



**Universidad de Valladolid**



## **TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**Máster: SUBESPECIALIDADES OFTALMOLÓGICAS**

**Especialidad: INFLAMACIÓN INTRAOCULAR Y UVEÍTIS**

# **ESTUDIO TOPOGRÁFICO DEL EPITELIO CONJUNTIVAL EN NIÑOS SANOS: FENOTIPO, VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR**

**Magnolia Trinidad Cano Suárez**

**Director: Dr. Roberto Reinoso Tapia**

**Julio 2017**









## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

En primer lugar, a mi tutor del TFM, el Dr. Roberto Reinoso por su gran generosidad, apoyo continuo, paciencia y disponibilidad.

A la Prof. Margarita Calonge, por su gran humanidad y animarme a continuar con este trabajo.

Al equipo de investigación: Prof. Alfredo Corell, Dra. Ana Vallelado, Dra. Carmen Martín, por su valiosa aportación y asesoría.

A la Dra. Itziar Fernández, por su ayuda en el análisis estadístico de los datos.

Al equipo de InmunoLab, que me han ayudado en la elaboración técnica de este trabajo.

Al equipo de Anestesia y enfermería del HCUV e IOBA por su paciencia cuando recogía las muestras.

A José Carlos Zarzuela, por su apoyo técnico en el procesamiento de las muestras.

A la Dra. Raquel Martín, por enseñarme a recoger muestras.

A mis dos compañeras del Máster en Subespecialidades Oftalmológicas, Soledad Rubio y Luisa Giraldo por ser no sólo compañeras sino amigas.







## ABREVIATURAS

ANOVA:	Análisis de Varianza
BALT:	Bronchial Associated Lymphoid Tissue (tejido linfoide asociado a los bronquios)
BS:	Bulbar Superior
CALT:	Conjunctival Associated Lymphoid Tissue (tejido linfoide asociado a la conjuntiva)
CIC:	Citología de impresión conjuntival
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
EALT:	Eye Associated Lymphoid Tissue (tejido linfoide asociado al ojo)
FSI:	Fonde de Saco Inferior
GALT:	Gut Associated Lymphoid Tissue (tejido linfoide asociado al intestino)
HCUV:	Hospital Clínico Universitario de Valladolid
IELs:	Intraepithelial Lymphocytes (linfocitos intraepiteliales)
Ig:	Inmunoglobulina
IOBA:	Instituto de Oftalmobiología Aplicada
IMP:	Índice Medio de Proliferación
IP:	Ioduro de Propidio
LDALT:	Lacrimal Drainage Associated Lymphoid Tissue (tejido linfoide asociado al sistema de drenaje lagrimal)
LGALT:	Lacrimal Gland Associated Lymphoid Tissue (tejido linfoide asociado a la glándula lagrimal)
MALT:	Mucosal Associated Lymphoid Tissue (tejido linfoide asociado a las mucosas)
NALT:	Nasopharynx Associated Lymphoid Tissue (tejido linfoide asociado a nasofaringe)
SO:	Superficie Ocular
TS:	Tarsal Superior



**ÍNDICE:**

Resumen.....	1
Capítulo 1. Introducción.....	3
1.1. Sistema inmune asociado a las mucosas.....	3
1.2. Sistema inmune de la mucosa ocular.....	4
1.3. Tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT).....	5
Capítulo 2. Justificación, hipótesis del trabajo y objetivos.....	10
2.1. Justificación.....	10
2.2. Hipótesis del trabajo.....	10
2.3. Objetivos.....	10
Capítulo 3. Material y métodos.....	12
3.1. Sujetos.....	12
3.2. Obtención de células de la superficie ocular.....	14
3.3. Caracterización de la población celular obtenida.....	15
3.4. Análisis estadístico.....	18
Capítulo 4. Resultados.....	19
4.1. Fenotipo celular.....	19
4.2. Viabilidad celular.....	22
4.3. Ciclo celular.....	24
Capítulo 5. Discusión.....	25
Capítulo 6. Conclusiones.....	30
Capítulo 7. Bibliografía.....	31
Anexos.....	33



## RESUMEN

### ESTUDIO TOPOGRÁFICO DEL EPITELIO CONJUNTIVAL EN NIÑOS SANOS: FENOTIPO, VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

**Trabajo Fin de Máster:** Subespecialidades Oftalmológicas: Inflamación intraocular y uveítis

**Alumna:** Magnolia Trinidad Cano Suárez

**Director:** Dr. Roberto Reinoso Tapia

**Introducción:** El tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT) desempeña un papel clave en la protección de la superficie ocular (SO) mediante el inicio y la regulación de las respuestas inmunes. En los últimos años, se ha demostrado la presencia del CALT como componente regular de la conjuntiva humana sana, conociéndose su distribución topográfica en la conjuntiva humana adulta. Sin embargo, no existen estudios en la actualidad que evalúen si esta distribución varía en función de la edad. El objetivo de este estudio fue por tanto investigar la proporción de linfocitos intraepiteliales (IELs), el grado de viabilidad y/o apoptosis y la proliferación celular en tres zonas diferentes de la conjuntiva en niños sanos.

**Material y métodos:** Se recogieron células conjuntivales de la región tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior de 24 sujetos pediátricos sanos que iban a ser sometidos a cirugía de corrección de estrabismo bajo anestesia general. Estas células se obtuvieron con una técnica mínimamente invasiva, la citología por cepillado. Posteriormente, estas células fueron analizadas fenotípica y funcionalmente mediante citometría de flujo.

**Resultados:** El análisis inmunofenotípico mostró que no todas las células obtenidas mediante cepillado conjuntival eran de estirpe epitelial, sino que existía una población de células CD45<sup>+</sup> (IELs) presente de manera regular en la conjuntiva de niños sanos, más numerosa en el fondo de saco inferior que en el resto de zonas. Estos IELs fueron predominantemente linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), seguidos de los linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) y finalmente linfocitos NK (CD3<sup>+</sup>CD16/56<sup>+</sup>), siendo la proporción CD3/CD19 mayor en la zona tarsal superior que en el resto de zonas. En el ensayo de apoptosis se observaron dos poblaciones celulares diferenciadas por el tamaño y la complejidad celular. Las células más complejas predominaron en las zonas superiores de la conjuntiva y presentaron una menor viabilidad que en el fondo de saco inferior, contrariamente a lo sucedido con las células menos complejas, que fueron menos abundantes en las zonas superiores aunque en este caso sin apenas diferencias en cuanto a la viabilidad. Por último, la capacidad proliferativa del epitelio conjuntival fue significativamente más alta en la zona tarsal superior que en el resto de zonas analizadas.

**Conclusiones:** Estos resultados demuestran que el componente epitelial del CALT también se encuentra presente de manera regular en la conjuntiva del niño sano, variando en cuanto a su fenotipo, viabilidad y proliferación celular según las diferentes regiones conjuntivales analizadas y también respecto a lo anteriormente descrito en la población sana adulta.



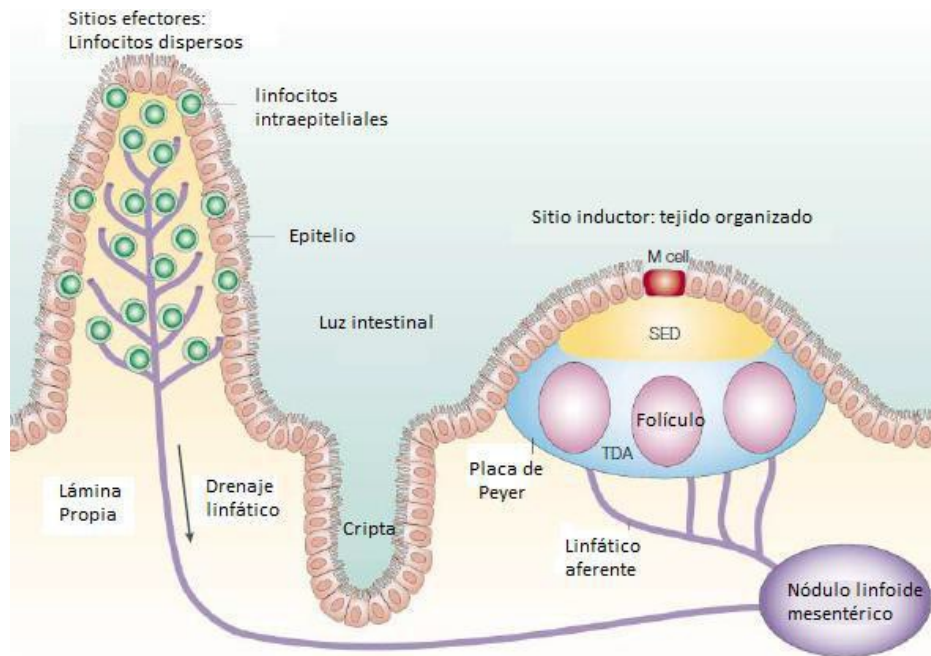
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. SISTEMA INMUNE ASOCIADO A LAS MUCOSAS

El sistema inmune asociado a las mucosas o tejido linfoide asociado a las mucosas (*mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT) constituye la primera línea de defensa del organismo frente a la invasión de patógenos<sup>1</sup>. Contiene aproximadamente el 60% de todas las células inmunitarias del organismo y en él se sintetizan alrededor del 80% del total de inmunoglobulinas (Igs) que se sintetizan al día<sup>2</sup>. El MALT está constituido por agrupaciones de tejido linfoide no encapsulado localizado en la lámina propia y áreas submucosas de las principales mucosas del organismo, como por ejemplo, el tracto gastrointestinal (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT), el tracto respiratorio (*bronchus-associated lymphoid tissue*, BALT); nasal (*nasal associated lymphoid tissue*, NALT), el tracto genitourinario, etc. Debido a su gran extensión, los tejidos MALT mejor caracterizados son los asociados con el tracto gastrointestinal y, de hecho, existen pocos estudios que describan estos tejidos linfoides en otras mucosas de menor superficie de nuestro organismo, como por ejemplo la mucosa ocular.

En general, el MALT se compone de un sitio inductor representado por tejido linfoide organizado en forma de folículos linfoides o centros foliculares germinales entre los cuales destacan las Placas de Peyer en el GALT o el anillo de Waldeyer en el NALT, y de un sitio efector representado por tejido linfoide difuso distribuido entre las células epiteliales de la mucosa como linfocitos intraepiteliales (*intraepithelial lymphocytes*, IELs) y entre la lámina propia como linfocitos de la lamina propia<sup>3</sup>. Estos IELs juegan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa mediante la regulación de la inmunidad mucosa innata y adquirida.

