



**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE OFTALMOBIOLOGÍA APLICADA (IOBA)**

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPONENTE  
EPITELIAL DEL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO  
A LA CONJUNTIVA-CALT- EN NIÑOS SANOS**

Trabajo de Fin de Máster “Investigación en Ciencias de la Visión” presentado por

**Magnolia Trinidad Cano Suárez**

**Directores:** Dr. Roberto Reinoso Tapia  
Prof. Dra. Margarita Calonge

**Equipo Investigador:** Dr. Alfredo Corell Almuzara  
Dra. Ana Isabel ValleladoAlvarez  
Dra. Carmen Martín Alonso  
Soledad Rubio Martínez





## 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 Dña. Margarita Calonge Cano**

en calidad de Tutores de la alumna

Dña. **Magnolia Trinidad Cano Suárez**

del Máster en: **Investigación en Ciencias de la Visión**

Curso académico: **2012-2013**

CERTIFICA haber leído la memoria del Trabajo de Fin de Máster titulado **“CARACTERIZACIÓN DEL COMPONENTE EPITELIAL DEL CALT EN NIÑOS SANOS”** 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.: Margarita Calonge Cano

El Tutor



## ÍNDICE

Resumen.....	<b>1</b>
1. Introducción.....	<b>3</b>
1.1. Sistema inmune de la mucosa ocular.....	3
1.2. Tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT).....	4
1.3. Técnicas mínimamente invasivas.....	7
1.4. Caracterización celular por citometría de flujo.....	8
2. Hipótesis de trabajo y objetivos.....	<b>9</b>
2.1. Hipótesis de trabajo.....	9
2.2. Objetivos.....	9
3. Material y métodos.....	<b>10</b>
3.1. Sujetos.....	10
3.2. Técnica anestésica.....	11
3.3. Obtención de células de la superficie ocular.....	12
3.4. Caracterización de la población celular obtenida.....	13
3.5. Análisis estadístico.....	16
4. Resultados.....	<b>17</b>
4.1. Fenotipo.....	17
4.2. Viabilidad.....	19
4.3. Ciclo celular.....	21
5. Discusión.....	<b>23</b>
6. Conclusiones.....	<b>27</b>
7. Agradecimientos.....	<b>28</b>
8. Bibliografía.....	<b>29</b>
9. Anexos.....	<b>33</b>



## RESUMEN

### CARACTERIZACIÓN DEL COMPONENTE EPITELIAL DEL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA CONJUNTIVA (CALT) EN NIÑOS SANOS

#### **Trabajo de Fin de Máster “Investigación en Ciencias de la Visión”**

**Alumna:** Lda. Magnolia Trinidad Cano Suárez.

**Directores:** Dr. Roberto Reinoso Tapia, Prof. Dra. Margarita Calonge Cano.

**Equipo Investigador:** Prof. Alfredo Corell Almuzara, Dra. Ana Isabel Vallelado Álvarez, Dra. Carmen Martín Alonso, Lda. Soledad Rubio Martínez.

**Introducción:** La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que recubre la superficie interna de los párpados y la superficie anterior de la esclera hasta el limbo, formando una barrera mecánica e inmunológica frente a todo tipo de agresiones. Como todo epitelio mucoso, está equipada con una amplia gama de mecanismos de defensa innatos pero, además, posee células de respuesta inmune específicas, como los linfocitos T y B. Toda esta estructura recibe el nombre de tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT). 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, aún falta por dilucidar si dicha distribución varía en función de la edad. El objetivo de este estudio fue estudiar la distribución fenotípica y funcional del componente epitelial del CALT en niños sanos, comparando las diferentes regiones entre sí y, además, éstas con las correspondientes a las de individuos adultos, las cuales ya han sido descritas y publicadas por nuestro grupo de investigación.

**Material y métodos:** Se recogieron células conjuntivales de la región tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior de 5 pacientes pediátricos, que fueron sometidos a cirugía con anestesia general de corrección de estrabismo. 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+ (linfocitos intraepiteliales o IELs). Estos IELs estaban distribuidos de manera regular en la conjuntiva de niños sanos, sin existir diferencias significativas entre las 3 zonas, pero en cantidades significativamente mayores que las encontradas en adultos. Además, la mayor parte de los IELs que residían en el epitelio de la conjuntiva del niño sano eran linfocitos T, seguidos de los linfocitos B y finalmente linfocitos NK. Finalmente, la proporción CD3/CD19 fue notablemente mayor en la zona tarsal superior que en el resto de zonas. En el ensayo de apoptosis se observaron, al igual que lo sucedido en adultos, dos poblaciones celulares diferenciadas por el tamaño y la complejidad celular. Por último, se constató que el índice medio proliferativo de las células del epitelio conjuntival era relativamente más alto en la región tarsal superior y bulbar superior que en el fondo de saco inferior.

**Conclusiones:** Estos resultados demuestran que el componente epitelial del CALT está presente de manera regular en la conjuntiva del niño sano, variando en cuanto a su fenotipo, viabilidad y proliferación celular en las regiones conjuntivales analizadas, lo que corrobora que juega un papel fundamental en la protección de la superficie ocular sana.



## 1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune de 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. 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 (Suzuki et al., 2010) y, de hecho, existen pocos estudios que describan estos tejidos linfoides en otras mucosas como, por ejemplo, la mucosa ocular.

### 1.1. SISTEMA INMUNE DE LA MUCOSA OCULAR

La superficie ocular 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 en la película lagrimal y en el propio tejido (Knop and Knop, 2007). El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa contra los microorganismos invasores y consta de barreras anatómicas de la superficie ocular (mucinas, epitelio, etc.) y de péptidos antimicrobianos presentes en la película lagrimal.

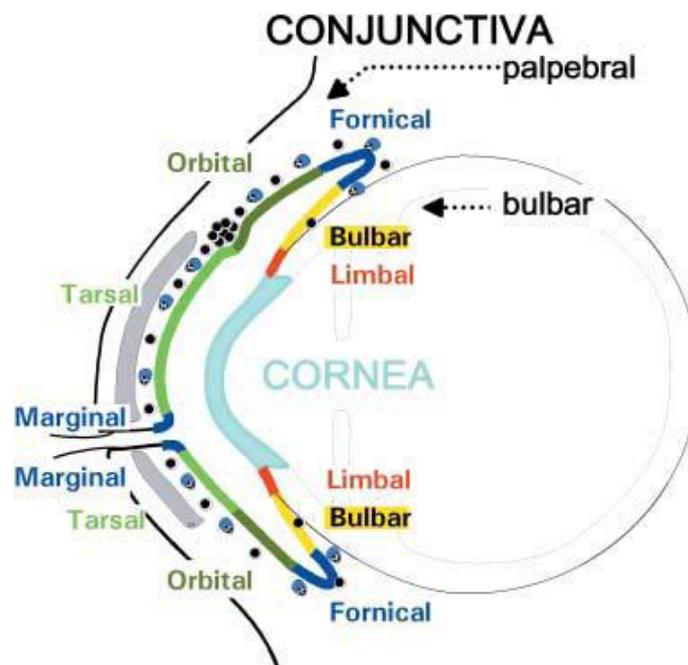
La repuesta inmunitaria innata no es específica de los antígenos, sino que actúa frente a diversos microorganismos. El sistema inmunitario adaptativo actúa como una segunda línea de defensa y sí es específica de los antígenos, por lo que normalmente sólo reacciona con el microorganismo que ha provocado la respuesta. Éste dispone de memoria inmunológica y reacciona más de prisa en los contactos posteriores con el mismo microorganismo.

En el micro-entorno único de la superficie ocular, estas dos armas de la respuesta inmunológica pueden tener funciones diferentes, pero existe una interrelación entre ellas para equilibrar la tolerancia a la microflora normal, la exposición a los irritantes del entorno y la irrigación sanguínea y linfática limitada de la córnea y algunos tejidos intraoculares.

