, si que se identificaron tanto a las 24 como a las 48 horas (Figura 3 C y D).

Se dio el caso de que en las LCH del donante 7 los hallazgos fueron distintos. Tanto a las 24 como a las 48 horas se identificaron abundantes depósitos teñidos (Figura 4 A), más que en cualquiera de los otros donantes. De este donante en concreto se pudo recoger una segunda pareja de LCH un mes más tarde, y en ese segundo análisis esos primeros hallazgos ya no aparecían (Figura 4 B).

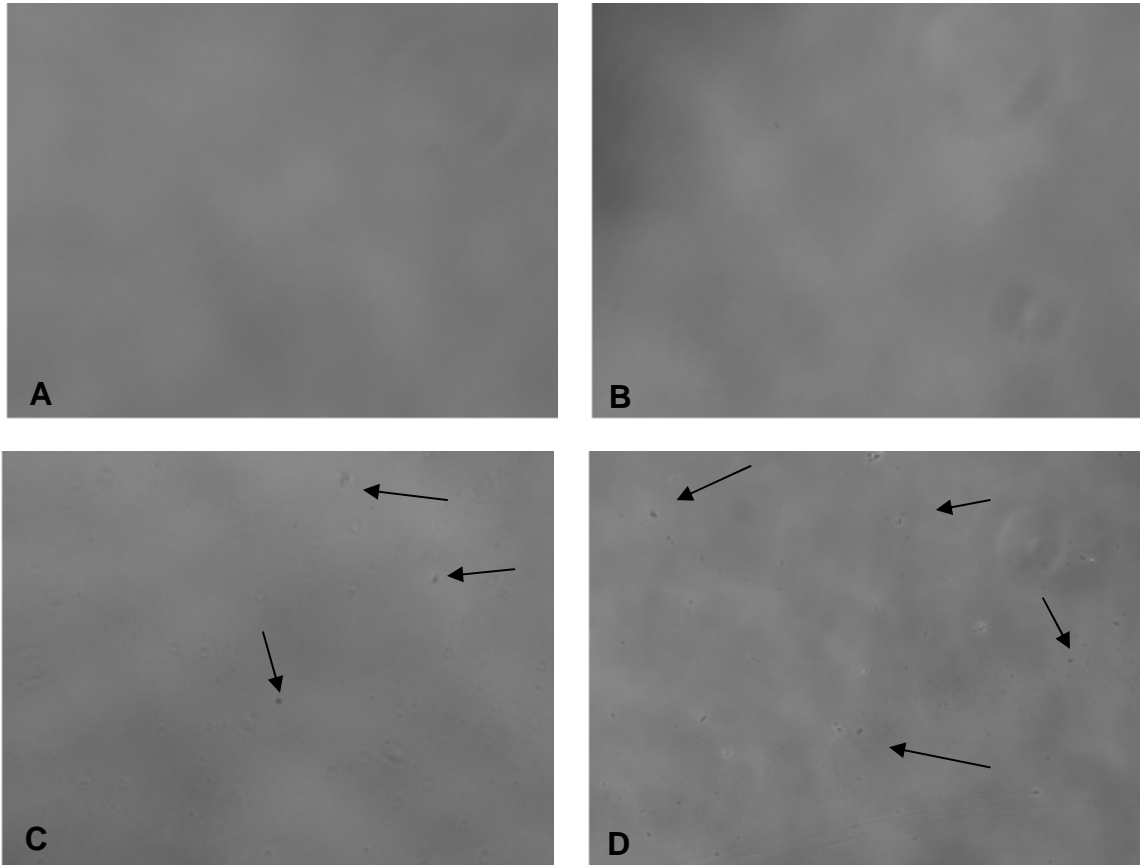


Figura 3: Microfotografías representativas de LCC sin usar teñidas con azul Coomassie a las 24h (A) y a las 48h (B), y de LCH usadas teñidas con azul Coomassie a las 24h (C) y a las 48h (D).

