



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE OFTALMOBIOLOGÍA APLICADA

**ALTERACIONES DEL COMPARTIMENTO
EPITELIAL DEL SISTEMA INMUNE DE LA
MUCOSA OCULAR EN LA
QUERATOCONJUNTIVITIS VERNAL**

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

M. Soledad Rubio Martínez

Directores: Dra. Carmen Martín Alonso.

Prof. Dra. Margarita Calonge Cano.

Equipo Investigador: Dr. Roberto Reinoso Tapia.

Prof. Dr. Alfredo Corell Almuzara.

Dra. Ana Isabel Vallelado Álvarez.

Magnolia T. Cano Suárez.



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)

Dña. **Carmen Martín Alonso** y Dña. **Margarita Calonge Cano**

en calidad de Tutoras de la alumna

Dña. **M^a Soledad Rubio Martínez**

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

**“ALTERACIONES DEL COMPARTIMENTO EPITELIAL DEL SISTEMA INMUNE
DE LA MUCOSA OCULAR EN LA QUERATOCONJUNTIVITIS VERNAL”,**

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

En Valladolid a 28 de Agosto de 2013

Vº Bº

Fdo.: Carmen Martín Alonso

La Tutora

Vº Bº

Fdo: Margarita Calonge Cano

La Tutora

ÍNDICE:

	Página
Resumen.....	6
Capítulo 1. Introducción.....	7
1.1. Queratoconjuntivitis vernal.....	8
1.2. Reacción de hipersensibilidad tipo I.....	9
1.3. Tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT).....	15
Capítulo 2. Hipótesis de trabajo y objetivos.....	19
2.1. Hipótesis de trabajo.....	19
2.2. Objetivos.....	19
Capítulo 3. Material y métodos.....	20
3.1. Sujetos.....	20
3.2. Obtención de células de la superficie ocular.....	21
3.3. Caracterización de la población celular obtenida.....	22
3.4. Análisis estadístico.....	25
Capítulo 4. Resultados.....	26
4.1. Fenotipo.....	26
4.2. Viabilidad.....	27
4.3. Ciclo celular.....	30
Capítulo 5. Discusión.....	31
Capítulo 6. Conclusiones.....	36
Perspectivas y limitaciones.....	37
Bibliografía	38
Anexos.....	43

RESUMEN

ALTERACIONES DEL COMPARTIMENTO EPITELIAL DEL SISTEMA INMUNE DE LA MUCOSA OCULAR EN LA QUERATOCONJUNTIVITIS VERNAL.

Trabajo de Fin de Máster “Investigación en Ciencias de la Vision”.

Alumna: M^a Soledad Rubio Martínez

Directores: Dra. Carmen Martín Alonso y Prof. Dra. Margarita Calonge Cano.

Equipo Investigador: Dr. Roberto Reinoso, Prof. Dr. Alfredo Corell, Dra. Ana Isabel Vallelado, Magnolia T. Cano Suárez.

Introducción: Cada vez son más los estudios que demuestran el papel del tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT) en la regulación de la respuesta inmune de la superficie ocular. Nuestro grupo de investigación ya ha establecido un mapa topográfico del componente epitelial del CALT en adultos sanos y, además, en pacientes afectados por una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular, el síndrome de ojo seco.

Este trabajo preliminar pretende iniciar el mismo tipo de análisis en una enfermedad claramente diferente de la superficie ocular, típica de la infancia y de naturaleza inflamatoria, con una base alérgica importante, la queratoconjuntivitis vernal (QCV). A día de hoy, su patogenia no está esclarecida y no existen criterios diagnósticos estandarizados universalmente aceptados, por lo que este estudio podría ayudar a entender algunos aspectos de su fisiopatología.

Material y métodos: Se recogieron muestras de la conjuntiva tarsal superior de tres niños con QCV y cinco niños sanos mediante citología por cepillado y se analizaron por citometría de flujo. Se analizó el porcentaje de linfocitos intraepiteliales (IELs), de células viables y en apoptosis, así como el estado proliferativo celular.

Resultados: En ambos grupos, se encontró una población de IELs, que fue mayor en los casos con QCV que en los niños sanos. En los pacientes con QCV hubo una mayor presencia de linfocitos T CD4+ infiltrados en el epitelio conjuntival, así como un menor porcentaje de células complejas muertas pero que tienden a la apoptosis precoz respecto al grupo control.

Conclusiones: Estos hallazgos sugieren la presencia de un infiltrado inflamatorio en el epitelio conjuntival, que se sumaría al ya conocido en el estroma mediante biopsias clásicas.

1. INTRODUCCIÓN

Las manifestaciones alérgicas oculares son relativamente comunes en la población general, considerando que la alergia afecta al 15-20% de la población, y que los síntomas oculares están presentes en un subconjunto de ~ 50%.¹

Los alérgenos del polen se encuentran en la exina de los granos de polen desde donde son liberados rápidamente. El polen responsable de las reacciones alérgicas procede principalmente de las plantas anemófilas (polinizadas por la acción del viento). La alergenicidad depende del número y el tamaño de los granos, las características de su superficie, su grado de flotación en el aire y la concentración de proteínas y alérgenos. Diferentes factores alteran la expresión y alergenicidad del polen. La contaminación ambiental actúa directamente sobre las plantas o sobre los granos del polen, produciendo alteraciones en la estructura del polen, modificaciones de la capacidad alérgica y aumento de la sensibilidad a los aeroalérgenos. Así mismo, los factores ambientales también influyen en la producción de alérgenos, como la luz solar o las precipitaciones, que si son intensas impide la polinización reteniéndolos en el suelo.

El tipo polínico principal de la provincia de Valladolid son las gramíneas (Poaceae). La concentración polínica atmosférica de los plátanos de sombra (Platanus), dependen en parte de las podas para que la planta pueda desarrollar grandes hojas. Los pinos (Pinaceae) y las encinas y robles (Quercus) son especies que responden a ritmos bianuales de floración. El polen de chopos y álamos (Populus) predomina en marzo.²

La alergia se observa con mayor frecuencia en países industrializados, en donde la contaminación del aire y los estilos de vida modernos favorecen una respuesta inmune de tipo alérgico. Esta respuesta inmune es llevada a cabo por los linfocitos T, en concreto por las células Th2, que mediante la liberación de citocinas promueven la respuesta alérgica. Entre estas citocinas se incluyen las interleucinas IL-4, IL-5 y IL-13, que se asocian a respuesta inmune de tipo IgE y a la producción de eosinófilos, y la IL-10 con una función principalmente antiinflamatoria.³

Las propiedades estructurales de la superficie ocular hacen de ella un sitio ideal para las reacciones de hipersensibilidad inmediata. La conjuntiva es rica en células del sistema inmune como mastocitos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos,⁴ tiene una rica red vascular y está bañada por la película lagrimal, la cual puede transportar alérgenos. La respuesta inmune de hipersensibilidad no se produce en la córnea dado que ésta es

avasascular y tan solo presenta como células inmunes las células de Langerhans y *stem cells*.

Es importante definir el concepto de alergia y atopia, pues a menudo en la literatura encontramos estos términos como sinónimos. Alergia es una hiperrreactividad por un mecanismo de hipersensibilidad tipo I mediada por IgE, desencadenada tras la exposición a una sustancia o alérgeno, aunque también interviene mecanismos de hipersensibilidad tipo IV (linfocitos T) y factores hormonales, neuronales y genéticos. Se denomina atopia al conjunto de signos en individuos genéticamente predispuestos a producir anticuerpos IgE. Por tanto, la atopia puede ser responsable de trastornos oculares.⁵

Los trastornos alérgicos oculares se clasifican en:⁵

1. Conjuntivitis alérgica

- Conjuntivitis alérgica aguda
 - Estacional
 - Inducida por drogas
- Conjuntivitis alérgica crónica
 - Perenne
 - Inducida por drogas

2. Conjuntivitis papilar gigante.

3. Queratoconjuntivitis vernal (palpebral, limbar o mixta).

4. Queratoconjuntivitis atópica

1.1. QUERATOCONJUNTIVITIS VERNAL

La queratoconjuntivitis vernal (QCV), es una enfermedad inflamatoria crónica y bilateral, aunque puede ser asimétrica, que afecta principalmente a niños y adultos jóvenes que viven en climas cálidos en todo el mundo, y que se caracteriza por su recurrencia estacional en primavera y verano, aunque puede hacerse perenne.

En su forma típica, la QCV presenta hiperemia conjuntival, prurito, fotofobia y lagrimeo. La QCV es bilateral en la mayoría de los pacientes (98%), aunque la severidad de los síntomas no es igual en ambos ojos.⁶ Los pacientes pueden tener varios episodios de inflamación activa durante todo el año.

Los signos de QCV se limitan en su mayoría a la conjuntiva y la córnea. Entre otros signos destaca la presencia de:

- ❖ Pápilas gigantes, especialmente en el párpado superior (Figura 1.A.) Si hay hipertrofia papilar a nivel del limbo se denomina conjuntivitis primaveral límbica. El tamaño de las papilas se correlaciona con la persistencia o empeoramiento de los síntomas a largo plazo.⁶
- ❖ Secreción filamentosa, así como una falsa membrana conjuntival de aspecto lechoso.
- ❖ Nódulos de Horner-Trantas: depósito de eosinófilos (Figura 1.B). Aparecen como puntos blancos-amarillentos en conjuntiva limbar.
- ❖ Cambios corneales: queratitis epitelial punteada (Figura 1.C), macroerosiones epiteliales, úlceras en escudo (Figura 1.D), aumento de la vascularización corneal de forma tardía.