En los últimos años, se ha demostrado la existencia de un sistema inmune común para toda la superficie ocular, denominado sistema inmune de la mucosa ocular (*ocular mucosal immune system*, OMIS) o tejido linfoide asociado al ojo (*eye-associated lymphoid tissue*, EALT), que actuaría como una unidad anatómica y funcional protegiendo de manera coordinada la mucosa ocular y que englobaría al tejido linfoide asociado a la conjuntiva (*conjunctiva-associated lymphoid tissue*, CALT), al tejido linfoide asociado al sistema de drenaje lagrimal (*lacrimal drainage-associated lymphoid tissue*, LDALT) y al tejido linfoide asociado a la glándula lagrimal (*lacrimal gland-associated lymphoid tissue*, LGALT) (Knop and Knop, 2007, 2005, 2002; Nesburn et al, 2006; Sullivan, 1999).

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

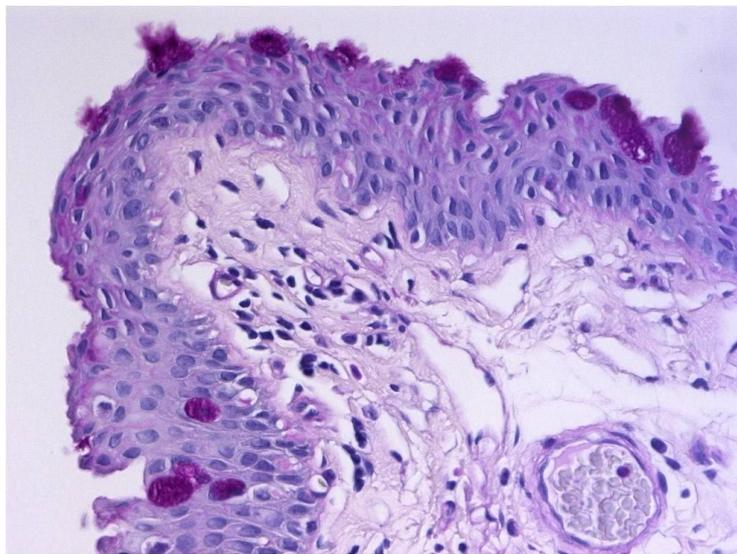
La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que recubre la cara interna de los párpados (conjuntivas palpebrales), la esclera anterior (conjuntiva bulbar), y forma un repliegue entre ambas secciones de la conjuntiva (conjuntiva de fondo de saco o fórnix) (Figura 1).



**Figura 1.**-Zonas geográficas de la conjuntiva (tomado de Knop and Knop, 2005).

Histológicamente, (Rodrigues and Hidayat, 2000; Cibis, 2005) la conjuntiva es similar a otras membranas mucosas y se compone de un epitelio estratificado no

queratinizado compuesto por al menos 2 capas, aunque frecuentemente más, sobre un estroma formado por tejido conectivo fibrovascular que contiene vasos y nervios linfáticos (Figura 2). En la capa basal del epitelio se observan melanocitos que producen melanina y la inyectan a las células de alrededor. A lo largo de todo el epitelio se pueden observar células caliciformes, encargadas de producir el componente mucoide de la película lagrimal, que son más numerosas en la porción ínfero nasal de la conjuntiva bulbar. En el canto interno se encuentran el pliegue semilunar y la carúncula en la que se pueden encontrar folículos pilosos finos y glándulas sebáceas e incluso glándulas lagrimales accesorias.

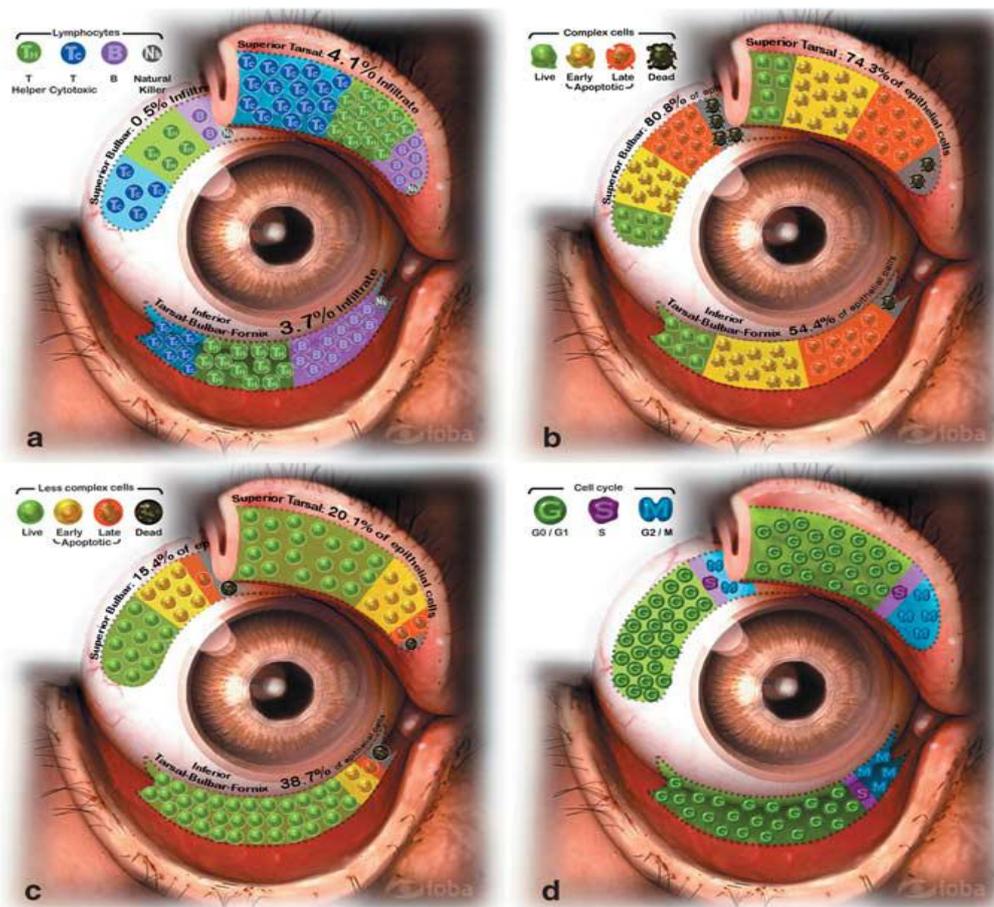


**Figura 2.**-Imagen histológica representativa de la conjuntiva humana, en la que se aprecian las células caliciformes teñidas con el PAS (imagen cedida por el Dr. José Carlos López, Laboratorio de Patología Ocular, IOBA)

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, un tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT), que le va a proporcionar toda una serie de mecanismos de defensa (innatos y adaptativos) para mantener integra la superficie ocular. El CALT se encuentra formado por tejido linfoide organizado (folículos linfoides) donde predominan las células B y por tejido linfoide difuso, principalmente compuesto por linfocitos T y células plasmáticas productoras de IgA, distribuidos arbitrariamente entre el epitelio (linfocitos intraepiteliales- IELs) y el tejido conectivo subyacente (linfocitos de lámina propia)(Knop and Knop, 2000; Hingorani et al, 1997; Dua et al, 1994). Aunque

históricamente 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 (Knop and Knop, 2008, 2005). 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) en distintas zonas topográficas de la conjuntiva humana.

Además, y dentro de nuestro grupo de trabajo, Reinoso et al, (2012) 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 3).



**Figura 3.-** 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 (Tomado de Reinoso et al, 2012).

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 3). 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 3).

Sin embargo, aún falta por dilucidar si tanto el CALT como la viabilidad y/o la proliferación celular del epitelio conjuntival varían en función de la edad. Este hecho sería importante pues de tener la edad del individuo una influencia en estos parámetros, como de hecho se anticipa, se deberá tener presente siempre el grupo de edad que se estudie en una población enferma y solo hacer comparaciones con individuos sanos de edad similar.

Por ello, en este estudio se pretende realizar un mapa topográfico de todas estas variables en la conjuntiva de niños sanos y compararlo con el ya existente en adultos sanos.

### **1.3. TÉCNICAS MINIMAMENTE INVASIVAS**

Los métodos mínimamente invasivos para la recolección de células han sido ampliamente utilizados en todo tipo de tejidos, como por ejemplo, en las células epiteliales traqueo-bronquiales, células epiteliales nasales, células uroteliales, células endoteliales de cordón umbilical, células escamosas del esófago, etc. La gran ventaja de estas técnicas es que pueden realizarse de manera repetitiva en los pacientes sin ocasionar grandes molestias a los sujetos (Martínez-Osorio et al, 2009).