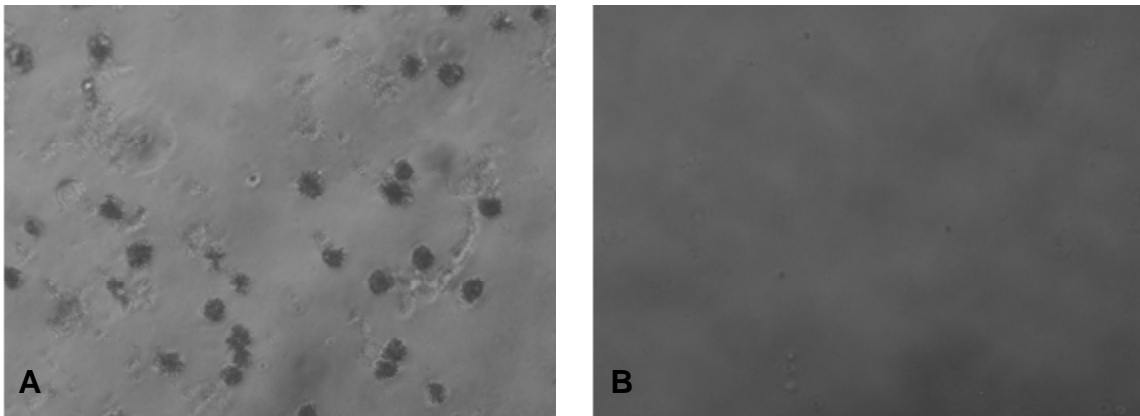


Figura 4: Microfotografías representativas del donante 7 LCH OI 24h (A) y 7 LCH OD 48h (B).

6.3 MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR TRAS LA EXPOSICIÓN A LAS LCH

En la Figura 5 se representan los porcentajes de viabilidad celular obtenidos tras la exposición de las células HCE a LCH donante 24 y 48 horas junto con sus respectivos controles.

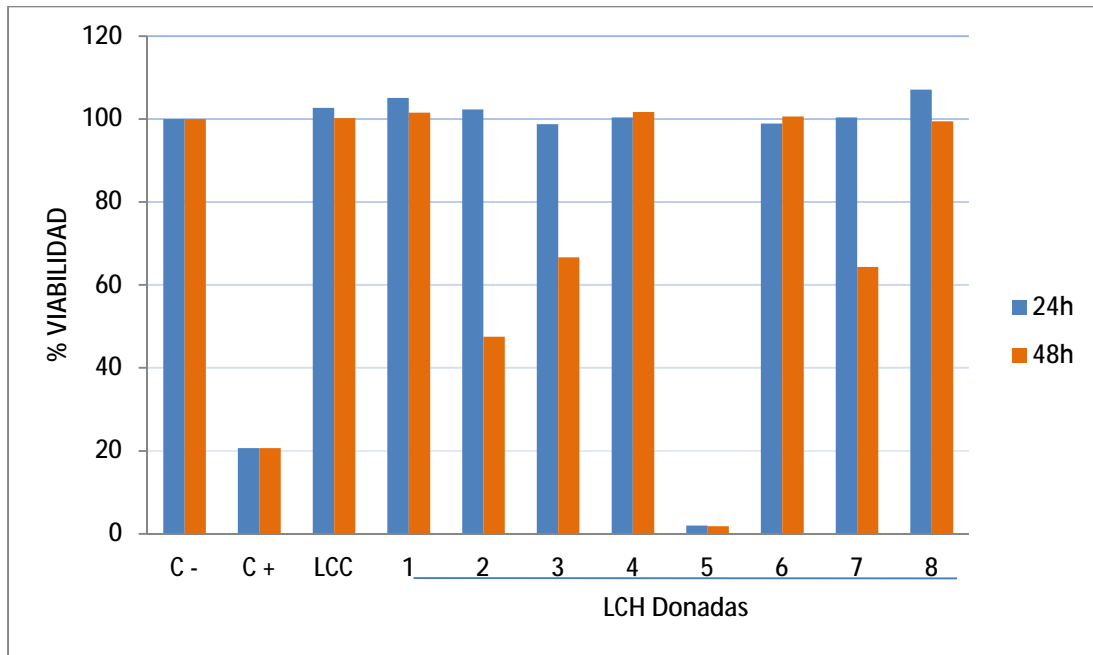


Figura 5: Porcentajes de viabilidad celular tras 24 y 48 horas de exposición a las LCH.

Como era de esperar, las células HCE expuestas a cloruro de benzalconio (Control +) tuvieron una viabilidad muy baja, inferior al 25%, tanto a las 24 como a las 48 horas.

La exposición de las células a las LCH durante 24 horas no produjo ninguna alteración en la viabilidad, que se mantuvo en el 100%. (Figura 5) Destacan como excepción las células expuestas a la LCH del donante 5, cuya viabilidad fue inferior al cabo de 24 horas (1%) incluso a la del control positivo.

A las 48 horas de exposición a las LCH, las células HCE redujeron su viabilidad en el caso de los donantes 2, 3, 5 y 7, que fue del 47%, 66%, 2% y 64%, respectivamente. El resto se mantuvieron en el 100% de viabilidad.

6.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6 Y DE IL-8 PRODUCIDOS POR LAS CÉLULAS HCE TRAS SU EXPOSICIÓN A LCH

6.4.1 PRODUCCIÓN DE IL-6

La Figura 6 muestra las concentraciones de IL-6 en pg/mL de los sobrenadantes a las 24 horas con las LCH donadas y control en posición normal, y a las 48 horas con las LCH donadas y control volteadas.