Gran parte de nuestros conocimientos sobre la inmunidad de las mucosas están basados en los estudios realizados en el GALT. En la mucosa del tubo digestivo existe una gran cantidad de linfocitos repartidos en tres regiones principales: dentro de su capa epitelial, salpicados por la lámina propia y organizados en grupos, como las placas de Peyer (Figura 1)<sup>4</sup>. Las células de cada zona presentan unas características fenóticas y funcionales distintas, donde se induce la respuesta inmune inicial de la mucosa.



**Figura 1.** Representación esquemática de los elementos linfoides del GALT. El sitio inductor está formado por la placa de Peyer y los nódulos linfoides mesentéricos mientras que el sitio efector corresponde a los linfocitos dispersos del epitelio y la lámina propia. Tanto la placa de Peyer como la lámina propia drenan mediante vasos linfáticos aferentes que desembocan en los nódulos linfoides mesentéricos. SED, subepithelial dome, región subepitelial; TDA, thymus-dependent area, área dependiente del timo<sup>4</sup>.

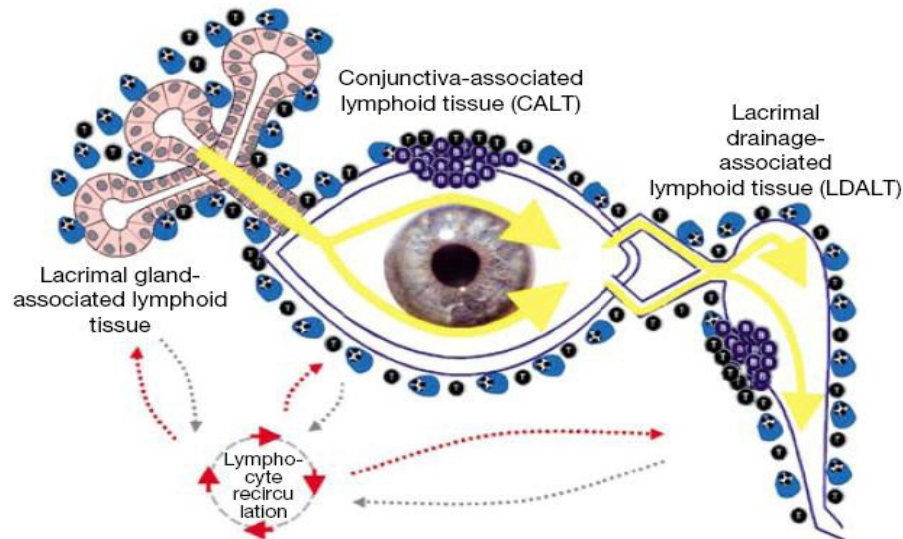
## 1.2. SISTEMA INMUNE DE LA MUCOSA OCULAR

La superficie ocular (SO) está continuamente en contacto con el ambiente externo y, por lo tanto, se encuentra expuesta a una multitud de antígenos y microorganismos patógenos. Como cualquier mucosa, está protegida por el MALT, que utiliza mecanismos efectores innatos y adaptativos presentes película lagrimal y en el propio tejido.

En los últimos años, se ha demostrado la existencia de un sistema inmune común para toda la SO, denominado sistema inmune de la mucosa ocular (*ocular mucosal immune system*, OMIS) o tejido linfóide asociado al ojo (*eye-associated lymphoid tissue*, EALT), que actuaría como una unidad anatómica y funcional protegiendo de manera coordinada a la SO y sus anejos mucosos, y que englobaría al tejido linfóide asociado a la conjuntiva (*conjunctiva-associated lymphoid tissue*, CALT), al tejido linfóide asociado al sistema de drenaje lagrimal (*lacrimal drainage-associated lymphoid tissue*, LDALT) y al tejido linfóide asociado a la glándula lagrimal (*lacrimal gland-associated lymphoid tissue*,



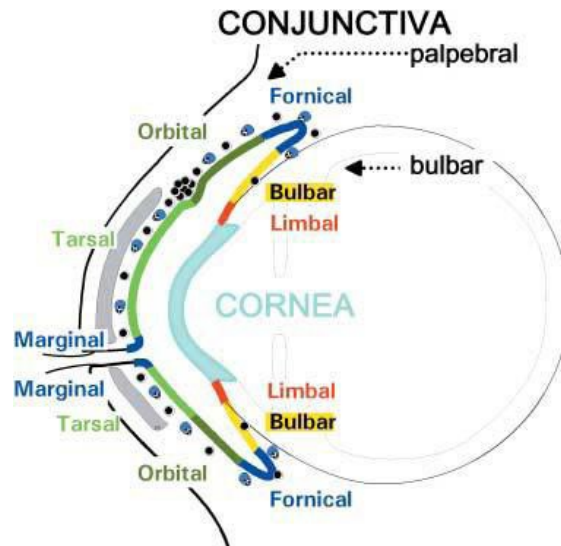
LGALT)<sup>5</sup>. Este sistema inmune de la mucosa ocular está conectado mediante la recirculación de linfocitos a través de vasos especializados entre sí con el resto del sistema inmunológico (Figura 2).



**Figura 2.** Sistema inmune asociado a la mucosa ocular. En el dibujo, las células azules grandes representan células plasmáticas, las células azules pequeñas representan las células B y las células negras pequeñas representan las células T<sup>6</sup>

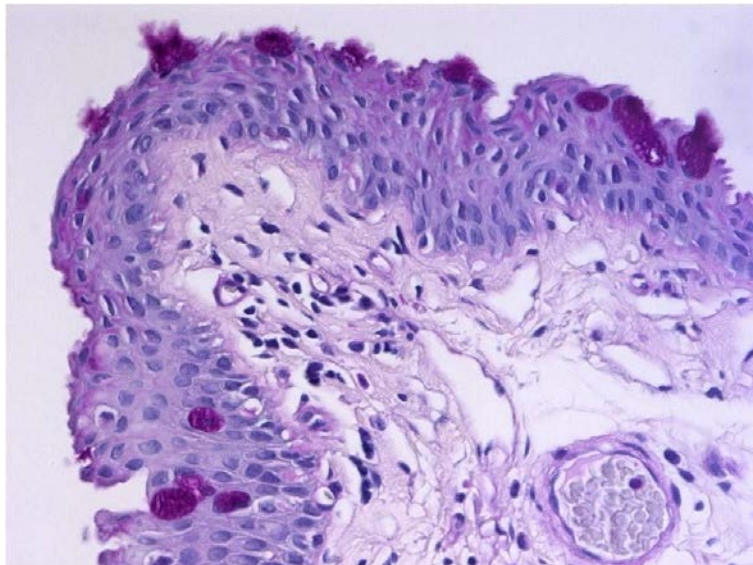
### 1.3. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA CONJUNTIVA (CALT)

La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que recubre la cara interna de los párpados (conjuntivas palpebrales), la esclera anterior (conjuntiva bulbar), y forma un repliegue entre ambas secciones de la conjuntiva (conjuntiva de fondo de saco o fórnix) (Figura 3).



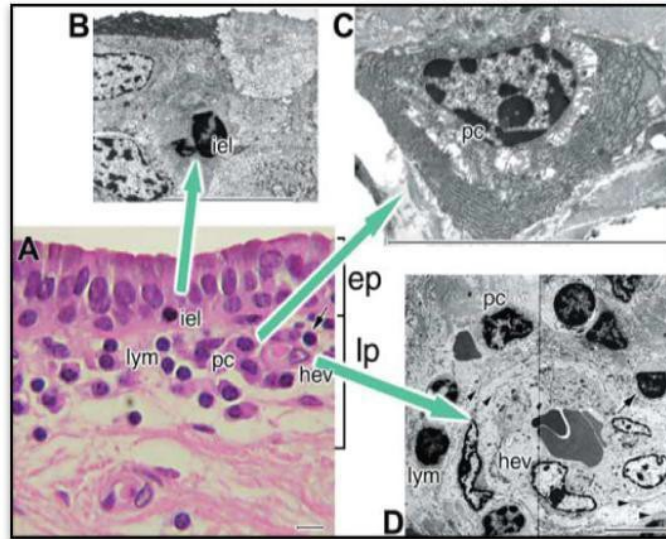
**Figura 3.** Topografía esquemática de zonas de la conjuntiva<sup>6</sup>

Histológicamente, la conjuntiva es similar a otras membranas mucosas, se compone de un epitelio estratificado no queratinizado de dos a seis capas de células epiteliales intercaladas con células caliciformes, y de una lámina propia o estroma formado por tejido conectivo fibrovascular que contiene vasos y nervios linfáticos (Figura 4).



**Figura 4.** Imagen histológica representativa de la conjuntiva humana. Se aprecian las células caliciformes teñidas con PAS (imagen cedida por el Laboratorio de Patología Ocular, IOBA)

Una de las principales funciones de la conjuntiva consiste en la protección corneal frente a posibles infecciones microbianas y/o ataques externos, para lo cual cuenta con una amplia gama de células inmunes ligadas a esta mucosa, es decir, un tejido linfoide asociado a la mucosa, o más concretamente, el CALT, que le va a proporcionar toda una serie de mecanismos de defensa (innatos y adaptativos) para mantener integra la SO. Estos elementos inmunitarios se distribuyen tanto en el epitelio (principalmente IELs) como a lo largo de la lámina propia (folículos linfoides) (Figura 5). El epitelio conjuntival posee células M, como otros tejidos MALT, que se encargan de transportar los antígenos a los folículos. Por lo tanto, el CALT es tanto un sitio inductor como efector de la respuesta inmune.

