



EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA DE CONJUNTIVITIS ADENOVÍRICA

Trabajo de Fin de Máster “Inmunología y Superficie Ocular” presentado por

Raquel Martín Sanz

Tutores: Dr. Roberto Reinoso Tapia

Dr. Alfredo Corell Almuzara

Valladolid, Septiembre 2013

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

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

D. Roberto Reinoso Tapia y Alfredo Corell Almuzara

en calidad de Tutores de la alumna

Dña. **Raquel Martín Sanz**

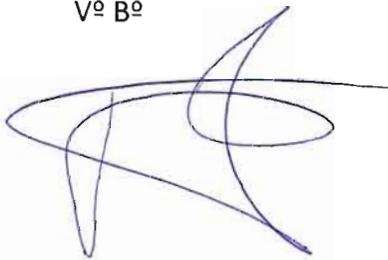
del Máster en: **Inmunología y superficie ocular**

Curso académico: 2012-2013

CERTIFICA haber leído la memoria del Trabajo de Fin de Máster titulado “**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA DE CONJUNTIVITIS ADENOVÍRICA**” y estar de acuerdo con su exposición pública en la convocatoria de Septiembre

En Valladolid a 27 de Agosto de 2013

Vº Bº



Fdo.: Roberto Reinoso Tapia

El Tutor



Fdo.: Alfredo Corell Almuzara

El Tutor

Índice

Resumen.....	1
Capítulo 1. Introducción.....	3
1.1. Conjuntivitis víricas: Adenovirus.....	3
1.2. Reacción inmune ocular: Alteraciones inmunológicas.....	9
Capítulo 2. Hipótesis de trabajo y objetivos.....	12
Capítulo 3. Material y métodos.....	14
3.1. Sujetos del estudio.....	14
3.2. Obtención de células de la superficie ocular.....	16
3.3. Caracterización celular de la población obtenida.....	17
3.4. Extracción de ADN y realización de PCR adenovírica.....	21
3.5. Análisis estadístico.....	23
Capítulo 4. Resultados.....	24
4.1. Individuos sanos vs. pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica.	24
4.2. Pacientes con conjuntivitis adenovírica confirmada vs. pacientes no confirmados	31
Capítulo 5. Discusión general.....	36
Capítulo 6. Conclusiones.....	40
Capítulo 7. Bibliografía.....	41
Capítulo 8. Anexos.....	45

RESUMEN

La conjuntivitis adenovírica es una patología oftalmológica extremadamente frecuente producida por múltiples serotipos de adenovirus humano. Su difícil diagnóstico etiológico a menudo retrasa la instauración de un tratamiento específico y eficaz por lo que frecuentemente aparecen complicaciones graves que en muchos casos producen secuelas definitivas en el órgano de la visión. El objetivo principal de este estudio es buscar un biomarcador que ayude a los oftalmólogos en el diagnóstico de la conjuntivitis adenovírica. Para ello, se seleccionaron 23 pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica y 23 individuos sanos (pareados en edad y sexo). Posteriormente, se procedió a la recolección de células de la superficie ocular mediante un método mínimamente invasivo como es la citología por cepillado. Por último, se caracterizó, mediante citometría de flujo, todas las células conjuntivales obtenidas (epiteliales e inmunes) y se analizó, mediante técnicas de biología molecular, el ADN extraído de todos los sujetos con el fin de confirmar el diagnóstico clínico de esta patología. Nuestros resultados demostraron que el sistema inmune asociado a la mucosa ocular de los pacientes con conjuntivitis adenovírica presenta características fenotípicas y funcionales totalmente diferentes a las encontradas en sujetos sanos. Sin embargo, no fue posible encontrar un biomarcador útil para este tipo de patología. Otro resultado obtenido fue que no todas las conjuntivitis atribuidas a este tipo de virus son debidas a tal patógeno sino que en muchas de ellas probablemente el agente causal sea otro agente infeccioso.

1. INTRODUCCIÓN

La conjuntivitis es una inflamación de la conjuntiva bulbar y/o tarsal causada por la acción de agentes infecciosos, alérgicos, tóxicos o mecánicos. Se trata de la patología que con mayor frecuencia afecta al globo ocular y la que más volumen de consultas origina tanto a nivel de atención primaria como en atención especializada. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son escozor ocular, sensación de cuerpo extraño, hiperemia, lagrimeo, fotofobia y secreción, ya sea serosa, fibrosa o purulenta. El diagnóstico de las conjuntivitis es eminentemente clínico, pero en muchas ocasiones se realiza de forma incorrecta, basándose únicamente en pruebas/tests clínicos, por lo que para un mejor y más completo diagnóstico, éste debe ser complementado con pruebas de laboratorio, principalmente del tipo inmunológico y molecular, y más aún, cuando ha sido ampliamente demostrado que este desorden provoca alteraciones en el sistema inmune asociado al ojo.

1.1. CONJUNTIVITIS VÍRICAS

Las conjuntivitis víricas son aquellas provocadas por agentes virales. Se engloban dentro de las conjuntivitis foliculares agudas puesto que el dato clínico más característico es la reacción folicular de la conjuntiva, aunque esto puede estar presente también en infecciones por *chlamydia* o conjuntivitis tóxicas (Tabla 1).

Tabla 1: Agentes causales de las conjuntivitis foliculares.

AGUDAS	CRÓNICAS
Adenovirus	Genero <i>Chlamydia</i>
De inclusión	<i>Molluscum</i> contagioso
Herpes simple y herpes zoster	<i>Moraxella</i>
Paramyxovirus	Síndrome óculoglandular de Parinaud
Poxvirus	Enfermedad de Lyme
Picornavirus	Conjuntivitis tóxicas
Orthomyxovirus	Foliculosis
Togavirus	

Los folículos son agregados de linfocitos rodeados de células plasmáticas y mastocitos en el estroma conjuntival superficial (Figura 1). En la biomicroscopía de

polo anterior se evidencian como lesiones blanco-amarillentas sobreelevadas, de forma oval con vasos sanguíneos desplazados a la periferia.

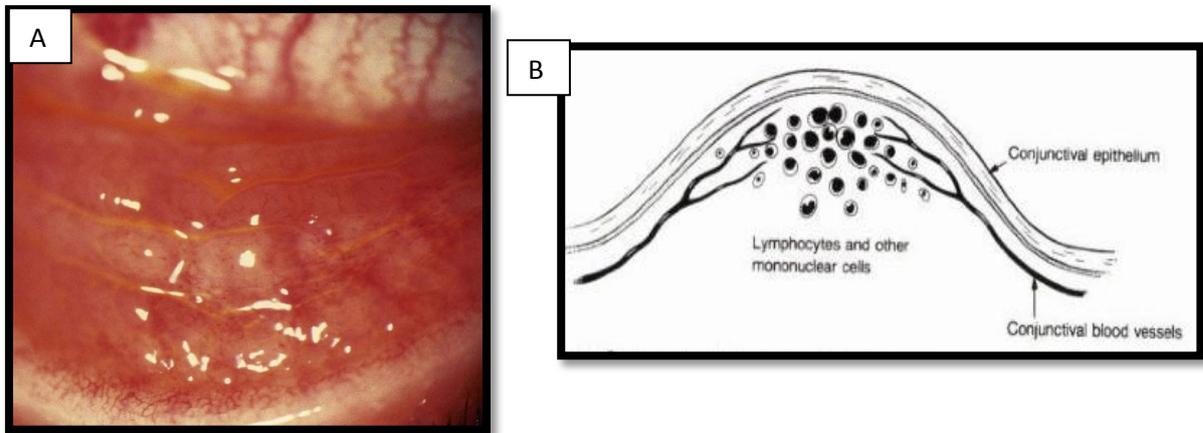


Figura 1: A: Folículos en conjuntiva en fondo de saco inferior; B: Esquema de folículo linfoide

Tanto los virus RNA como DNA, pueden infectar la conjuntiva. Los primeros normalmente causan cuadros más leves, mientras que los últimos pueden llegar a amenazar la visión. Los virus más habituales son virus respiratorios, como adenovirus, picornavirus, etc., debido por una parte al gran tropismo que tienen por la superficie ocular (Tabla 2)¹ y en segundo lugar a la estrecha relación anatómica existente entre la superficie ocular y los epitelios respiratorios. De hecho, existe una relación muy estrecha ente el sistema linfoide asociado a las mucosas de la conjuntiva y de la mucosa nasal². La similitud en la distribución de receptores celulares para estos virus entre ambos epitelios, ocular y respiratorios explica el tropismo hacia la superficie ocular.¹ Se calcula que suponen el 30% de las conjuntivitis, presentándose con mayor frecuencia en los meses de otoño e invierno. Todas ellas presentan una clínica similar con ligeros matices en la intensidad de los signos y los síntomas.

Tabla 2. Principales virus respiratorios causantes de infecciones oculares.

VIRUS	SUBTIPOS	TROPISMO	ENF OCULAR
Adenovirus	Especie D	Ocular	Queratoconjuntivitis epidémica
	Especie B, C y E	Respiratorio	Ocasional. Conjuntivitis folicular aguda o fiebre faringo conjuntival
Virus influenza	H7	Ocular	Conjuntivitis
	H1, H3, H5	Respiratorio	Rara
Virus respiratorio sinticial	NA	Respiratorio	Ocasional junto con el cuadro respiratorio
Coronavirus	N1.63	Respiratorio	Rara
	SARS	Respiratorio	No casos reportados
Rinovirus	NA	Respiratorio	Rara
Metapneumovirus humano	NA	Respiratorio	Rara

NA: no aplicable: sin asociación de serotipo con complicaciones oculares

Dentro de las conjuntivitis víricas, el agente causal más frecuentemente implicado es el **adenovirus**³ Se trata de un virus DNA de morfología icosaédrica carente de envoltura (Figura 2).

Existen 55 serotipos⁴ clasificados en HAdV de la A a la G según las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos⁵, aunque el número de adenovirus descubierto llega hasta 60, teniendo en cuenta la gran capacidad recombinante que existe entre las especies⁶⁻⁷. Puede causar infecciones en distintas mucosas⁸ como en el aparato respiratorio (especies HAdV-B y C), digestivo (HAdV-F, serotipos 40 y 41) y conjuntiva (serotipo 3 en HAdV-B, serotipo 4 en HAdV-E, serotipo 8, 19a, 37, 53 y 54 en HAdV-D), en función de las moléculas por las que muestren tropismo^{2,9}. Sin embargo casi cualquier serotipo puede causar afección ocular en forma de conjuntivitis folicular aguda¹ (Tabla 2). La carga viral de muestras conjuntivales y lágrima de pacientes con conjuntivitis por adenovirus es mayor que en el caso de infecciones respiratorias o digestivas, lo que confiere a las conjuntivitis mayor riesgo de producir infecciones familiares o nosocomiales¹⁰. Además es altamente contagiosa, transmitiéndose por

contacto íntimo con secreciones oculares, respiratorias, etc. Es frecuente la contaminación de instrumental en consultas de oftalmología. Los adenovirus presentan una persistencia en fómites de hasta siete semanas y una alta resistencia a la acción de los desinfectantes¹¹⁻¹². Es por ello que se considera una infección nosocomial y su diagnóstico precoz es esencial para evitar epidemias¹³. Las infecciones ocurren durante todo el año, pero los brotes epidémicos, ocurren con más frecuencia en invierno y en primavera¹⁴.

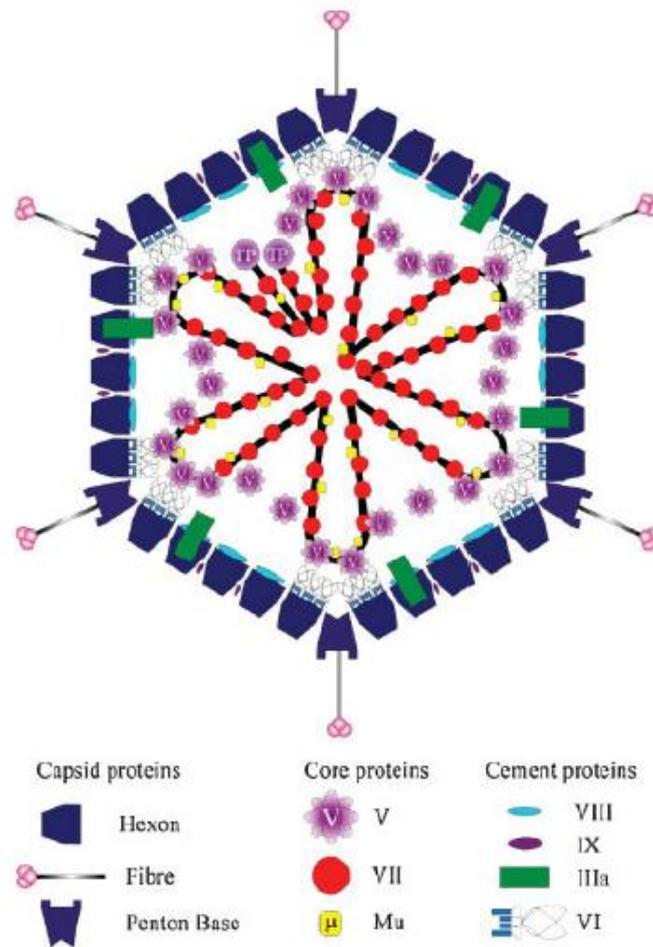


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de un adenovirus. Lenaerts et al., 2008.

Tabla 2. Serotipos de Adenovirus.