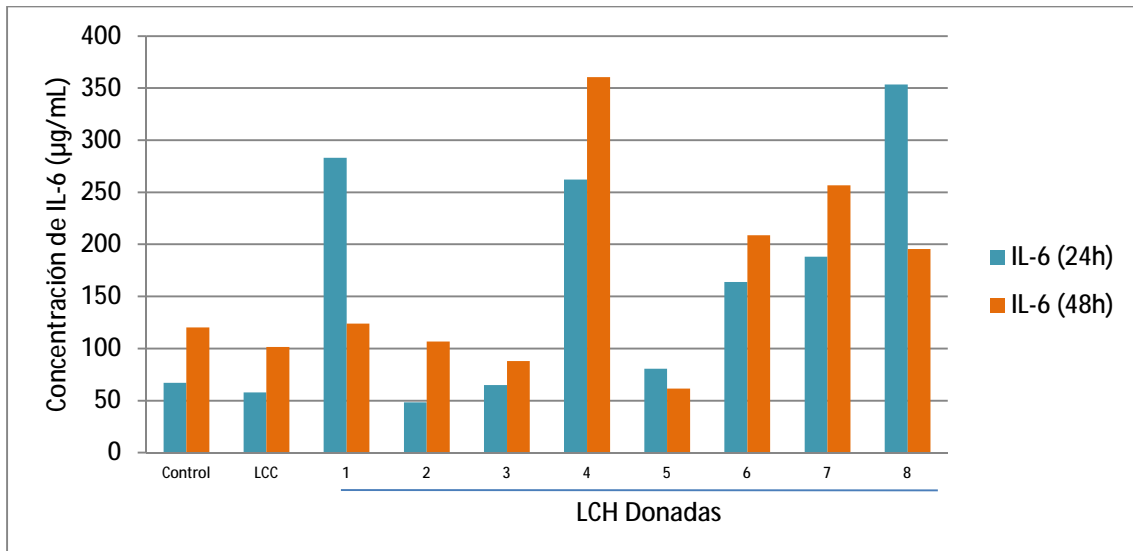


Figura 6: Gráfica comparativa de concentraciones de IL-6 en los controles y LCH OI donantes en posición normal 24h frente a controles y LCH OD donantes volteadas a 48h.

Las células HCE control, no expuestas a LCH, produjeron de manera basal IL-6 en cantidades de aproximadamente 67 pg/mL a las 24 horas y de 121 pg/mL a las 48 horas.

La exposición a las LCC no indujo aumento en la producción de IL-6. Las LCH de 6 de los 8 donantes (donantes 1, 4, 5, 6, 7 y 8) produjeron un aumento de la producción de IL-6 tras 24 horas de exposición, especialmente llamativo en el caso de los donantes 1, 4 y 8.

A las 48 horas, en los sobrenadantes de los cultivos control se midió más IL-6 que a las 24 horas. Sin embargo, sólo los sobrenadantes de las células expuestas a las LCH de los donantes 2, 3, 4, 6 y 7 tenían más cantidad de IL-6 que a las 24 horas. En el resto de donantes (1, 5 y 8) se midió menos IL-6 que a las 24 horas.

La Figura 7 recoge las concentraciones de IL-6 en cada caso, ordenada en orden decreciente de izquierda a derecha desde el donante con más días de uso de sus LCH hasta el de menos.

Se observa que en el caso de los donantes 7 y 1, que son los que más días usaron sus LCH (62 y 58 días, respectivamente) se produce un aumento destacado de la producción de IL-6 respecto al control, que fue de 66,96 pg/mL a las 24 horas y de 120,096 pg/mL a las 48 horas.