En los últimos años, la técnica más utilizada para llevar a cabo todos estos estudios ha sido la citología de impresión, incluidos los realizados en la superficie ocular (Corrales et al, 2003; Diebold et al, 1998, 1999, 2002). En este contexto, varios autores demostraron que la citología de impresión conjuntival (CIC) era capaz de recoger un número muy elevado de células de la superficie ocular, concretamente de 2 a 6 capas superficiales de epitelio conjuntival (Calonge et al, 2004; Brinole-Baudouin et al, 2004). Sin embargo, recientes estudios han demostrado que la citología por cepillado conjuntival (Martínez-Osorio et al, 2009; Reinoso et al, 2011, 2012), 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 (Yagmur et al, 1997).

#### **1.4. CARACTERIZACIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. 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. Las aplicaciones más relevantes de la citometría de flujo en la práctica médica se relacionan con la hematología e inmunología clínica, midiendo parámetros como número y clasificación de células sanguíneas. Esta técnica es empleada también en el conteo de subpoblaciones de linfocitos en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana, así como la caracterización de leucemias agudas y síndromes linfoproliferativos crónicos, entre otros padecimientos (Orfao A et al, 1992). Las aplicaciones de la citometría de flujo son numerosas, lo cual ha permitido el empleo de estos instrumentos de manera amplia en varios campos, tanto de la investigación biológica como médica. En la superficie ocular, la citometría de flujo se ha utilizado para estudiar diferentes patologías, especialmente de origen inmunológico o inflamatorio, como el síndrome de ojo seco (Reinoso et al, 2011) y las conjuntivitis alérgicas (Diebold et al, 2003; Fujihara et al, 1997). También se ha utilizado en la identificación de células madre (Romano et al, 2003), en la caracterización fenotípica (Reinoso et al, 2012), en análisis de viabilidad (Martínez-Osorio et al, 2009), análisis de proliferación (Reinoso et al, 2012), etc.

## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

### 2.1. HIPOTESIS DE TRABAJO

El componente epitelial del CALT se encuentra presente de manera regular en la superficie ocular de niños sanos, variando funcional y fenotípicamente, no sólo en función de la región topográfica de la conjuntiva, sino también cuando es comparado con una población adulta sana.

### 2.2. OBJETIVOS

**OBJETIVO 1. Obtención, mediante métodos mínimamente invasivos, de células conjuntivales en niños sanos que van a ser intervenidos estrabismo.** Este objetivo consiste en obtener, ocasionando las mínimas molestias al donante, el número suficiente de células de la conjuntiva de manera que permanezcan en medio de cultivo en condiciones óptimas el tiempo suficiente para llevar a cabo su posterior caracterización.

**OBJETIVO 2. Caracterización fenotípica y funcional, mediante citometría de flujo, de las células epiteliales y linfocitos intraepiteliales (IELs) obtenidos.** Con este objetivo, se pretende determinar el fenotipo de las células encontradas en la conjuntiva humana de niños sanos (células de estirpe epitelial y células pan-leucocitarias), evaluar su contenido de ADN y su viabilidad/apoptosis.

**OBJETIVO 3. Análisis de la distribución topográfica del componente epitelial del tejido linfoide asociado a la conjuntiva (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 mapa topográfico de la distribución del CALT a lo largo de toda la conjuntiva humana infantil

**OBJETIVO 4. Comparación de los resultados obtenidos con los ya existentes en adultos sanos.** La finalidad de este objetivo es demostrar que el componente epitelial del sistema inmune asociado a la mucosa ocular (CALT) varía no sólo en función de la región topográfica de la conjuntiva sino también con la edad, para lo cual se compararán estos resultados con los ya obtenidos en adultos previamente por este grupo de investigación.

### **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 (ver anexos). El estudio siguió los principios de la Declaración de Helsinki y el protocolo fue presentado a la Comisión de Investigación del IOBA y aprobado por el Comité Ético del HCUV.

Los participantes fueron pacientes pediátricos (entre 3 y 12 años de edad) que iban a ser sometidos a anestesia general para 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.

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

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), procediéndose posteriormente a la técnica programada para corrección del estrabismo de manera habitual.

#### **Criterios de inclusión**

- Niños/as con edades comprendidas entre los 3 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 superficie ocular.
- Específicamente, se descartan la presencia de ojo seco mediante la historia clínica, la exploración con lámpara de hendidura y test de Schirmer sin anestesia.
- 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**

- Niñas que, aunque sean menores de 12 años, ya hayan tenido menstruación.
- Cualquier patología ocular diferente del estrabismo que motiva la cirugía.
- Uso de lentes de contacto.
- Haber sufrido alguna cirugía ocular en los últimos 6 meses.
- Haber recibido medicación tópica ocular en los últimos 6 meses.
- Uso de fármacos sistémicos, inhaladores, pomadas, etc. de uso crónico 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. TÉCNICA ANESTESICA**

La anestesia general se llevó a cabo, tanto en el IOBA como en el HCUV, por médicos anestesiólogos habituales a este tipo de cirugías y a pacientes en edad infantil. En los pacientes pediátricos, operaciones mínimamente agresivas o incluso simples exploraciones requieren de la administración de una técnica de anestesia general dada la ausencia, más que probable, de colaboración por parte del niño (Saunders RA, 1993).

- **Inducción anestésica.** Los agentes de inducción utilizados con más frecuencia son el propofol por vía intravenosa y el sevoflorane por vía inhalatoria (Fonseca et al, 2004). Tanto en el IOBA como en el HUV (Figura 4), se utilizó la inducción inhalatoria con el agente de elección en pediatría, el sevoflorane, que produce una hipnosis profunda en breves instantes y proporciona una magnífica estabilidad cardiovascular y respiratoria. La cirugía de estrabismo suele requerir de relajación muscular y ventilación controlada; para ello, se optó por relajantes musculares de vida media intermedia como el atracurio (0,5-1 mg/kg), el cisatracurio (0,1-0,4 mg/kg), el vecuronio (0,1 mg/kg) o el rocuronio (0,5-1mg/kg).

- **Mantenimiento.** Para mantener la anestesia general en los niños, se utilizó o bien sevoflorane 2,5%-3,3% o una perfusión de propofol a 6-10mg/kg/hr (Fonseca et al, 2004).



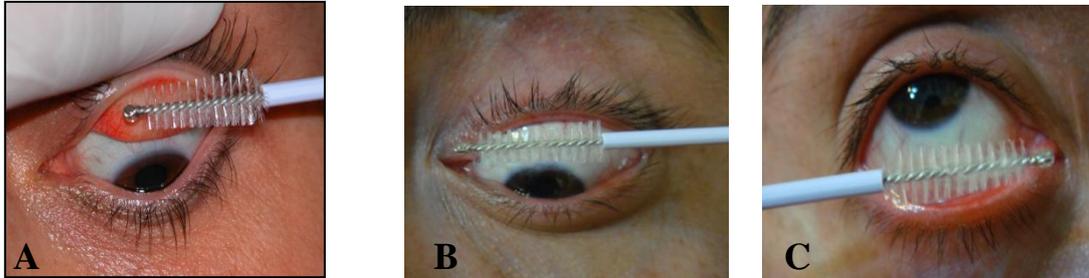
**Figura 4.-** Fase de inducción de la anestesia general (izquierda) y vista general del procedimiento general quirúrgico, una vez que se habían tomado las muestras conjuntivales (derecha) (tomadas de quirófanos del IOBA)

### 3.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LA SUPERFICIE OCULAR

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.