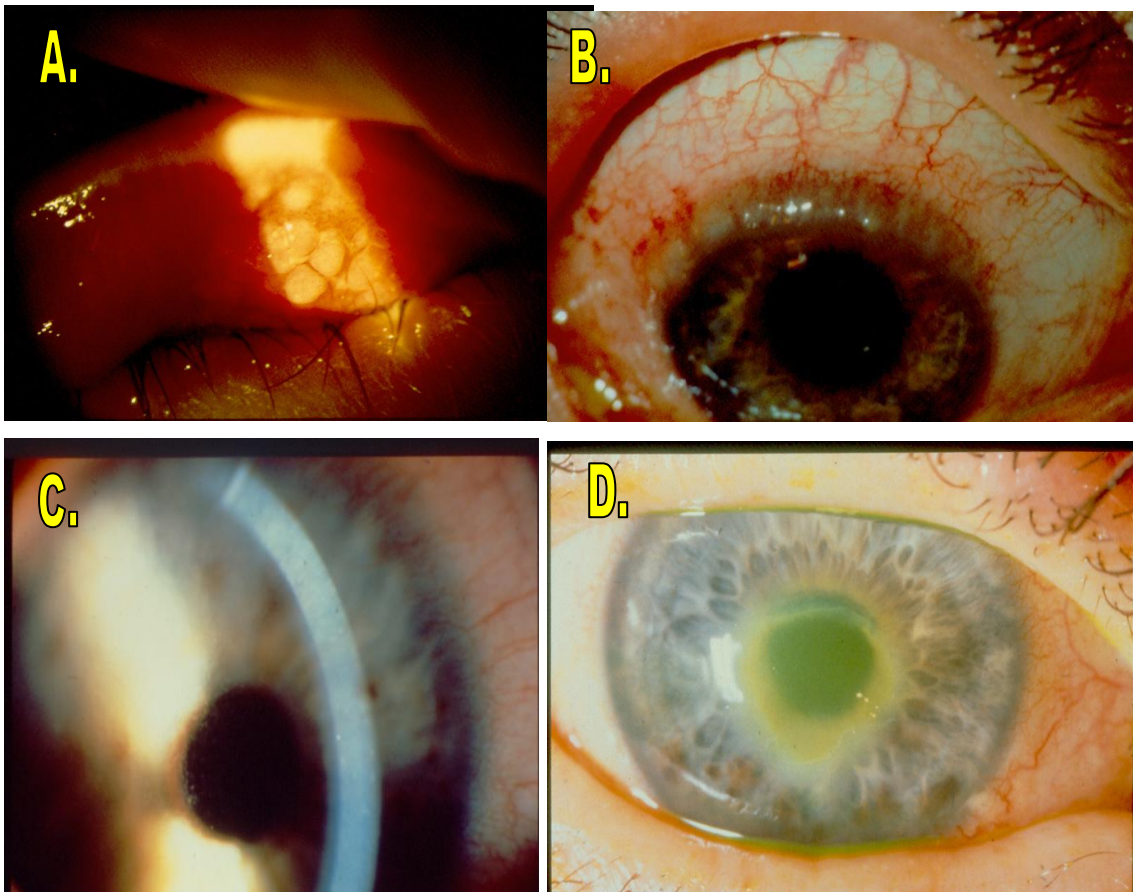


Figura 1. Signos clínicos de la queratoconjuntivitis vernal. (A) Papilar en conjuntiva tarsal superior. (B) Nódulos de Horner-Trantas. (C) Queratitis punteada difusa de Tobgy. (D) Úlcera en escudo. Imágenes cedidas por la Unidad de Inmunología Ovular del HCUV e IOBA.

No hay criterios diagnósticos estandarizados. El diagnóstico se basa en los signos y síntomas clínicos. Ello hace más difícil diagnosticar y tratar esta enfermedad.

Basándose en los signos clínicos, Bonini et al.⁶ sugieren una clasificación de la gravedad de la enfermedad:

- Grado 0, reposo: el paciente lleva libre de enfermedad un año. Se encuentra asintomático, la conjuntiva puede estar levemente hiperémica y la córnea no está involucrada en la reacción alérgica. Pueden existir papilas.
- Grado 1, leve intermitente: el paciente refiere síntomas ocasionales durante la estación primaveral, como picor y fotofobia leve. Puede aparecer leve hiperemia conjuntival pero sin afectación corneal. Puede presentar alguna papila gigante.
- Grado 2, moderada, que se subdivide a su vez en dos grupos:
 - 2A, moderado intermitente: los síntomas se presentan como en el grado 1 pero con una mayor frecuencia y ya comienzan a ser poco tolerados por el paciente. Aparece secreción conjuntival, hiperemia conjuntival y una reacción papilar severa. La córnea está respetada.
 - 2B, persistente moderada: se diferencia del anterior porque los síntomas ya son diarios. La córnea puede presentar una leve queratitis punteada superficial.
- Grado 3, severa: la córnea ya está involucrada. Aparecen nódulos de Horner-Trantas y una reacción papilar severa.
- Grado 4, muy severo: se caracteriza por una reacción papilar severa, con filamentos mucosos entre ellas. La córnea puede presentar erosiones o ulceraciones.
- Grado 5, evolucionado: aparece fibrosis conjuntival.

1.2. REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO I

⁷La conjuntiva normalmente está expuesta a alérgenos ambientales tales como el polen, los ácaros del polvo, la caspa de los animales y otras proteínas. Cuando estos alérgenos atraviesan la barrera epitelial conjuntival, se encuentran con células de Langerhans, con células dendríticas o con otras células presentadoras de antígeno

(*Antigen presenting cell*, APC) en el epitelio de la mucosa. Las APC captan estos antígenos proteicos y los procesa. El procesamiento del antígeno es la transformación de estas proteínas en péptidos y la posterior unión de los péptidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (*major histocompatibility complex class II*, MHC-II) de las APC. El complejo péptido- MHC-II es transportado hasta la superficie de la APC, donde son presentados para su reconocimiento por las células T CD4+ de tipo Th0 *naive*, los cuales reconocen el péptido antigénico y, mediante múltiples intercambios de citocinas específicas, las células Th0 se diferencian a linfocitos T efectoras Th2. Los linfocitos Th2 activan los factores de transcripción GATA-3 y c-Maf, y liberan citocinas. Es importante la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. La interleucina 4 (IL-4) induce la diferenciación de células B específicas para ese antígeno en células productoras de IgE. La IL-5 activa los eosinófilos. La IL-13 tiene una acción sinérgica con la IL-4, de forma que mediante un mecanismo de *feedback*, activan a su vez a las células Th2, perpetuando el proceso. Otras citocinas que liberan las células Th2 son las IL-5, IL-6 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF).

La IgE específica de antígeno producida se une a receptores de alta afinidad para su Fc de mastocitos y basófilos (FcεRI). Los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos son las células efectoras de las reacciones de hipersensibilidad inmediata. En la conjuntiva existen dos tipos de mastocitos: los productores de quimasa, y los productores de triptasa-quimasa, siendo estos últimos los más abundantes.

La primera exposición al alérgeno es asintomática. (Figura 2).

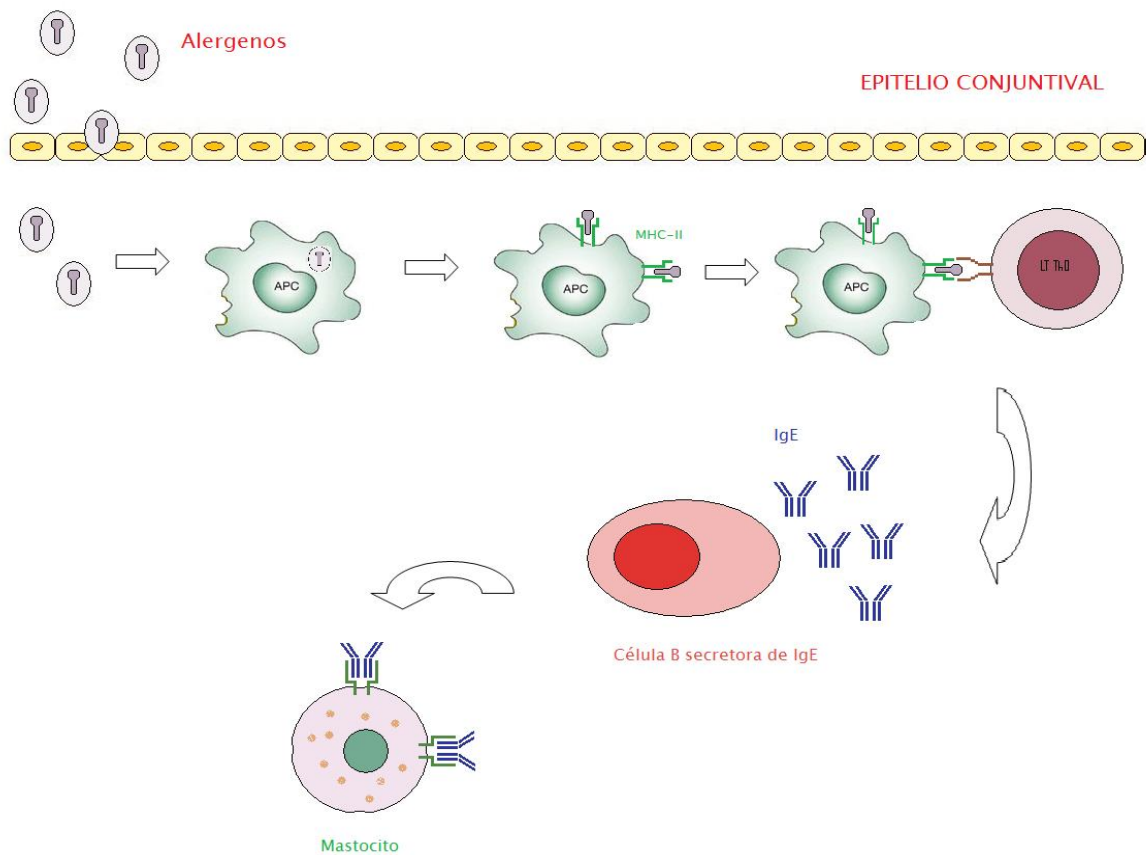


Figura 2: Inducción de la reacción de hipersensibilidad 1: activación por el antígeno de células Th2, producción de de IgE y unión a mastocitos. Modificación personal de Soledad Rubio Martínez (HCUV).