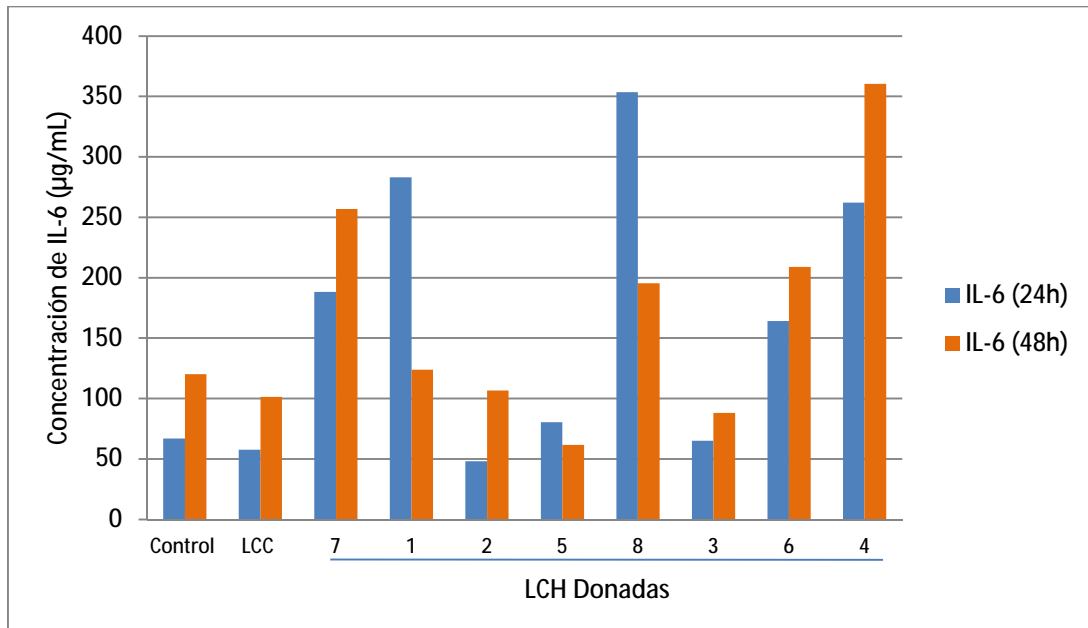


Figura 7: Gráfica que recoge los porcentajes de IL-6 obtenidos en cada LCH donante en función de más tiempo de uso a menos.

En las LCH de los siguientes donantes por tiempo de uso, sin embargo, se observa un descenso de la producción de IL-6 con respecto al control (donantes 2 y 5), mientras que en las LCH de los donantes siguientes se observa de nuevo un incremento de la producción de IL-6 en el donante 8, seguido de una disminución en el donante 3, y de nuevo un aumento en los donantes 6 y 4 (Figura 7).

6.4.2 PRODUCCIÓN DE IL-8

La Figura 8 muestra las concentraciones de IL-8 que se obtuvieron en los sobrenadantes recogidos a las 24 horas con las LCH donadas y control en posición normal, y a las 48 horas con las LCH donadas y control volteadas.

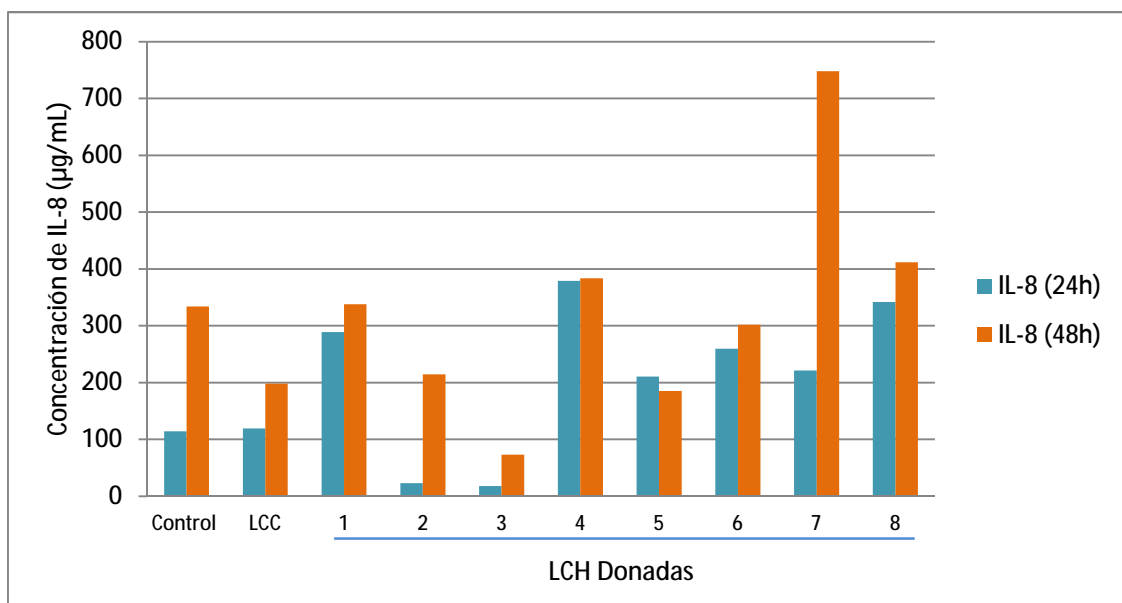


Figura 8: Gráfica comparativa de concentraciones de IL-8 en los controles y LCH OI donadas posición normal a 24h frente a controles y LCH OD donadas volteadas a 48h.

Las células HCE control, no expuestas a LCH, produjeron de manera basal IL-8 en cantidades de aproximadamente 114 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas y de 334 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 horas.

La exposición a las LCC no indujo aumento en la producción de IL-8. Las LCH de 6 de los 8 donantes (donantes 1, 4, 5, 6, 7 y 8) produjeron un aumento de la producción de IL-8 tras 24 horas, que, de nuevo, fue especialmente llamativo en los donantes 1, 4 y 8.