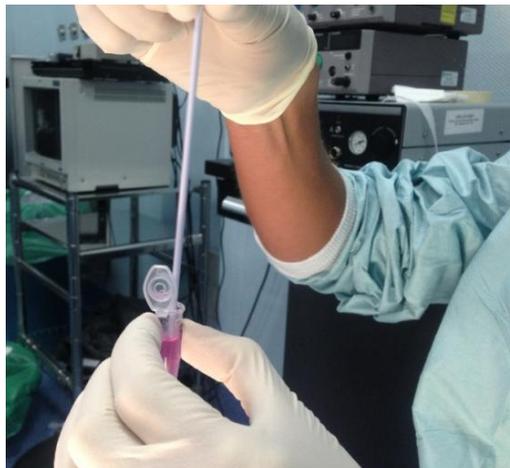
La obtención mínimamente invasiva de células de la superficie ocular fue llevada a cabo mediante citología por cepillado en la conjuntiva tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior (Figura 5), como ya se ha descrito previamente por nuestro grupo

de trabajo (Martínez-Osorio et al, 2009; Reinoso et al, 2011, 2012). Previa anestesia tópica (0.04% oxybuprocaine), se procedió a la rotación suave del cepillo (Cytobrush® plus GT, Medscand Medical, Suecia) sobre cada una de las tres áreas mencionadas independientemente.



**Figura 5.-** Citología por cepillado conjuntival en las tres zonas de estudio. (A) Tarsal superior, (B) bulbar superior y (C) tarsal inferior-fórnix (tomado a pacientes en HCUV)

A continuación, las células se desprendieron del cepillo por rotación circular de éste durante aproximadamente 30 segundos en 1,4 ml de medio de transporte y/o cultivo (DMEM/F-12 suplementado con 10% de suero bovino fetal). Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones más, siempre realizándolo en el mismo sitio y con el mismo medio (Figura 6). 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 a 4°C y se transportaron al laboratorio para su posterior análisis



**Figura 6.-** Rotación suave del cepillo en el interior del tubo que contiene el medio de cultivo, con objeto de desprender las células.

### 3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR OBTENIDA

La caracterización fenotípica y funcional de las células conjuntivales obtenidas se realizó mediante citometría de flujo (Reinoso et al, 2011, 2012). 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 superficie ocular 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	SFC112T4D11	Linfocitos T cooperadores (T <sub>h</sub> )	BC
	CD8-ECD	SFC121Thy2D3	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).

### **3.4.1. 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 centrifugaron durante 5 minutos a 500 g, se decantó el sobrenadante y las células fueron incubadas en oscuridad con los anticuerpos correspondientes (Tabla 1) durante 15 minutos a temperatura ambiente (4 µl de la mezcla de anticuerpos para el tubo 1 y 2.5 µl de cada anticuerpo para el tubo 2). Posteriormente, las células fueron fijadas (15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad) con 500 µl 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.

### **3.4.2. Viabilidad (estudio de apoptosis)**

Para llevar a cabo el estudio de apoptosis/viabilidad, se utilizaron otros 300 µl 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 µl de una solución tampón (Annexin V Binding Buffer, Immunostep, Salamanca, Spain). Posteriormente, las células fueron incubadas en oscuridad con 2,5 µl de anexina V-FITC (25 µg/ml) y 5 µl de yoduro de propidio (IP, a 250 µg/ml) durante 10 minutos a 4°C (Tabla 1). Finalmente, se añadieron 300 µl 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 precoz (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.

### **3.4.3. 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  $\mu$ 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 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, quedando listas las células para ser analizadas con el citómetro de flujo.

### **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico del estudio se realizó usando el programa SPSS para Windows (versión 19.0). Los porcentajes obtenidos de los ensayos de citometría fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar. La significación estadística se determinó mediante el test no paramétrico de Friedman para analizar las diferentes variables en las 3 zonas conjuntivales.

## 4. RESULTADOS

Siguiendo los criterios de inclusión/exclusión, se seleccionaron 5 niños (4 niños y 1 niña), con una edad media de  $7 \pm 3$  años), pudiendo realizar a los 5 las citologías por cepillado en las 3 zonas previstas sin ningún contratiempo. Por lo tanto, el número de muestras de cada zona fue de  $n=5$ .

### 4.1. FENOTIPO

El número de células analizadas en las tres zonas en este ensayo fue de  $17.7 \pm 3.9 \times 10^3$  en la zona tarsal superior,  $18.8 \pm 8.5 \times 10^3$  en la zona bulbar superior y  $41.0 \pm 11.6 \times 10^3$  en el fondo de saco inferior. No hubo diferencias significativas en el número de células analizadas entre las tres zonas. En la Tabla 2 y en la Figura 7 se muestran los hallazgos que se relatan a continuación.

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), con una porcentaje relativamente similar en las tres zonas, no encontrándose diferencias significativas en ellas.

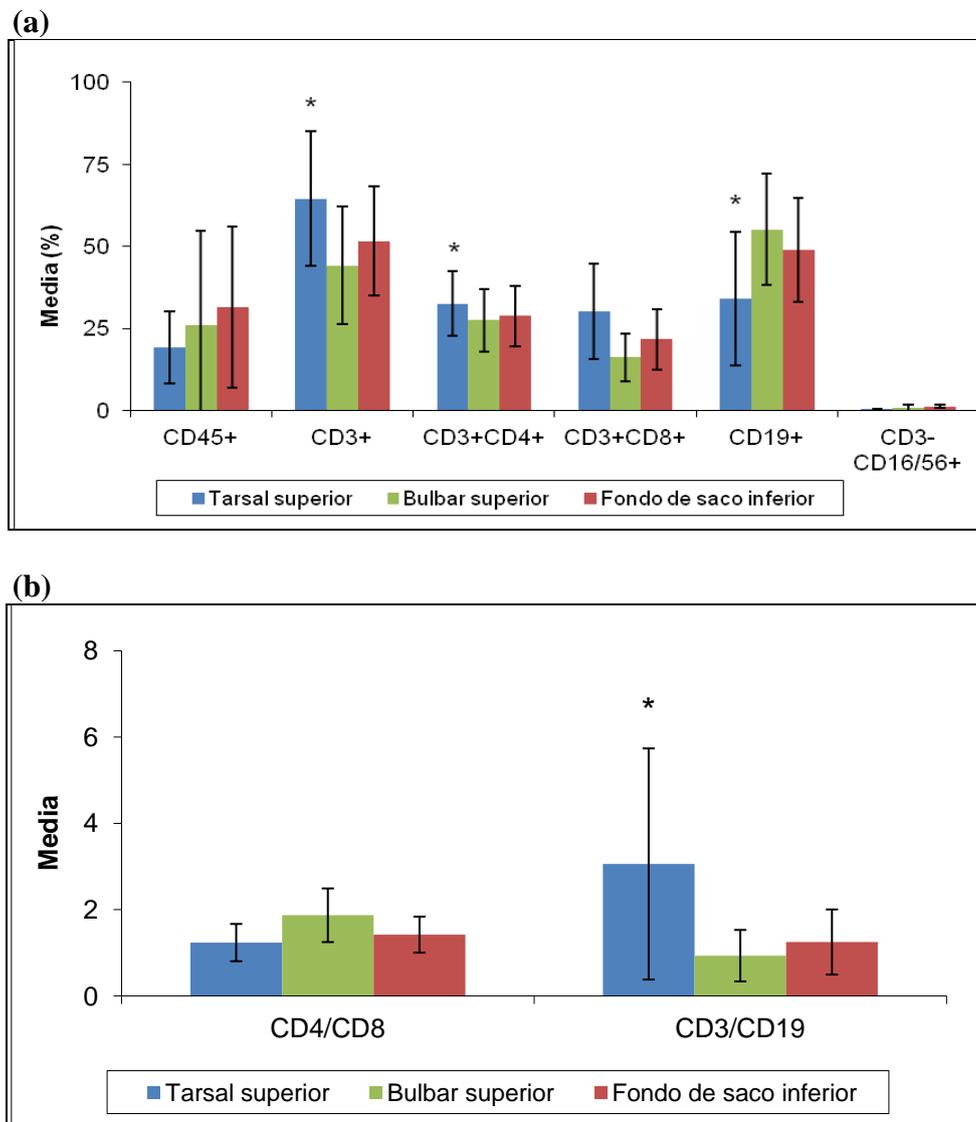
**Tabla 2.-** Análisis fenotípico (citometría de flujo) de los leucocitos intraepiteliales hallados en el epitelio conjuntival de 5 niños sanos y obtenidos mediante citología por cepillado, expresados en porcentajes (media  $\pm$  desviación estándar)