Una vez sensibilizado el huésped tras el primer contacto con el alérgeno, si se produce un segundo contacto los receptores FcεRI de alta afinidad activan segundos mensajeros intracelulares, que inducen la degranulación de mastocitos y basófilos y con ello la liberación de mediadores inflamatorios preformados almacenados en sus gránulos intracitoplasmáticos, así como las síntesis de novo de los anteriores.

Los mediadores preformados de los mastocitos y basófilos provocan la reacción clínica inicial rápida que dura unos 20-30 minutos. Estos mediadores son los siguientes:

- ❖ Aminas biógenas: predominantemente histamina. La histamina provoca edema por extravasación vascular y vasodilatación.
- ❖ Mediadores quimiotácticos (factores quimiotácticos de los eosinófilos y de los neutrófilos).
- ❖ Enzimas contenidas en los gránulos: quimasa, que estimula la secreción de moco, y tripsasa que activa la colagenasa favoreciendo la lesión

tisular. Otras enzimas presentes en los gránulos de los mastocitos son la carboxipeptidasa A y la tripsina G.

- ❖ Proteoglicanos, como la heparina y el condroitín sulfato, que parecen estar involucrados en el control de la cinética de las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

Los mediadores sintetizados de novo actúan en la respuesta retardada que se inicia a las 2-24 horas después de la exposición del alérgeno; puede durar varios días y se caracteriza por una intensa infiltración de células inflamatorias, lo que se denomina lesión tisular infiltrante. Son de dos clases:

1. Mediadores lipídicos. Se trata de metabolitos de la cascada del ácido araquidónico por acción de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa. Tienen efecto sobre los vasos sanguíneos, el músculo liso bronquial y los leucocitos.

- El principal mediador es la prostaglandina D₂ (PGD₂), producido por la vía de la ciclooxigenasa de los mastocitos. Actúa como vasodilatador, broncoconstrictor y factor de quimiotaxis de neutrófilos.
- Leucotrienos, sobretudo el leucotrieno C₄ (LTC₄) y sus productos de degradación LTD₄ y LTE₄. Se producen por activación de la cascada del ácido araquidónico por la vía de la lipooxigenasa de los mastocitos y los basófilos. Tienen un efecto broncoconstrictor, además de aumento de la permeabilidad vascular y aumento de la secreción de moco, así como poder de quimiotaxis.
- Factor activador de las plaquetas (PAF). El PAF posee acción de broncoconstricción y de aumento de la permeabilidad vascular, además de quimiotaxis de neutrófilos.

2. Citocinas: reclutan y activan a células inflamatorias Incluyen:

- Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y proteína inflamatoria de los mastocitos (MIP1 α y MIP1 β). Inducen inflamación y reacción de fase tardía.
- Interleucinas (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13). La IL-3 induce proliferación de los mastocitos.
- Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF).

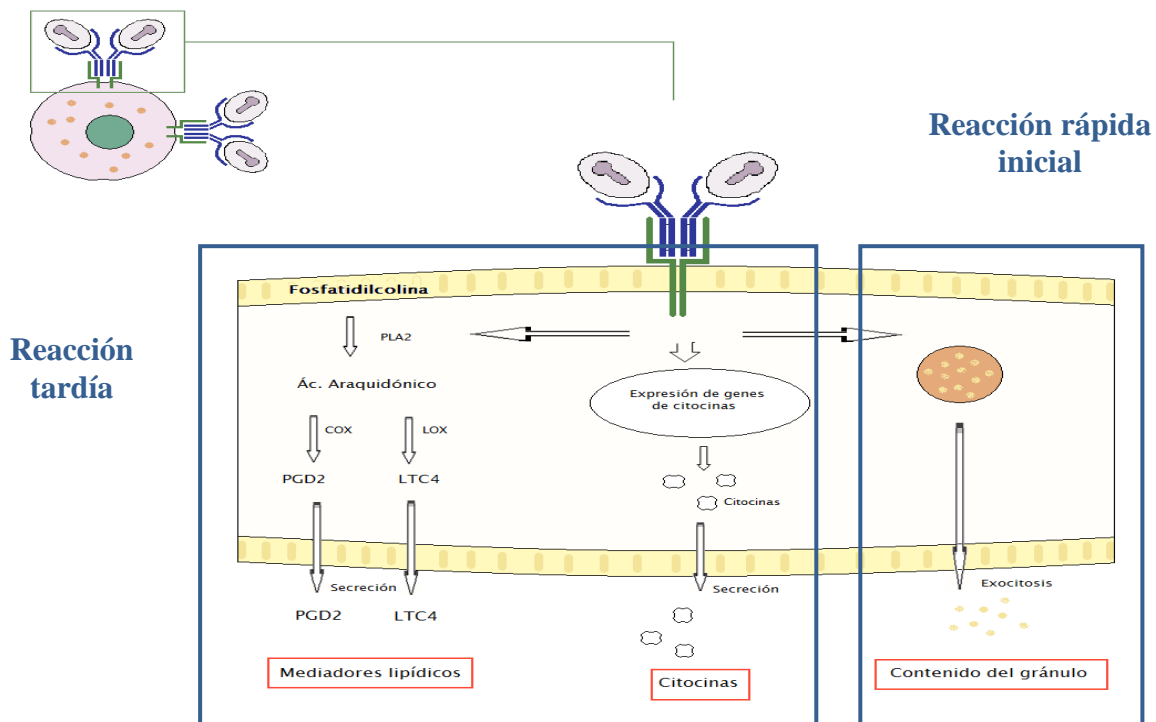


Figura 3. Procesos bioquímicos precoces y tardíos tras la activación del mastocito. Modificación personal de Soledad Rubio Martínez (HCUV).

En la respuesta tardía, los eosinófilos adquieren una especial importancia. Son reclutados en la fase inicial de la inflamación por la IL-4 y el GM-CSF, y posteriormente activados por la IL-5 procedente de las células Th2. Los mastocitos y basófilos favorecen su supervivencia. Los eosinófilos liberan proteínas catiónicas de los gránulos, como la proteína básica principal (*eosinophil granule major basic protein*, MBP, PRG2) y la proteína catiónica de eosinófilos (*eosinophil cationic protein*, ECP, RNASE3), con acción tóxica para los parásitos y que podría también dañar tejidos sanos. Los gránulos de los eosinófilos también contienen hidrolasas lisosómicas y otras enzimas que producen lesión tisular. Los eosinófilos activados, al igual que los basófilos y los mastocitos, producen y liberan mediadores lipídicos y citocinas, como la eotaxina y RANTES, ambas con propiedades quimiotácticas de leucocitos.

1.3. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA CONJUNTIVA

Numerosos autores han demostrado la existencia de un sistema inmune común para toda la SO⁹⁻¹⁴, 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 al sistema de drenaje lagrimal (*lacrimal drainage-associated lymphoid tissue*, LDALT), al tejido linfoide asociado a la glándula lagrimal (*lacrimal gland-associated lymphoid tissue*, LGALT) y al tejido linfoide asociado a la conjuntiva (*conjunctiva-associated lymphoid tissue*, CALT), (Figura 4).

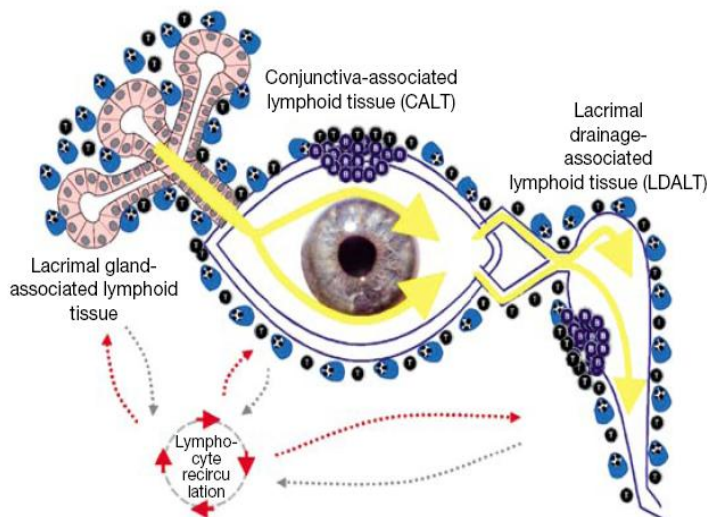


Figura 4. Sistemas inmune asociado a la mucosa ocular.¹⁰

La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que recubre la cara interna de los párpados (conjuntivas palpebrales), la esclera anterior (conjuntiva bulbar), formando un repliegue entre ambas (conjuntiva de fondo de saco o fórnix) (Figura 5).

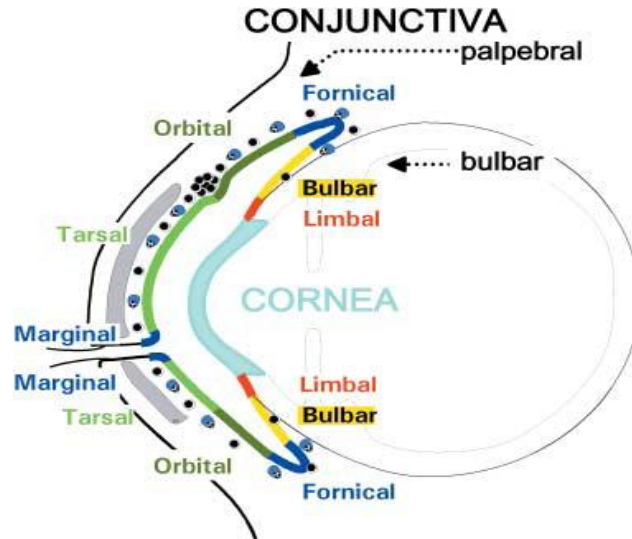


Figura 5. Topografía de la conjuntiva¹⁵

Histológicamente la conjuntiva se compone de dos capas: una capa de epitelio estratificado no queratinizado que contiene células caliciformes secretoras de mucina, intercaladas entre células epiteliales, que contribuyen a mantener la capa lagrimal de la superficie ocular, y una capa de tejido conectivo por debajo del epitelio, la *lamina propria*, la cual está altamente vascularizada.