A las 48 horas, en los sobrenadantes de los cultivos control se midió más IL-8 que a las 24 horas. Todos los sobrenadantes de las células expuestas a las LCH de los donantes tenían más cantidad de IL-8 que a las 24 horas, a excepción del sobrenadante del donante 5, donde la concentración de IL-8 fue inferior a las 48 horas que a las 24 horas. Sin embargo, en comparación con el control, el incremento en la concentración de IL-8 más llamativo fue el inducido por la exposición a la LCH del donante 7 que fue de casi cuatro veces más.

La Figura 9 recoge las concentraciones de IL-8 en cada caso, ordenada en orden decreciente de izquierda a derecha desde el donante con más días de uso de sus LCH hasta el de menos.

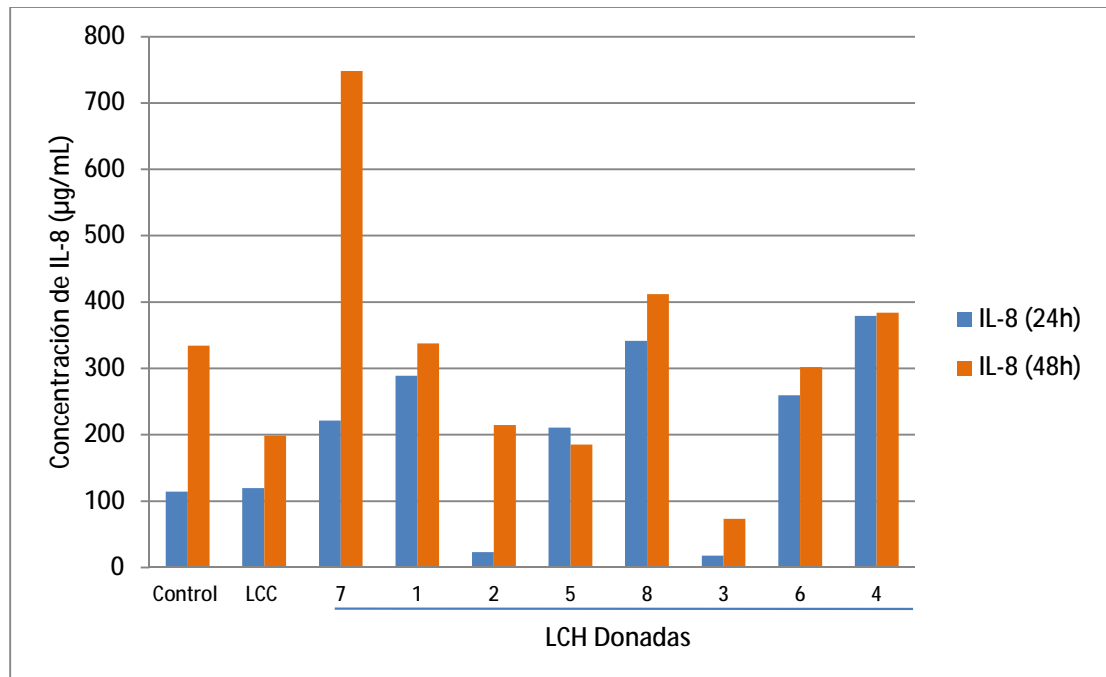


Figura 9: Gráfica que recoge los porcentajes de IL-8 obtenidos en cada LCH donante en función de más tiempo de uso a menos.

Se observa que en el caso de los donantes 7 y 1, que son los que más días usaron sus LCH (62 y 58 días, respectivamente), se produjo un aumento de la producción de IL-8 respecto al control que no fue especialmente llamativo si se compara, por ejemplo, con el resultado del donante 4, que solo usó sus LCH 27 días.

En las LCH de los siguientes donantes por tiempo de uso, sin embargo, se observa un descenso de la producción de IL-8 con respecto al control (donantes 2 y 5), mientras que, en las LCH de los donantes siguientes se

observa de nuevo un incremento de la producción de IL-8 en el donante 8, seguido de una disminución en el donante 3, y de nuevo un aumento en los donantes 6 y 4.

COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE IL-6 Y DE LA IL-8 POR DONANTE

La siguiente tabla presenta una comparativa de las concentraciones de IL-6 y de IL-8 en cada donante a las 24 y a las 48 horas.

Tabla 2: Tabla comparativa de las concentraciones obtenidas de la IL-6 y de la IL-8 a las 24 horas y a las 48 horas.

		TIEMPOS DE CONTACTO			
		24 horas		48 horas	
LCH	Citoquinas	IL-6	IL-8	IL-6	IL-8
		C	66,97	114,14	120,09
	LCC	57,70	119,49	101,70	198,50
	1	283,07	288,67	123,97	337,83
	2	48,20	23,31	106,70	214,61
	3	65,03	17,91	88,03	73,43
	4	262,19	378,87	360,37	383,73
	5	80,52	210,80	61,47	185,42
	6	164,01	259,53	208,84	301,80
	7	188,24	221,20	256,80	747,97
	8	353,50	341,66	195,46	411,70

La exposición a LCC control no indujo aumento en la producción ni de IL-6 ni de IL-8 respecto al control de células sin lente.