Zona conjuntival	Leucocitos (CD45+)	Linfocitos T (CD3+)	Linfocitos Th CD3+CD4+	Linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Linfocitos B (CD19+)	Linfocitos NK (CD3-CD16/56+)	Cociente $T_h/T_c$ (CD4/CD8)	Cociente T/B (CD3/CD19)
Tarsal superior (n = 5)	19.2 $\pm$ 5.0	64.5 $\pm$ 9.2	32.6 $\pm$ 4.4	30.2 $\pm$ 6.5	34.1 $\pm$ 9.1	0.3 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 1.2
Bulbar superior (n = 5)	25.9 $\pm$ 12.9	44.2 $\pm$ 8.9	27.5 $\pm$ 4.8	16.2 $\pm$ 3.6	55.2 $\pm$ 8.5	0.8 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.3
Fórnix inferior (n = 5)	31.5 $\pm$ 10.9	51.6 $\pm$ 7.5	28.7 $\pm$ 4.1	21.6 $\pm$ 4.1	48.8 $\pm$ 7.1	1.2 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.3
<i>P-valor</i>	0.247	0.039	0.039	0.174	0.049	0.127	0.472	0.049

El análisis inmunofenotípico de los subtipos de linfocitos reveló que la mayor parte de estas células eran linfocitos T CD3+, seguidos de linfocitos B CD19+ y de NK CD3-CD16/56+.

La proporción CD3/CD19 (Linfocitos T/Linfocitos B) varió significativamente entre las tres zonas conjuntivales analizadas ( $p=0.049$ ), siendo casi 3 veces mayor en la zona tarsal superior que en las zonas bulbar superior y fondo de saco inferior, estas dos últimas zonas presentaron un porcentaje muy similar, con un claro predominio de los linfocitos T sobre B.

Al hacer comparaciones entre cada 2 zonas respecto a esta proporción CD3/CD19, ese encuentran diferencias significativas con  $p=0.034$  (tarsal superior vs bulbar superior) y  $p=0.034$  (tarsal superior vs fondo de saco inferior), en ambas comparaciones se evidencian niveles significativamente más altos en la conjuntiva tarsal superior.



**Figura 7.-** Análisis inmunofenotípico de los linfocitos intraepiteliales recogidos por citología por cepillado conjuntival en la zona tarsal superior, bulbar superior y fondo de saco inferior. **(a)** Distribución del porcentaje medio de células CD45+,CD3+,CD4+,CD8+,CD19+,CD16/56 o combinaciones de las mismas. **(b)** Cociente medio CD4/CD8 y CD3/CD19.

\*CD3+( $P=0.039$ ), \*CD3+CD4+( $P=0.039$ ), \*CD19+( $P=0.049$ ), \*CD3/CD19( $P=0.049$ ).

En cuanto a las subclases de linfocitos T, es necesario destacar que en la zona tarsal superior, el porcentaje de linfocitos T cooperadores ( $32.6 \pm 4.4\%$ ) fue muy similar al de linfocitos T citotóxicos ( $30.2 \pm 6.5\%$ ), como queda reflejado en la proporción  $T_H/T_C$ . Sin embargo, en la zona bulbar superior, dicha proporción aumentó ( $T_H/T_C$ : 1.9) al disminuir significativamente el porcentaje de linfocitos T citotóxicos ( $16.2 \pm 3.6\%$ ). Además se puede evidenciar que los niveles significativamente más altos de linfocitos T CD 3+ ( $p=0.039$ ) en las tres zonas es a expensas de los niveles significativamente más altos de linfocitos TCD3+CD4+ ( $P=0.039$ ) en dichas zonas.

## 4.2. VIABILIDAD

El número total de células analizadas fue de  $3.3 \pm 1.4 \times 10^4$  en la zona tarsal superior, de  $2.5 \pm 1.9 \times 10^4$  en la zona bulbar superior y de  $4.4 \pm 1.5 \times 10^4$  células en el fondo de saco inferior. Los resultados de este parámetro se encuentran reflejados en las Tabla 3 y 4 y en las Figuras 8 y 9.

No se encontraron diferencias significativas entre dichas zonas. En este ensayo de apoptosis se observaron dos poblaciones celulares totalmente diferentes en cuanto a su tamaño y complejidad celular. Por un lado, una población de células más grandes, más complejas y con baja viabilidad (Tabla 3 y Figura 8) y, por otro lado, una población de células más pequeñas, más simples pero con mayor viabilidad (Tabla 4 y Figura 9).

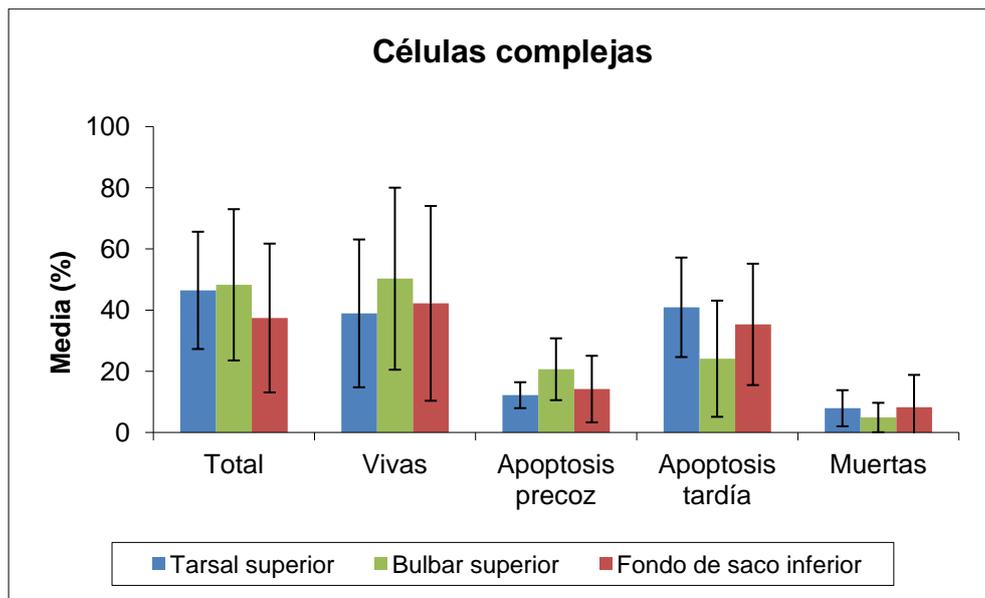
Aunque no se observaron diferencias significativas, sin embargo, se apreció una ligera tendencia a que las células más complejas predominaran en las regiones superiores de la conjuntiva, tanto tarsal ( $46.6 \pm 8.6\%$ ) como bulbar ( $48.3 \pm 11.1\%$ ); contrariamente a lo sucedido con las células más simples que predominaron en el fondo de saco inferior ( $60.7 \pm 11.3\%$ ).

Cabe destacar que en la población de células más complejas, el porcentaje de apoptosis en las tres zonas presentó unos valores más altos en cuanto a apoptosis tardía sobre la apoptosis precoz. En esta misma población, también se observó que la zona bulbar superior tenía los porcentajes más altos de células vivas ( $50.3 \pm 13.3\%$ ) respecto a las otras zonas, aunque sin significación estadística ( $p=0.165$ ), con un mayor porcentaje de apoptosis precoz ( $20.7 \pm 4.5\%$ ) ( $p=0.449$ ) y un menor porcentaje de apoptosis tardía ( $24.1 \pm 8.5\%$ ) ( $p=0.074$ ).

Tampoco se observaron diferencias significativas en el resto de variables analizadas en cuanto a viabilidad celular.