Su función principal proteger la córnea frente a agentes externos. Para ello presenta diferentes células inmunes ligadas a esta mucosa, es decir, un tejido linfoide asociado (*mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT), o más concretamente, un tejido linfoide asociado a la conjuntiva (*conjunctive-associated lymphoid tissue*, 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) y el tejido conectivo subyacente (linfocitos de *lamina propria*)¹⁵⁻¹⁹

Clásicamente, la citología por impresión conjuntival ha sido la técnica mínimamente invasiva empleada para estudio de patologías inflamatorias de la superficie.²⁰⁻²¹ Esta técnica permite la recogida de gran cantidad de células del epitelio conjuntival causando mínimas lesiones al paciente, así como el análisis y el estudio de las muestras en diferentes localizaciones de la superficie ocular.²²⁻²³ En los últimos

años, esta técnica ha sido sustituida por otra técnica también mínimamente invasiva, la citología por cepillado, capaz de recoger mayor cantidad de células en suspensión, mucho más viables y menos alteradas morfológicamente.²⁴⁻²⁵

Martínez Osorio et al, mediante citología por cepillado, caracterizó el epitelio conjuntival.²⁶ Mostró que más del 95% de las células conjuntivales humanas son de estirpe epitelial. Sin embargo, existe una pequeña población CD45+ intercalada entre las distintas capas epiteliales de la conjuntiva, presente de manera regular tanto en la conjuntiva sana como cuando existe proceso inflamatorio. Reinoso et al. Estableció que los linfocitos T son el fenotipo predominante dentro de esta población leucocitaria, seguido de los linfocitos B y NK.²⁷ Dentro de los linfocitos T (CD3+) existe un predominio de los linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+) sobre los linfocitos T coadyuvantes (CD3+CD4+).²⁸⁻²⁹

Un estudio reciente de nuestro grupo de trabajo ha establecido un mapa topográfico de la localización y fenotipo de las células linfoides del CALT en adultos sanos.²⁷ En él se observó que el fondo de saco inferior existe mayor número de linfocitos B y linfocitos cooperadores, lo que representaría la zona de activación de la respuesta inmune. Por el contrario, la zona bulbar y tarsal superior presentan mayor capacidad proliferativa, y representa la zona efectora del sistema inmune (Figura 6).

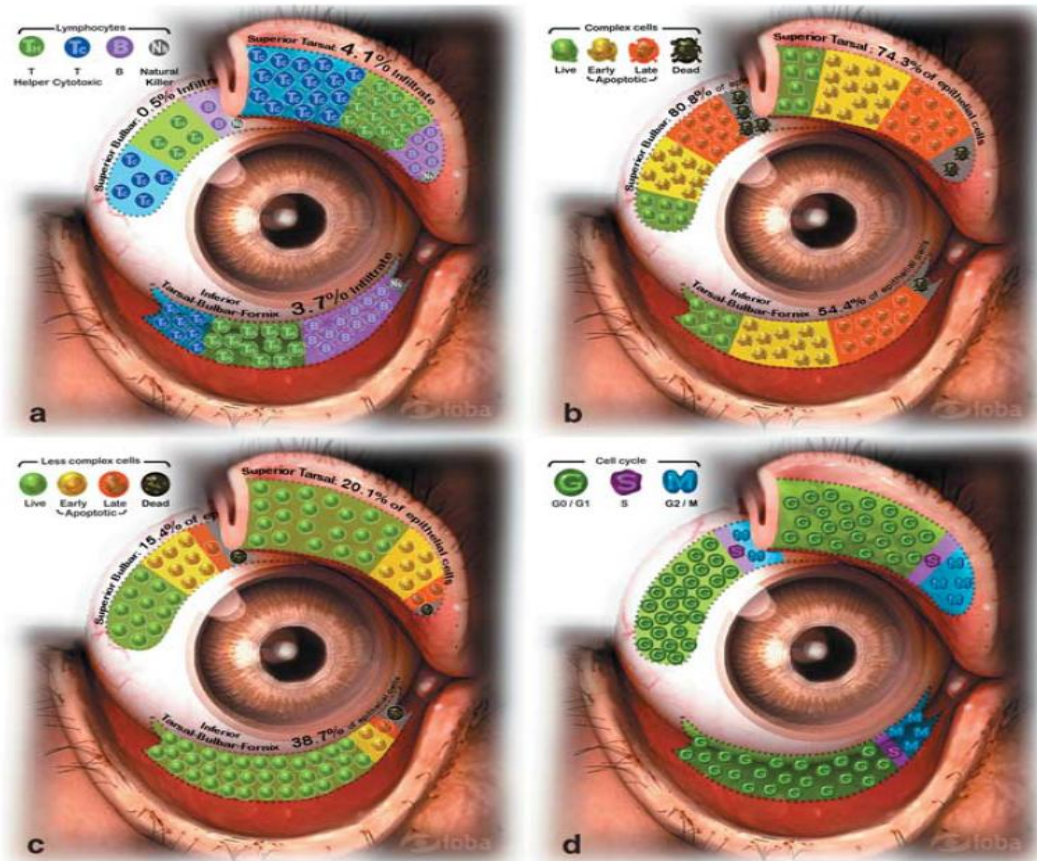


Figura 6. Distribución topográfica de los linfocitos intraepiteliales (*intraepithelial lymphocytes*, IELs), células vivas y muertas, células en apoptosis precoz y tardía y fases del ciclo celular en tres regiones de la conjuntiva humana. **(a)** Porcentaje de linfocitos Th, Tc, B y células NK. **(b)** Porcentaje de células complejas vivas, muertas, en apoptosis precoz y en apoptosis tardía. **(c)** Porcentaje de células simples vivas, muertas, en apoptosis precoz y en apoptosis tardía. **(d)** Porcentaje de células en fase G₀/G₁, S y G₂/M del ciclo celular.²⁷

Las células inmunes son productoras de citocinas pro y anti-inflamatorias (T_H1: IL-2, IFN- γ ; T_H2: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). Las células epiteliales conjuntivales también son capaces de secretar diversas citocinas (IL-4, IL-13, TGF- β) implicándose directamente en la iniciación y propagación del fenómeno inflamatorio.³⁰ El TGF- β está regulado tanto por células del epitelio corneal (*human corneal epithelial cell line*, HCE) como del epitelio conjuntival (*conjunctival epithelial cell line*, IOBA-NHC).³¹

La película lagrimal también está implicada en los procesos inflamatorios de la SO. Cada vez es más evidente su composición en citocinas y quimiocinas no sólo en pacientes con procesos inflamatorios crónicos como el ojo seco,³² sino también en pacientes sanos,³³ pudiéndose establecer como biomarcadores del síndrome de ojo seco o conjuntivitis alérgicas.³⁴

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Clásicamente se ha considerado la QCV una reacción alérgica de hipersensibilidad tipo I, pero la reacción mediada por IgE es insuficiente para explicar la clínica y cambios histopatológicos.³⁵ Aunque existen numerosos datos preliminares acerca de la base inmunológica de esta patología, la mayoría de ellos están centrados en el estroma conjuntival. Existen estudios previos de que cada zona topográfica de la superficie conjuntival de adultos sanos podría desempeñar un papel diferencial en la regulación de la respuesta inmune. La comparación de la función inmunológica entre la conjuntiva ocular de pacientes con QCV y sujetos sanos nos podría ayudar como diagnóstico y / o biomarcador de progresión de la enfermedad.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Nuestra hipótesis de partida es que el sistema inmune asociado a la mucosa ocular, y más concretamente, el componente epitelial del tejido linfoide asociado a la conjuntiva (*conjunctive-associated lymphoid tissue*, CALT) en individuos con queratoconjuntivitis vernal varía funcional y fenotípicamente con respecto a individuos sin patologías de la superficie ocular.

OBJETIVOS

- Caracterización fenotípica y funcional, mediante citometría de flujo, de las células conjuntivales obtenidas en pacientes de QCV, evaluando la población celular, la viabilidad y la fase del ciclo celular del epitelio conjuntival obtenido mediante cepillado.
- Comparación fenotípica y funcional entre la conjuntiva ocular de pacientes con queratoconjuntivitis vernal y el grupo control.
- Discusión del posible papel de los elementos anteriormente caracterizados en la etiopatogenia de la queratoconjuntivitis vernal.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SUJETOS

El reclutamiento de los participantes 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 Valladolid. Este estudio se realizó previa obtención del consentimiento informado según la legislación vigente en España y previa aprobación del comité de ética del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Este estudio se le propuso a todos los pacientes que acudieron a consulta y cumplían con los criterios de selección requeridos para llevarlo a cabo. Cada donante fue informado de las características del estudio y del procedimiento de obtención de células, firmando el consentimiento informado que se adjunta su padre/madre/tutor legal (Anexo 1). Se reclutaron 3 casos con queratoconjuntivitis vernal activa, con un rango de edad de 5 a 18 años a los que se les realizó la citología por cepillado en la conjuntiva tarsal superior de un solo ojo, previo examen oftalmológico. Para ello, se tuvieron en cuenta una serie de criterios de inclusión y exclusión:

a) Criterios de inclusión QCV:

- Participación voluntaria en el estudio.
- Edad de inclusión de los participantes entre 3 y 12 años.
- Selección de sujetos con diagnóstico de queratoconjuntivitis vernal, ya sea en su forma palpebral o mixta.
- Presentación de un cuadro activo, definido como presencia de múltiples papilas grandes en conjuntiva tarsal superior asociada a una conjuntiva roja y congestionada (grado 3 o mayor según la clasificación de severidad de Bonini⁷⁾

b) Criterios de exclusión QCV:

- Padecimiento de patologías crónicas.
- Tratamiento farmacológico sistémico inmunosupresor, o tratamiento tópico, excepto antialérgicos y/o anti-inflamatorios tópicos.