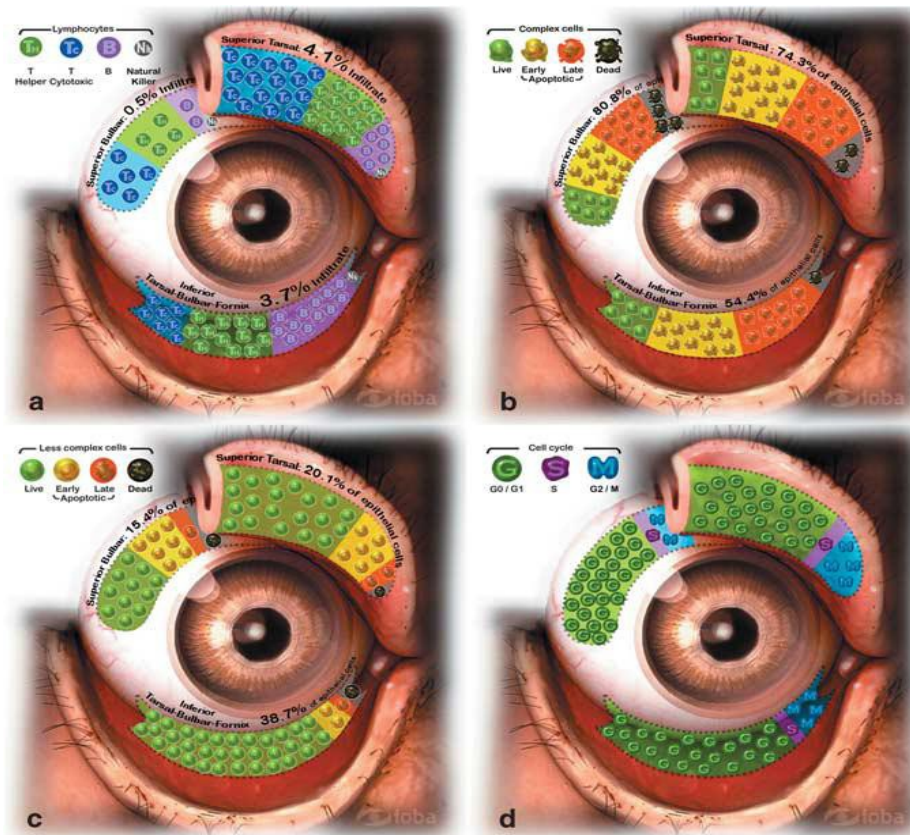


**Figura 5.** Tejido linfoide difuso del epitelio conjuntival. A) Corte histológico del epitelio conjuntival, Lym (linfocito), iel (linfocito intraepitelial), pc (célula plasmática), hev (vénulas de endotelio alto). B) Imagen de microscopía electrónica donde se observa un linfocito intraepitelial. C) Imagen de microscopía electrónica donde se observa una célula plasmática; D) Imagen de microscopía electrónica donde se observa una vénula postcapilar<sup>6</sup>.

El CALT se encuentra formado por tejido linfoide organizado (folículos linfoides) donde predominan las células B, y por tejido linfoide difuso principalmente compuesto por linfocitos T distribuidos arbitrariamente entre el epitelio (IELs) y el tejido conectivo subyacente (linfocitos de lámina propia). El tejido linfoide organizado en forma de folículos corresponde a la rama efectora de la respuesta inmune y el tejido difuso a la rama inductora.

Aunque clásicamente el CALT ha estado asociado a procesos inflamatorios, ya hace unos años se demostró que este tejido forma parte intrínseca de la conjuntiva humana sana<sup>6</sup>. También se ha demostrado que la densidad de estas células varía en función de la zona conjuntival observada, como queda reflejado en un trabajo realizado por Knop and Knop (1999a)<sup>7</sup> en distintas zonas topográficas de la conjuntiva humana. La mayor parte de los IELs de la conjuntiva humana son linfocitos T (CD3+) con un claro predominio de los linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+), sobre los linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+), sin embargo, estos autores también destacan que existe una distribución inversa en los linfocitos de la lámina propia.

Además, y dentro de nuestro grupo de trabajo, Reinoso et al., (2012)<sup>8</sup> demostraron que los IELs de la conjuntiva humana normal adulta residen principalmente en la conjuntiva tarsal, disminuyendo gradualmente hacia el fondo de saco y la conjuntiva bulbar (Figura 6).



**Figura 6.** Distribución topográfica de linfocitos intraepiteliales, células vivas, células muertas, células en apoptosis precoz y tardía y fases del ciclo celular en la conjuntiva humana adulta normal<sup>8</sup>

Estos mismos autores mostraron que la mayor parte de los IELs de la conjuntiva humana de adultos sanos son linfocitos T, seguidos de linfocitos B y linfocitos NK, aunque en distinta proporción dependiendo de la zona anatómica (Figura 6). Estas diferencias topográficas también han sido observadas en la viabilidad celular y en la capacidad proliferativa del epitelio de la conjuntiva humana adulta sana (Figura 6). Aunque es evidente que la conjuntiva, o mejor dicho el CALT, juega un papel crucial en los mecanismos defensivos de la SO humana, no está del todo claro si su distribución varía en función de la edad.

## 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

Con la realización de este trabajo pretendemos incrementar el conocimiento actual sobre el sistema inmune de la mucosa conjuntival, intentando descifrar un patrón topográfico de la conjuntiva en niños sanos que nos permita posteriormente determinar y entender las principales reacciones inmunológicas que tienen lugar en algunas patologías de la SO, principalmente de carácter inflamatorio (ya sean estas de origen infeccioso u otras etiologías).

### 2.2. HIPOTESIS DE TRABAJO

Nuestra hipótesis de trabajo es que el componente epitelial del CALT se encuentra presente de manera regular en la SO de niños sanos, variando funcional y fenotípicamente en función de la zona topográfica de la conjuntiva.

### 2.3. OBJETIVOS

- **OBJETIVO 1. Obtención, mediante métodos mínimamente invasivos, de células conjuntivales en niños sanos que van a ser intervenidos quirúrgicamente.** Este objetivo consiste en obtener, ocasionando las mínimas molestias al niño, el número suficiente de células de la conjuntiva para llevar a cabo su posterior caracterización.
  
- **OBJETIVO 2. Caracterización fenotípica y funcional, mediante citometría de flujo, de las células epiteliales y IELs obtenidos.** Con este objetivo, se pretende determinar el fenotipo de las células encontradas en la conjuntiva humana de niños sanos (subpoblaciones linfocitarias), evaluar su viabilidad/apoptosis y la fase del ciclo celular del epitelio conjuntival.

- **OBJETIVO 3. Análisis de la distribución topográfica del componente epitelial del CALT en niños sanos.** La finalidad de este objetivo es comparar diferentes zonas topográficas de la conjuntiva humana (tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior) en una población de niños sanos. De este modo, se podrán establecer, en términos fenotípicos y funcionales, un patrón topográfico de la distribución del CALT en este grupo de sujetos.

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. SUJETOS

La selección de los sujetos del estudio se llevó a cabo en el Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV) y en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid. La naturaleza de la investigación y los protocolos fueron explicados antes de la firma del consentimiento informado, el cual fue firmado por los padres o representantes legales de los menores en la visita de inclusión (anexo 1). El estudio siguió los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado tanto por la Comisión de Investigación del IOBA como por el Comité Ético del HCUV (anexo 2).

Los participantes fueron pacientes pediátricos (entre 2 y 12 años de edad) que iban a ser sometidos a intervención quirúrgica bajo anestesia general (corrección quirúrgica de estrabismo o inyección de toxina botulínica) en las Unidades de Oftalmología Pediátrica de ambas instituciones, a cargo de la Dra. Ana I. Vallelado Álvarez.

La decisión de seleccionar pacientes pre-quirúrgicos fue, en primer lugar, porque carecen de enfermedad inflamatoria de la SO y, por tanto, son individuos sanos desde el punto de vista inmunológico. En segundo lugar, el hecho de que fueran a ser sometidos a un procedimiento invasivo programado por su patología quirúrgica ahorró al paciente de un nuevo episodio traumático para obtener las muestras para el estudio.

A todos los participantes, con el fin de determinar su idoneidad para el estudio propuesto, se les realizó una evaluación oftalmológica previa coincidiendo con la visita pre-operatoria programada por su cirujano, consistente en agudeza visual y biomicroscopía de polo anterior con lámpara de hendidura. El resto de datos, no relevantes para este estudio (fondo de ojo, presión intraocular, etc.), se tomaron de la historia clínica,

El día de la cirugía programada del participante, una vez realizada la anestesia general, se les tomó muestras de la conjuntiva del ojo que se iba a intervenir (si eran ambos, la muestra se tomó del que se intervenía en primer lugar), inmediatamente después el cirujano procedió con la intervención quirúrgica de manera habitual.

Se seleccionaron 24 niños (13 niños y 11 niñas), con una edad media de  $6 \pm 2$  años, a los que se les realizó la citología por cepillado en la conjuntiva de las 3 zonas previstas de



un sólo ojo (n=24 bulbar superior, n=24 tarsal superior y n=24 fondo de saco inferior). Por lo tanto, el número total de muestras analizadas en este estudio fue de 72.

Asimismo, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

**Criterios de inclusión:**

- Participación voluntaria en el estudio.
- Niños/as con edades comprendidas entre los 2 y los 12 años de edad.
- Ausencia de enfermedad sistémica pudiera interferir con un sistema inmune normal.
- Ausencia de enfermedad ocular diferente que la que motivó el estrabismo y ausencia de enfermedad alguna de la SO.
- Específicamente, se descarta presencia de alergias extraoculares mediante la historia clínica, un cuestionario que rellenan los padres o representantes legales para el despistaje de alergias extraoculares y mediante exploración con lámpara de hendidura.
- Que los representantes legales entiendan y firmen el consentimiento informado.

**Criterios de exclusión:**

- Padecer patologías crónicas o enfermedad inflamatoria de la SO.
- Cualquier patología ocular diferente del estrabismo que motiva la cirugía.
- Haberse sometido a algún tipo de cirugía ocular previa.
- Haber recibido medicación tópica ocular o uso de fármacos sistémicos en los últimos 6 meses.
- Haber padecido algún proceso inflamatorio de vías respiratorias superiores (resfriados, catarros, gripe...) en las últimas 2 semanas.
- Haber padecido algún proceso inflamatorio de vías digestivas (gastroenteritis...) en las últimas 2 semanas.

### 3.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LA SO

Una vez que el paciente se encontraba bajo anestesia general y tras la instilación de la anestesia tópica, se procedió a la toma de células conjuntivales del ojo que se iba a intervenir; si eran ambos ojos, la muestra se tomó del que se intervenía en primer lugar.