**Tabla 3.-** Análisis de la viabilidad celular de las células grandes y complejas del epitelio conjuntival obtenidos mediante citología por cepillado, de la conjuntiva de 5 niños sanos expresados en porcentajes (media  $\pm$  desviación estándar)

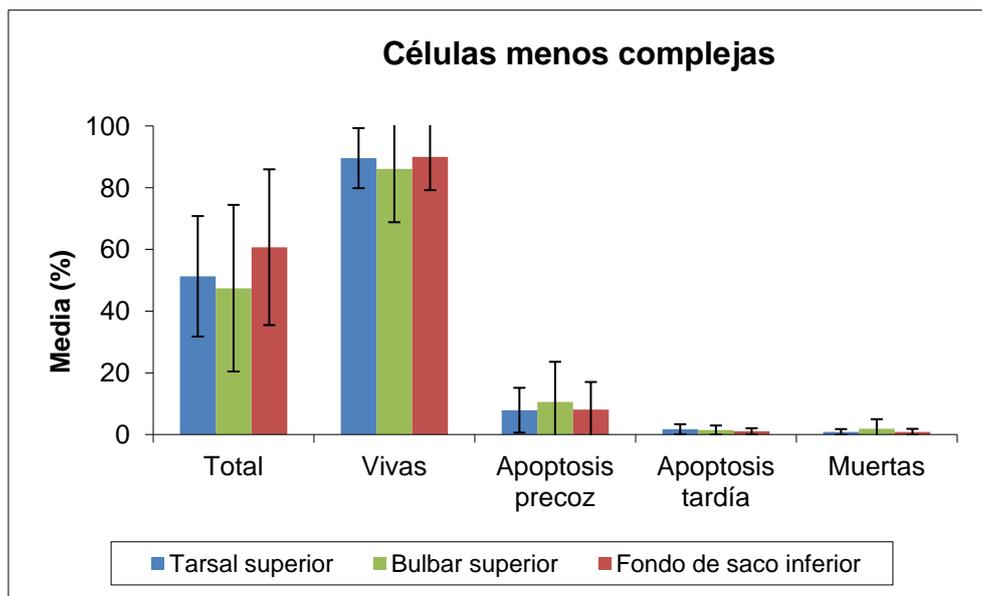
Zona conjuntival	Células complejas				
	Células obtenidas	Células vivas	Apoptosis precoz	Apoptosis tardía	Células muertas
Tarsal superior ( $n = 5$ )	46.6 $\pm$ 8.6	38.9 $\pm$ 10.8	12.2 $\pm$ 1.9	40.9 $\pm$ 7.3	7.9 $\pm$ 2.6
Bulbar superior ( $n = 5$ )	48.3 $\pm$ 11.1	50.3 $\pm$ 13.3	20.7 $\pm$ 4.5	24.1 $\pm$ 8.5	4.9 $\pm$ 2.2
Fórnix inferior ( $n = 5$ )	37.4 $\pm$ 10.9	42.2 $\pm$ 14.2	14.2 $\pm$ 4.9	35.3 $\pm$ 8.9	8.2 $\pm$ 4.7
<i>P-valor</i>	0.549	0.165	0.449	<b>0.074</b>	0.247



**Figura 8.-** 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. Población de células más grandes y complejas.

**Tabla 4.-** Análisis de la viabilidad celular de las células pequeñas y menos complejas del epitelio conjuntival obtenidos mediante citología por cepillado, de la conjuntiva de 5 niños sanos expresados en porcentajes (media  $\pm$  desviación estándar)

Zona conjuntival	Células menos complejas				
	Células obtenidas	Células vivas	Apoptosis precoz	Apoptosis tardía	Células muertas
Tarsal superior (n = 5)	51.3 $\pm$ 8.7	89.5 $\pm$ 4.4	7.9 $\pm$ 3.3	1.7 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.4
Bulbar superior (n = 5)	47.4 $\pm$ 12.1	86.1 $\pm$ 7.7	10.6 $\pm$ 5.8	1.5 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 1.4
Fórnix inferior (n = 5)	60.7 $\pm$ 11.3	90.0 $\pm$ 4.8	8.1 $\pm$ 4.0	1.1 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.4
<i>P-valor</i>	0.449	0.449	0.623	0.247	0.936



**Figura 9.-** 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. Población de células más pequeñas y menos complejas.

### 4.3. CICLO CELULAR

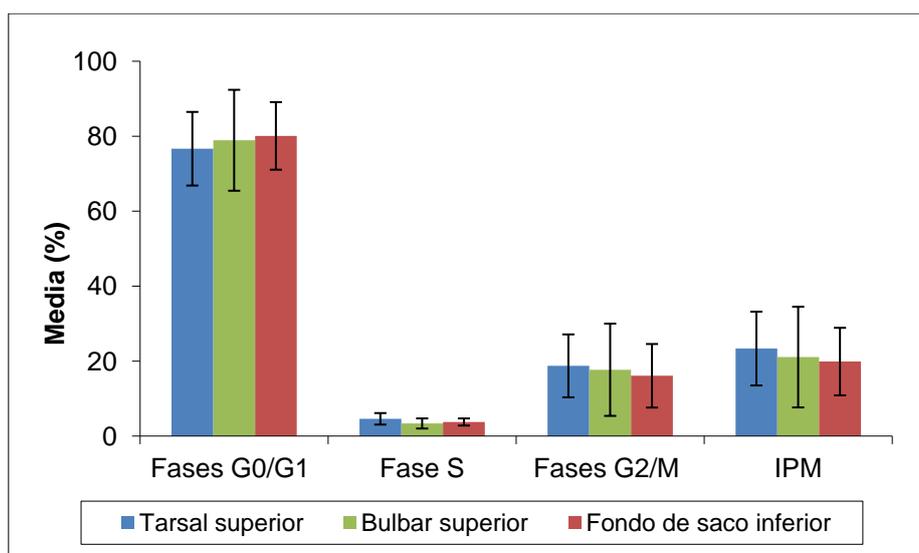
El número total de células analizadas fue de  $5.2 \pm 1.3 \times 10^3$  en la zona tarsal superior, de  $4.4 \pm 1.6 \times 10^3$  en la zona bulbar superior y de  $5.6 \pm 1.6 \times 10^3$  células en el

fondo de saco inferior. No se encontraron diferencias significativas entre dichas zonas. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 10.

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 8). El índice medio proliferativo (MPI) del epitelio conjuntival fue relativamente más alto en la región tarsal superior (23.3 ± 4.4%) y bulbar superior (21.1 ± 6.0%) que en el fondo de saco inferior (19.9 ± 4.0%), aunque sin llegar a ser significativamente diferente.

**Tabla 4.-** Análisis de las fases del ciclo celular de las células del epitelio conjuntival obtenidos mediante citología por cepillado, de la conjuntiva de 5 niños sanos expresados en porcentajes (media ± desviación estándar). Se muestra también el índice medio de proliferación.

Zona conjuntival	Fase del ciclo celular			Índice medio de proliferación (MPI)
	G0/G1	S	G2/M	
Tarsal superior (n = 5)	76.7 ± 4.4	4.6 ± 0.7	18.7 ± 3.8	23.3 ± 4.4
Bulbar superior (n = 5)	78.9 ± 6.0	3.4 ± 0.6	17.7 ± 5.5	21.1 ± 6.0
Fórnix inferior (n = 5)	80.1 ± 4.0	3.8 ± 0.4	16.1 ± 3.8	19.9 ± 4.0
<i>P</i>	0.449	0.074	0.819	0.449



**Figura 10.-** 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.

## 5. DISCUSIÓN

La recogida de las células de la conjuntiva se llevó a cabo por una técnica mínimamente invasiva como fue la citología por cepillado conjuntival, técnica ampliamente utilizada en los últimos años que permite recoger una gran cantidad de células de la superficie ocular permitiendo ser realizada varias veces en el mismo sujeto sin apenas ocasionar daño al paciente (Fujihara T et al, 1997, Martínez-Osorio et al, 2009). Esta técnica está sustituyendo a la que se usaba hasta hace algunos años atrás, la citología por impresión conjuntival (CIC) (Brinole-Baudouin F et al, 2004, Calonge M et al, 2004). 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 linfocitos intraepiteliales que residen en la conjuntiva del niño sano.

Es evidente que la presencia del CALT juega un papel crucial en los mecanismos defensivos de la superficie ocular humana, estando presente no sólo cuando tiene lugar el proceso inflamatorio sino de forma regular, participando en la secreción de mediadores inmunológicos así como en la regulación de la respuesta inmune local (McGhee JR et al, 1999, Hazlett LD et al, 2004). Por eso, resulta esencial conocer la población de linfocitos residentes y sus subtipos en la conjuntiva sana, así como determinar si varían en función de la edad.