- Queratoconjuntivitis vernal en su forma limbar.
- Niñas que ya presenten menstruación.

Asímismo, se reclutaron de 5 controles con un rango de edad de 3 a 11 años sin patología de la superficie ocular ni signos de inflamación (pacientes de cirugía de estrabismo, previamente a la misma). Estos donantes también fueron informados del procedimiento, firmando el consentimiento que se adjunta su padre/madre/tutor legal (Anexo 2). La decisión de incluir pacientes prequirúrgicos como controles fue, en primer lugar, porque carecen de enfermedad inflamatoria de la superficie ocular y, por tanto, son individuos sanos desde el punto de vista inmunológico. En segundo lugar, el hecho de que fueran a ser sometidos a un procedimiento invasivo programado por su patología estrábrica, ahorró al paciente de un nuevo episodio traumático para obtener las muestras para el estudio. Del mismo modo, se tuvieron en cuenta una serie de criterios de inclusión y exclusión:

a) Criterios de inclusión grupo control:

- Participación voluntaria en el estudio
- Edad de inclusión de los participantes entre 3 y 12 años.
- Pacientes con estrabismo que fueron intervenidos quirúrgicamente de forma programada.

b) Criterios de exclusión grupo control:

- Padecer enfermedad inflamatoria de la superficie ocular.
- Padecer patologías crónicas.
- Tratamiento farmacológico sistémico inmunosupresor, o tratamiento tópico, excepto antialérgicos y/o anti-inflamatorios tópicos.
- Niñas que ya presenten menstruación.

3.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LA SUPERFICIE OCULAR

La obtención mínimamente invasiva de células de la superficie ocular se llevó a cabo mediante citología por cepillado en la conjuntiva tarsal superior de los donantes seleccionados. Las muestras del estudio fueron recogidas por dos residentes de Oftalmología del HCUV.

Citología por cepillado:

Previa anestesia tópica (0.04% oxybuprocaine), se procedió a la rotación suave del cepillo (Cytobrush® plus GT, Medscand Medical, Sweden) sobre la conjuntiva tarsal superior de los donantes enfermos. A continuación, se desprendieron las células por rotación circular del cepillo durante 30 segundos en un tubo Eppendorf que contenía 1,4 ml de medio de transporte y/o cultivo [DMEM/F12 suplementado con 1 mg/ml de insulina pancreática bovina, 2 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano (EGF), 0.1 mg/ml de toxina colérica, 5 mg/ml de hidrocortisona, suero fetal bovino (FBS) al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50mg/ml de estreptomicina y 2,5 mg/ml de anfotericina B]. Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones más, siempre realizándolo en el mismo sitio y con el mismo procedimiento. Posteriormente, se introdujo el tubo con las células en hielo y se transportó al laboratorio para su posterior análisis.

En el caso de los donantes del grupo control, se les practicó anestesia general por su procedimiento quirúrgico de su patología estrábica. La anestesia general se realizó con sevoflurano 1,2CAM , atropina 0,01-0,02 mg/kg, fentanilo 3µg/kg y rocuronio 0,6mg/kg. También se les administró anestesia tópica (0.04% oxybuprocaine). Al igual que en el caso anterior, se tomaron tres muestras de la misma zona topográfica con la misma técnica anteriormente descrita (Figura 7).



Figura 7: Toma de muestra en conjuntiva tarsal superior mediante citología por cepillado en un paciente sano.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR 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 tres tipos de análisis: población celular, viabilidad/apoptosis y fase del ciclo celular.

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, que excita a 488 nm, y láser de Helio-Neón que excita a 633 nm) y 5 fotomultiplicadores: FL1 (525nm), FL2 (575 nm), FL3 (620 nm), FL4 (675 nm) y FL5 (755 nm).

<i>Tubo</i>	<i>Anticuerpo/marcador</i>	<i>Clon</i>	<i>Población</i>	<i>Compañía</i>
1	CD45-PC7	J33	Leucocitos	BC
	CD3-FITC	33-2A3	Linfocitos T	IS**
	CD19-PC5	J4.119	Linfocitos B	BC
	CD16-PE	B73.1	Linfocitos NK	CL***
	CD56-PE	NCAM 16.2	Linfocitos NK	CL
2	CD45-FITC	B3821F4A	Leucocitos	BC
	CD3-PC5	UCHT1	Linfocitos T	BC*
	CD4-RD1	SFC112T4D11	Linfocitos T cooperadores (T _h)	BC
	CD8-ECD	SFC121Thy2D3	Linfocitos T citotóxicos (T _c)	BC
3	Anexina V-FITC	No procede	Viabilidad/apoptosis	IS
	Ioduro de Propidio	No procede	Viabilidad/apoptosis	BC
4	Ioduro de Propidio	No procede	Ciclo celular	BC

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

*BC: Beckman Coulter (Marseille, France).

**IS: Immunostep (Salamanca, Spain).

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

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales y marcadores utilizados en citometría de flujo.

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 descartó 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 se fijaron (15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad) con 500 µl de una solución de lisis-fijación (FACS™ Lysing solution, BD biosciencias, San Jose, USA) para posteriormente ser 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 desechó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas con 100 µl de una solución tampón (Annexin V Binding Buffer, Immunostep, Salamanca, Spain). Posteriormente, las células se incubaron en oscuridad con 2.5 µl de anexina V-FITC (25 µg/ml) y 5 µl de Ioduro de Propidio (a 250 µg/ml) durante 10 minutos a 4°C (Tabla 1). Finalmente, se añadió 400 µl de la solución tampón a la muestra celular quedando lista para su estudio por citometría de flujo.

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 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 Ioduro de propidio (DNA-prep Stain, Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, Beckman Coulter, Fullerton,

CA) (tabla 1), se agitó suavemente y se incubó en oscuridad durante 30 minutos en una estufa, quedando listas las células para ser analizadas con el citómetro de flujo. El Índice medio de proliferación (*mean proliferative index*, MPI) se calculó como el ratio $(S + G_2/M)/(G_0/G_1 + S + G_2/M)$, donde S fue el porcentaje de células en fase S, G₂/M el porcentaje de 4n células en fase G₂ y M, y G₀/G₁ el porcentaje de 2n células en fase G₀ y G₁.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó en primer lugar un estudio descriptivo de los resultados obtenidos para ambos grupos, incluyendo n válido, mínimo, máximo, media, mediana, error estándar de la media (SD/\sqrt{n}) y percentiles 25 y 75. A continuación se realizaron pruebas no paramétricas de contraste de hipótesis (U de Mann Whithney y prueba de la mediana) para muestras independientes. Todos los análisis se realizaron con IBM SPSS Statistics v19.0. Los resultados se anotan en el texto como media +/- error estándar.

4. RESULTADOS

4.1. FENOTIPO

Los resultados obtenidos en los pacientes con QCV fueron los siguientes: El número medio de células analizadas fue de $1.7 \times 10^4 \pm 3.7 \times 10^3$. Se observó una población de células CD45+, leucocitos intraepiteliales ($12.1 \pm 3.0\%$). Estos leucocitos CD45 fueron predominantemente linfocitos T (CD3+) ($86.6 \pm 2.2\%$) y B (CD19+) ($11.4 \pm 9.1\%$), aunque también pudo observarse una pequeña población de linfocitos NK (CD3-, CD16+ CD56+) que representa menos del 1.5% del total de células.

En comparación con los controles sanos, el número medio de células analizadas fue muy similar en ambos grupos, en torno a $1.7 \times 10^4 \pm 3.7 \times 10^3$. Se observó una población de células CD45+, leucocitos intraepiteliales, que en el caso del grupo con QCV fue de $12.1 \pm 3.0\%$ y en el grupo control de $19.2 \pm 5.0\%$. El porcentaje de células T fue mayor en los pacientes con QCV ($86.6 \pm 2.2\%$ vs $64.5 \pm 9.2\%$, $p=0.053$) Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, pero si una tendencia. Esto parece ocurrir a expensas de una disminución de el porcentaje de linfocitos B ($11.4 \pm 9.1\%$ vs $34.1 \pm 9.1\%$, $p=0.053$), como queda reflejado en la proporción células T/célulasB (tabla 2). Del mismo modo, tampoco se hallaron diferencias significativas en cuanto a las subclases de linfocitos T, pero hay que destacar que en las muestras de los pacientes con QCV se halló un incremento de los linfocitos CD3+CD4+ ($58.7 \pm 6.3\%$ vs $32.6 \pm 4.4\%$, $p=0.053$) sin ninguna variación en los linfocitos CD3+CD8+ ($27.4 \pm 7.7\%$ vs $30.2 \pm 6.5\%$, $p=0.881$) respecto a los sujetos sanos (tabla 2, figura 8).

Sujetos	% Leucocitos (CD45+)	% linf. T (CD3+)	% Th (CD3+CD4+)	% Tc (CD3+CD8+)	% linf. B (CD19+)	% linf. NK (CD3-CD16/56+)	CD4/CD8	CD3/CD19
Grupo QCV (n = 3)	12.1 ± 3.0	86.6 ± 2.2	58.7 ± 6.3	27.4 ± 7.7	11.4 ± 1.6	1.1 ± 1.0	2.5 ± 1.1	7.9 ± 1.5
Grupo control (n = 5)	19.2 ± 5.0	64.5 ± 9.2	32.6 ± 4.4	30.2 ± 6.5	34.1 ± 9.1	0.3 ± 0.1	1.2 ± 0.2	3.1 ± 1.2
P	0.655	0.053	0.053	0.881	0.053	0.653	0.297	0.053

Tabla 2. Subpoblaciones linfocitarias en cepillado conjuntival (porcentajes medios +/- error típico de la media.