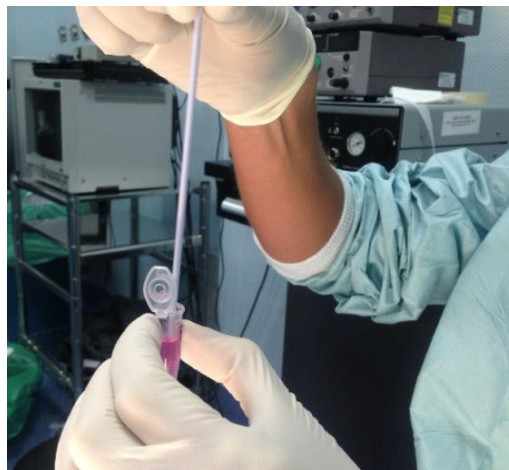
La obtención mínimamente invasiva de células de la SO fue llevada a cabo mediante citología por cepillado en la conjuntiva tarsal superior (TS), bulbar superior (BS) y fondo de saco inferior (FSI) (Figura 7), como ya se ha descrito previamente por nuestro grupo de trabajo<sup>8-10</sup>. Previa anestesia tópica (0.04% oxybuprocaine), se procedió a la rotación suave del cepillo (Cytobrush<sup>®</sup> plus GT, Medscand Medical, Suecia) sobre cada una de las tres áreas mencionadas, de forma independiente y consecutivamente.



**Figura 7.** Citología por cepillado conjuntival en las tres zonas de estudio. (A) Tarsal superior, (B) bulbar superior y (C) fondo de saco inferior (tomadas a pacientes en HCUV).

A continuación, las células se desprendieron del cepillo por rotación circular de éste durante aproximadamente 30 segundos en un tubo Eppendorf que contenía 1,4 ml de medio de transporte y/o cultivo [DMEM/F12 suplementado con 1 mg/ml de insulina pancreática bovina, 2 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano (EGF), 0.1 mg/ml de toxina colérica, 5 mg/ml de hidrocortisona, suero fetal bovino (FBS) al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50mg/ml de estreptomina y 2,5 mg/ml de anfotericina B]. Para garantizar una adecuada obtención de células se realizó la rotación del cepillo en 3 ocasiones seguidas, en cada zona de la conjuntiva, siempre realizándolo en el mismo sitio y con el mismo medio (Figura 8). Se obtuvieron, por tanto, 3 tipos de muestras de cada individuo, una de cada

área conjuntival. Posteriormente, se introdujeron los tubos con las células en hielo y se transportaron al laboratorio para su posterior análisis.



**Figura 8.** Rotación suave del cepillo en el interior del tubo que contiene el medio de transporte con objeto de desprender las células. Imagen propia

### 3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR OBTENIDA

La caracterización fenotípica y funcional de las células conjuntivales obtenidas se realizó mediante citometría de flujo<sup>8,10</sup>. Para llevar a cabo dicha caracterización, se realizaron 3 tipos de análisis: linaje celular, viabilidad/apoptosis y ciclo celular. Para ello, las células recuperadas de la SO fueron incubadas con diferentes anticuerpos y/o marcadores (Tabla 1) y analizadas utilizando el citómetro de flujo FC 500 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA), compuesto de 2 láseres (Argón, excita a 488 nm y HeNe excita a 633 nm) y 5 fotomultiplicadores: FL1 (525nm), FL2 (575 nm), FL3 (620 nm), FL4 (675 nm) y FL5 (755 nm). Los datos obtenidos fueron expresados como porcentaje de células (media  $\pm$  desviación estándar).

**Tabla 1.** Marcadores fluorescentes utilizados en la citometría de flujo

Tubo	Anticuerpo/marcador	Clon	Especificidad	Compañía
1	CD3-PC5	UCHT1	Linfocitos T	BC*
	CD4-RD1	SFCI12T4D11	Linfocitos T cooperadores (T <sub>h</sub> )	BC
	CD8-ECD	SFCI21Thy2D3	Linfocitos T citotóxicos (T <sub>c</sub> )	BC
	CD45-FITC	B3821F4A	Leucocitos	BC
2	CD3-FITC	33-2A3	Linfocitos T	IS**
	CD16-PE	B73.1	Linfocitos NK	CL***
	CD19-PC5	J4.119	Linfocitos B	BC
	CD45-PC7	J33	Leucocitos	BC
	CD56-PE	NCAM 16.2	Linfocitos NK	CL
3	Anexina V-FITC		Viabilidad/apoptosis	IS
	Ioduro de propidio		Viabilidad/apoptosis	BC
4	Ioduro de propidio		Ciclo celular	BC

PC5: Ficoeritrina-Cianina 5; RD1: Ficoeritrina; ECD: Ficoeritrina-Texas Red®-X; FITC: Isocianato de Fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PC7: Ficoeritrina-Cianina 7.

\*BC: Beckman Coulter (Marsella, Francia).

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

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

### 3.3.1. Linaje celular (estudio fenotípico)

La caracterización fenotípica de las células recolectadas se realizó utilizando los anticuerpos monoclonales descritos en la tabla 1 (Tubo 1 y 2). Para determinar la naturaleza (inmunofenotipo) de las células recuperadas, se utilizaron 600  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular (tubo 1: 300  $\mu\text{l}$  y tubo 2: 300  $\mu\text{l}$ ). En primer lugar, las células fueron lavadas con 2 ml de una solución de lavado (CellWASH Solution, BD biosciencias, San Jose, USA) para eliminar cualquier resto del medio de cultivo. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 500 xg, se decantó el sobrenadante y las células fueron incubadas en oscuridad con los anticuerpos correspondientes durante 15 minutos a temperatura ambiente (4  $\mu\text{l}$  de la mezcla de anticuerpos para el tubo 1 y 2.5  $\mu\text{l}$  de cada anticuerpo para el tubo 2). Posteriormente, las células fueron fijadas (15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad) con 500  $\mu\text{l}$  de una solución de lisis-fijación (FACS<sup>TM</sup> Lysing solution, BD Biosciencias, San Jose, CA, USA) y analizadas con el citómetro de flujo.

### 3.3.2. Viabilidad (estudio de apoptosis)

Para llevar a cabo el estudio de apoptosis/viabilidad, se utilizaron otros 300  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular (tubo 3). En primer lugar, las células fueron lavadas con 2 ml de una solución de lavado (CellWASH Solution, BD biosciencias, San Jose, USA). A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 500 xg, se decantó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas con 100  $\mu\text{l}$  de una solución tampón (Annexin V Binding Buffer, Immunostep, Salamanca, Spain). Posteriormente, las células fueron incubadas en oscuridad con 2,5  $\mu\text{l}$  de anexina V-FITC (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y 5  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio (IP) (a 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 10 minutos a 4°C (Tabla 1). Finalmente, se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de la solución tampón a la muestra celular quedando lista para su estudio por citometría de flujo. Las células doble negativas para Anexina V e IP fueron las viables. Las positivas para Anexina V y negativas para IP fueron las que estuvieron en apoptosis temprana (su membrana celular ya se ha alterado, pero aún no se ha iniciado la degradación del núcleo). Las células doble positivas fueron las que estuvieron en apoptosis tardía mientras que las células negativas para Anexina V y positivas para IP fueron las muertas.

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

Para llevar a cabo este análisis, se utilizaron otros 300  $\mu$ l de la suspensión celular (tubo 4). Como en anteriores ensayos, las células fueron lavadas en primer lugar con 2 ml de una solución de lavado (CellWASH Solution, BD Biosciences, San Jose, USA). Posteriormente, y después de centrifugar la muestra a 500 xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células fueron permeabilizadas con 50  $\mu$ l de una solución detergente (DNA-prep LPR, Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA). A continuación, se añadió 1 ml de una solución con IP (DNA-prep Stain, Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA), se agitó suavemente y se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 37°C, quedando listas las células para ser analizadas con el citómetro de flujo.

## 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores que aparecen en este trabajo están representados en forma de media  $\pm$  desviación típica (DT). Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Toda la estadística se analizó con el programa estadístico R versión 3.4.0 (R Core Team, 2017)<sup>11</sup>, y se contó con la asesoría de la Dra. Itziar Fernández Martínez de la Unidad de Estadística del IOBA

Para evaluar las diferencias entre zonas se utilizó un ANOVA con 3 medidas repetidas en un factor intra-sujeto: Zona. Para comprobar la normalidad de los residuos se utilizó el Test de Shapiro-Wilk y para comprobar la hipótesis de esfericidad, el test de Mauchly, utilizando la corrección  $\epsilon$  de Greenhouse-Geisser en caso de rechazo de la hipótesis. Para llevar a cabo el ajuste de los modelos se utilizó el *package car* de R. y para evaluar las diferencias entre zonas, una vez encontrado un p-valor significativo con el contraste global, se utilizó un contraste t-Student para 2 muestras relacionadas aplicando la corrección de Bonferroni o la alternativa no paramétrica, el *test de Friedman*, en caso de que no fuera posible asumir la normalidad de la variable dependiente. Para comparar los grupos dos a dos, se contrastó la hipótesis de simetría para las medidas repetidas, a partir de un test basado en permutaciones utilizando el *package coin* de R.

## 4. RESULTADOS

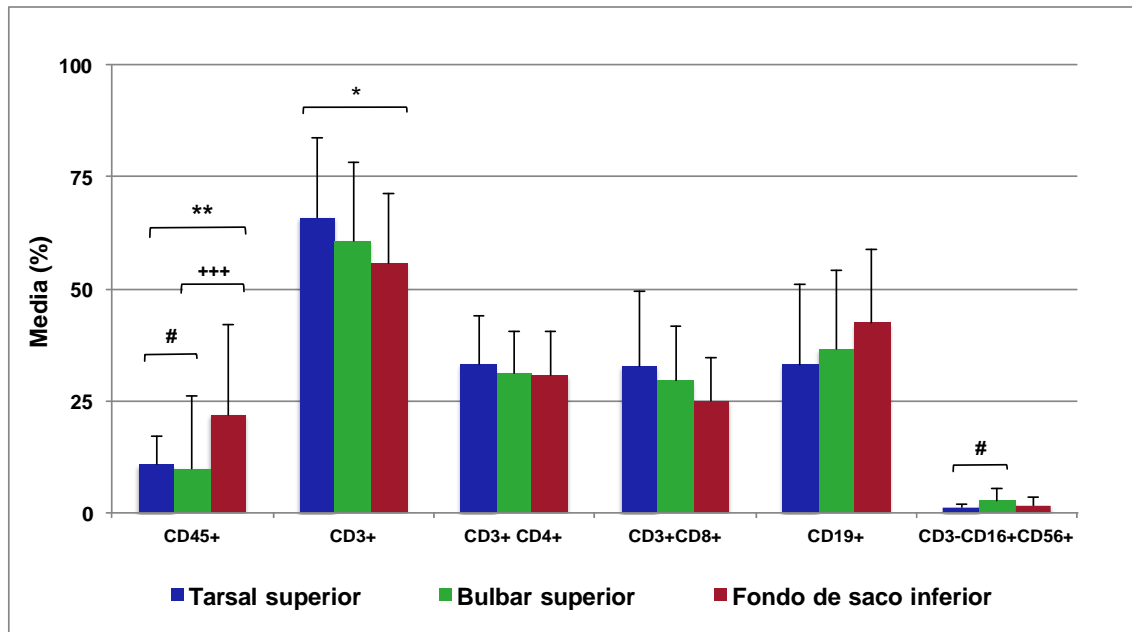
En este capítulo se exponen los principales resultados obtenidos durante la realización de este trabajo.