SEROTIPO	CARACTERISTICAS
8, 19, 37	Queratoconjuntivitis epidémica y esporádica
11, 37	Conjuntivitis hemorrágica aguda epidémica
1-11, 13-16, 29	Queratoconjuntivitis esporádica
2, 3, 6, 7	Fiebre adenofaringo conjuntival
1, 2, 3, 5	Cepas endémicas.
3, 7	Conjuntivitis de las piscinas, Fiebre adenofaringo conjuntival
4, 7, 21	Enfermedad respiratoria aguda epidémica del adulto
40, 41	Diarrea nosocomial pediátrica

Aunque cada serotipo presenta un tropismo tisular específico que va a determinar el cuadro clínico¹⁵, muchas veces varios serotipos pueden causar un mismo cuadro y el mismo cuadro puede ser causado por varios serotipos diferentes. Por esta razón algunos autores agrupan a todas las afecciones oculares causadas por adenovirus bajo la denominación de queratoconjuntivitis adenovíricas¹³.

Clásicamente, las infecciones oculares por adenovirus se han clasificado en 3 formas clínicas diferentes: (1) fiebre faringoconjuntival (PCF); (2) queratoconjuntivitis epidémica (EKC) y (3) conjuntivitis folicular aguda no específica¹⁶. La infección puede ser uni o bilateral. Independientemente del serotipo que las origine, existen una serie de síntomas comunes consistentes en hiperemia conjuntival, folículos, edema palpebral, sensación de cuerpo extraño y cierto grado de quemosis conjuntival. Anatómicamente presenta folículos linfoides (Figura 1b) rodeados de vasos sanguíneos que hacen relieve bajo la conjuntiva. Generalmente se encuentran en conjuntiva tarsal, aunque también pueden observarse en el limbo esclerocorneal o en la porción bulbar de la conjuntiva.

- Conjuntivitis folicular simple (Figura 3): Es la forma más leve y no se asocia a patología sistémica. Está causada por múltiples serotipos.



Figura 3. Ejemplo de conjuntivitis folicular simple.

- Fiebre faringoconjuntival (Figura 4): Causada por los serotipos 3, 7 y 11^{13,16}. Además de los signos oftalmológicos típicos, se acompaña frecuentemente de cefalea, fiebre, odinofagia y adenopatía preauricular. La presencia de adenopatía preauricular palpable no es exclusiva de conjuntivitis adenovíricas, ya que también pueden aparecer en cuadros herpéticos y/o enterovíricos.

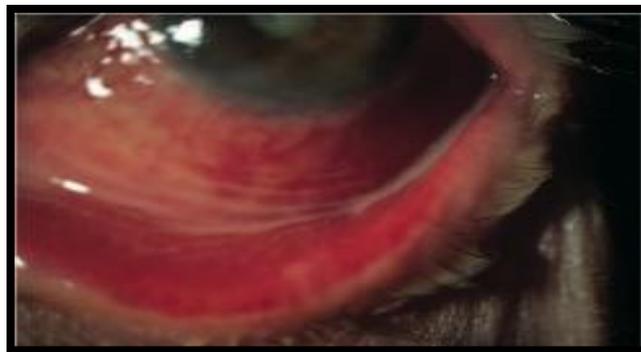


Figura 4. Hiperemia conjuntival bulbar/tarsal con secreción en un paciente afecto de fiebre faringoconjuntival

- Queratoconjuntivitis epidémica (Figura 5): causada por los serotipos 8, 19 y 37¹⁷⁻¹⁹, es la forma más agresiva y es muy frecuente que se vea comprometida la córnea en forma de infiltrados numulares subepiteliales. Histológicamente se aprecia un acúmulo de linfocitos, histiocitos y fibroblastos que se acompañan de una disrupción en las fibras de colágeno de la membrana de Bowman²⁰. Suelen aparecer

a los 10 días del inicio del cuadro conjuntival. Además se pueden desarrollar membranas o pseudomembranas²¹.



Figura 5. Infiltrados subepiteliales en una queratoconjuntivitis epidémica

1.2. REACCIÓN INMUNE OCULAR: ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS

El sistema inmune de las mucosas constituye la primera línea de defensa del organismo frente a la invasión de patógenos²². La conjuntiva es una membrana mucosa que recubre la cara interna de los párpados y la esclera anterior, formando un repliegue entre ambas secciones para formar los fondos de saco conjuntivales (Figura 6).

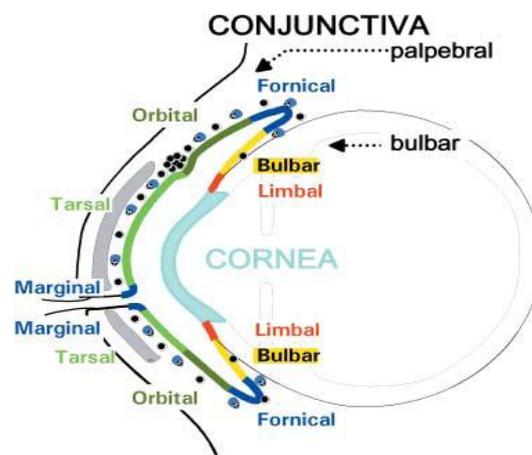


Figura 6: Topografía de la conjuntiva. Knop and Knop, 2005

Se compone de un epitelio y una lámina propia ricamente vascularizada que contiene elementos de la inmunidad innata (macrófagos, neutrófilos y mastocitos) y de la específica (linfocitos, células plasmáticas y células dendríticas (Figura 7).

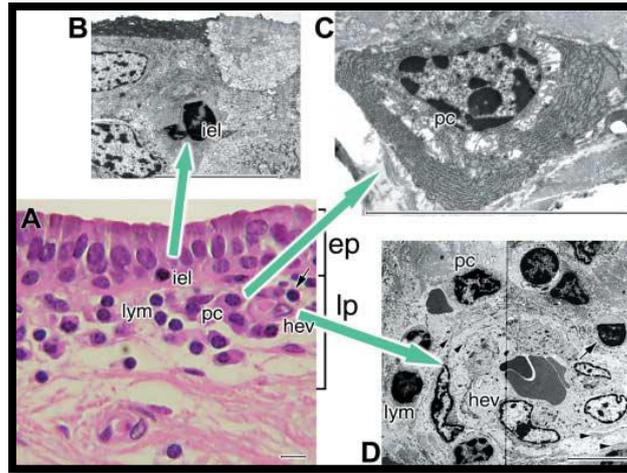


Figura 7. A) Corte histológico epitelio conjuntival, Lym (linfocito), iel (linfocitos intraepiteliales), pc (célula plasmática), hev (vénulas de endotelio alto); B) imagen microscopía electrónica tejido conjuntival donde se observa un linfocito intraepitelial; C) imagen microscopía electrónica donde se observa una célula plasmática; D) imagen microscopía electrónica donde se observa una vénula postcapilar. Knop and Knop, 2005.

Este conjunto de células inmunes conocido como CALT (conjuntiva-associated lymphoid tissue), junto con el LDALT (lacrimal drainage-associated lymphoid tissue) y el LGALT (lacrimal gland associated lymphoid tissue) constituyen el sistema inmune ocular o tejido linfoide asociado al ojo (eye-associated lymphoid tissue, EALT)²³⁻²⁵. El CALT, se encuentra formado por folículos linfoides, donde predominan las células B (LB) y por tejido linfoide difuso, compuesto por linfocitos T (LT) y células plasmáticas productoras de IgA²⁶⁻³², distribuidos arbitrariamente entre el epitelio y el tejido conectivo subyacente (lámina propia). La distribución de estas células varía en función de la zona conjuntival, observándose que la mayoría de los linfocitos intraepiteliales son linfocitos CD3 + (T) con un claro predominio de LT CD8+ (citotóxicos) sobre los LT CD4+ (cooperadores)³³; en la lámina propia la mayoría de los linfocitos son LB.

Tras la infección por adenovirus (Figura 8), las células epiteliales comienzan a morir en 36 horas. Los mecanismos de la inmunidad innata que limitan la infección se activan de manera precoz^{20,22}, de forma que las células infectadas producen interferones, que van a limitar la expansión de las partículas virales y reclutar macrófagos y neutrófilos. En el caso de la infección por adenovirus, parece que la respuesta inmune adaptativa tiene mayor relevancia, iniciándose cuando los macrófagos o las células dendríticas se infectan (capturando por lo tanto el antígeno viral). Estas células presentadoras de antígeno²¹ viajan hasta los ganglios regionales (preauriculares y submandibulares) a través de los vasos linfáticos. Tras la presentación antigénica se

activarán tanto LT como LB provocando la aparición de linfadenopatías. Durante la fase efectora precoz de la respuesta de los linfocitos B vírgenes, se libera IgM al torrente circulatorio y de manera local en la conjuntiva, con la finalidad de evitar la diseminación viral. En fases posteriores, la liberación local de IgG o IgA en la conjuntiva favorecerá la neutralización y lisis mediada por complemento de las células infectadas. Al inicio de la infección los elementos más eficaces son los linfocitos T CD8+ (citotóxicos) y los NK que eliminarán las células epiteliales infectadas. No obstante los adenovirus tienen la capacidad de inhibir la expresión de las moléculas HLA de clase I haciéndose invisibles para la acción de las células citotóxicas (fundamentalmente los T CD8+). Por otro lado, durante la respuesta adaptativa, también se activan macrófagos por mecanismos de hipersensibilidad retardada; esta respuesta a los antígenos virales parece ser la responsable de la aparición de los infiltrados subepiteliales típicos de la queratoconjuntivitis epidémica^{7, 9, 21} (Figura 5). Gracias al EALT, y su componente lagrimal, la IgA se secreta en la lágrima lo que permitirá cierto grado de protección ante infecciones similares debido a la preexistencia de anticuerpos²¹ neutralizantes durante la primoinfección. No obstante, si el inóculo viral supera la barrera de anticuerpos o el virus muta, el proceso infeccioso se llevará a cabo como si de una nueva infección se tratara.

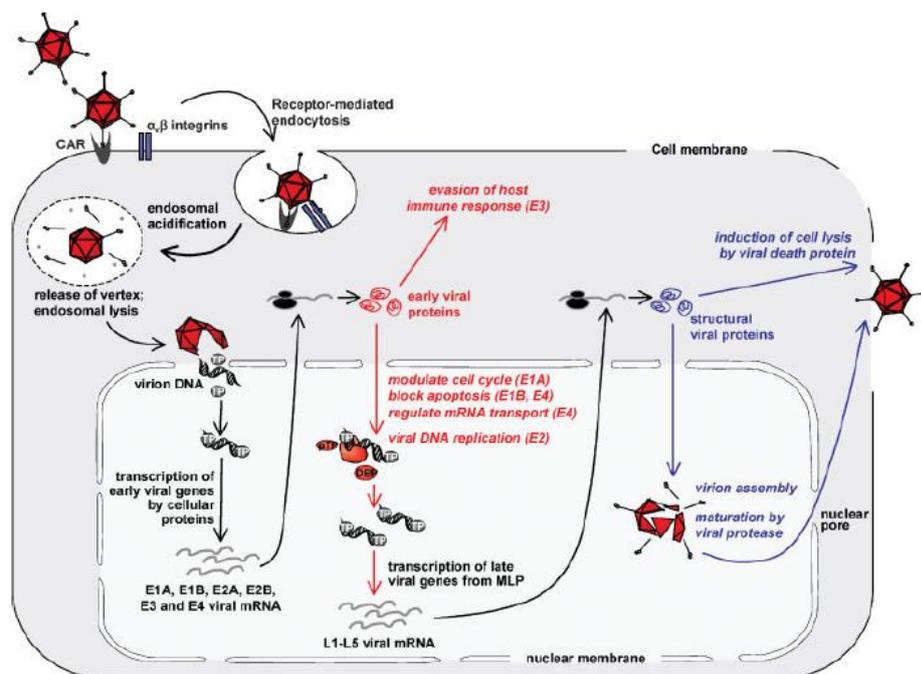


Figura 8. La vía de infección del adenovirus. CAR, coxsackie-adenovirus receptor; DBP, DNA-binding protein; E, early; L, late; MLP, major late promoter; pTP, precursor terminal protein; TP, terminal protein. Lenaerts et al., 2008.

2. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

En este capítulo se describe la hipótesis de partida y los principales objetivos planteados al inicio del estudio.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Nuestra hipótesis de partida es que la conjuntivitis adenovírica provoca alteraciones inmunológicas en el epitelio conjuntival que podrían ser utilizadas como marcadores de diagnóstico en este tipo de patologías.

OBJETIVOS:

El objetivo general de este proyecto es la búsqueda de biomarcadores inmunológicos que ayuden al oftalmólogo en el diagnóstico de las conjuntivitis adenovíricas.

Objetivos específicos:

- **Objetivo 1.** Definir los **grupos participantes** en el estudio (pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica e individuos sanos).
INTERES: No es fácil llevar a cabo una buena selección de estos pacientes ya que en muchas ocasiones se confunden con otros procesos inflamatorios etiológicamente diferentes pero clínicamente indistinguibles. De ahí, que este objetivo sea crucial para posteriormente observar diferencias entre ambos grupos.
- **Objetivo 2.** Aislar las **células de la superficie ocular** de estos individuos (pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica e individuos sanos) mediante métodos mínimamente invasivos (citología por cepillado conjuntival).
INTERES: Es importante que este procedimiento se realice sin molestias para el sujeto ya que cualquier tipo de irritación podría alterar los resultados obtenidos. Además es IMPORTANTE conseguir gran número de células para su posterior caracterización. De ahí, que la técnica empleada sea la citología por cepillado conjuntival, previamente validada para este uso.
- **Objetivo 3.** Determinar, mediante citometría de flujo, el **fenotipo y el estado funcional** de las células recolectadas, prestando especial atención a las posibles diferencias entre los distintos grupos participantes del estudio.

*INTERES: Los pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica tienen alterado el epitelio conjuntival y todo el sistema inmune que les rodea, de ahí que sea **IMPORTANTE** conocer el porcentaje de células inflamatorias que presentan, así como el fenotipo, la viabilidad celular y la capacidad proliferativa de estas células.*

- **Objetivo 4.** Confirmar, mediante PCR, el **diagnóstico clínico de presunción** de los pacientes reclutados (conjuntivitis por adenovirus).