En el análisis inmunofenotípico, nuestros resultados demostraron que existe una población considerable de células CD45+, leucocitos intraepiteliales, en el epitelio conjuntival del niño sano, con niveles de infiltración linfocitaria más altos en el fondo de saco inferior seguidos de cerca por la zona bulbar superior y la zona tarsal superior. Resultados similares, se encontraron en estudios anteriores pero en adultos, los cuales afirmaron que la densidad más alta de tejido linfoide difuso se encontraba en el fórnix o en la conjuntiva bulbar (Sacks EH et al 1986; Dua HS et al, 1994; Hingorani M et al, 1997). Sin embargo, nuestros resultados difieren de los encontrados por Reinoso et al (2012), quienes observaron una muy pequeña población de células CD45+ en el epitelio conjuntival de todos los sujetos que participaron en el estudio, con un porcentaje mayor en el tarso superior seguidos del fondo de saco inferior y con un porcentaje apenas detectable de células linfoides de la zona bulbar superior. Resultados similares a Reinoso et al (2012), pero en biopsias de tejido conjuntival, han sido previamente descritos por Knop y cols. (2000), quienes observaron la predominancia tarso-orbital tanto de folículos linfoides como de tejido linfoide difuso subepitelial, en su mayoría

linfocitos T y células plasmáticas. Una de las observaciones realizadas por Reinoso et al (2012), fue que los elevados niveles de linfocitos intraepiteliales que encontraron en el fondo de saco inferior probablemente puedan ser debidos al excesivo tamaño del cepillo que 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 linfocitos intraepiteliales. Con lo cual, se hace necesario seguir investigando debido a que actualmente no hemos encontrado referencias bibliográficas realizadas en la conjuntiva de niños al respecto, para poder realizar comparaciones.

Nuestros resultados también demostraron que esta población leucocitaria que reside en el epitelio de la conjuntiva del niño sano está predominantemente compuesta de linfocitos T (64.5% en la zona tarsal superior, 44.2% en la bulbar superior y 51.6% en el fondo de saco inferior), seguida de linfocitos B (34.1% en la zona tarsal superior, 55.2% en la bulbar superior y 48.8% en el fondo de saco inferior) y de linfocitos NK (0.3% en la tarsal superior, 0.8% en la bulbar superior y 1.2% en el fondo de saco inferior). Estos resultados concuerdan con lo anteriormente publicado donde se indica el predominio de los linfocitos T sobre los B (Reinoso et al, 2012, Dua HS et al, 1994; Hingorani M et al, 1997). En cuanto a la proporción CD3/CD19 en nuestro estudio, en la zona tarsal superior fue aproximadamente de 3:1, sugiriendo una predominancia de linfocitos T sobre los B. Sin embargo, en las otras dos zonas esta proporción disminuyó, en el fondo de saco inferior fue de 1:3 y en la bulbar superior fue de 0:9, indicando una predominancia de linfocitos B. Al respecto, Reinoso et al (2012), señalaron que estos hallazgos sugieren que en estas zonas, donde al epitelio está compuesto de pocas capas epiteliales, es posible que el cepillado conjuntival pueda ocasionalmente cruzar la membrana basal y alcanzar la lámina propia sub-epitelial con el consiguiente incremento de linfocitos B procedentes de folículos linfoides. En cuanto a los subtipos de linfocitos T, cooperadores (CD3+CD4+) y citotóxicos (CD3+CD8+), nuestros resultados mostraron predominio de linfocitos T CD4+ sobre los linfocitos T CD8+ en el epitelio conjuntival del niño sano en las tres zonas analizadas, lo cual concuerda con estudios anteriormente publicados (Reinoso et al, 2012; Sacks EH et al 1986; Hingorani M et al, 1997; Barabino S et al, 2010).

En cuanto al análisis de la viabilidad celular, cabe recordar que la apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular programada y juega un rol crucial en el mantenimiento de la homeostasis celular y en la regulación de la respuesta inmune. Nuestros resultados en cuanto a viabilidad celular en la conjuntiva del niño sano,

corroboraron lo que se había descrito en estudios anteriores (Reinoso et al, 2012; Martínez-Osorio H, et al, 2009), la existencia de dos poblaciones celulares totalmente diferenciadas: Una población compuesta por células grandes, más complejas y de baja viabilidad; y por otro lado, otra población compuesta de células pequeñas, menos complejas, pero con mayor viabilidad. Cabe destacar, que en nuestro estudio, en el grupo de población de células más complejas se observó un porcentaje significativamente mayor de apoptosis tardía en las tres zonas (40.9% en la tarsal superior, 24.1% en la bulbar superior y 35.3% en el fondo de saco inferior), en comparación con los porcentajes de apoptosis precoz de la misma población (12.2% en la tarsal superior, 20.7% en la bulbar superior y 14.4% en el fondo de saco inferior), contrariamente a lo publicado por Reinoso et al (2012). A la luz de estos resultados, se podría interpretar que el grupo de células más complejas correspondería a las células localizadas en las capas más superficiales de la conjuntiva; mientras que el grupo de células menos complejas, podría ser que correspondan a las células que provengan de capas más profundas o basales de la conjuntiva y estén probablemente menos diferenciadas. Estos resultados, concuerdan con estudios anteriores (Giebel J et al, 2005; Tan DT et al, 2000), que mencionan que existe una expresión de proteínas pro-apoptóticas en las células epiteliales superficiales, y factores inhibitorios de la apoptosis en las capas más basales de la conjuntiva. En nuestro estudio, se evidenció que la población de células más complejas, presentaron mayores niveles de apoptosis en la zona tarsal superior que en la zona bulbar superior, probablemente debido al mayor rozamiento de la conjuntiva tarsal con la córnea durante el parpadeo; lo cual se asemeja a lo publicado por Reinoso et al (2012).

En cuanto a la proliferación 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 (Thompson HW et al, 1991; Tan DT et al, 2000), aunque en ningún caso en una población “inmunologicamente” sana. Nuestros resultados demostraron que la mayor parte de las células obtenidas de la conjuntiva del niño sano se encontraban en fases  $G_0/G_1$  (fase de crecimiento o pre-ciclo), seguidas de aquellas con capacidad proliferativa (fases S y  $G_2/M$ ). 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 (Wei ZG et al, 1993; Lavker RM et al, 1998), en los que las células madre conjuntivales de ratón y conejo se encuentra concentradas en el fórnix. El índice medio proliferativo del epitelio conjuntival en el niño sano, fue relativamente más alto en la región tarsal superior ( $23.3 \pm 4.4\%$ ) y bulbar superior ( $21.1 \pm 6.0\%$ ) que en el fondo de saco inferior ( $19.9 \pm 4.0\%$ ) aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo ( $p=0.449$ ). Las células madre con elevado potencial proliferativo suelen estar localizadas en las zonas epiteliales más gruesas (Cotsarelis G et al, 1989, Lavker RM et al, 1993).

Teniendo en cuenta la bibliografía existente, podríamos decir que este es el primer estudio que analiza la distribución de los linfocitos intraepiteliales, la viabilidad celular y la proliferación celular en cada una de las regiones de la conjuntiva humana de un niño sano. Claro está mencionar que una de las limitaciones principales de este TFM es el número de pacientes que finalmente se pudieron incluir en el estudio, que fue muy modesto. No obstante, creemos que podría ser muy útil como estudio piloto, debido a algunas diferencias estadísticamente significativas encontradas entre las variables analizadas.