### 4.1. FENOTIPO CELULAR

El número total de eventos adquiridos en este ensayo fue de  $19.7 \pm 16.3 \times 10^3$  aunque solamente se analizaron  $8.3 \pm 5.9 \times 10^3$  células una vez eliminados los desechos celulares. No hubo diferencias significativas ni en el número de eventos adquiridos ni en el número de células analizadas entre las zonas tarsal superior y fondo de saco inferior pero sí entre la zona tarsal superior y la zona bulbar superior ( $p < 0.001$ ), siendo la zona bulbar superior donde se registraron los porcentajes más bajos tanto de eventos adquiridos como de células analizadas.

La mayor parte de las células conjuntivales obtenidas mediante la citología por cepillado fueron de origen epitelial (CD45-), sin embargo, se observó una considerable población de células CD45+ (IELs) en el epitelio conjuntival de todos estos niños (TS:  $10.82 \pm 6.3\%$ , BS:  $9.87 \pm 16.01\%$ , FSI:  $21.88 \pm 20.2\%$ )(Figura 9). De la misma forma que lo observado con el número de eventos y/o células analizadas, la zona bulbar superior presentó menor infiltración linfocitaria que el resto de las zonas (BS vs TS,  $p < 0.05$ ; BS vs FSI,  $p < 0.001$ ).

Estos leucocitos CD45+ fueron predominantemente linfocitos T (CD3+) y linfocitos B (CD19+), aunque también pudo observarse una pequeña población de linfocitos NK (CD3-DC16/56+)(Figura 9). El porcentaje de linfocitos T en la conjuntiva del fondo de saco inferior ( $55.76 \pm 15.68\%$ ) fue menor que en el resto de zonas (TS:  $65.92 \pm 17.77\%$  y BS:  $60.72 \pm 17.73\%$ ), aunque sólo significativo con respecto a la zona tarsal superior ( $p < 0.05$ ). Por el contrario, el porcentaje de linfocitos B en la zona del fondo de saco inferior ( $42.27 \pm 16.47\%$ ) fue mayor que en regiones superiores, tanto tarsal superior ( $33.07 \pm 18.06\%$ ) como bulbar superior ( $36.43 \pm 17.59\%$ ), pero sin llegar a ser estadísticamente significativo (Figura 9).

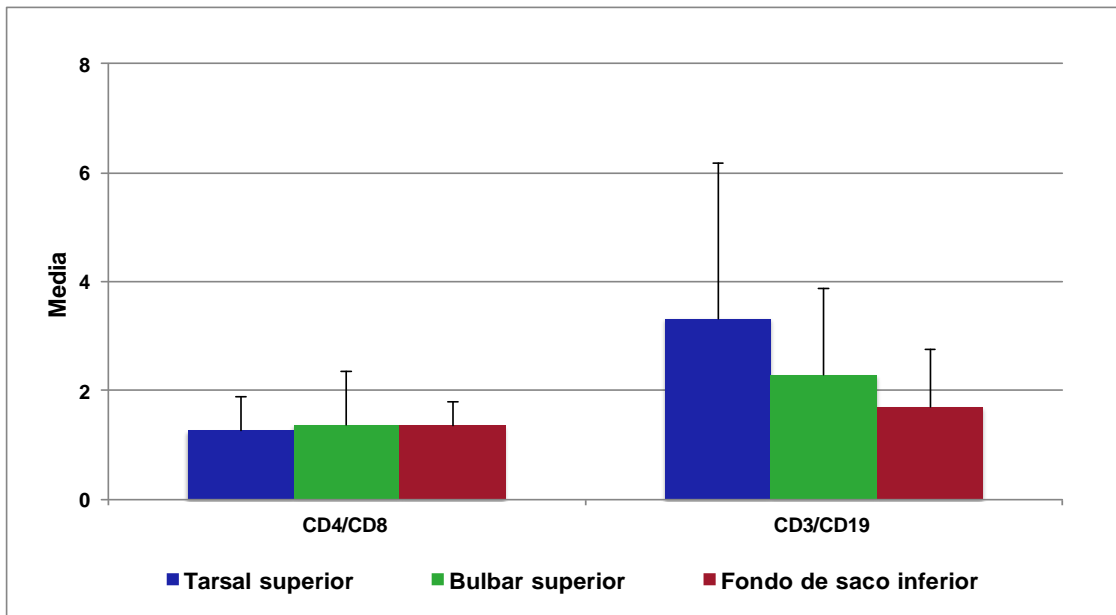


**Figura 9.** Análisis inmunofenotípico de los linfocitos intraepiteliales (IELs) recogidos por citología por cepillado conjuntival en la zona tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior de niños sanos.

\*  $p < 0.05$  TS vs FSI, \*\*  $p < 0.01$  TS vs FSI, +++  $p < 0.001$  BS vs FSI, #  $p < 0.05$  TS vs BS

Consecuentemente, la proporción de linfocitos T/B (CD3/CD19) encontrada en la conjuntiva de estos niños fue menor en la zona del fondo de saco inferior que en las zonas superiores, pero igualmente sin llegar a ser significativa (Figura 10). En cuanto a los subtipos de linfocitos T, no se observaron diferencias significativas, sin embargo, se apreció una ligera tendencia ( $p=0.0603$ ) en la zona fondo de saco inferior que presentó menor porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) ( $25.04 \pm 9.54\%$ ), que las zonas superiores (TS:  $32.74 \pm 16.78\%$  y BS:  $29.44 \pm 12.47\%$ ) (Figura 9). No se observaron diferencias significativas entre las 3 zonas analizadas en cuanto al porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) (Figura 9). Asimismo, la proporción de linfocitos T cooperadores/citotóxicos (CD4/CD8) fue relativamente similar entre las tres zonas, no encontrándose diferencias significativas (Figura 10). Con respecto al porcentaje de linfocitos NK (CD3-DC16/56+), se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la conjuntiva bulbar superior ( $2.57 \pm 2.68\%$ ) y la conjuntiva tarsal superior ( $0.97 \pm 0.88\%$ ) (Figura 9) (Anexo 3).





**Figura 10.** Análisis inmunofenotípico (cociente CD4/CD8 y CD3/CD19) de los linfocitos intraepiteliales (IELs) recogidos por citología por cepillado conjuntival en la zona tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior de niños sanos.

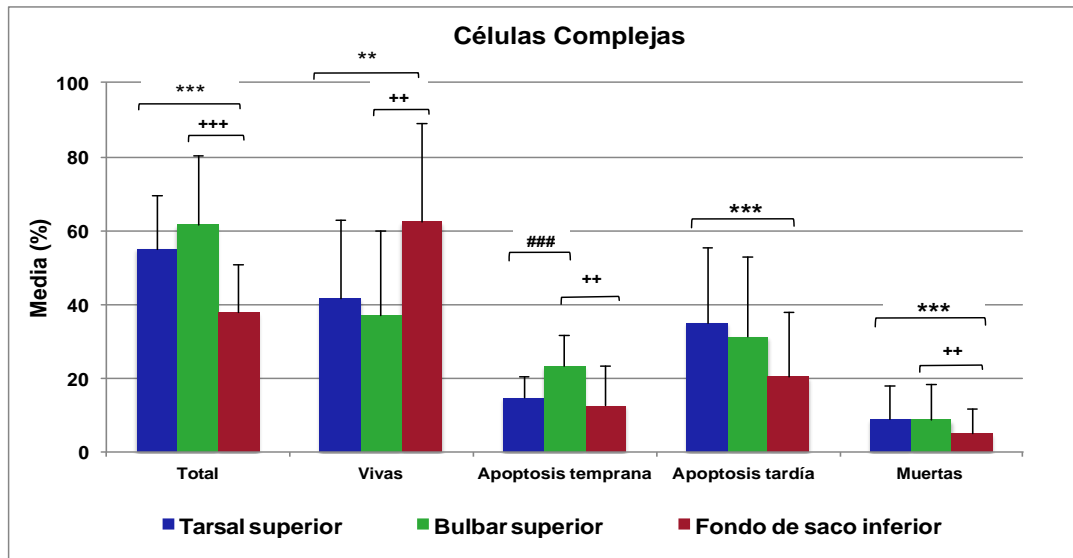
## 4.2. VIABILIDAD CELULAR

El número total de células analizadas en este ensayo varió significativamente entre las 3 zonas estudiadas, siendo la zona de fondo de saco inferior donde se obtuvo un mayor número ( $4.4 \pm 3.6 \times 10^4$  células;  $p < 0.05$ ) y la zona bulbar superior la que registró los menores porcentajes ( $1.0 \pm 2.0 \times 10^4$  células;  $p < 0.001$ ).

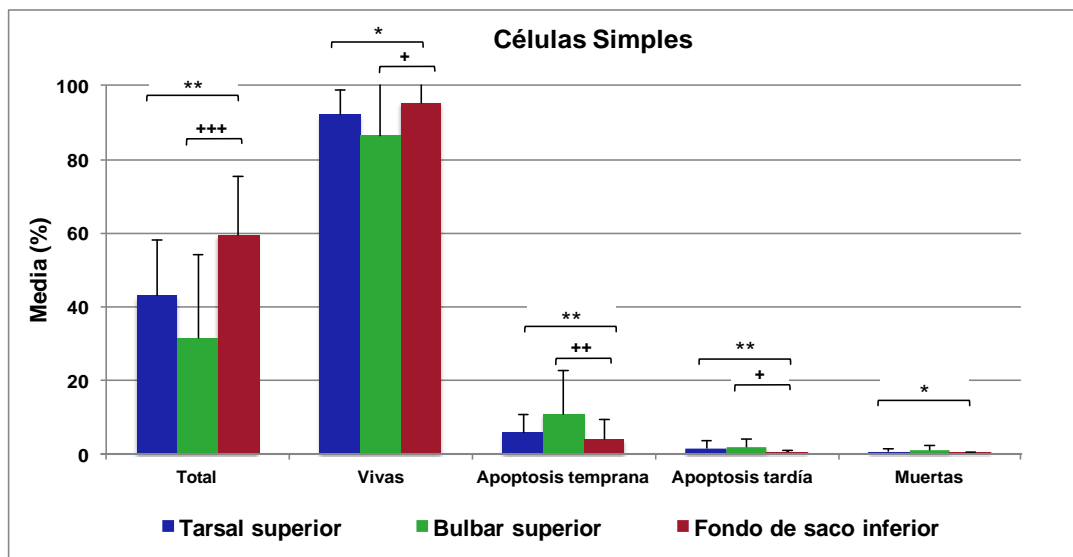
En este ensayo de apoptosis se observaron dos poblaciones celulares totalmente diferentes en cuanto a su tamaño y complejidad celular que fueron analizadas de forma independiente. Por un lado, una población de células más grandes, más complejas y con baja viabilidad, que llamaremos “células complejas” y, por otro lado, una población de células más pequeñas, más simples pero con mayor viabilidad, que llamaremos “células simples”.