*INTERES: No todas las conjuntivitis atribuidas a este tipo de virus (Adenovirus) son debidas a este patógeno sino que en muchas de ellas probablemente el agente causal sea totalmente diferente. De ahí, que este objetivo sea especialmente **IMPORTANTE** para llevar a cabo un diagnóstico lo más exacto posible.*

- **Objetivo 5.** Determinar si existen diferencias significativas en las variables inmunológicas analizadas entre los pacientes con conjuntivitis adenovírica confirmada y los no confirmados.

*INTERES: Este objetivo es especialmente **IMPORTANTE** ya que nos va a permitir determinar si las variables inmunológicas evaluadas en este estudio podrían ser utilizadas como biomarcadores de diagnóstico en las conjuntivitis adenovíricas.*

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se hace referencia a los criterios de inclusión y exclusión que se han tenido en cuenta a la hora de realizar la selección de los posibles participantes del estudio y a la metodología utilizada para el aislamiento de células de la superficie ocular humana, caracterización celular por citometría de flujo y análisis molecular del material genético extraído.

3.1. SUJETOS DEL ESTUDIO

La selección de sujetos se realizó previa obtención del consentimiento informado según la Declaración de Helsinki (ver Anexo 1) y previa aprobación del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

3.1.1. Sujetos con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica

La selección de sujetos se llevó a cabo en los servicios de Oftalmología del Hospital Universitario Río Hortega y Hospital Clínico Universitario, ambos de Valladolid, y en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid. Se seleccionaron 23 pacientes con edades comprendidas entre los 19 y 79 años (10 mujeres y 13 hombres; edad: 49 ± 16 años) a los que se realizó la toma de muestra mediante cepillado de fondo de saco inferior conjuntival de uno de los ojos a pesar de que la afectación en algún caso fuera bilateral. Los pacientes seleccionados fueron usuarios de los servicios de urgencias de oftalmología de ambos hospitales así como de las consultas del IOBA, que acudían para consultar por su situación ocular y para ello se tuvo en cuenta una serie de criterios de inclusión y exclusión:

a) Criterios de inclusión:

- Participación voluntaria tras explicación, aceptación y comprensión del procedimiento.
- Aceptación del consentimiento específico.
- Mayores de 18 años.
- Exploración objetiva compatible clínica y epidemiológicamente con conjuntivitis adenovírica:
 - Inyección conjuntival

- Quemosis conjuntival
- Secreciones fibrosas/serosas
- Presencia de folículos en fondo de saco inferior o tarso superior
- Antecedentes personales compatibles con patología sistémica relacionada con conjuntivitis víricas, como por ejemplo cuadro catarral.
- Antecedentes de contacto con fuente infectada (exploración oftalmológica reciente de familiares compatible con conjuntivitis vírica o síndrome catarral).
- Adenopatía preauricular
- Infiltrados corneales

b) Criterios de exclusión:

- Sintomatología de más de un mes de evolución
- Justificación clínica del cuadro por otro mecanismo no causante de conjuntivitis folicular (por ejemplo: cuerpo extraño, exposición a irritantes oculares).
- Negativa del paciente a la toma de muestras

A todos los pacientes se les realizó una exploración oftalmológica consistente en un estudio de la agudeza visual máxima corregida en ambos ojos, pregunta sobre el motivo de consulta (síntomas, tiempo de evolución y tratamientos realizados, etc), estudio de la motilidad ocular extrínseca y biomicroscopía de polo anterior.

3.1.2. Sujetos sanos

La selección de los posibles sujetos sanos del estudio se llevó a cabo en el servicio de oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid. Cada donante fue ampliamente informado de las características del estudio. Se seleccionaron 23 sujetos con edades comprendidas entre los 25 y 80 años (9 mujeres y 14 hombres; edad: 51 ± 21 años) a los que se realizó la toma de muestra mediante cepillado de fondo de saco inferior conjuntival de uno de los ojos. Los sujetos seleccionados eran médicos internos residentes (MIR) del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, fellows del IOBA,

rotantes externos que durante los años 2010/2012 se encontraron en cualquiera de ambos centros y pacientes que iban a ser operados de cirugía de catarata. A todos los donantes, ya fueran de uno u otro grupo, se les realizó un examen oftalmológico previo con el fin de determinar su idoneidad para el estudio propuesto. En el caso de los pacientes que iban a ser operados de cataratas, se valoró su situación oftalmológica mediante la historia clínica. Para ello, se tuvieron en cuenta una serie de criterios de inclusión y exclusión:

a) Criterios de inclusión:

- Participación voluntaria en el estudio
- Aceptación del consentimiento
- Edad de inclusión de los participantes superior a 18 años.
- Selección de sujetos sanos (sin enfermedad de la superficie ocular) que nunca hayan utilizado lentes de contacto, sin sintomatología de Síndrome de Ojo seco (SOS) y con normalidad en al menos dos de los siguientes test de la superficie ocular:
 - Tiempo de ruptura lagrimal (TBUT) $\geq 10\text{seg}$ ³⁴⁻³⁵
 - Tinción corneal con fluoresceína negativa.

b) Criterios de exclusión:

- Padecer patologías crónicas o estar bajo tratamiento farmacológico inmunosupresor (oral o tópico)
- Consumo excesivo de tabaco y/o alcohol.
- Haberse sometido a algún tipo de cirugía ocular previa.
- Uso de algún fármaco tópico ocular desde tres meses antes del estudio.

3.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LA SUPERFICIE OCULAR

La obtención de células de la superficie ocular (fondo de saco inferior) fue llevada a cabo mediante un método mínimamente invasivo como es la citología por cepillado (Brush cytology, BC)³⁶⁻³⁸.

Citología por cepillado:

Previa instilación de anestesia tópica (0,04% oxybuprocaine), se procedió a la rotación suave del cepillo (Cytobrush plus GY, Medscand Medical, Sweden) sobre la conjuntiva (fondo de saco inferior) de los donantes. A continuación, se desprendieron las células por rotación circular del cepillo en 1,4 ml de medio de transporte durante 30 segundos y /o cultivo [DMEM/F12 suplementado con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina pancreática bovina, 2 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano (EGF), 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de toxina colérica, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hidrocortisona, suero fetal bovino (FBS) al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina y 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina B]. Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones más, siempre realizándolo en el mismo sitio y con el mismo medio. Posteriormente se introdujo el tubo con las células en hielo y se transportó al laboratorio para su posterior análisis.

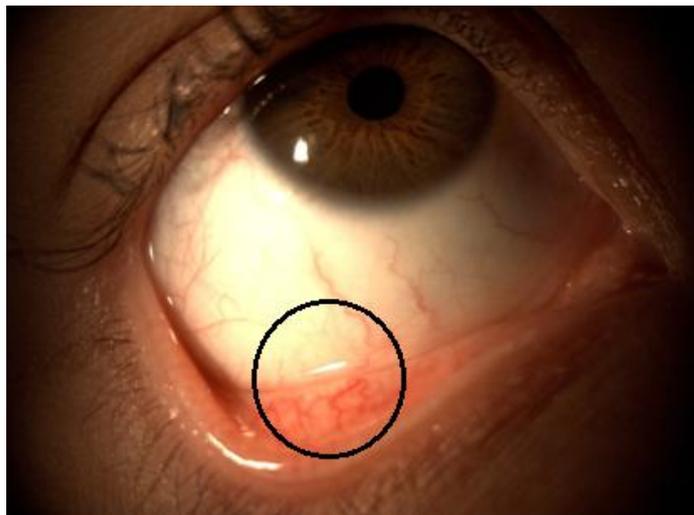


Figura 9: Fondo de saco inferior. Zona de donde se recogieron las muestras.

3.3. CARACTERIZACIÓN CELULAR DE LA POBLACIÓN OBTENIDA

La caracterización fenotípica y funcional de las células conjuntivales obtenidas se realizó mediante citometría de flujo. Para llevar a cabo dicha caracterización, se realizaron 3 tipos de análisis: fenotipo celular, viabilidad/apoptosis y ciclo celular. Las células recuperadas de la superficie ocular fueron incubadas con diferentes anticuerpos y/o marcadores (Tabla 3) y analizadas utilizando el citómetro de flujo FC 500 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA), compuesto de 2 láseres (Argón, 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).

Tabla 3. 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 _h)	BC
	CD8-ECD	SFCI21Thy2D3	Linfocitos T citotóxicos (T _c)	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 (Marseille, France).

**IS: Immunostep (Salamanca, Spain).

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

3.3.1. Linaje celular (estudio fenotípico)

Para determinar la naturaleza (inmunofenotipo) de las células recuperadas, se utilizaron 600 µl de la suspensión celular (tubo 1: 300 µl y tubo 2: 300 µl). 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 centrifugó durante 5 minutos a 500 g, se decantó el sobrenadante y las células fueron incubadas en oscuridad con los anticuerpos correspondientes (Tabla 3) durante 15 minutos a temperatura ambiente (4 μ l de la mezcla de anticuerpos para el tubo 1 y 2.5 μ l de cada anticuerpo para el tubo 2). Posteriormente, las células fueron fijadas (15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad) con 500 μ l de una solución de lisis-fijación (FACS™ Lysing solution, BD biosciencias, San Jose, USA) y analizadas con el citómetro de flujo.

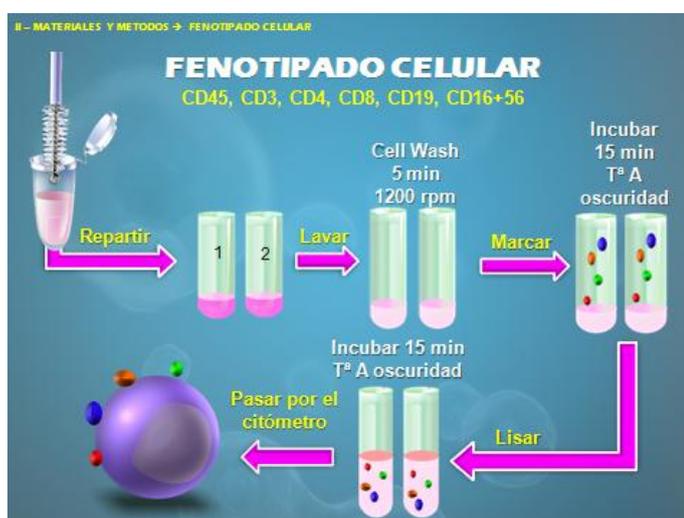


Figura 10. Fenotipado celular

3.3.2. Viabilidad celular (estudio de apoptosis)

Para llevar a cabo el estudio de apoptosis/viabilidad se utilizaron otros 300 μ 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 g, se decantó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas con 100 μ l de una solución tampón (Annexin V Binding Buffer, Immunostep, Salamanca, Spain). Posteriormente, las células fueron incubadas en oscuridad con 2.5 μ l de anexina V-FITC (25 μ g/ml) y 5 μ l de Ioduro de Propidio (a 250 μ g/ml) durante 10 minutos a 4°C (Tabla 3). Finalmente, se añadieron 400 μ l de la solución tampón a la muestra celular quedando lista para su estudio por citometría de flujo.

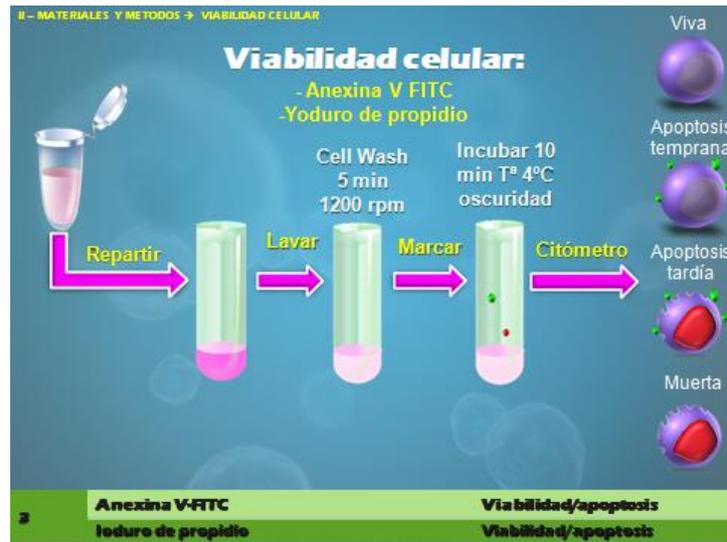


Figura 11. Viabilidad celular

3.3.3. Ciclo celular (estudio del contenido de ADN)

Para llevar a cabo este análisis se utilizaron otros 300 µl 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 biosciencias, San Jose, USA). Posteriormente, y después de centrifugar la muestra a 500 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células fueron permeabilizadas con 50 µl de una solución detergente (DNA-prep LPR, Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA). A continuación, se añadió 1 ml de una solución con Yoduro de propidio (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 (Tabla 3), quedando listas las células para ser analizadas con el citómetro de flujo.

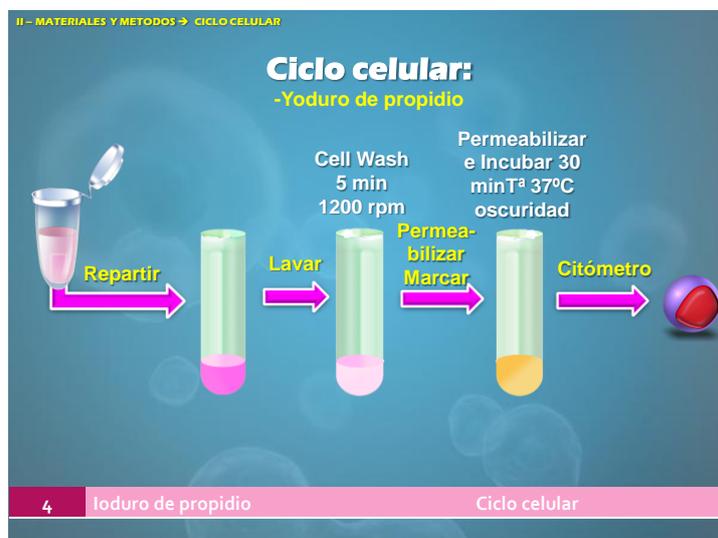


Figura 12. Ciclo celular

3.4. EXTRACCIÓN DE ADN Y REALIZACIÓN DE PCR ADENOVÍRICA

La confirmación del diagnóstico clínico de presunción se llevó a cabo utilizando técnicas moleculares, concretamente una PCR convencional para ADENOVIRUS.