Se observa como a las 24 horas, las LCH de los mismos donantes que producían un aumento de la IL-6 lo hacían también para la IL-8 (celdas sombreadas de naranja).

A las 48 horas, se observa que de nuevo, las LCH que producían un aumento de la IL-6 lo hicieron en la IL-8, a excepción del donante 6.

En el caso de los donantes 1 y 5 se observa un aumento en la producción respecto al control de IL-6 y de la IL-8, que, sin embargo, a las 48 horas baja con respecto a los valores tras 24 horas.

7. DISCUSIÓN

En la hipótesis de este TFG se planteaba la posibilidad de comprobar *in vitro* si la exposición a una LCH ya usada durante al menos un mes aumenta la producción basal de IL-6 y de IL-8 en las células epiteliales de la córnea.

La interpretación de los resultados de este TFG debe realizarse con cautela debido a que somos conscientes de las siguientes limitaciones:

- El número limitado de LCH donantes (solo 8 parejas de LCH).
- Sólo se tiene una recogida de lentes por donante, cuando el propósito inicial era realizar dos recogidas para tener, como mínimo, datos por duplicado de cada donante. Este paso no se ha podido llevar a cabo debido a la tardanza que sufrimos hasta tener la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica.
- En el estudio se decidió colocar las lentes en dos posiciones y dos tiempos diferentes, las de OI (24 horas) se colocaron de manera normal mientras que las del OD (48 horas) se colocaron volteadas. Esta decisión se tomó partiendo de que se llevarían a cabo dos recogidas de LCH por donante y que, por lo tanto, se tendrían datos al menos por duplicado de cada situación.
- A pesar de que en su gran mayoría, las LCH comparten el mismo material, no comparten la marca comercial ni el líquido de mantenimiento usado (a excepción de los donantes 2 y 3, que si usan el mismo). Lo ideal hubiese sido que todos ellos fuesen usuarios de la misma marca comercial de LCH y usuarios del mismo líquido de mantenimiento para eliminar una posible influencia de esas variables en los resultados.

La tinción con azul de Coomassie permitió identificar los depósitos presentes en las LCH donantes, que fueron muy similares y escasos a excepción del donante 7. En un principio se pensó que tal vez los hallazgos podrían ser consecuencia de una mala manipulación de las LCH, pero tras observar que se repetía en ambas LCH a los diferentes tiempos y tras búsquedas en literatura [8], no parece ser un error. Teniendo en cuenta, además, que este donante concreto es el que más días usó sus LCH (62 días), se cree que los hallazgos son depósitos proteicos y que, por lo tanto, con el tiempo de uso de las LCH éstos aumentan.

La viabilidad celular de la línea HCE tras las 24 horas de exposición a las LCH no sufrió ningún cambio, siendo del 100% en todas ellas. Hubo una excepción, el caso del donante 5, donde la viabilidad celular fue del 1%. Por el contrario, a las 48 horas de exposición a las LCH se observan más diferencias, viéndose que en los donantes 2, 3 y 7 la viabilidad celular disminuye, siendo del 47%, 66% y 64%, respectivamente, y en el donante 5, de nuevo, la viabilidad celular es prácticamente nula (2%). Quizá el descenso en la viabilidad en los donantes 2 y 3 pueda tener que ver con que ambos utilizan la misma solución de mantenimiento para sus LCH. En el caso del donante 7 se cree que pueda tener relación con los días de uso, fue el que más días las usó (62 días) y, además, fueron las que más depósitos presentaron. En el caso del donante 5, se cree que pueda tener relación con la solución de mantenimiento.

La producción de IL-6 aumenta a las 24 horas con respecto al control en todos los casos a excepción de los donantes 2 y 3, los cuales comparten solución de mantenimiento, por lo que podría tener relación. A las 48 horas, sólo se observa aumento en la producción de IL-6 en cuatro de los ocho donantes (donantes 4, 6, 7 y 8). Esto podría indicar un cierto efecto debido a la colocación de la LCH volteada en los experimentos a las 48 horas.

La producción de IL-8 aumenta a las 24 horas con respecto al control, en todos los casos a excepción de los donantes 2 y 3, motivo por el que de nuevo, se cree que pueda estar relacionado con la solución de mantenimiento de estos dos usuarios. A las 48 horas, se observa que la cantidad de IL-8 es mayor que a las 24 horas (a excepción del donante 5), pero el aumento no es llamativo respecto al control. El valor destacable tras la comparación con el control es el correspondiente al donante 7, donde la concentración de IL-8 aumenta considerablemente a las 48 horas. De nuevo, ese aumento podría estar relacionado con los días de uso de esas LCH y en el caso de los donantes en los que no hay aumento, nuevamente podría haber influido la posición volteada de la LCH.