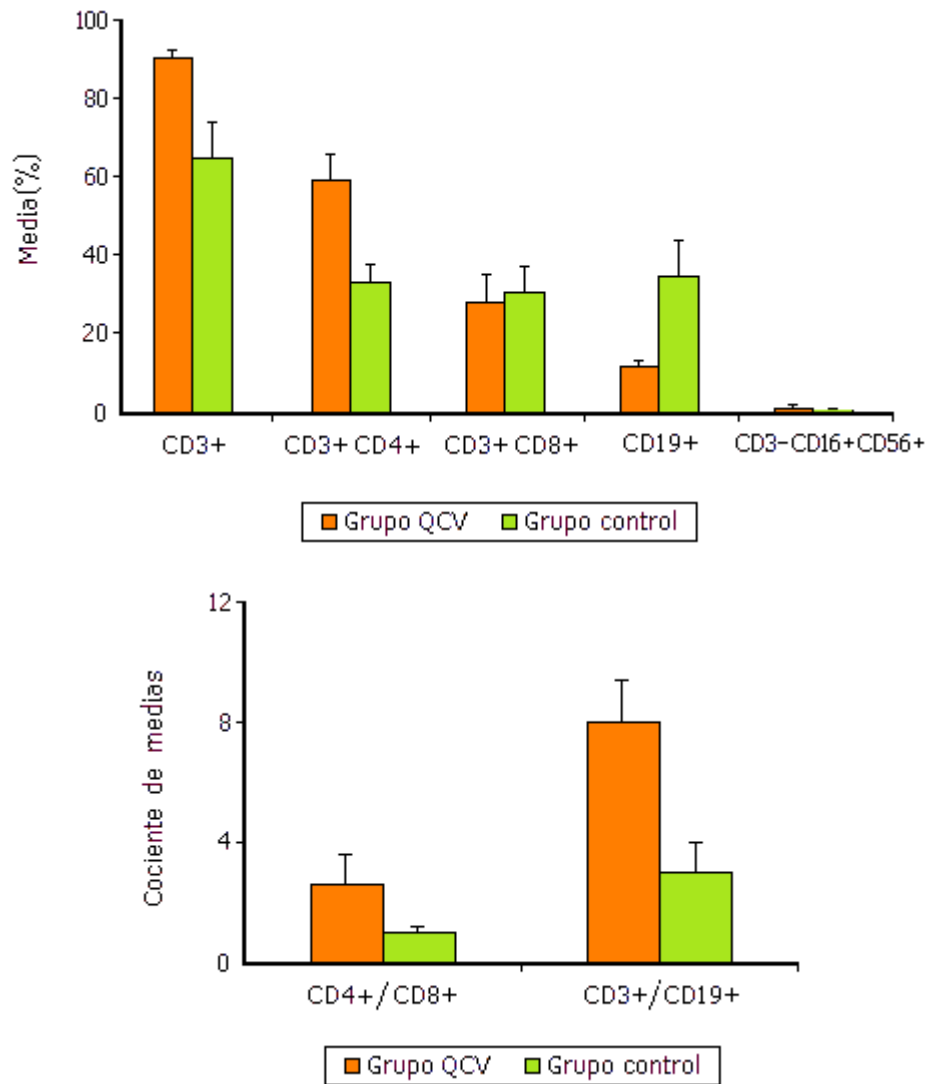


Figura 8. Subpoblaciones linfocitarias en cepillado conjuntival (porcentajes medios +/- error típico de la media).

4. 2. VIABILIDAD

En primer lugar, se realizó *forward scatter* (FS) y *side scatter* (SS) para determinar tamaño y complejidad respectivamente. A continuación, la diferente expresión de los marcadores Anexina V-FITC y Ioduro de Propidio permitió el análisis de la viabilidad. (Figura 9)

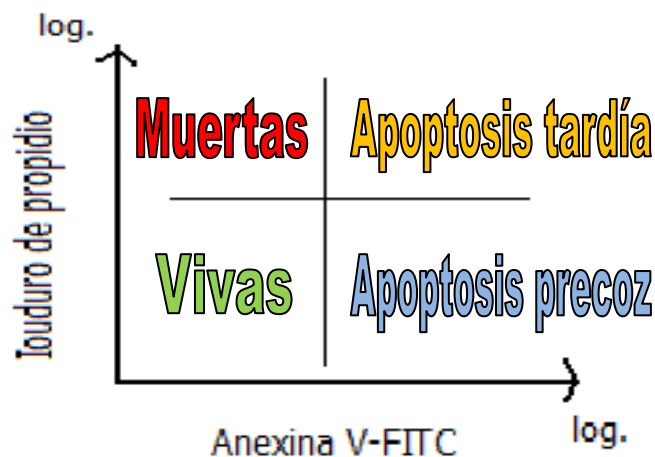


Figura 9. Análisis de la viabilidad por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos en los pacientes con QCV fueron los siguientes: Se analizaron una media de 3.6×10^4 células. Se observaron dos grupos morfológicamente diferenciados.

La población celular mayoritaria estaba compuesta de células grandes, complejas ($57.0 \pm 8\%$) con una baja viabilidad ($30.8 \pm 25.3\%$). El porcentaje de estas células en apoptosis precoz fue $54.6 \pm 22.8\%$, el porcentaje en apoptosis tardía fue $13.8 \pm 7.2\%$. El porcentaje de células muertas (necrosis) fue $0.7 \pm 0.2\%$.

Se encontró también una población celular minoritaria, $38.7 \pm 10\%$ células, compuesta de células pequeñas menos complejas pero con una mayor viabilidad en comparación con las células complejas ($55.1 \pm 23.2\%$ vs $30.8 \pm 25.3\%$). La ratio de viabilidad de ambas poblaciones es análoga. Dentro del grupo de células menos complejas, se encontró un $54.6 \pm 22.8\%$ de células en apoptosis precoz, de $13.8 \pm 7.2\%$ células en apoptosis tardía y un $0.7 \pm 0.2\%$ de células muertas.

En comparación con el grupo control, el número medio de células analizadas fue muy similar en ambos grupos, 3.6×10^4 vs 3.4×10^4 .

La población celular mayoritaria en ambos grupos estaba compuesta de células grandes, complejas ($57.0 \pm 8\%$ vs $46.5 \pm 8.6\%$) con una baja viabilidad ($30.8 \pm 25.3\%$ vs $38.9 \pm 10.8\%$).

- El porcentaje de estas células en apoptosis precoz fue mayor en comparación con el grupo control, sin diferencias estadísticamente significativas ($54.6 \pm 22.8\%$ vs $12.2 \pm 1.9\%$, $p=0.101$).
- El porcentaje de estas células en apoptosis tardía fue menor en comparación con el grupo control, sin encontrarse diferencias significativas ($13.8 \pm 7.2\%$ vs $40.9 \pm 7.3 \pm 7.3\%$ $p=0.053$).
- El porcentaje de células muertas (necrosis) fue significativamente menor que en el grupo control ($0.7 \pm 0.2\%$ vs $7.9 \pm 2.6\%$, $p=0.025$) (tabla 3, figura 10).

Células complejas

Sujetos	% células	% vivas	% apoptosis temprana	% apoptosis tardía	% muertas
Grupo QCV ($n = 3$)	57.0 ± 8.0	30.8 ± 25.3	54.6 ± 22.8	13.8 ± 7.2	0.7 ± 0.2
Grupo control ($n = 5$)	46.5 ± 8.6	38.9 ± 10.8	12.2 ± 1.9	40.9 ± 7.3	7.9 ± 2.6
P	0.456	0.456	0.101	0.053	0.025

Tabla 3. Viabilidad y apoptosis en células complejas (media +/- error típico de la media)

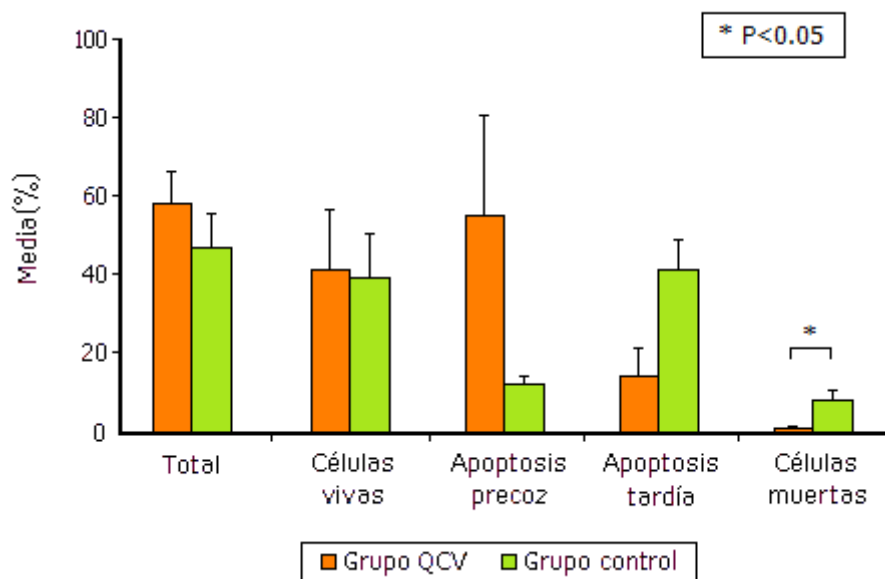


Figura 10. Viabilidad y apoptosis en células complejas (media +/- error típico de la media)

La población celular minoritaria ($38.7 \pm 10\%$ vs $51.3 \pm 8.7\%$) estaba compuesta de células pequeñas menos complejas más viables (55.1 ± 23.2 vs $89.5 \pm 4.4\%$). No se evidenciaron diferencias significativas con respecto al grupo control en ninguna de estas variables ni en la proporción de células en apoptosis precoz, apoptosis tardía o células muertas (necrosis) (Tabla 4, figura 11)

Células menos complejas					
Sujetos	% células	% vivas	% apoptosis temprana	% apoptosis tardía	% muertas
Grupo QCV ($n = 3$)	38.7 ± 10.0	55.1 ± 23.2	37.4 ± 22.6	6.6 ± 5.8	0.9 ± 0.8
Grupo control ($n = 5$)	51.3 ± 8.7	89.5 ± 4.4	7.9 ± 3.3	1.7 ± 0.7	0.8 ± 0.4
P	0.297	0.456	0.456	0.881	0.879

Tabla 4. Viabilidad y apoptosis en células menos complejas (media +/- error típico de la media).