## 6. CONCLUSIONES

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

1. La citología por cepillado conjuntival es una herramienta perfectamente válida para obtener células conjuntivales de la superficie ocular en niños sanos.
2. No todas las células obtenidas mediante cepillado conjuntival son de estirpe epitelial, sino que existe una población de células CD45+ (linfocitos intraepiteliales) presente de manera regular en la conjuntiva de niños sanos, significativamente mayor que la encontrada en adultos.
3. La mayor parte de linfocitos intraepiteliales que residen en el epitelio de la conjuntiva del niño sano son linfocitos T, seguidos de los linfocitos B y finalmente linfocitos NK, de manera que la proporción CD3/CD19 es notablemente mayor en la zona tarsal superior que en el resto de zonas, resultados similares a los observados en los estudios en adultos.
4. Existen dos poblaciones celulares totalmente diferenciadas por el tamaño y la complejidad celular en el epitelio conjuntival del niño, como ocurría también en el adulto: una población compuesta por células grandes, más complejas y de baja viabilidad y otra población de células pequeñas, menos complejas, pero con mayor viabilidad.
5. La viabilidad y la apoptosis celular ha resultado similar en las tres zonas conjuntivales estudiadas.
6. La mayor parte de las células obtenidas de la conjuntiva del niño sano se encuentran en fase  $G_0/G_1$  (fase de crecimiento o pre-ciclo), seguidas por células en fase  $G_2/M$  (fase de mitosis) y finalmente células en fase S (fase de síntesis), resultados similares a los observados en los estudios en adultos.
7. El índice medio proliferativo del epitelio conjuntival en el niño sano es relativamente más alto en la región tarsal superior y bulbar superior que en el fondo de saco inferior.

## **7. AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la elaboración de este TFM, por su valiosa aportación, paciencia, constancia, voluntad y empeño:

Prof. Margarita Calonge: Directora del TFM.

Dr. Roberto Reinoso: Director del TFM

Al equipo de investigación: Prof. Alfredo Corell, Dra. Ana Vallelado, Dra. Carmen Martín, Lda. Soledad Rubio.

En forma muy especial, a la Prof. Margarita Calonge y Dr. Roberto Reinoso, por sus horas de dedicación, esfuerzo y estrecha colaboración.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Suzuki K, Kawamoto S, Maruya M, Fagarasan S. GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis. *Adv Immunol.* 2010; 107:153-85.
2. Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. In Niederhorn JY, Kaplan HJ, eds. *Immune Response and the Eye.* 2<sup>nd</sup> ed. Basel, Switzerland: Karger; 2007;36-49.
3. Knop E, Knop N. Influence of the eye-associated lymphoid tissue (EALT) on inflammatory ocular surface disease. *Ocul Surf* 2005; 3:S180–S186.
4. Knop E, Knop N. A functional unit for ocular surface immune defense formed by the lacrimal gland, conjunctiva and lacrimal drainage system. *Adv Exp Med Biol.* 2002; 506:835–44.
5. Nesburn AB, Bettahi, I, Zhang X, Zhu X, Chamberlain W, Afifi RE, Wechsler SL, Benmohamed L. Topical/Mucosal delivery of sub-unit vaccines that stimulate the ocular mucosal immune system. *The ocular surface.* 2006;4(4):178-87.
6. Sullivan DA. Ocular mucosal immunity. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee J, Bienenstock J, eds. *Handbook of Mucosal Immunology.* 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press; 1999; 1241–81.
7. Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat* 2005; 206:271–85.
8. Rodrigues MM, Hidayat AA. Conjunctival and corneal pathology. In: Albert DM, Jakobiec FJ. *Principles and practice of ophthalmology.* Philadelphia: WB Saunders Co. 2000; Vol. 4: 3609-33.
9. Cibis GW. Basic and Clinical Science Course. Section 2. 2005-2006, Fundamentals and principles of ophthalmology. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2005; 528.
10. Knop N, Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1270–9.
11. 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.
12. Hingorani M, Metz D, Lightman SL. Characterisation of the normal conjunctival leukocyte population. *Exp Eye Res* 1997; 64:905–12.

13. 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.
14. Knop E, Knop N. Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in the human eye-Components and topographical distribution. *Ophthalmic Res.* 1999a. 31 (Suppl.), 156.
15. 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.
16. Knop E, Knop N. [Eye-associated lymphoid tissue (EALT) is continuously spread throughout the ocular surface from the lacrimal gland to the lacrimal drainage system]. *Ophthalmologie* 2003; 100:929-42.
17. Saunders RA, Miller KW, Hunt HH. Topical anesthesia during infant eye examinations: does it reduce stress? *Ann Ophthalmol* 1993; 25: 436-9.
18. Agustín Fonseca Sandomingo, José Abelairas Gómez, Jose María Rodriguez Sanchez. *Actualización en Cirugía Oftálmica Pediátrica*, 2004 p. 2.
19. Corrales RM, Calonge M, Herreras JM, et al. Levels of mucin gene expression in normal human conjunctival epithelium in vivo. *Curr Eye Res* 2003; 27:323-8.
20. Corrales RM, Calonge M, Herreras JM, et al. Human epithelium from conjunctival impression cytology expresses MUC7 mucin gene. *Cornea* 2003; 22:665-71.
21. Corrales RM, Galarreta DJ, Herreras JM, et al. [Normal human conjunctival epithelium expresses MUC13, MUC15, MUC16 and MUC17 mucin genes]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2003; 78:375-81.
22. Diebold Y, Corrales RM, Calonge M, et al. Human conjunctival epithelium in culture: a tool to assay new therapeutic strategies for dry eye. *Adv Exp Med Biol* 2002; 506:307-11.
23. Diebold Y, Calonge M, Carretero V, et al. Expression of ICAM-1 and HLA-DR by human conjunctival epithelial cultured cells and modulation by nedocromil sodium. *J Ocul Pharmacol Ther* 1998; 14:517-31.
24. Diebold YC, Calonge MC, Callejo SC, et al. Ultrastructural evidence of mucus in human conjunctival epithelial cultures. *Curr Eye Res* 1999; 19:95-105.
25. Yagmur M, Ersoz C, Reha Ersoz T, Varinli S. Brush technique in ocular surface cytology. *Diagnostic Cytopathology* 1997; 17:88-91.

26. Orfao A, González M, Ciudad J, López-Berges MC, López A, San Miguel JF, et al. Aplicaciones de la citometría de flujo en el diagnóstico hematológico. *Biol Clin Hematol* 1992;13:456-523.
27. Diebold Y, Calonge M, Enriquez de Salamanca A, et al. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4263-74.
28. Romano AC, Espana EM, Yoo SH, et al. Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5125-9.
29. 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.
30. 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.
31. Fujihara T, Takeuchi T, Saito K, Kitajima Y, Kobayashi TK, Tsubota K. Evaluation of human conjunctival epithelium by a combination of brush cytology and flow cytometry: an approach to the quantitative technique. *Diagn Cytopathol* 1997; 17:456-60.
32. Brinole-Baudouin F, Ott AC, Warnet JM, Baudouin C. Flow cytometry in conjunctival impression cytology: a new tool for exploring ocular surface pathologies. *Exp Eye Res* 2004; 78:473-81.
33. 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.
34. McGhee JR, Lamm ME, Strober W. Mucosal immune responses. An overview. In: *Handbook of Mucosal Immunology* (eds Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J: 485-506 (Academic Press, San Diego, 1999).
35. Hazlett LD, Corneal response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Prog Retin Eye Res* 2004; 23:1-30.
36. Sacks EH, Wieczorek R, Jakobiec FA, Knowles DM, Lymphocytic subpopulations in the normal human conjunctiva. A monoclonal antibody study. *Ophthalmology* 1986; 93:1276-83.

37. Barabino S, Montaldo E, Solignani F, Valente C, Mingari MC, Rolando M, Immune response in the conjunctival epithelium of patients with dry eye. *Exp Eye Res* 2010; 91:524-9.
38. Giebel J, Woenckhaus C, Fabian M, Tost F, Age-related differential expression of apoptosis-related genes in conjunctival epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 2005; 83:471-6.
39. 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; 84:212-6.
40. Thompson HW, Malter JS, Steinemann TL, Beuerman RW. Flow cytometry measurements of the DNA content of corneal epithelial cells during wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:433-6.
41. Tan DT, Liu YP, Sun L. Flow cytometry measurements of DNA content in primary and recurrent pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1684-6.
42. 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.
43. 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.
44. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RD. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989; 57:201-9.
45. Lavker RM, et al. Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle and involvement in skin tumor formation. *J Invest Dermatol* 1993; 101:16S-26S.

## 9. ANEXOS

### 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 la respuesta inmune.

#### 4. Manejo de las muestras

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

### **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)