Resumiendo, se ha diseñado un sistema que ha permitido medir de manera *in vitro* la producción basal de IL-6 y de IL-8 en la línea celular HCE tras colocar una LCH sobre ellas durante 24 y 48 horas pero no se ha podido encontrar una relación directa entre la producción de estas citoquinas y el tiempo de uso de las LCH.

8. CONCLUSIONES

- Se pueden identificar depósitos proteicos con azul de Coomassie en LCH usadas, pero la abundancia de estos depósitos no parece tener una relación directa con un uso de las LCH mayor del mes.
- Se puede llevar a cabo de manera *in vitro* una simulación de contacto entre una LCH y el epitelio corneal, permitiendo además, realizar medidas tales como la producción de IL-6 y de la IL-8 por parte de dichas células tras esa exposición.
- La exposición de una línea celular de epitelio de córnea humano (HCE) a LCH usadas durante al menos un mes no parece producir cambios en la viabilidad celular.
- La línea celular HCE tras ser expuesta a una LCH donante usada durante al menos un mes sí aumenta la producción basal de IL-6 y de IL-8. Sin embargo, los días de uso de más de las LCH no parece tener una relación directa con la producción de esas citoquinas.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Schultz CL, Kunert KS. Interleukin-6 levels in tears of contact lens wearers. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20(3):309-310.
2. Tan M, Thakur A, Morris C, Willcox MD. Presence of inflammatory mediators in the tears of contact lens wearers and non-contact lens wearers. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1997; 25 Suppl 1:S27-9.
3. Dogru M, Ward SK, Wakamatsu T, et al. The effects of 2 week senofilcon-A silicone hydrogel contact lens daily wear on tear functions and ocular surface health status. *Cont Lens Anterior Eye.* 2011; 34(2):77-82.
4. The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007; 5:93–107.
5. Maltseva IA, Fleiszig SMJ, Evans DJ, Kerr S, Sidhu SS, McNamara NA, Basbaum C. Exposure of human corneal epithelial cells to contact lenses *in vitro* suppresses the upregulation of human β -defensin-2 in response to antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp Eye Res* 2007; 85:142-153.
6. Gorbet MB, Tanti NC, Jones L, Sheardown H. Corneal epithelial cell biocompatibility to silicone hidrogel and conventional hidrogel contact lens packaging solutions. *MolVis* 2010;16:272-282.
7. Modelo *in vitro* de inflamación corneal causada por lentes de contacto. Trabajo fin de master (2012). Mario Crespo. Yolanda Diebold.
8. Goldenberg MS, Beekman AC. Detection of protein deposition on contact lens type polymeric hydrogels by Coomassie blue R staining. *Biomaterials* 1991; 2(3):267-74.



Universidad de Valladolid



COMISION DE INVESTIGACION

Dña. M^º 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 TFG titulado "Interacción in vitro de lentes de contacto usadas con células epiteliales de la córnea" con número de registro 01/2015 de Dña. Saray Ramos Palenzuela, se encuentra en el momento de la última reunión de la Comisión de Investigación de 22 de enero de 2015

Aprobado

Pendiente de

Y para que así conste expido el presente certificado.

En Valladolid, a 23 de enero de 2015

Fdo.: M^º 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 26 de Febrero de 2015

En la reunión del CEIC ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE del 26 de Febrero de 2015, se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente proyecto de investigación.

PI 15-218	INTERACCIÓN IN VITRO DE LENTES DE CONTACTO USADAS CON CÉLULAS EPITELIALES DE LA CórNEA	IOBA I.P. YOLANDA DIEBOLD LUQUE EQUIPO: SARAY RAMOS RECIBIDO: 12-01-2015
-----------	--	--

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

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

Un cordial saludo.

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

Hoja de información al paciente

Le ofrecemos participar en el estudio titulado:

Nombre del Estudio: **INTERACCIÓN IN VITRO DE LENTES DE CONTACTO USADAS CON CÉLULAS EPITELIALES DE LA CórNEA**

Promotor del Estudio: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA)

Responsables del Estudio: Yolanda Diebold Luque

Centro: IOBA, Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Propósito del estudio

Está invitado a participar en un estudio de investigación en el que se va a comprobar "*in vitro*", es decir, en el laboratorio, si las células epiteliales de la córnea que se expongan a una lente de contacto hidrofílica ya usada al menos durante un mes aumentan su producción basal de unas moléculas denominadas interleuquinas 6 y 8. La presencia de estas moléculas en cantidades anormales nos indicaría que se ha iniciado un proceso inflamatorio.