El porcentaje de células complejas fue significativamente menor ( $p < 0.001$ ) en la conjuntiva del fondo de saco inferior ( $37.79 \pm 12.94\%$ ) que en las 2 regiones superiores, tanto tarsal ( $54.9 \pm 14.49\%$ ), como bulbar ( $61.4 \pm 18.63\%$ ) (Figura 11). Dentro de esta población celular se observó que la mayor parte estaban vivas (TS:  $41.47 \pm 21.16\%$ , BS:  $36.96 \pm 22.81\%$  y FSI:  $62.16 \pm 26.99\%$ ), siendo significativamente mayor en el fondo de saco inferior que en las zonas superiores, tanto bulbar como tarsal ( $p < 0.01$ ) (Figura 11). Asimismo, en esta misma población, se observó que las zonas superiores (tarsal y bulbar) presentaron mayores porcentajes de apoptosis temprana, tardía y de células muertas, que la zona del fondo de saco inferior (Figura 11).

El porcentaje de células simples, por el contrario, fue significativamente mayor en la zona del fondo de saco inferior ( $59.44 \pm 15.96\%$ ) que en las 2 regiones superiores (TS:  $42.86 \pm 15.29\%$ ,  $p < 0.01$  y BS:  $31.35 \pm 22.74\%$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 12). Dentro de esta población celular, también se observó que la mayor parte de las células simples fueron células vivas con elevados porcentajes en las 3 zonas analizadas (TS:  $92.03 \pm 6.68\%$ , BS:  $86.35 \pm 14.18\%$  y FSI:  $95.14 \pm 6.09\%$ ), siendo significativamente mayor en el fondo de saco inferior que en las zonas superiores tanto bulbar como tarsal ( $p < 0.01$ ) (Figura 12). Consecuentemente, la conjuntiva de fondo de saco inferior presentó los niveles más bajos de células en apoptosis temprana, tardía y células muertas (Figura 12)(Anexo 4).



**Figura 11.-** Análisis de viabilidad de células conjuntivales recogidas por citología por cepillado conjuntival en la zona tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior en niños sanos. \*\*  $p < 0.01$  TS vs FSI, \*\*\*  $p < 0.001$  TS vs FSI, ++  $p < 0.01$  BS vs FSI, +++  $p < 0.001$  BS vs FSI, ###  $p < 0.001$  TS vs BS

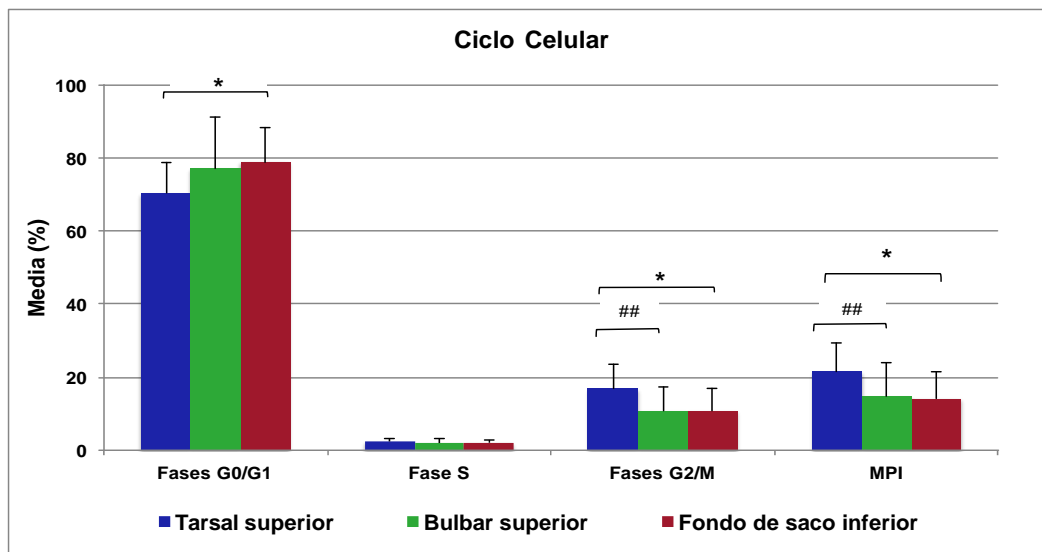


**Figura 12.-** Análisis de viabilidad de células conjuntivales recogidas por citología por cepillado conjuntival en la zona tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior en niños sanos. \*  $p < 0.05$  TS vs FSI, \*\*  $p < 0.01$  TS vs FSI, +  $p < 0.05$  BS vs FSI, ++  $p < 0.01$  BS vs FSI, +++  $p < 0.001$  BS vs FSI

### 4.3. CICLO CELULAR

El número total de células analizadas en este ensayo fue  $1.7 \pm 1.5 \times 10^3$  células, no encontrándose diferencias significativas entre las 3 zonas estudiadas. El ensayo del ciclo celular reveló que la mayor parte de las células obtenidas por citología por cepillado se encontraban en fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (fase de crecimiento o pre-ciclo), seguidas por fases G<sub>2</sub>/M (fase de mitosis) y en último lugar por células en fase S (fase de síntesis) (Figura 13).

El porcentaje de células en fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fue significativamente mayor en la conjuntiva del fondo de saco inferior que en la zona tarsal superior ( $p < 0.05$ ) (Figura 13). El porcentaje de células en fase-S fue similar en las 3 zonas analizadas sin significación estadística. Sin embargo, hubo diferencias significativas en la fase de mitosis (G<sub>2</sub>/M), con un porcentaje superior de estas células en la zona tarsal superior ( $16.83 \pm 6.8\%$ ) que el resto de zonas, tanto bulbar superior ( $10.82 \pm 6.44\%$ , con  $p < 0.01$  TS vs BS) como fondo de saco inferior ( $10.82 \pm 5.91\%$ , con  $p < 0.05$  TS vs FSI). Del mismo modo, el índice medio proliferativo (MPI) del epitelio conjuntival fue también significativamente mayor en la zona tarsal superior ( $21.52 \pm 7.69$ ) que en el resto de zonas, tanto bulbar superior ( $14.75 \pm 9.26\%$ , con  $p < 0.01$  TS vs BS) como fondo de saco inferior ( $14.15 \pm 7.19\%$ , con  $p < 0.05$  TS vs FSI) (Figura 13) (Anexo 5).



**Figura 13.** Análisis del contenido de ADN (ciclo celular) de células conjuntivales recogidas por citología por cepillado conjuntival en la zona tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior en niños sanos.

\*  $p < 0.05$  TS vs FSI, \*\*  $p < 0.01$  TS vs BS

## 5. DISCUSIÓN

Es evidente que la presencia del CALT juega un papel crucial en los mecanismos defensivos de la SO humana, estando presente no sólo cuando tiene lugar el proceso inflamatorio sino también de forma regular, participando en la secreción de mediadores inmunológicos así como en la regulación de la respuesta inmune local. Nuestro estudio se centra en el componente epitelial del CALT, y más concretamente en la población de IELs presentes en dicho compartimento en un grupo poblacional de niños sanos. Hasta el momento, todos los estudios publicados sobre el CALT se han realizado en población adulta, no existiendo ningún trabajo en la bibliografía que incluya sujetos con este rango de edad, siendo por tanto un estudio pionero en la caracterización de este tejido.

En los últimos años, la técnica más utilizada para llevar a cabo todos estos estudios ha sido la citología de impresión conjuntival (CIC). En este contexto, varios autores demostraron que la CIC era capaz de recoger un número muy elevado de células de la SO<sup>12</sup>. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que la citología por cepillado conjuntival<sup>8</sup><sup>10</sup>, es capaz de recoger mayor cantidad de células directamente en suspensión, con las consiguientes ventajas a la hora de su posterior caracterización. Además, se ha demostrado que el cepillado es capaz de aislar poblaciones celulares más viables que la CIC, manteniendo intacta la morfología de las células recuperadas.

Una vez recogidas las células de la SO, se procedió a su posterior caracterización mediante citometría de flujo para establecer la distribución topográfica de los IELs que residen en la conjuntiva del niño sano. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad y, por supuesto, cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo. La citometría de flujo se ha utilizado para estudiar diferentes patologías de la SO, especialmente de origen inmunológico o inflamatorio, como el síndrome de ojo seco<sup>10</sup> y las conjuntivitis alérgicas. También se ha utilizado en la identificación de células madre, caracterización fenotípica, análisis de viabilidad, análisis de proliferación<sup>8,9</sup>, etc. La combinación de la citología por cepillado junto con el análisis

por citometría de flujo constituye una herramienta útil para determinar la presencia de IELs en el epitelio conjuntival humano e investigar la fisiopatología de la SO.

El análisis inmunofenotípico mostró que la mayor parte de las células recuperadas de la conjuntiva de niños sanos tienen estirpe epitelial (CD45-), como ya se había demostrado en estudios anteriores<sup>9</sup>. Nuestros resultados también revelaron la existencia de una población de células CD45+, IELs, intercalada entre las distintas capas epiteliales de la conjuntiva del niño sano, como también se había descrito en trabajos anteriores. Sin embargo, en el presente trabajo se observaron niveles de infiltración linfocitaria significativamente más altos que los encontrados en la población adulta<sup>8</sup>, principalmente en la zona del fondo de saco inferior. Una de las observaciones realizadas por Reinoso et al.<sup>8</sup> (2012), fue que los elevados niveles de IELs que encontraron en el fondo de saco inferior probablemente puedan ser debidos al excesivo tamaño del cepillo, el cual no permite recoger células exclusivas de esta zona sino que englobaría también a células de la conjuntiva tarsal y bulbar inferior, incrementando de este modo el porcentaje de IELs, aspecto que parece verse incrementado en la población pediátrica debido a las dimensiones del ojo del niño. El diámetro anteroposterior del ojo en un niño oscila alrededor de unos 17mm y en el adulto oscila aproximadamente entre los 23-25mm, y lo mismo sucede con los anejos oculares que suelen tener menos dimensiones que en el adulto, aspectos que podrían explicar los resultados encontrados en este trabajo.