3.4.1. Extracción de ADN

Se emplearon 100 µL del cepillado conjuntival de cada paciente para llevar a cabo el proceso de extracción de ADN. En primer lugar, se agitó el Reactivo Instagene Matrix con el magnetoagitador (SBS A-152) al menos durante 15 minutos y se dio un vortex (Dinco D-051) a las muestras. A continuación, se colocaron en un eppendorf estéril 100 µL de muestra y en otro eppendorf estéril 100 µL de control negativo (agua libre RNAsas y DNAsas). Tras la centrifugación en la microcentrífuga (Beckman coulter Microfuge 18) durante 2 minutos a 13000 g, se quitaron 75 µL del sobrenadante con una pipeta P200 Finnpipete J29096 (no se aprecia pellet), los cuales fueron guardados en un eppendorf estéril en congelación (-20°C). Posteriormente, se añadieron 50 µL del Reactivo Instagene Matrix a los 25 µL de muestra que quedaron en el eppendorf. Se calentó la muestra y el control en el calentador de placas (Biosan TDB-100) en 2 tandas, la primera a 56 °C durante 30 minutos y la segunda a 100 °C durante 8 minutos. Por último, se centrifugaron en la microcentrífuga 2 minutos a 13000 g y se congeló el ADN hasta el momento de su utilización.

3.4.2. Confirmación de la obtención de ADN

Para confirmar la presencia de ADN en las muestras, fue necesario amplificar un fragmento del gen de la Beta Actina mediante PCR a tiempo real. Para ello, se prepararon los reactivos necesarios para la técnica de PCR: atemperar el kit 15 min a T^a ambiente, agitar y dar un pulso a todos los productos. Se dispensó la mezcla de reacción a todos los pocillos de la placa. Para el Control de Beta Actina se preparó la mezcla (10µl Mastermix + 4µl H2O + 1µl primer ACTB + 5µl DNA). Una vez hecho esto, se cubrió la placa de PCR con las tapas autoadhesivas transparentes MicroAmp optical adhesive film (Life Technologies S.A., Madrid Spain), utilizando un prensador e incidiendo especialmente en los bordes del mismo para que no se evapore la mezcla durante la PCR; y se centrifugó la placa de PCR 2 minutos a 132 x g en la centrifugadora (*Omnifuge 2.0 rs Heraeus sepatech*). Posteriormente, se introdujo la

placa en el termociclador de tiempo real ABI 7500 *Real Time PCR System* (Life Technologies S.A., Madrid Spain) y se configuraron los ciclos del ensayo:

- 95°C durante 10 minutos
- 50 ciclos de:
 - 95°C durante 10 segundos
 - 60°C durante 60 segundos

3.4.3. PCR para la detección del genoma de adenovirus

Para ello, se utilizó un kit comercial de la empresa Genekam biotechhology AG (Duisburg, Alemania). Antes de empezar a realizar el ensayo, se procedió a encender la campana de flujo laminar con los rayos UV, limpiar las pipetas con etanol de 70° y atemperar el kit de adenovirus. Pasados 15 minutos, se quitaron los rayos UV y se limpió la superficie de la campana con el limpiador de DNA (*Termi-DNA-tor*) y con etanol de 70°. Una vez descongelados todos los reactivos, se les dio un pulso de centrifuga con la micro-centrifuga (*Microfuge 18 Centrifuge*). A continuación, se realizó la mezcla de reacción para la primera PCR en un eppendorf añadiendo 8 µl del Tubo A y 10 µl del Tubo B. Posteriormente, se dispensó la mezcla de reacción a los eppendorf de 0.2 ml de PCR y se añadieron 2 µl de cada DNA a la mezcla de reacción. Para el C- de DNA, se añadieron 2 µl del control de extracción de DNA a la mezcla de reacción. Para el C- se añadirán 2 µl del tubo D2. Para el C+ se añadirán 2 µl del tubo D1. Se taparon los eppendorfs para que no se evaporara la mezcla durante la PCR y se les dio un pulso de centrifuga con la microcentrifuga *Microfuge 18 Centrifuge*. A continuación, se configuró el termociclador y se procedió a realizar la PCR.

- Un primer ciclo que consta de tres fases:
 - 94°C durante 7 minutos
 - 55°C durante 60 segundos
 - 72°C durante 90 segundos
- Un segundo ciclo que se repite 42 veces y consta de tres fases:
 - 94°C durante 1 minuto
 - 55°C durante 1 minuto
 - 72°C durante 90 segundos

Una vez completada la PCR, se procedió a su lectura mediante la **preparación de un gel de agarosa**:

- Se preparó un gel de agarosa al 2% con TBE al 1X.
- Se añadieron 2.5 μL de Bromuro de Etidio (10mg/mL) al gel antes de que gelificara (el tamaño de los pocillos permitirá la carga de al menos 15 μL).
- Una vez gelificado, se introdujo el gel de agarosa en la cubeta de electroforesis.
- Se cubrió toda la superficie con TBE al 1X y se cargaron 10 μL de muestra (9 μL de PCR + 1 μL de azul de bromofenol).
- La electroforesis se realizó a 120 V durante 30 minutos.
- Una vez finalizada, se procedió a su visualización mediante el sistema chemidoc con iluminación UV.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos en el presente estudio se utilizó el software SPSS15.0 (*SPSS Inc, Chicago, EE.UU*) y SAS versión 8.01 (*SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, EEUU*). Se realizó un primer análisis descriptivo de todas las variables estudiadas, tanto cualitativas como cuantitativas. Se contrastó la hipótesis de igualdad de medias para **dos muestras independientes**, utilizando el contraste t-Student, o su equivalente no paramétrico el test U de Mann-Whitney dependiendo de que fuera posible o no asumir normalidad. Estos dos tests asumen que las varianzas de los dos grupos son iguales. Para comprobar esta hipótesis utilizamos el test de Levene. Si este contraste rechaza la hipótesis de homogeneidad de varianzas, utilizando el test de Welch en el caso paramétrico y el de Kolmogorov Smirnov en el no-paramétrico.

La muestra de sanos fue elaborada a partir de una muestra más grande y heterogénea para que fuera pareada con los individuos con conjuntivitis según su edad. Para ello, se utilizó el método basado en el índice de propensión conocida como “Propensity Score Matching (PSM)” [Rubin, 1997].

4. RESULTADOS

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

4.1. INDIVIDUOS SANOS VS. PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA DE CONJUNTIVITIS ADENOVÍRICA

En este apartado se describen las diferencias encontradas entre los pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica y los individuos sanos para cada una de las variables inmunológicas analizadas:

4.1.1. Fenotipo celular

El número total de células analizadas en los pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica y en los sujetos sanos fue de $1.4 \pm 1.0 \times 10^4$ y $1.5 \pm 1.0 \times 10^4$, respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos. La mayor parte de las células conjuntivales obtenidas mediante la citología por cepillado fueron de origen epitelial (CD45-), sin embargo, se observó una pequeña población de células CD45+, leucocitos intraepiteliales, significativamente más abundante en los pacientes AdV ($14.6 \pm 8.3\%$) que en los sujetos sanos ($3.2 \pm 2.5\%$)(Figura 13). Estos leucocitos CD45+ fueron predominantemente linfocitos T y B, aunque también pudo observarse una pequeña población de linfocitos NK ($<1\%$)(Figura 13). La proporción T/B varió entre los dos grupos analizados pero no llegó a ser estadísticamente significativa, y en ambos casos, con un claro predominio de los linfocitos T sobre B (Figura 14). En cuanto a las subclases de linfocitos T, es necesario destacar que los pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica presentaron mayor porcentaje de linfocitos T citotóxicos que cooperadores, como queda reflejado en la proporción $T_h/T_c < 1$ (Figura 14), sin embargo, en los controles sanos, dicha proporción aumentó ($T_h/T_c: 1.5$) al disminuir significativamente el porcentaje de linfocitos T citotóxicos y aumentar el porcentaje de linfocitos T cooperadores.

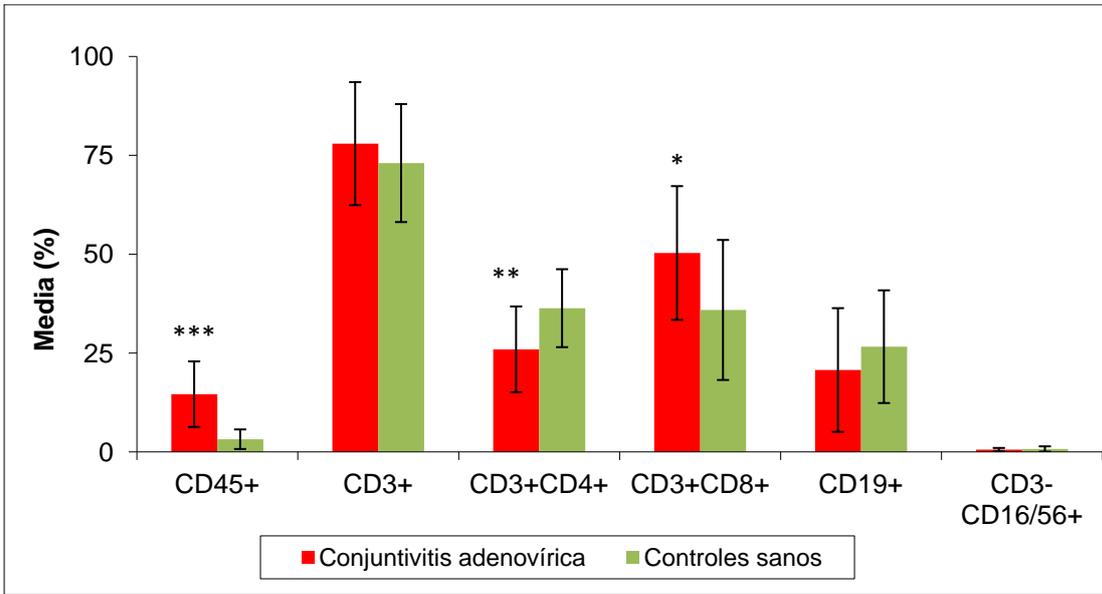


Figura 13. Análisis inmunofenotípico de los linfocitos intraepiteliales. Porcentajes de células CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56.

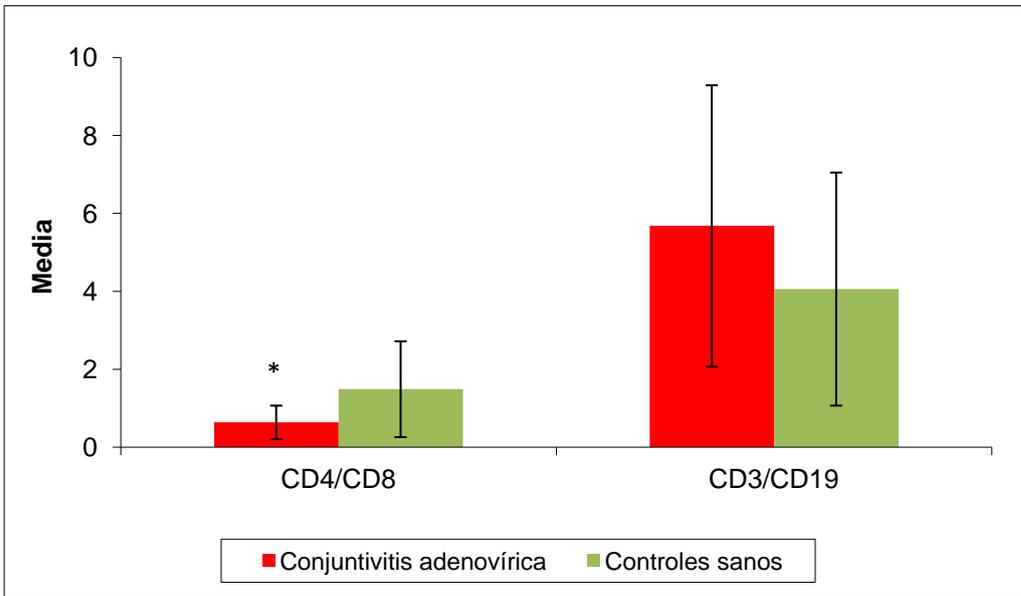


Figura 14. Análisis inmunofenotípico de los linfocitos intraepiteliales. Ratios CD4/CD8 y CD3/CD19. *p<0.05.