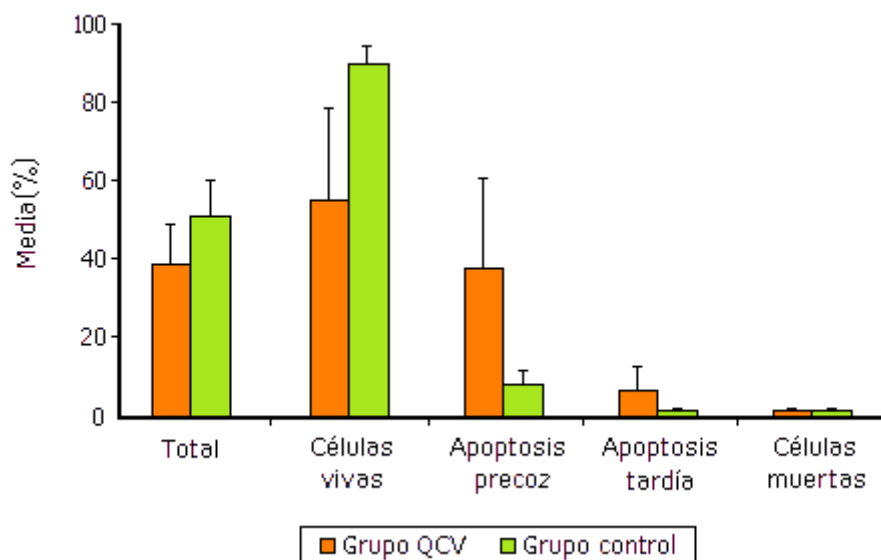


Figura 11. Viabilidad y apoptosis en células menos complejas (media +/- error típico de la media).

4. 3. CICLO CELULAR

Los resultados obtenidos en los pacientes con QCV fue la siguiente: La media de células analizadas fue 4.4×10^3 . Referente a las fases del ciclo celular, se encontró un mayor porcentaje de células conjuntivales en la fase de reposo (G0/G1) ($73.5 \pm 6.3\%$),

seguido de células conjuntivales en fase de mitosis (G2/M) y en fase de síntesis (S) respectivamente. El índice medio de proliferación (*mean proliferation index*, MPI) fue $26.5 \pm 6.3\%$.

En comparación con el grupo control, el número medio de células analizadas fue muy similar en ambos grupos (4.4×10^3 vs 5.2×10^3). Referente a las fases del ciclo celular, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control para ninguna de las fases ni para el índice medio de proliferación. (MPI) respecto a la misma zona del grupo control ($26.5 \pm 6.3\%$ vs $23.3 \pm 4.4\%$) (tabla 5, figura 12)

Sujetos	Fase del ciclo celular			Índice Medio Proliferación (MPI)
	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)	
QCV (n = 3)	73.5 ± 6.3	7.2 ± 2.4	19.3 ± 5.1	26.5 ± 6.3
Grupo control (n = 5)	76.7 ± 4.4	4.6 ± 0.7	18.7 ± 3.8	23.3 ± 4.4
P	0.456	0.655	0.881	0.456

Tabla 5. Análisis del ciclo celular (media +/- error típico de la media).

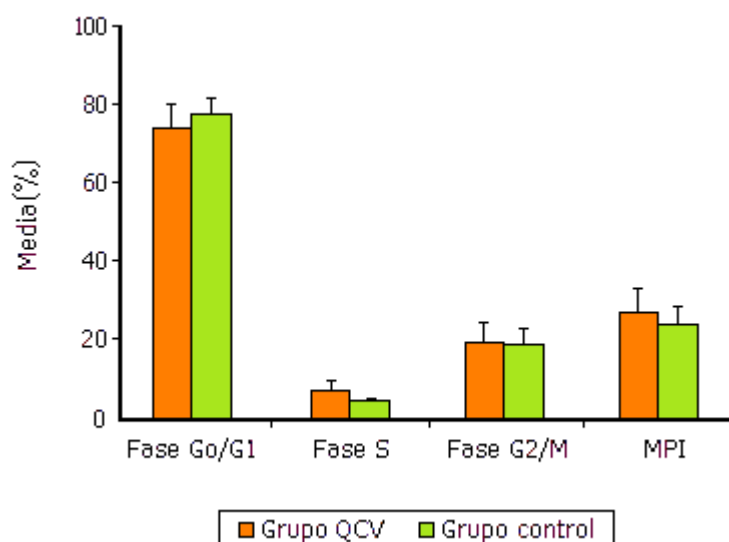


Figura 9. Análisis del ciclo celular (media +/- error típico de la media).

5. DISCUSIÓN

Existen múltiples técnicas para evaluar los cambios que se producen en la superficie ocular cuando esta se lesiona: tinciones vitales, citología por impresión conjuntival, citología por cepillado, biopsia o la microscopía especular. La obtención de células de la SO por técnicas mínimamente invasivas, impresión conjuntival y citología por cepillado, han sido herramientas fundamentales para poder investigar ciertas patologías oculares de carácter inflamatorio, como por ejemplo, el síndrome de ojo seco o las conjuntivitis alérgicas.^{20-21,36} La citología por impresión conjuntival poco a poco ha sido sustituida por la citología por cepillado, capaz de recoger mayor cantidad de células en suspensión, mucho más viables y menos alteradas morfológicamente.^{20,24}

En la SO, la citometría de flujo se ha utilizado para estudiar diferentes patologías, especialmente de origen inmunológico o inflamatorio, como el síndrome de ojo seco y las conjuntivitis alérgicas^{21,23,37}. También se ha utilizado en la identificación de células madre³⁸⁻⁴¹, en la caracterización fenotípica⁴², en análisis de viabilidad⁴³, análisis de proliferación⁴⁴, etc. La combinación de la citología por cepillado junto con el análisis por citometría de flujo constituye una herramienta útil para investigar la fisiopatología de la SO y determinar la presencia de infiltrado inflamatorio en el epitelio conjuntival humano.²⁶

Como principal limitación de este trabajo, debemos decir que la *n* del estudio fue baja debido a las especiales condiciones climatológicas de los últimos meses. 2013 ha sido poco propicio para las enfermedades alérgicas ya que debido a las condiciones climatológicas de la provincia de Valladolid los niveles de alérgenos ambientales han sido menores respecto a años anteriores. Si comparamos los niveles de polen en la provincia de Valladolid con años anteriores en las mismas fechas, se observa una disminución de hasta un tercio en los niveles de los principales aeroalergenos, alcanzando los picos máximos en una época más tardía que años anteriores.⁴⁵

Los pacientes con QCV diferían en su pauta de tratamiento. Algunos de estos pacientes se encontraban en tratamiento con corticoides tópicos y/o inmunosupresores tópicos en el momento de la obtención de las muestras. Aunque el objetivo de este estudio no era analizar los efectos de la terapia sobre las diferentes variables.

Este es el primer estudio que trata de caracterizar fenotipo por citometría de flujo de las subpoblaciones linfocitarias de la SO, así como la viabilidad, la apoptosis y las

fases del ciclo celular en la conjuntiva tarsal superior en niños con QCV. Como ya estaba descrito en adultos sanos,²⁷ existe una pequeña población leucocitaria CD45+ infiltrada entre las células epiteliales tanto en el grupo control como en los pacientes con QCV. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de estas células entre ambos grupos. En un estudio realizado en pacientes con síndrome de ojo seco³⁷ se observó una menor población de células CD45+, probablemente porque el aumento de los linfocitos en las enfermedades inflamatorias de la superficie ocular ocurre a nivel del estroma y no del epitelio.⁶

Nuestros resultados también indican que, en ambos grupos, esta población leucocitaria está predominantemente compuesta de linfocitos T, seguida de linfocitos B y de linfocitos NK, tal y como cabe esperar dada la topografía ya descrita.²⁷

En un estudio reciente, Lambiase et al. demostraron una alta infiltración de células NK en la conjuntiva de niños con QCV, sugiriendo que las células NK juegan un papel en la fisiopatología de esta enfermedad.⁴⁵ En nuestro estudio no se han encontrado diferencias en las poblaciones de NKs. Este hecho podría explicarse a que el estudio de Lambiase et al. se realizó con biopsias conjuntivales y la mayor infiltración inflamatoria se encuentra a nivel del estroma conjuntival, aunque no se puede descartar que con una *n* más amplia se llegaran a encontrar diferencias análogas.

El estudio del fenotipo por citometría de flujo mostró en el grupo con QCV una mayor población de linfocitos T a expensas de los linfocitos B, con una proporción T/B =7.9, aunque no se alcanzó diferencias significativas. En cuanto a los subtipos de linfocitos T, cooperadores (CD3+CD4+) y citotóxicos (CD3+CD8+), nuestros resultados mostraron que la relación CD4/CD8 era mayor en el grupo con QCV respecto al grupo control. Esto concuerda con la patogénesis de la QCV.⁴⁷

Otros aspectos estudiados fueron la viabilidad y el ciclo celular. La relación entre proliferación y muerte celular determina la homeostasis de un tejido y la regulación de la respuesta inmune.

Al igual que en estudios previo²⁷, nuestros resultados demostraron en ambos grupos la existencia de dos poblaciones celulares morfológicamente diferentes, células complejas y células simples o menos complejas, basándose en la granularidad del citoplasma. La población mayoritaria consistía en células grandes, complejas y de baja viabilidad, es decir, la mayoría de las células se encuentran en apoptosis. La población

más escasa consistía en células pequeñas, menos complejas, pero con mayor viabilidad. De acuerdo a que existen marcadores pronflamatorios y proapoptóticos en las capas superficiales del epitelio, y marcadores antiapoptóticos en las capas inferiores,⁴⁸ podríamos sugerir que las células complejas se encuentran en las capas más superficiales mientras que las células menos complejas se encuentran en estratos basales. Estos datos concuerdan con un estudio realizado con microscopía láser confocal por Efron et al.,^{49,50} quien sugiere que hay diferentes tipos celulares en los diferentes estratos del epitelio. Así, las capas superficiales estarían formadas por células epiteliales superficiales y por células caliciformes, mientras que las capas más basales se encontrarían células epiteliales basales y linfocitos intraepiteliales.