Nuestros resultados también demostraron que la mayor parte de los IELs que residen en el epitelio de la conjuntiva del niño sano están predominantemente compuestos de linfocitos T. Estos resultados concuerdan con lo anteriormente publicado donde se indica el predominio de los linfocitos T sobre los B<sup>7,8</sup>. Asimismo, en este estudio observamos una infiltración de linfocitos B mucho mayor que lo descrito en publicaciones anteriores, fundamentalmente en la zona de fondo de saco inferior. Teniendo en cuenta que el grosor del epitelio conjuntival no es igual en todas las regiones topográficas de la conjuntiva, estos hallazgos podrían sugerir que en esta zona, al ser más delgada, es posible que el cepillado conjuntival pueda ocasionalmente cruzar la membrana basal del epitelio y alcanzar la lámina propia con el consiguiente incremento de linfocitos B procedentes de folículos linfoides<sup>8</sup>.

En cuanto a los subtipos de linfocitos T, tanto cooperadores (CD3+CD4+) como citotóxicos (CD3+CD8+), nuestros resultados no mostraron diferencias, siendo similares en las 3 zonas analizadas. Consecuentemente, la proporción linfocitos T cooperadores/citotóxicos (CD4/CD8) fue muy pareja en las tres zonas y estuvo entorno a 1. Estos hallazgos se encuentran en discordancia con resultados de estudios previos, donde se menciona un predominio de los linfocitos T citotóxicos frente a los cooperadores en el epitelio conjuntival, con proporciones  $CD4/CD8 < 0.5^7$ . En cuanto a la proporción de linfocitos T/B (CD3/CD19), es necesario resaltar que fue menor en la zona del fondo de saco inferior que en las zonas superiores, sugiriendo un elevado porcentaje de linfocitos B en el fondo de saco inferior. Teniendo en cuenta lo comentado líneas arriba acerca de las diferencias en el grosor del epitelio conjuntival entre las zonas, podríamos sugerir que dicho incremento pudiese ser debido a contaminación de la muestra con sangre considerando que dicha zona es más delgada.

En cuanto al análisis de la viabilidad celular, cabe recordar que este parámetro nos da información sobre el recambio celular de un tejido. Para que éste se produzca con garantías es esencial un mecanismo fisiológico de muerte celular programada denominado apoptosis, que juega un rol crucial tanto en el mantenimiento de la homeostasis celular como en la regulación de la respuesta inmune<sup>13</sup>. Nuestros resultados corroboraron lo que se había descrito en estudios anteriores<sup>14</sup>, es decir, la existencia de dos poblaciones celulares totalmente diferenciadas por su tamaño y complejidad citoplasmática: Una población compuesta por células grandes, más complejas y de baja viabilidad que llamamos “células complejas”; y por otro lado, otra población compuesta de células pequeñas, menos complejas, pero con mayor viabilidad que llamamos “células simples”. Un aspecto a destacar en nuestro estudio, son las diferencias encontradas entre las zonas superiores (bulbar/tarsal) y la zona del fondo de saco inferior. Observamos un mayor porcentaje de células vivas en el fondo de saco inferior con bajos porcentajes de apoptosis y células muertas, contrariamente a lo evidenciado en las zonas superiores; asimismo se observó que el mayor porcentaje de células simples se encuentran en el fondo de saco inferior. Estos resultados nos podrían indicar que en esta zona topográfica de la conjuntiva del niño sano existiría un retardo en la tasa de recambio celular que podría asociarse con el hecho de que en esta zona las células están menos diferenciadas (menor tamaño y granularidad).

Estos resultados se asemejan a estudios anteriores donde se evidencia la expresión de proteínas pro-apoptóticas en las capas epiteliales superficiales (población de “células complejas”) y factores inhibidores de apoptosis en las capas más basales del epitelio conjuntival (población de células “simples”)<sup>15,16</sup>. A la luz de estos resultados, se podría interpretar que el grupo de “células complejas” correspondería a las células localizadas en las capas más superficiales de la conjuntiva; mientras que el grupo de “células simples,” podría ser que correspondan a las células que provengan de capas más profundas o basales de la conjuntiva e incluirían a los IELs y estén probablemente menos diferenciadas.

En cuanto a la proliferación celular (ciclo celular), en este estudio medimos por citometría de flujo, la cantidad de ADN de las células obtenidas por citología por cepillado, y en consecuencia la etapa del ciclo celular en la que se encuentran, de manera que pueda ser utilizado como marcador del estado proliferativo. El uso del citómetro de flujo para contabilizar el DNA celular y así diferenciar en qué fase del ciclo celular se encuentran las células ha sido ampliamente utilizado<sup>16</sup>. Nuestros resultados demostraron que la mayor parte de las células analizadas se encuentran en fases de crecimiento o pre-ciclo ( $G_0/G_1$ ), seguidas de aquellas con capacidad proliferativa (fases S y  $G_2/M$ ). En general, estos resultados son similares a los obtenidos por Karukonda et al.<sup>17</sup>, en un estudio realizado sobre conjuntivas sanas y conjuntivas con pterigium. Estos autores observaron que en individuos sanos, el 80% de las células se encontraban en fases  $G_0/G_1$ , el 14% en fase S y el 5% en fases  $G_2/M$ . Los valores de la fases  $G_0/G_1$  son similares a los obtenidos en nuestro estudio, sin embargo, nosotros obtuvimos mayores porcentajes de células en fase de mitosis ( $G_2/M$ ) pero menores en la fases de síntesis que los obtenidos por estos autores. Bien es cierto, que el estudio de referencia no estudió individuos en edad pediátrica, por lo que estas diferencias podrían deberse a la edad de los sujetos.

En nuestro estudio, se evidenció que la zona del fondo de saco inferior, presentó los niveles más altos de células en fase  $G_0/G_1$  y un menor índice de proliferación (seguidos de cerca de la zona bulbar superior), sugiriendo que esta zona podría ser el sitio predominante de la localización de las células madres epiteliales de la conjuntiva del niño sano. Estos resultados se asemejan a otros estudios<sup>18,19</sup>, en los que las células madre conjuntivales de ratón y conejo se encuentran concentradas en el fondo de saco inferior. Podríamos decir, que el epitelio conjuntival del fondo de saco inferior es el área preferida para las células



madres de la conjuntiva del niño sano, ya que esta área ofrece una mayor protección física. Otros estudios en adultos<sup>8,20</sup>, sugieren la presencia de células madres en la conjuntiva bulbar. Teniendo en cuenta ambos hallazgos, podría ser que las posibles localizaciones de las células madres epiteliales de la conjuntiva sana, se encuentren distribuidas uniformemente en la conjuntiva del fondo de saco inferior y la bulbar<sup>20</sup>, o que su localización varíe en función de la edad.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. La citología por cepillado conjuntival es una herramienta válida para obtener células conjuntivales de la SO en niños sanos, sin embargo, debido a las dimensiones del ojo del niño, sería recomendable el uso de cepillos más pequeños en estudios posteriores.
2. En base a nuestros resultados, se refuerza la idea de la presencia del CALT como componente regular de la conjuntiva humana sana, no sólo en la población adulta como ya se había descrito, sino también en la edad pediátrica, donde queda demostrada la existencia de una población de IELs, mayoritariamente linfocitos T y B, infiltrando el epitelio de la conjuntiva del niño sano. También queda ampliamente demostrada la presencia en este epitelio de dos poblaciones celulares totalmente diferenciadas por su viabilidad, tamaño y complejidad celular, así como el predominio de células en fase de crecimiento.
3. El componente epitelial del CALT varía funcional y fenotípicamente en función de la región topográfica analizada, siendo las zonas tarsal superior y fondo de saco inferior las que presentan mayores diferencias, tanto en su fenotipo como en su viabilidad/proliferación, y sugiriendo por tanto que cada zona topográfica podría jugar un papel específico en la regulación de la respuesta inmune en la conjuntiva.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Tomasi TBJ. Introduction: an overview of the mucosal immune system. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, eds. *Handbook of mucosal Immunology*. San Diego, CA: Academic Press; 1994; 3-8.
2. Heneghan AF, Pierre JF, Kudsk KA. JAK-STAT and intestinal mucosal immunology. *JAKSTAT*. 2013 Oct 1; 2(4):e25530.
3. Brandtzaeg P. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. *Immunol Invest*. 2010; 39(4-5):303-55
4. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr; 3(4):331-41.
5. Knop E, Knop N. Influence of the eye-associated lymphoid tissue (EALT) on inflammatory ocular surface disease. *Ocul Surf* 2005; 3:S180–S186.
6. Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat* 2005; 206:271–85.
7. Knop E, Knop N. Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in the human eye- Components and topographical distribution. *Ophthalmic Res*. 1999a. 31 (Suppl.), 156.
8. Reinoso R, Martín-Sanz R, Martino M, Mateo ME, Blanco-Salado R, Calonge M, Corell A. Topographical distribution and characterization of epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in the human ocular mucosa. *Mucosal Immunol*. 2012;5:455-67.
9. Martínez-Osorio H, Calonge M, Corell A, Reinoso R, López A, Fernández I, San José EG, Diebold Y. Characterization and short-term culture of cells recovered from human conjunctival epithelium by brush cytology. *Mol Vis*. 2009; 15:2185-95.
10. Reinoso R, Calonge M, Castellanos E, Martino M, Fernández I, Stern ME, Corell A. Differential cell proliferation, apoptosis, and immune response in healthy and evaporative-type dry eye conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52:4819-28.
11. R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. (21/04/2017)

12. Calonge M, Diebold Y, Saez V, Enríquez de Salamanca A, García-Vázquez C, Corrales RM, Herreras JM. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp Eye Res* 2004; 78:457-72.
13. Gupta S. Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging. *Immunol Rev.* 2005 Jun; 205:114-29.
14. Stern ME, Siemasko KF, Niederkon J. The Th1/Th2 paradigm in ocular allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 5:446-450.
15. Giebel J, Woenckhaus C, Fabian M, Tost F. Age-related differential expression of apoptosis-related genes in conjunctival epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 2005 Aug; 83(4):471-6.
16. Tan DT, Tang WY, Liu YP, Goh HS, Smith DR. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctival and pterygium. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:212-216.
17. Karukonda SR, Thompson HW, Beuerman RW, Lam DS, Wilson R, Chew SJ, Steinemann TL. Cell cycle kinetics in pterygium at three latitudes. *Br J Ophthalmol* 1995; 79(4):313-317.
18. Wei ZG, Wu RL, Lavker RM, Sun TT. In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:1814-28.
19. Lavker RM, Wei ZG, Sun TT. Phorbol ester preferentially stimulates mouse fornical conjunctival and limbal epithelial cells to proliferate in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:301-7.
20. Pellegrini, G. et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface . *J. Cell. Biol.* 145, 769 – 82 .1999.