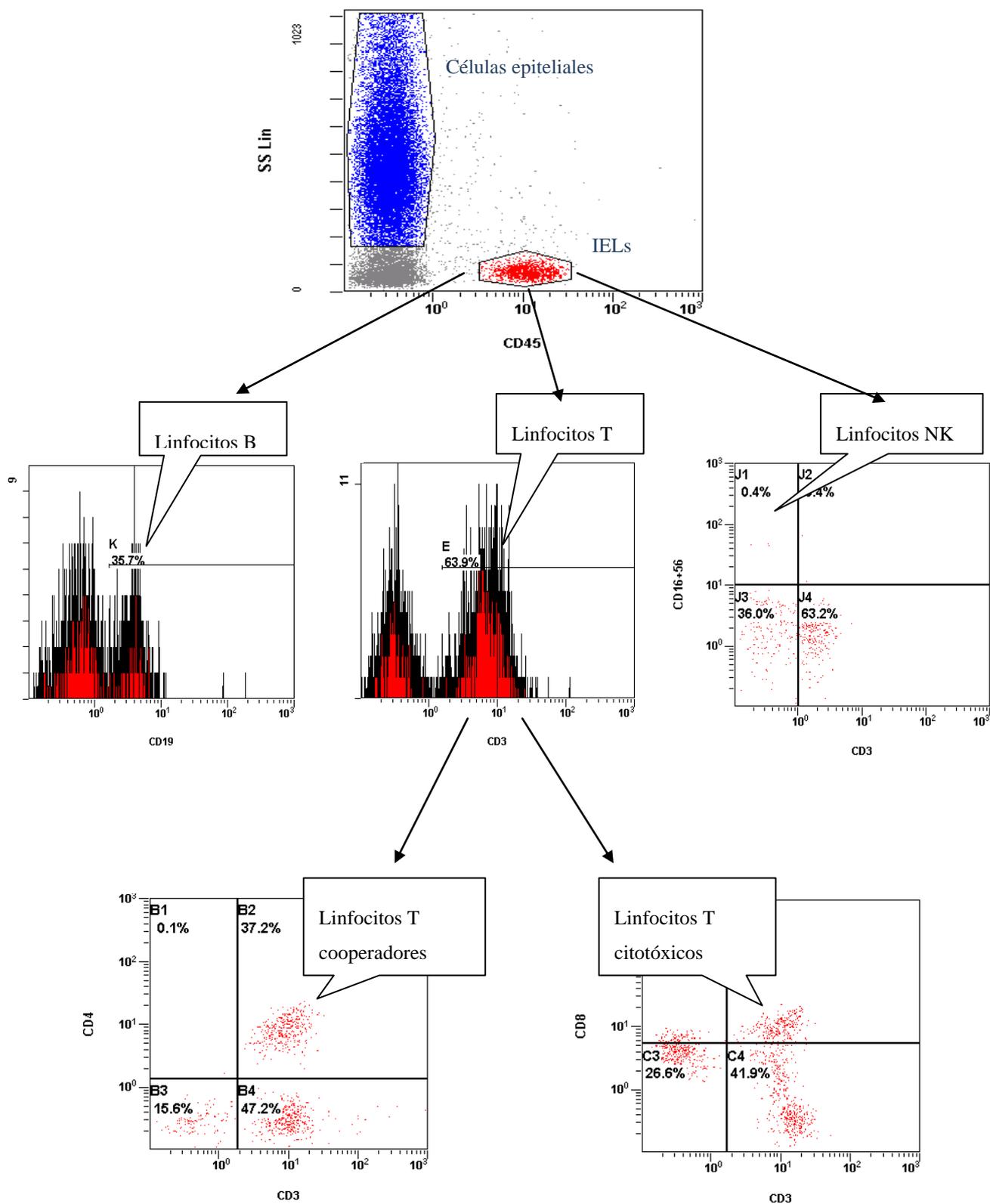


Figura 15. Ejemplo de análisis fenotípico de células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado

4.1.2. Viabilidad celular

El número total de células analizadas fue de $9.2 \pm 7.5 \times 10^3$ en el grupo de sanos frente a un $2.8 \pm 3.2 \times 10^4$ en el grupo de conjuntivitis sin diferencias significativas entre ambos. En este ensayo, se observaron 2 poblaciones celulares diferentes en función de su tamaño y su complejidad. Por una lado, una población celular compuesta de células más grandes y complejas (sanos: $67.8 \pm 18.99\%$ vs conjuntivitis: $44.13 \pm 14.51\%$, $p=0.0001$) y por otro lado, una población celular compuesta de células más pequeñas y menos complejas (sanos: $26.81 \pm 20.53\%$ vs conjuntivitis: $53.3 \pm 16.52\%$, $p=0.0002$). En cuanto a la viabilidad celular de las células simples (figura 16), el porcentaje de células viables es mayor en el grupo de conjuntivitis, $86.69 \pm 18.28\%$ frente a un $76.57 \pm 18.41\%$ de los sanos, con un p-valor de 0,0327. Lo contrario sucede con el porcentaje de células en apoptosis tardía, donde es mayor en el grupo de sanos, $2.83 \pm 2.89\%$ frente a $0.88 \pm 2.08\%$. Los datos de la apoptosis precoz quedan al borde de la significación estadística. En relación a las células muertas no hay diferencias entre ambos grupos.

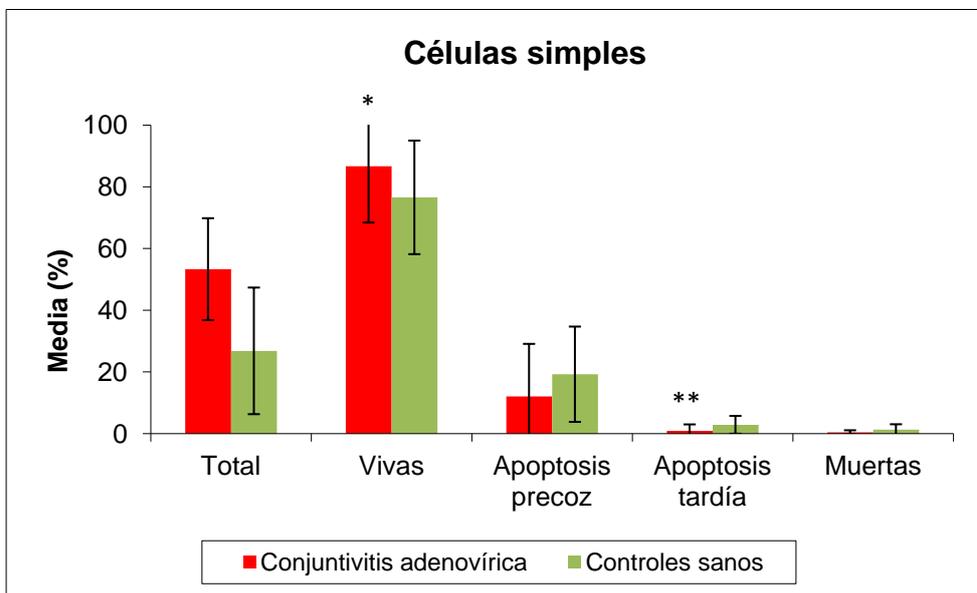


Figura 16. Análisis de viabilidad de células simples. Porcentajes de células vivas, apoptosis precoz, apoptosis tardía y muertas. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

Respecto a la viabilidad de células complejas (figura 17), el porcentaje de células viables es significativamente mayor en el grupo de conjuntivitis, $55,93 \pm 30,64$ frente a

15,63 ±13,75, con un p-valor de 0,0004. Al contrario sucede con el porcentaje de células complejas en fase de apoptosis tardía, donde es mayor en el grupo de sanos: 36,31 ± 19,91 frente a 16,14 ±15,96, con un p-valor de 0,0005. En el porcentaje de células muertas también existen diferencias significativas, siendo el porcentaje mayor en el grupo de sanos, con un 11,08 ± 14,06 frente a un 2,99 ± 4,06 del grupo de las conjuntivitis y un p-valor de 0,0013. No existen diferencias en los porcentajes de las células en apoptosis precoz.

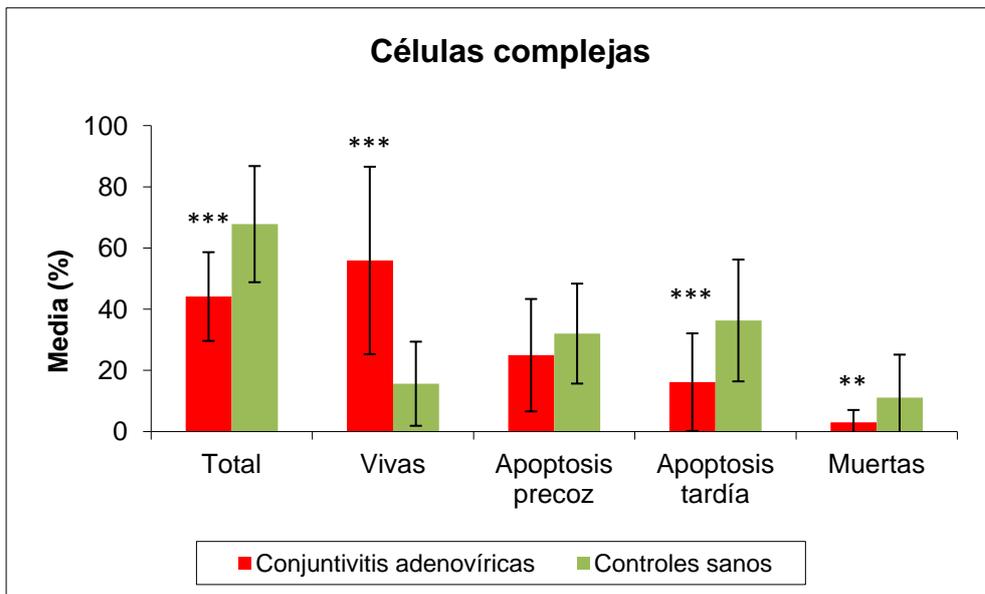


Figura 17. Análisis de viabilidad celular. Porcentaje de células vivas, apoptosis precoz, apoptosis tardía y muertas. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

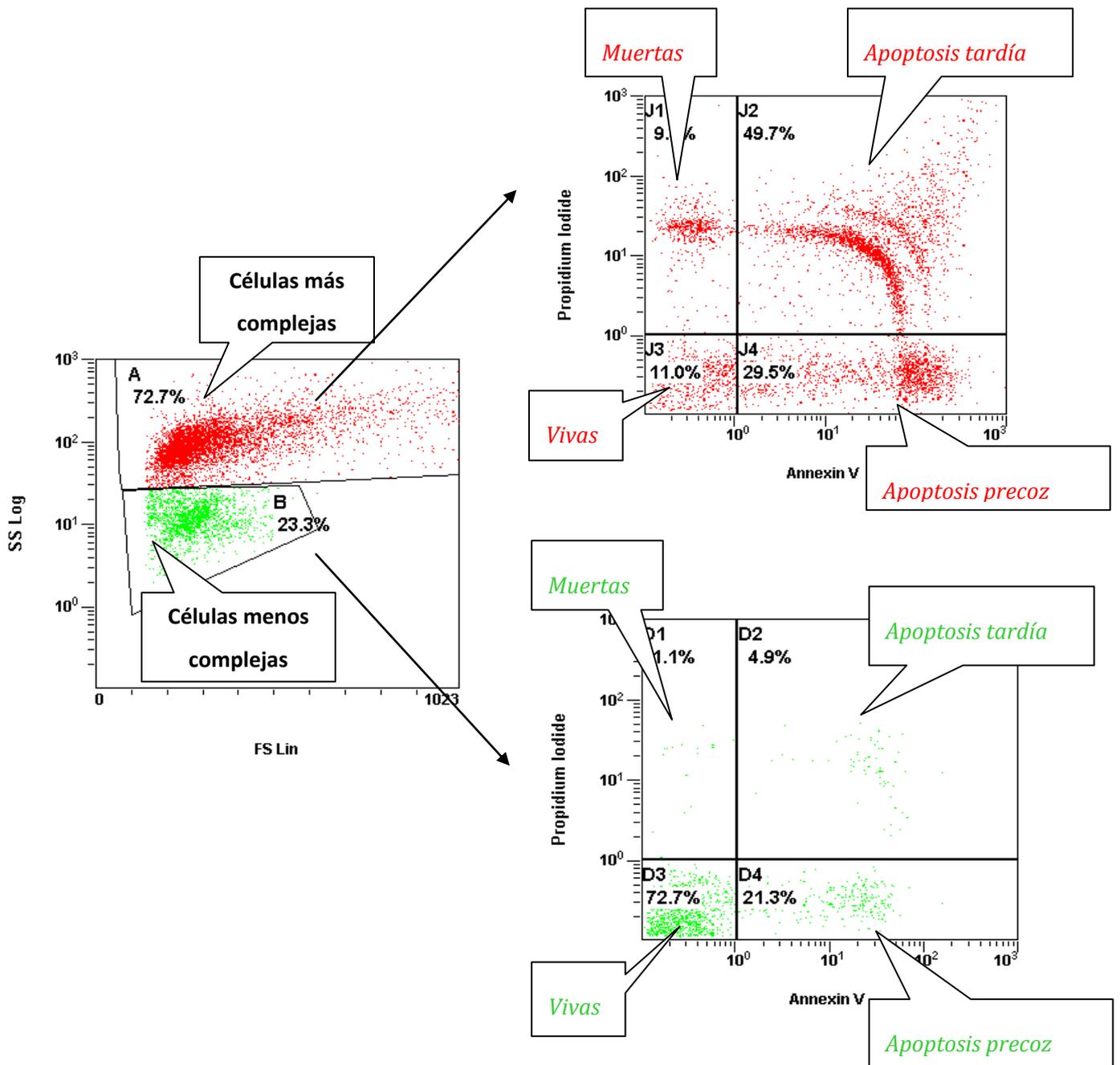


Figura 18. Ejemplo de análisis de viabilidad de células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado.

4.1.3. Ciclo celular

El número total de células analizadas en este ensayo fue de $5.9 \pm 3.6 \times 10^3$ en el grupo de sanos y $2.1 \pm 1.7 \times 10^3$ en el grupo de conjuntivitis siendo estas diferencias estadísticamente significativas, con un p-valor de 0.0012. Con respecto a las diferentes fases del ciclo celular, el porcentaje de células en fase G0/G1 fue significativamente mayor en el grupo de sanos, $78.5 \pm 7.74\%$ frente a $69.84 \pm 9.09\%$ de las conjuntivitis y

con un p-valor de 0.001. En el porcentaje de células en fase intermedia se observa una pequeña diferencia que queda al borde de la significación estadística. En relación a la fase de mitosis y el IPM (índice de proliferación medio), no existen diferencias.