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 participa, usted accede a entregarnos sus lentes de contacto usadas durante al menos un mes, en vez de tirarlas. Tendría que entregárnoslas en el momento en que decida que no las va a usar más y vaya a cambiarlas por otras nuevas.

Cuando nos entregue las lentes, el estudio que va a llevarse a cabo con ellas es el siguiente: se pondrán en contacto esas lentes previamente usadas por usted con una línea celular de células epiteliales de la córnea humana y se estudiará si esa exposición provoca algún cambio inflamatorio en dichas células. En concreto, se estudiará si aumenta la producción basal de dos moléculas relacionadas con la inflamación de la superficie ocular (IL -6 e IL-8) por parte de las células corneales expuestas a las lentes.

Cuando nos entregue las lentes, deberá facilitarnos la siguiente información: refracción en cada lente; marca comercial y material de cada lente; sistema de mantenimiento que usted utiliza de forma habitual. Además, deberá especificar cuánto tiempo (preferentemente en días) ha usado las lentes.

En caso de obtener resultados relevantes usted accede a que éstos puedan ser compartidos con otros investigadores.

Pruebas y toma de muestras que se realizarán durante el estudio

La toma de muestras no es experimental, es decir, ya ha sido ampliamente utilizada con anterioridad en humanos y forman parte de la práctica clínica de otros centros además del nuestro.

Se recogerán sus lentes cuando finalice el tiempo de uso y usted decida cambiarlas. La forma de recogida de las lentes será en un tubo o bote que le facilitaremos nosotros y en el que colocará la lente cubierta con la solución única que use de forma habitual.

La recogida de las lentes se realizará una vez al mes en el momento en que usted nos avise de que va a proceder a sustituir sus lentes viejas por otras nuevas. Este procedimiento se repetirá un máximo de tres veces para el desarrollo de este proyecto.

Este material estará bajo la custodia del IOBA y del personal investigador del estudio. El material no será comercializado ni manipulado por personal no autorizado. El material recogido para este estudio será utilizado en su totalidad y NO se conservará, será destruido inmediatamente tras su utilización.

Riesgos que entraña la toma de muestras

Este tipo de estudio no entraña ningún tipo de riesgo para usted, ya que no se le va a tomar ninguna muestra; simplemente, recogeremos las lentes ya usadas que usted quiere desechar.

Riesgos que entraña el presente estudio

Usted será tratado siempre siguiendo 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 y quirúrgica más adecuada para su caso. No se trata pues, de un ensayo clínico, sino de un estudio de recogida de datos y muestras de manera sistematizada.

Este tipo de estudio no entraña ningún tipo de riesgo para usted, ya que se realizará en su totalidad en el laboratorio con lentes ya usadas que iban a desecharse.

Beneficios y riesgos derivados de su participación

Su participación no le supondrá ningún gasto adicional; sin embargo, no le otorgará derechos sobre las patentes y explotaciones comerciales que deriven de los descubrimientos originados en los mismos.

Los riesgos derivados de este estudio son nulos para el paciente colaborador, el único riesgo que puede darse es el daño o deterioro de la lente en el momento de su recogida y que, por lo tanto, no pueda ser usada en el estudio.

Los beneficios para el paciente donante son la satisfacción personal que pueda suponerle la participación en un estudio de investigación, y en caso de obtenerse resultados relevantes, la publicación de dichos resultados y el saber que se ha sido partícipe de los mismos.

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.

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., no a sus familiares, cuando sea relevante para su salud. Si se trata de información no relevante para su salud, Vd. decidirá si quiere o no que se le comunique. Si la información resultante del análisis de la muestra fuera de interés para la salud de sus familiares, la decisión de comunicárselo a ellos o no será suya, según la normativa vigente. 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, pero los datos obtenidos en la investigación se conservarán como parte de la documentación de dicha investigación. También debe saber que puede ser excluido del programa si los responsables del estudio lo consideran oportuno

Consentimiento informado

Nombre del Estudio INTERACCIÓN IN VITRO DE LENTES DE CONTACTO USADAS CON CÉLULA EPITELIALES DE LA CÓRNEA

Promotor del Estudio: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA)

Responsables del Estudio: Yolanda Diebold Luque 983-184750

Centro: IOBA, Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Centro donde se realiza la recogida de muestra: IOBA

Yo

Nombre y apellidos del paciente: [Paciente donante]

He sido informado por:

Nombre y apellidos de quien informa al paciente:

Saray Ramos Palenzuela

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

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.

En fecha:

Paciente:

NHC:

Representante Legal del Paciente(1):

Nombre:

Nombre:

NIF:

NIF:

En calidad de:

Firma

Firma

(1) La representación legal deberá ser acreditada.

Responsable del estudio

Nombre: Dra. Yolanda Diebold Luque

Centro recogida:

IOBA

Firma

Este documento se realiza por duplicado con copia a: Paciente y Centro