## ANEXOS

la respuesta inmune.

### Anexo 1: Formulario de Consentimiento informado

#### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

<b>Título del Estudio:</b>	Caracterización del componente epitelial del CALT en niños sanos
<b>Nº de estudio:</b>	IOBAXXX-2013
<b>Coordinadores:</b>	Dra. Margarita Calonge (Tf. 983 184 763); Dr. Roberto Reinoso Tapia (Tf. 983 42 3238).
<b>Centro:</b>	Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid. Campus Miguel Delibes, Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

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

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

#### 1. Objetivo del estudio

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

#### 2. Participación voluntaria

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

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

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

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

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

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

#### **5. Confidencialidad**

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **7. Riesgos**

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

## DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

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

**Nº de estudio:** IOBAXXX-2013

Al firmar abajo, yo declaro que:

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

### Nombre del paciente

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

### Nombre del representante legalmente autorizado

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

### Nombre del Investigador

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

### Nombre de la persona que participó en la discusión del CI

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

**Anexo 2:** Informe del comité ético de investigación clínica: Área de Salud Valladolid – Este (CEIC-VA-ESTE-HCUV)





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

Valladolid 21 de Febrero de 2013

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

PI-13-63	CARACTERIZACIÓN DEL COMPONENTE EPITELIAL DEL CALT EN NIÑOS SANOS CODIGO: HCUV - PI-13-63 ACRONIMO SI LO TIENE (no tiene)	IOBA Roberto Reinoso Tapia - Margarita Calonge Cano Otros Investigadores en IOBA: Dra. Amalia Enríquez de Salamanca Dra. Ana Isabel Vallelado Soledad Rubio Martínez Recibido: 13-02-2013
----------	--	--

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

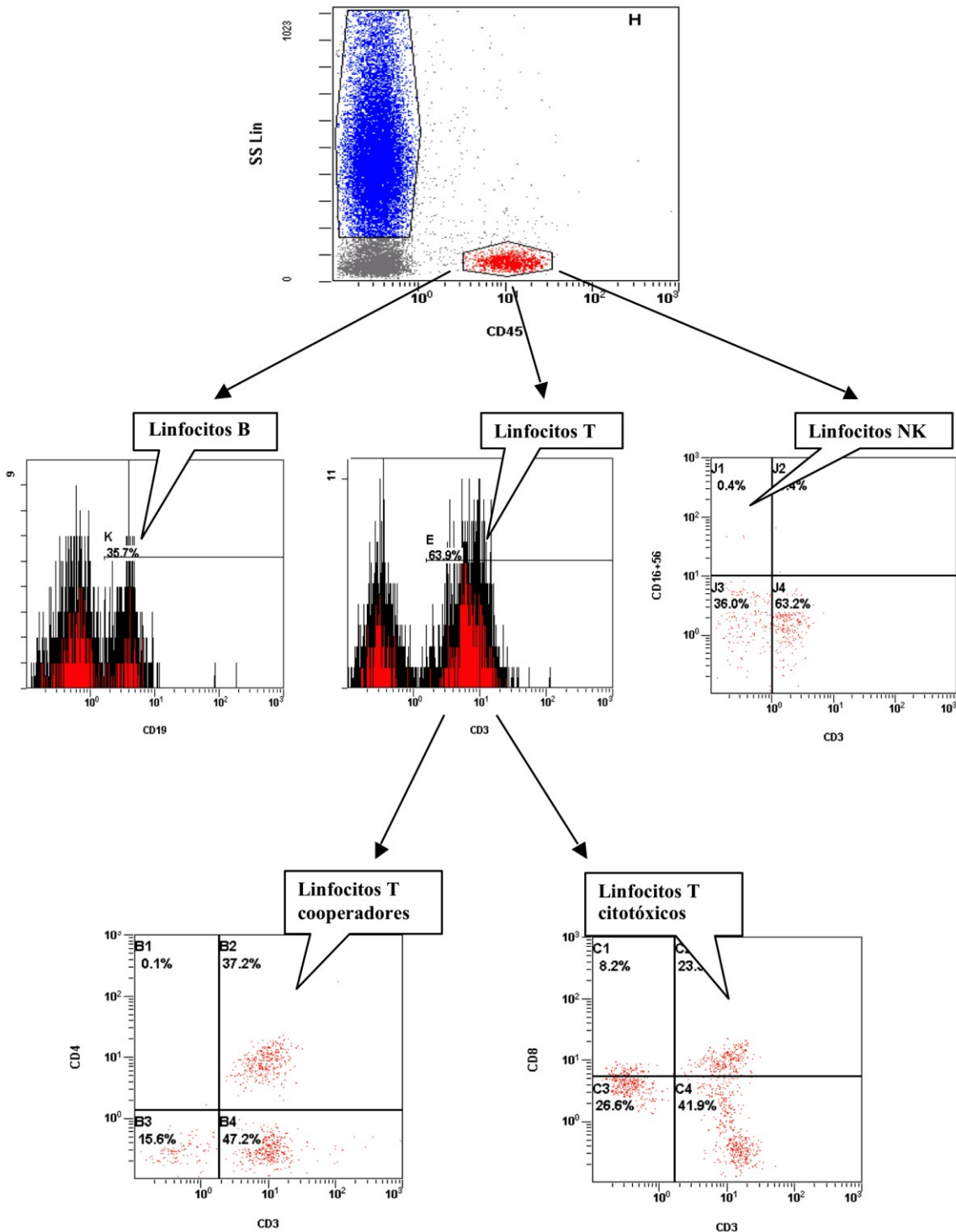
Considerando que el Proyecto contempla los Convenios y Normas establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética, se hace constar el **informe favorable** y la **aceptación** del Comité Ético de Investigación Clínica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

Un cordial saludo.

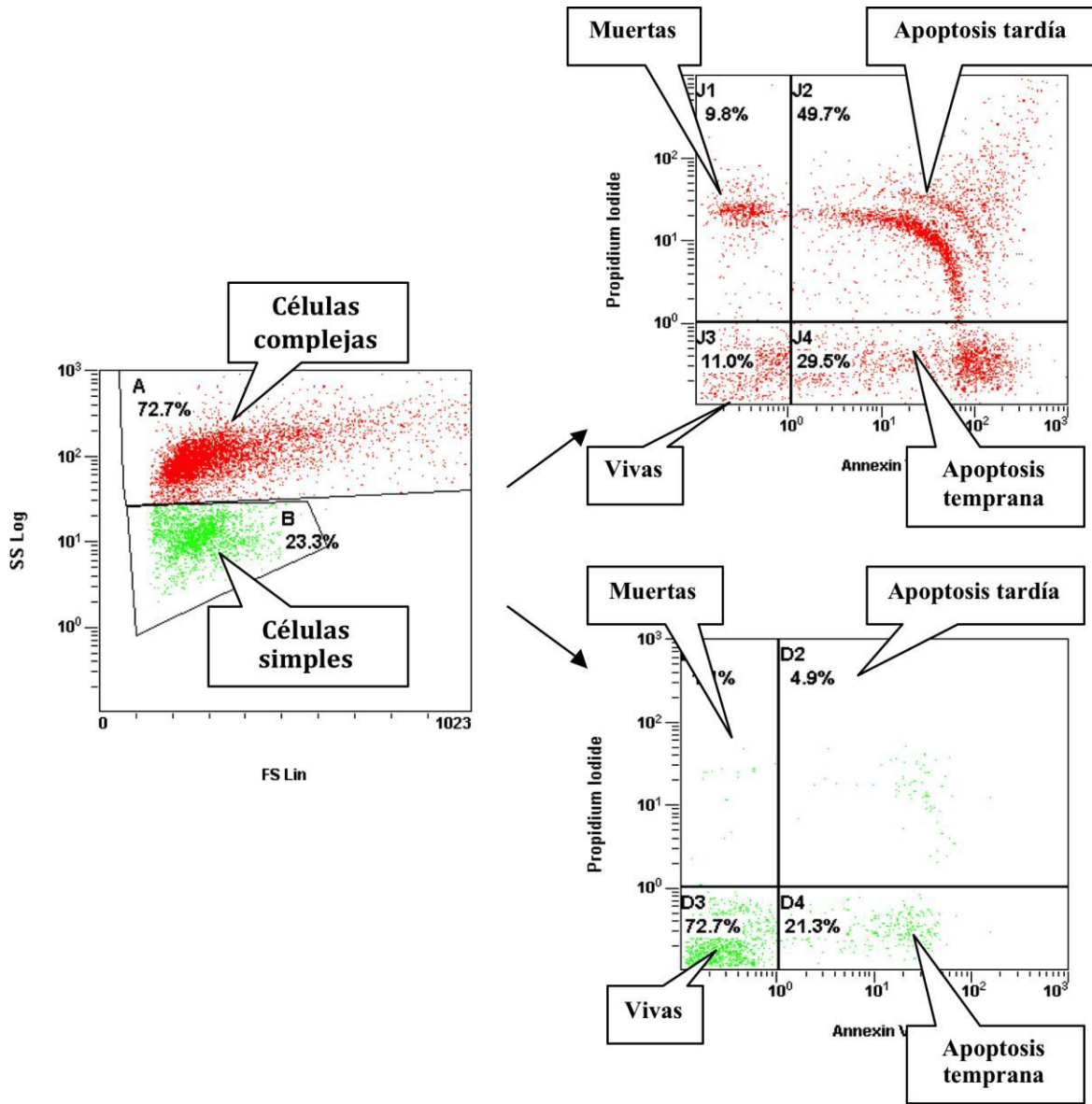
F. Javier Álvarez

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

**Anexo 3:** Ejemplo representativo de un análisis de fenotipo de células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado



**Anexo 4:** Ejemplo representativo de un análisis de viabilidad de células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado



**Anexo 5:** Ejemplo representativo de un análisis de ciclo celular de células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado