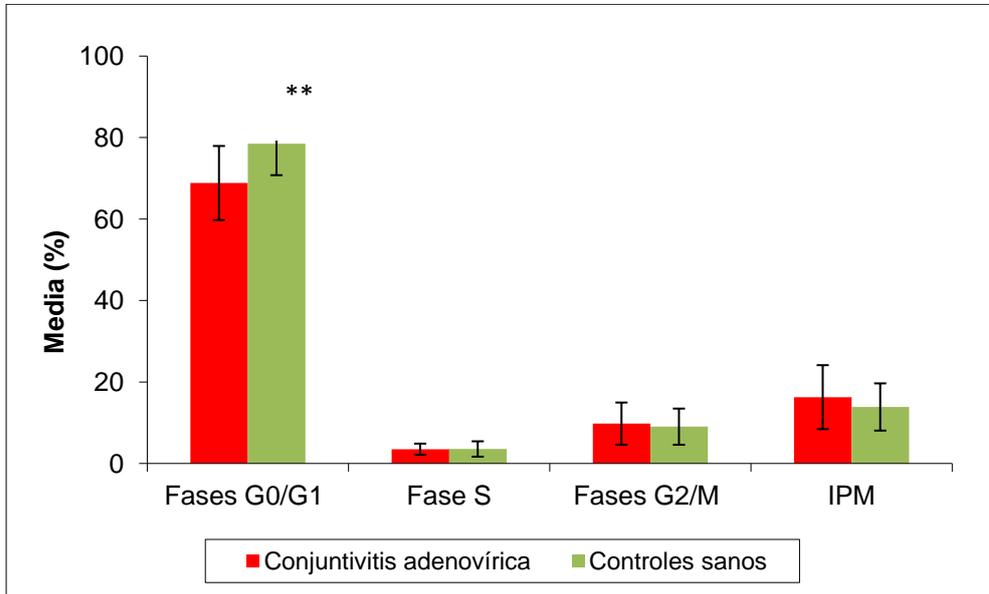


Figura 19. Análisis del ciclo celular. Fases G0/G1, S, G2/M e IPM. . *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

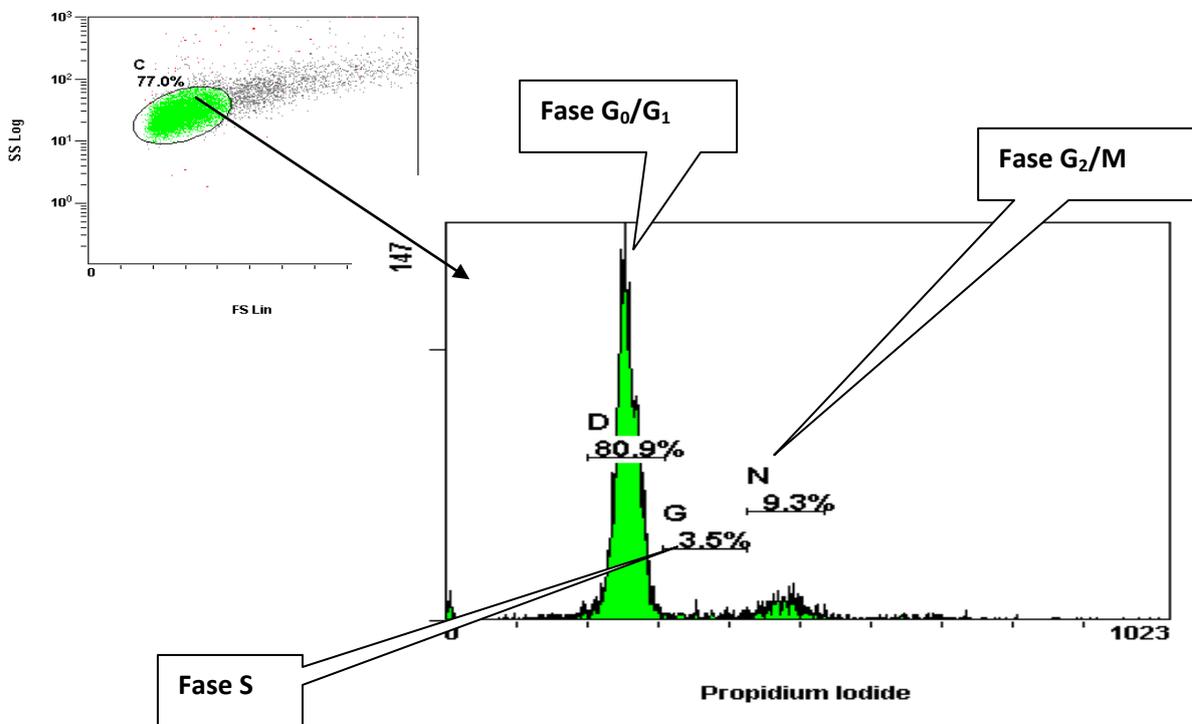
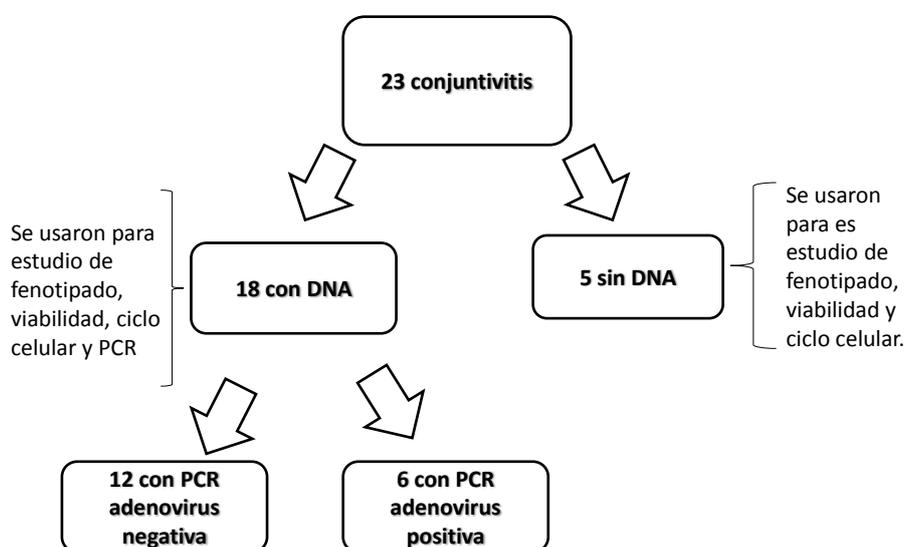


Figura 20. Ejemplo de análisis del contenido de ADN (ciclo celular) de células conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado

4.2. PACIENTES CON CONJUNTIVITIS ADENOVÍRICA CONFIRMADA VS. PACIENTES NO CONFIRMADOS

En este apartado se describen las diferencias encontradas entre los pacientes con conjuntivitis adenovírica confirmada por PCR (**Adv+**) y los no confirmados (**Adv-**). A pesar de que el número de muestras con conjuntivitis recogidas fue de 23, para este estudio se analizaron únicamente los resultados de 18 individuos en los que se pudo realizar la PCR: en 12 el resultado fue negativo y en 6 positivo. En los 5 restantes, no se pudo obtener DNA y por lo tanto no se pudo realizar PCR.



4.2.1. Fenotipo celular

El número total de células analizadas en el grupo Adv+ y Adv- fue de $4.5 \times 10^4 \pm 3.4 \times 10^4$ y $2.1 \times 10^4 \pm 1.8 \times 10^4$ respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos.

Dentro de la población linfocitaria (CD45+), no se aprecian diferencias significativas entre los porcentajes de linfocitos totales ni linfocitos T CD3+ totales encontrados en ambos grupos. Sin embargo si analizamos los resultados de las subpoblaciones T, se observa que en el grupo de Adv-, el porcentaje de LT CD4+ es de $31.14 \pm 9.91\%$ mientras que en grupo de Adv+ es sólo de $20.24 \pm 9.99\%$. Sin embargo esta diferencia está al borde de la significación estadística. Tal vez con un “n” mayor, la diferencia sería mayor. Con respecto a la población de LT CD8+, ocurre lo contrario.

En el grupo de AdV- el porcentaje es menor que el grupo de AdV+, concretamente $48.57 \pm 10.45\%$ y $60.74 \pm 10.16\%$ respectivamente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con un p-valor de 0.0436. En cuanto a la población de LB y LNK, no se observó diferencias entre los grupos (figura 21).

De los resultados anteriormente descritos, se desprende que la relación CD4/CD8, quede al borde de la significación estadística y la relación CD3/CD19 no muestre diferencias (figura 22)

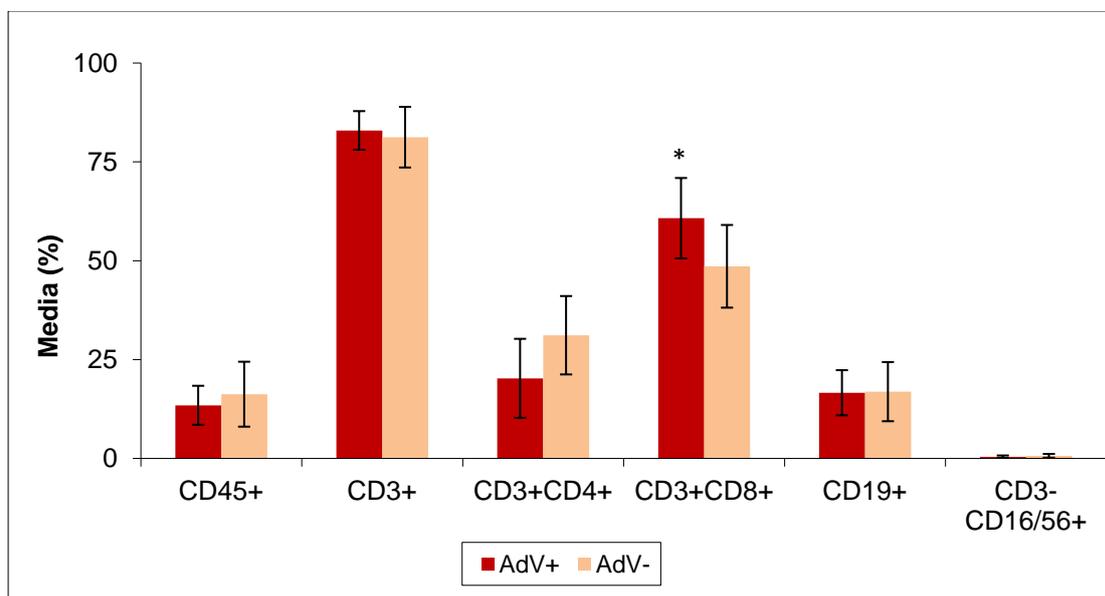


Figura 21. Análisis inmunofenotípico de los linfocitos intraepiteliales. CD3, CD4, CD8, CD19, CD 16/56. * p<0.05.

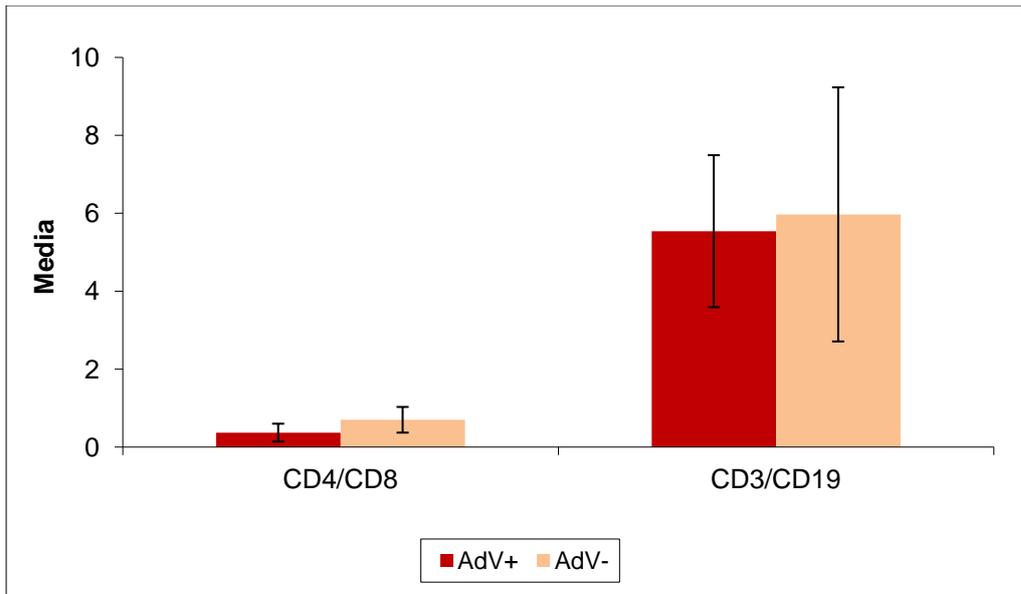


Figura 22. Análisis inmunofenotípico de los linfocitos intraepiteliales. Ratios CD4/CD8 y CD3/CD19. * $p < 0.05$.

4.2.2. Viabilidad celular

El número total de células analizadas fue de $4.2 \times 10^4 \pm 3.8 \times 10^4$ en el grupo de PCR negativo y $1.1 \times 10^4 \pm 7.3 \times 10^3$ en el grupo positivo sin diferencias significativas entre ambos grupos. En este ensayo, se observaron 2 tipos celulares distintos: por una lado, una población celular mayoritaria compuesta de células más grandes y más complejas y por otro lado, una población celular compuesta de células más pequeñas y menos complejas. No se encontraron diferencias entre el porcentaje de ambas poblaciones celulares en los 2 grupos. Sin embargo sí existen diferencias en cuanto a la viabilidad celular.

En el grupo de células simples, el porcentaje de células viables es significativamente mayor en el grupo AdV -, $91.52 \pm 14.7 \%$ frente a $78.82 \pm 23.42 \%$, con un p-valor de 0.0351 (figura 23). De manera contraria, el porcentaje de células simples en apoptosis precoz es mayor en el grupo AdV +, $20 \pm 23.31\%$ frente a $8.08 \pm 14.35 \%$, con un p-valor de 0.0393, algo similar a lo que ocurre en la apoptosis tardía, con un 0.65 ± 0.35 en el grupo AdV + y un 0.27 ± 0.35 en el AdV -, con un p-valor de 0,027. No se encontraron diferencias en la población de células muertas.

En el grupo de células complejas, el porcentaje de células viables en el grupo de AdV - es mayor que el de AdV +, un $65.44 \pm 30.07 \%$ frente a un $40.77 \pm 17.48 \%$ pero no llegando a la significación estadística. El resto de variables no mostraron diferencias entre ambos grupos (figura 24)

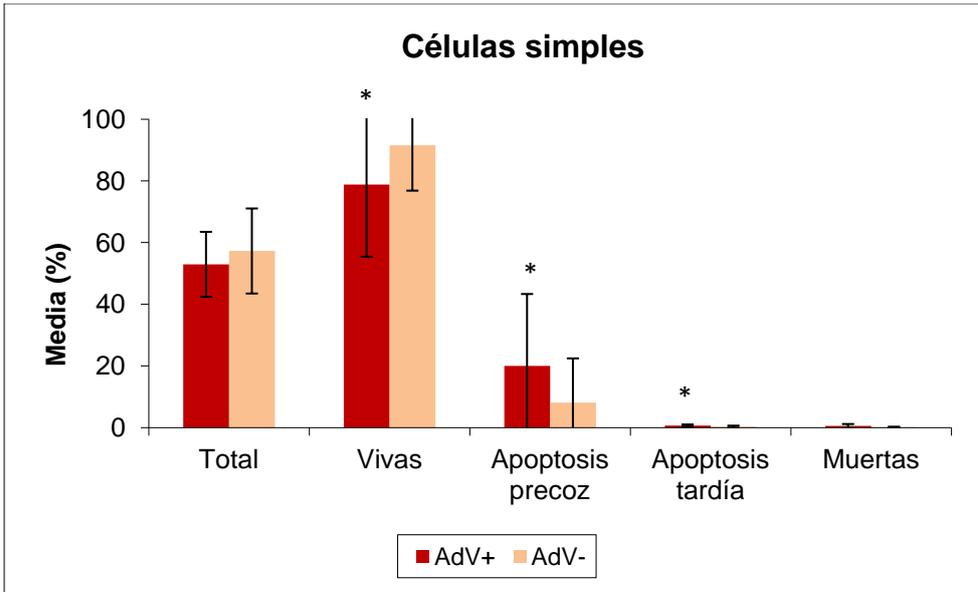


Figura 23. Análisis de viabilidad de células simples. Porcentajes de células vivas, apoptosis precoz, apoptosis tardía y muertas. * $p < 0.05$.

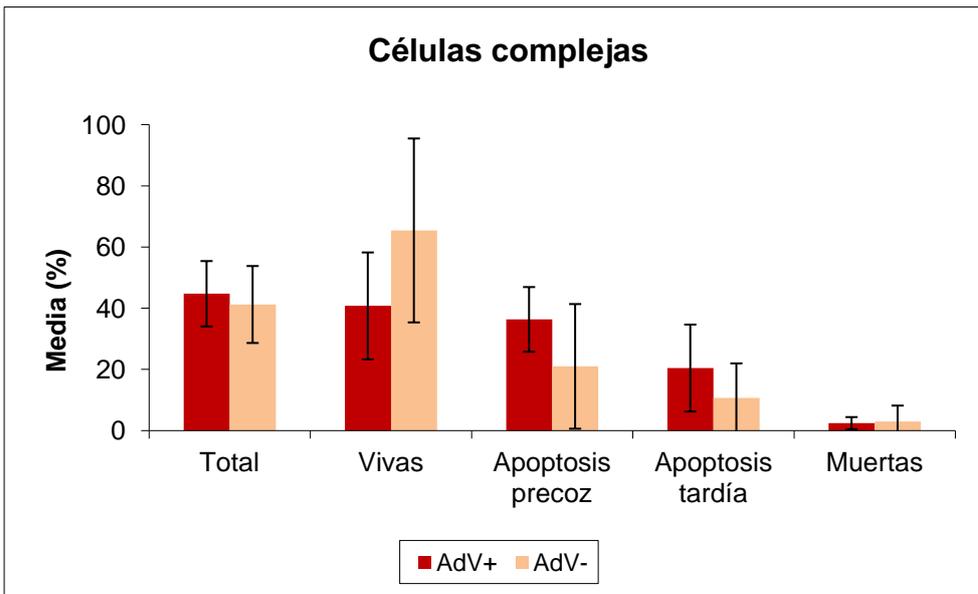


Figura 24. Análisis de viabilidad de células complejas. Porcentajes de células vivas, apoptosis precoz, apoptosis tardía y muertas.

4.2.3. Ciclo celular

El número total de células analizadas en este ensayo fue de $1.7 \pm 0.88 \times 10^3$ en el grupo AdV- y $1.2 \pm 0.9 \times 10^3$ en el AdV +, no observándose diferencias significativas entre ambos. El porcentaje de células conjuntivales en las fases de crecimiento o preciclo (G_0/G_1) fue muy similar en ambos grupos (figura 25), sin embargo, hubo diferencias significativas en la fase S, $3.12 \pm 1.26 \%$ en AdV- frente a $4.8 \pm 1.43\%$ del

AdV + con un p-valor de 0.0456. En cuanto a las células en fase de mitosis e IPM no hay diferencias significativas entre los grupos.

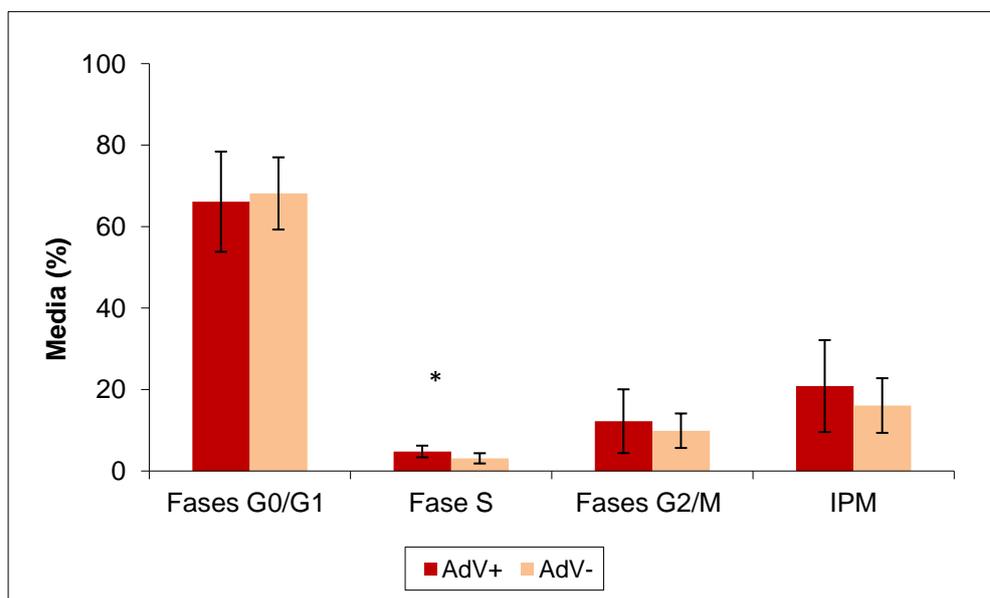


Figura 25. Análisis del ciclo celular. Fases G0/G1, S, G2/M e IPM. . *p<0.05

5. DISCUSIÓN

Las conjuntivitis infecciosas de origen viral, sobre todo las adenovíricas, representan un motivo frecuente de consulta en el servicio de oftalmología. Son además, la primera causa de infección nosocomial en los servicios de oftalmología¹⁶. Este grupo de infecciones oculares, se diagnostican por su presentación clínica sin realizar una búsqueda del agente causal, por lo que en muchas ocasiones, como vemos en nuestros resultados, se realizan diagnósticos etiológicos inexactos. Sin embargo, esto no repercute de manera importante en la conducta terapéutica, ya que estos procesos tienen un tratamiento sintomático, inespecífico e independiente del agente viral etiológico.

Actualmente, gracias a las técnicas de biología molecular, como la PCR, podemos realizar test de confirmación etiológica rápidos y fiables. Aunque este tipo de confirmaciones moleculares no nos resulten muy útiles para mejorar el pronóstico del paciente en cuanto a que su tratamiento no va a variar, pueden resultar interesantes a la hora de confirmar brotes epidemiológicos (sobre todo en adenovirus que se asocian a clínica respiratoria, donde la PCR se considera la técnica diagnóstica de elección³⁹ o con la finalidad de iniciar estudios de sensibilidad a determinados fármacos antivíricos. La confirmación del agente etiológico, va a adquirir relevancia en el caso de afectación sistémica y no exclusivamente ocular, donde su uso está muy limitado por la relación entre el coste del análisis y el provecho terapéutico que de él se obtiene.

La obtención mínimamente invasiva de células de la SO ha sido una herramienta fundamental para poder investigar ciertas patologías oculares de carácter inflamatorio, como por ejemplo, el síndrome de ojo seco y la conjuntivitis alérgica,³⁹⁻⁴⁰ etc y para evaluar el estado de la SO en poblaciones “inmunologicamente” sanas³³. En nuestro estudio, utilizamos el cepillo Cytobrush[®]-Plus GT (Medscand Medical AB, Molmö, Sweden) para la obtención de células. Se recogieron muestras de fondo de saco conjuntival de 2 poblaciones diferenciadas: una de sujetos sanos y otra de pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica.

Dentro del grupo de las conjuntivitis, se analizaron las muestras en busca de DNA para la realización de PCR para adenovirus y de esta manera realizar un diagnóstico etiológico de cada caso. Se recogieron muestras de 23 sujetos sanos y 23 de pacientes con conjuntivitis. De esas 23 conjuntivitis se obtuvo DNA en sólo 18, de las que en 12 la PCR fue negativa y en 6 fue positiva. En base a estos resultados podemos comentar

que el diagnóstico clínico de conjuntivitis adenovírica de manera aislada, representa un método inexacto. No obstante y aunque la PCR es una técnica que ha demostrado ser fiable y superior a otras en la confirmación de adenovirus⁴¹, no podemos obviar, que como en cualquier prueba de laboratorio, cabe la posibilidad de que entre los resultados aparezcan falsos negativos:

- a) Por un defecto de muestra
- b) Por recogida de la muestra en periodos tardíos de la infección donde las partículas virales pueden ser insuficientes
- c) Por defectos en el test o incapacidad del mismo para detectar algunos serotipos de adenovirus
- d) Por recogida de muestras en pacientes previamente tratados en los que hubiera disminuido la carga viral.
- e) Tratarse de una infección por cualquier otro agente causante de conjuntivitis folicular, como otros virus o chlamydia.

Y falsos positivos (derivados de contaminación de la muestra, de los primers, de las sondas, del agua, etc...; si bien estos posibles falsos positivos están minimizados en nuestro estudio puesto que se han realizado los convenientes controles de la reacción).

Una vez recogidas las células de la SO, se procedió a su posterior caracterización mediante citometría de flujo. Se llevaron a cabo dos estudios comparativos, por un lado, sujetos sanos vs pacientes con sospecha de conjuntivitis adenovírica y por otro, muestras de conjuntivitis PCR positivas para adenovirus vs muestras de conjuntivitis PCR negativas. En ambas comparaciones se analizaron el fenotipo, la viabilidad y el ciclo celular.

En el estudio comparativo entre sanos y conjuntivitis, los resultados mostraron que la población linfocitaria es mayor en las conjuntivitis, donde hay más porcentaje de células T CD8+, al contrario que los sanos donde hay más células TCD4+. Tanto el dato de infiltración linfocitaria como los datos de porcentajes en subpoblaciones CD4 y CD8, podrían ser utilizados como biomarcadores de conjuntivitis folicular. De estos resultados se deduce que el cociente CD4/CD8 sea mayor en los sanos. Este dato también podría ser utilizado como biomarcador de conjuntivitis folicular. En el resto de variables a estudio los resultados no fueron estadísticamente significativos.

En cuanto al estudio de viabilidad celular, se describen 2 poblaciones diferencias en cuanto a su complejidad y tamaño: un grupo de células más grandes y complejas y

otro de células más pequeñas y simples. De aquí, podemos suponer que la población de células complejas esté compuesta en su mayoría por células epiteliales y la población de células simples por linfocitos. El porcentaje de células simples fue mayor en las muestras de conjuntivitis y al contrario, el porcentaje de complejas mayor en los sanos. Si tomamos en consideración que las células simples pudieran ser linfocitos, tiene sentido que esta población represente un porcentaje mayor en las muestras de conjuntivitis. En cuanto a la viabilidad de ambos tipos celulares, las células simples a pesar de estar en su mayoría viables en ambos grupos, en el grupo de conjuntivitis el porcentaje de estas células en estado de viables es aún mayor, siendo estadísticamente significativo. Esto podría tener relación con que las células linfoides permanezcan más tiempo viables para combatir la infección viral. La viabilidad de las células complejas también es significativamente mayor en el grupo de las conjuntivitis. Muy probablemente durante el proceso inflamatorio haya una regeneración más rápida del epitelio (células complejas) y se alteren las fases de la apoptosis, como mecanismo de reparación del daño epitelial ocasionado. De estos datos se deduce que el porcentaje de células simples y complejas en apoptosis precoz, tardía y muertas, sea mayor en el grupo de los sanos: La infección activa las células y disminuye la apoptosis y la muerte celular. En relación al estudio del ciclo celular, los únicos datos significativos se encontraron en el porcentaje de células en fase G0-G1, que fue mayor en el grupo de sanos.

El siguiente estudio realizado consistió en comparar las mismas variables entre aquellas muestras con confirmación positiva para adenovirus por PCR (18) y muestras negativas (6). El porcentaje de linfocitos T en ambos grupos fue similar, sin embargo la subpoblación de LT CD8+ fue mayor en el grupo de AdV +. Lo que concuerda con una infección viral como es el caso de los adenovirus. La proporción de LT CD4+ y por lo tanto el cociente CD4+/CD8+ queda al borde de la significación estadística, no pudiendo ser utilizado como biomarcador de infección adenovírica. Las proporciones de LB y LNK se mantienen similares en ambos grupos. En cuanto a los datos de viabilidad, en el grupo de AdV-, la viabilidad de las células simples es mayor. Por el contrario el porcentaje de células simples en apoptosis (precoz y tardía) es mayor en el grupo de AdV+. Con respecto al último estudio realizado, el del ciclo celular, lo único destacable es que en el grupo de AdV +, el porcentaje de células en fase de síntesis es mayor.

En resumen, en este trabajo, demostramos que en las conjuntivitis diagnosticadas por la clínica como foliculares de posible etiología viral la inflamación ocular se

acompaña de un infiltrado inflamatorio rico en linfocitos T y en concreto de linfocitos T citotóxicos (CD8+), por ser éstos los más adecuados en la acción antiviral. El cociente CD4/CD8 se apunta como un posible biomarcador en estos casos. No siendo útil como biomarcador de conjuntivitis adenovírica. Reforzamos también, el concepto de la existencia de dos grandes subtipos celulares en la conjuntiva, compuestos por elementos simples y complejos que se modifican respondiendo a un patrón de inflamación, donde aumentan las células simples (lo que se correlaciona con un aumento en la proporción de linfocitos intraepiteliales). La viabilidad celular también se altera por la inflamación, aumentando la viabilidad de las células simples y las complejas. Las simples para desarrollar una adecuada respuesta a la inflamación y las complejas en respuesta a la acción viral que mantiene a las células vivas el tiempo suficiente como para completar el ciclo de replicación viral, de hecho la disminución de la apoptosis en las muestras infectadas podría relacionarse con la capacidad del adenovirus de inhibir las distintas vías de la apoptosis con la finalidad de evitar la lisis celular antes de que el ciclo de replicación finalice⁴². Cabe destacar que con los resultados obtenidos se refuerza la importancia del papel de los linfocitos CD8+ en la eliminación de las células infectadas. Además, debemos recordar y conocer que la existencia de técnicas de biología molecular nos pueden ayudar a diagnosticar etiológicamente diversos procesos clínicos, aunque, en nuestro caso y debido a lo inespecífico del tratamiento, no nos resulte clínicamente relevante.

6. CONCLUSIONES

1. En base a nuestros resultados, no existen biomarcadores adecuados para el diagnóstico de conjuntivitis por adenovirus.
2. Sin embargo, la infiltración linfocitaria y el cociente CD4/CD8 sí sirven como biomarcadores de conjuntivitis folicular de posible etiología viral.
3. El diagnóstico molecular mediante PCR, confirma que el diagnóstico clínico de las conjuntivitis adenovíricas a veces es inexacto.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Jessica A. Belser, Paul A. Rota, Terrence M. Tumpey. Ocular Tropism of Respiratory Viruses. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013 Mar;77 (1):144-56.
2. Chentoufi AA, Dasgupta G, Nesburn AB, Bettahi I, Binder NR, Choudhury ZS, Chamberlain WD, Wechsler SL, BenMohamed L. Nasolacrimal duct closure modulates ocular mucosal and systemic CD4+ T-cell responses induced following topical ocular or intranasal immunization.. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010. 17:342–353.
3. Liesbeth Lenaerts, Erik De Clercq and Lieve Naesens. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Reviews in Medical Virology.* 2008; 18: 357–374.
4. Aoki K, Kaneko H, Kitaichi N, Ohguchi T, Tagawa Y, Ohno S. Clinical features of adenoviral conjunctivitis at the early stage of infection.. *Jpn J Ophthalmol.* 2011 Jan; 55 (1):11-5.
5. De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ, Khoo SH, Hierholzer JC.. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol.* 1999 Dec; 37(12):3940-5
6. Robinson CM, Zhou X, Rajaiya J, Yousuf MA, Singh G, DeSerres JJ, Walsh MP, Wong S, Seto D, Dyer DW, Chodosh J, Jones MS.. Predicting the next eye pathogen: analysis of a novel adenovirus. *MBio.* 2013 Apr 9; 4(2):e00595-12
7. Robinson CM, Singh G, Lee JY, Dehghan S, Rajaiya J, Liu EB, Yousuf MA, Betensky RA, Jones MS, Dyer DW, Seto D, Chodosh J. Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci Rep.* 2013;3: 1812.
8. Lynch JP 3rd, Fishbein M, Echavarria M. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011 Aug; 32(4):494-511
9. Cupelli K, Stehle T. Viral attachment strategies: the many faces of adenoviruses. *Curr Opin Virol.* 2011 Aug; 1(2):84-91
10. Dand Hiroaki Ishiko Shudo Yamazaki, Koki Aoki, Shigeaki Ohno, Eitaro Suzuki Rika Miura-Ochiai, Yasushi Shimada, Tsunetada Konno. Quantitative Detection and Rapid Identification of Human Adenoviruses. *Clin. Microbiol.* 2007, 45(3):958.
11. Gordon RY et al. Prolonges recovery of desiccated adenoviral from plastic and metal surfaces in vitro. *Ophthalmology* 1993; 100: 1835-39.

12. Nauheim et al. Prolonged recovery of desiccated adenovirus from various surfaces. *Ophthalmology* 1990; 97: 1450-53.
13. Melendez CP, Florentino MM, Martinez IL, Lopez HM. Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus in medical residents. *Mol Vis.* 2009; 15:557-62.
14. González-López JJ, Morcillo-Laiz R, Muñoz-Negrete FJ. Adenoviral keratoconjunctivitis: an update. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2013. Mar; 88 (3):108-115.
15. DOSSO AA, Rungger-Brändle E Clinical course of epidemic keratoconjunctivitis: evaluation by in vivo confocal microscopy. *Cornea.* 2008 Apr; 27 (3):263-8
16. Renard G. Adenoviral keratoconjunctivitis.. *J Fr Ophtalmol.* 2010 Oct; 33(8):586-92.
17. Tabbara KF, Omar N, Hammouda E, Akanuma M, Ohguchi T, Ariga T, Tagawa Y, Kitaichi N, Ishida S, Aoki K, Ishiko H, Ohno S. Molecular epidemiology of adenoviral keratoconjunctivitis in Saudi Arabia.. *Mol Vis.* 2010 Oct 24; 16: 2132-6.
18. Huang S, Reddy V, Dasgupta N, Nemerow GRA single amino acid in the adenovirus type 37 fiber confers binding to human conjunctival cells. *J Virol.* 1999 Apr;73 (4):2798-802.
19. Aoki K, Tagawa Y. A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan. *Int Ophthalmol Clin.* 2002 Winter; 42(1):49-54
20. Okumus S, Coskun E, Tatar MG, Kaydu E, Yayuspayi R, Comez A, Erbagci I, Gurler B. Cyclosporine a 0.05% eye drops for the treatment of subepithelial infiltrates after epidemic keratoconjunctivitis. *BMC Ophthalmol.* 2012 Aug 18;12:42.
21. Ashish V. Chintakuntlawar, Jamens Chososh. Cellular and tissue architecture of conjunctival membranes in epidemic keratoconjunctivitis.. *Ocular Immunology Inflammation.* 2010 October: 18(5): 341.
22. 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.
23. Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. In Niederkorn JY, Kaplan HJ, eds. *Immune Response and the Eye.* 2nd ed. Basel, Switzerland: Karger; 2007;36-49.
24. Knop E, Knop N. Influence of the eye-associated lymphoid tissue (EALT) on inflammatory ocular surface disease. *Ocul Surface* 2005;3:S180–S186.

25. Knop E, Knop N. A functional unit for ocular surface immune defense formed by the lacrimal gland, conjunctiva and lacrimal drainage system. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506:835–844.
26. Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat* 2005;206:271–285.
27. Knop N, Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1270–1279.
28. Dua HS, Gomes JA, Jindal VK, Appa SN, Schwarting R, Eagle RC Jr, Donoso LA, Laibson PR. Mucosa specific lymphocytes in the human conjunctiva, corneoscleral limbus and lacrimal gland. *Curr Eye Res* 1994;13:87–93.
29. Hingorani M, Metz D, Lightman SL. Characterisation of the normal conjunctival leukocyte population. *Exp Eye Res* 1997;64:905–912.
30. Knop E, Knop N, Claus P. Local production of secretory IgA in the Eye-Associated Lymphoid Tissue (EALT) of the normal human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(6):2322-2329
31. Knop E, Knop N. Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in the human eye – Components and topographical distribution. *Ophthalmic Res.* 1999a. 31 (Suppl.), 156.
32. Knop N, Knop E. Ultrastructural anatomy of CALT follicles in the rabbit reveals characteristics of M-cells, germinal centres and high endothelial venules. *J Anat* 2005; 207:409-26.
33. 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 Jul; 5(4):455-67.
34. Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea.* 1998; 17:38-56
35. Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45:221-226.
36. Yagmur M, Ersoz C, Reha Ersoz T, Varinli S. Brush technique in oculaire surface cytology. *Diagnostic Cytopathology* 17;2:88.91.
37. 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 minimally invasive means. *Molecular Vision* 2009 Oct 27;15:2185-95.

38. Fujihara T, Takeuchi T, Saito K, Tsubota K. Flow cytometric analysis of surface antigens on human conjunctival epithelial cells. *Ophthalmic Res* 1997;29:103-9.
39. Rika Miura-Ochiai, Yasushi Shimada, Tsunetada Konno, Shudo Yamazaki, Koki Aoki, Shigeaki Ohno, Eitaro Suzuki, and Hiroaki Ishiko. Quantitative Detection and Rapid Identification of Human Adenoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 2007, p. 958–967 Vol. 45, No.3
40. Fujishima H, Saito I, Takeuchi T, Tsubota K. Immunological characteristics of patients with vernal keratoconjunctivitis *Jpn J Ophthalmol* 2002;46:244-8.
41. Rätty R, Kleemola M, Melén K, Stenvik M, Julkunen I. Efficacy of PCR and other diagnostic methods for the detection of respiratory adenoviral infections. *J Med Virol*. 1999 Sep;59(1):66-72.
42. Stephen A, K.Harvey, Eric G.Romanowski, Kathleen A. Yates, Y. Jerold Gordon: The role of conjunctival defensin-like chemokines (IP 10, I-TAC) and phagocytic human defensin- α , *IOVS*, October 2005 vol 46 no 10).

8. ANEXOS

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio:	EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA DE CONJUNTIVITIS ADENOVÍRICA
Nº de estudio:	IOBAXXX-2013
Coordinadores:	Dra. Margarita Calonge (Tf. 983 184 763); Dr. Roberto Reinoso Tapia (Tf. 983 42 3238).
Centro:	Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid. Campus Miguel Delibes, Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Se le ha invitado a participar en un estudio clínico coordinado por el IOBA para pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis adenovírica.

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 general de este estudio es la búsqueda de biomarcadores inmunológicos que ayuden al oftalmólogo en el diagnóstico de las conjuntivitis adenovíricas.

2. Participación voluntaria

Debe saber que su participación en este proyecto 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 recogerán células de la superficie ocular mediante una técnica mínimamente invasiva como es la citología por cepillado. Previa anestesia tópica (0.04% Oxybuprocaina + 0.01% Tetracaina), se procederá a la rotación suave del cepillo (Cytobrush® plus GT, Medscand Medical, Sweden) sobre la conjuntiva del fondo de saco inferior. Esta maniobra se repetirá en 3 ocasiones más, siempre realizándolo en el mismo sitio y con los mismos medios.

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

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: EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA DE CONJUNTIVITIS ADENOVÍRICA

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)

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

Se le ha invitado a participar en un estudio clínico coordinado por el IOBA para sujetos controles.

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.

8. Objetivo del estudio

El objetivo general de este estudio es la caracterización del componente epitelial del CALT en sujetos sanos

9. Participación voluntaria

Debe saber que su participación en este proyecto 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.

10. 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 recogerán células de la superficie ocular mediante una técnica mínimamente invasiva como es la citología por cepillado. Previa anestesia tópica (0.04% Oxybuprocaina + 0.01% Tetracaina), se procederá a la rotación suave del cepillo (Cytobrush® plus GT, Medscand Medical, Sweden) sobre la conjuntiva del fondo de saco inferior. Esta maniobra se repetirá en 3 ocasiones más, siempre realizándolo en el mismo sitio y con los mismos medios.

Usted deberá notificar al responsable del estudio si en el momento de la misma padece alguna enfermedad y/o está tomando algún tipo de medicación, bien sea bajo prescripción o no. Al aceptar

participar en este programa permitirá que se utilice su muestra para estudiar cualquier parámetro relacionado con la respuesta inmune/infecciosa.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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 sujetos sanos.

Nº de estudio: IOBAXXX-2013

Al firmar abajo, yo declaro que:

- 7) 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.
- 8) He tenido la oportunidad de preguntar y obtener respuestas satisfactorias a cada una de mis preguntas
- 9) 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
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Se me entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para mis propios archivos.

Nombre del Paciente

Firma _____
(Debe ser firmado y fechado por el paciente)

Fecha _____

Nombre del representante legalmente autorizado

Firma _____ 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)