Dentro del grupo de células complejas, se halló un mayor porcentaje de células en apoptosis precoz en las muestras de los pacientes con QCV con respecto al grupo control, así como una disminución de dichas células en apoptosis tardía. Esta tendencia ($p < 0.2$) podría sugerir que, para mantener la homeostasis del tejido, aparece un aumento del volumen del tejido, ya que clínicamente los pacientes con QCV presentan hiperplasia (papilas). Las papilas de la QCV no son más que un infiltrado inflamatorio compuesto por eosinófilos, mastocitos, células Th2 y fibroblastos. Los fibroblastos sintetizan proteínas de la matriz extracelular (MEC). Las citocinas proinflamatorias pueden aumentar tanto el número de fibroblastos como la producción de MEC de forma directa. El aumento de proteínas de la MEC determina el volumen de un tejido y, por tanto, es responsable de la aparición de hipertrofia.⁵¹ Además, en un estudio realizado en pacientes con síndrome de ojo seco se observó que tras el tratamiento con Ciclosporina A aumentó la expresión del marcador proapoptótico APO 2.7 en las células del epitelio conjuntival, las cuales presentaban signos de hiperplasia.⁵²

Sin embargo, se observó un porcentaje significativamente menor de células grandes complejas muertas. Teniendo en cuenta la distribución en los diferentes estratos de las células del epitelio conjuntival anteriormente sugerida, este hallazgo contrasta con diversos estudios, los cuales sostienen que las capas superficiales del epitelio expresan proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bad, Fas (CD95) y CD40, y las capas basales la proteína inhibidora de la apoptosis Bcl-2.^{48,52,53}

Con respecto a la proliferación de las células obtenidas, la medición del contenido del ADN por citometría de flujo proporciona una información del número y porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular de una forma más exacta

que con marcadores proapoptóticos como el marcador APO 2.7. Se observó que la mayor parte de las células conjuntivales de ambos grupos se encuentran en fases precoces (G_0/G_1), seguido de la fase G_2/M y, por último, de la fase de síntesis (S). Estos hallazgos coinciden con los encontrados por Reinoso et al.,²⁷ así como el realizado por el mismo autor en conjuntiva de individuos con una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular como es el Síndrome de Ojo Seco.³⁶

6. CONCLUSIONES

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

1. Existe una pequeña población de células CD45+ infiltradas en el epitelio conjuntival de niños afectados de QCV que no difiere de la encontrada en el epitelio conjuntival de niños sanos.
2. Tanto en la conjuntiva de niños sanos como en la conjuntiva de niños con QCV los linfocitos T son el fenotipo predominante dentro de esta población leucocitaria, seguido de los linfocitos B y NK.
3. En los pacientes con QCV habría una mayor presencia de linfocitos T.
4. En los pacientes con QCV habría un mayor porcentaje de células complejas en apoptosis precoz.
5. En la QCV hay un menor porcentaje de células muertas complejas respecto a niños sanos.
6. No existen diferencias en el índice de proliferación entre ambos grupos.

PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES

La infancia es un periodo de continuo cambio. A día de hoy desconocemos si estos cambios también suceden a nivel del tejido linfoide asociado a la conjuntiva. Sería conveniente continuar con el estudio para ampliar la n así como comparaciones por rango de edad para corroborar los resultados obtenidos. Sería interesante en estudios posteriores introducir los efectos de la terapia sobre las diferentes variables, así como el estudio de los niveles de citocinas en lágrima y su papel en la fisiopatología de la QCV.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a todo el equipo de InmunoLab por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. En concreto a las tutoras, la Dra. Carmen Martín Alonso y la Prof. Dra. Margarita Calonge Cano, por su tesón y esfuerzo, y al Dr. Roberto Reinoso, siempre disponible, y al equipo técnico de InmunoLab.

A la Dra. Vallelado, Dr. Herreras y Dr. Asensio porque sin sus pacientes esto no podría haberse realizado.

A Raquel Martín, porque ella fue el inicio de todo este proyecto.

A todo el equipo de Anestesia y enfermería del HCUV e IOBA por su paciencia para poder recoger las muestras.

Y a Magnolia T. Cano, siempre apoyándome.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leonardi A. Emerging drugs for ocular allergy. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2005 Aug;10(3):505-20.
2. Portal de Salud de la Junta de Castilla y León.
<http://www.saludcastillayleon.es/ciudadanos/es/polen>
3. Abi Berger. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*. 2000 August 12; 321(7258): 424
4. Allansmith, M.R., Greiner, J.V., Baird, R.S., 1978. Number of inflammatory cells in the normal conjunctiva. *Am. J. Ophthalmol.* 86, 250–259.
5. Calonge M. Classification of ocular atopic/allergic disorders and conditions: an unsolved problem. *Acta Ophthalmol Scand Suppl.* 1999;(228):10
6. Bonini S, Bonini S, Lambiase A et al. (2000): Vernal keratoconjunctivitis revisited. A case series of 195 patients with long-term followup. *Ophthalmology* 107: 1157–1163.
7. Stefano Bonini, Marta Sacchetti, Flavio Mantelli and Alessandro Lambiase. Clinical grading of vernal keratoconjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7:436–441. _ 2007
8. *Inmunología celular y molecular*. McGraw Hill Ed. Abdul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober.
9. Paulsen F. Functional anatomy and immunological interactions of ocular surface and adnexa. In Geerling G, Brewitt H (eds). *Surgery for the Dry Eye*. Dev Ophthalmol. Basel, Karger, 2008;41:21-35.
10. 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.
11. Knop E, Knop N. Influence of the eye-associated lymphoid tissue (EALT) on inflammatory ocular surface disease. *Ocul Surface* 2005;3:S180–S186.
12. 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.
13. 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):178-187.

14. 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;1241–1281.
15. Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat* 2005;206:271–285.
16. Knop N, Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1270–1279.
17. 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.
18. Hingorani M, Metz D, Lightman SL. Characterisation of the normal conjunctival leukocyte population. *Exp Eye Res* 1997;64:905–912.
19. 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.
20. 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.
21. Fujishima H, Saito I, Takeuchi T, Tsubota K. Immunological characteristics of patients with vernal keratoconjunctivitis *Jpn J Ophthalmol* 2002;46:244-8.
22. 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(3):457-472
23. 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.
24. Fujihara T, Takeuchi T, Saito K, et al. 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.
25. Yagmur M, Ersoz C, Reha Ersoz T, Varinli S. Brush technique in oculaire surface cytology. *Diagnostic Cytopathology* 17;2:88.91.
26. 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.

27. 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(4):455-67.
28. Knop E, Knop N. Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in the human eye – Components and topographical distribution. *Ophthalmic Res.* 1999a. 31 (Suppl.), 156.
29. 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]. *Ophthalmologe* 2003;100:929-42.
30. Enríquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, Galatowicz G, García-Vázquez C, Fernández I, Stern ME, Diebold Y, Calonge M. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: an in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine.* 2008 Oct;44(1):160-7. doi: 10.1016/j.cyto.2008.07.007. Epub 2008 Aug 28.
31. Benito MJ, Calder V, Corrales RM, García-Vázquez C, Narayanan S, Herreras JM, Stern ME, Calonge M, Enríquez-de-Salamanca A. Effect of TGF- β on ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2013 Feb;107:88-100. doi: 10.1016/j.exer.2012.11.017. Epub 2012 Dec 7.
32. Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreño E, García-Vázquez C, Herreras JM, Calonge M. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 2010;16:862-73.
33. Carreño E, Enríquez-de-Salamanca A, Tesón M, García-Vázquez C, Stern ME, Whitcup SM, Calonge M. Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta Ophthalmol.* 2010;88(7):250-8.
34. Enríquez-de-Salamanca A, Bonini S, Calonge M. Molecular and cellular biomarkers in dry eye disease and ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012 Oct;12(5):523-33. doi: 10.1097/ACI.0b013e328357b488.
35. Bonini S, Coassin M, Aronni S & Lambiase A (2004): Vernal keratoconjunctivitis. *Eye* 18: 345–351.
36. 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(7):4819-28.

37. Diebold Y, Calonge M, Enriquez dS, et al. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4263-74.
38. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, et al. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells* 2005;23:1266-75.
39. Sosnova M, Bradl M, Forrester JV. CD34+ corneal stromal cells are bone marrow-derived and express hemopoietic stem cell markers. *Stem Cells* 2005;23:507-15.
40. 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.
41. De Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem Cells* 2006;24:368-75.
42. Chan JH, Amankwah R, Robins RA, Gray T, Dua HS. Kinetics of immune cell migration at the human ocular surface. *Br J Oph* 2008 ;92 :970-975.
43. Martínez-Osorio H, Calonge M, Corell A, Reinoso R, López A, Fernández I, Gutiérrez-San José E, Diebold Y. Characterization and short-term culture of cells recovered from human conjunctival epithelium by minimally invasive means. *Mol vis* 2009 (accepted).
44. Karukonda SR, Thompson HW, Beuerman RW, Lam DS, Wilson R, Chew SJ, Steinemann TL. Cell cycle kinetics in pterygium at three latitudes. *Br J Ophthalmol* 1995; 79(4):313-317.
45. Sociedad Española de Alergología e Inmunología clínica (SEAIC). <http://www.polenes.com>
46. Lambiase A, Normando EM, Vitiello L, Micera A, Sacchetti M, Perrella E, Racioppi L, Bonini S, Bonini S. Natural killer cells in vernal keratoconjunctivitis. *Mol Vis*. 2007 Aug 30;13:1562-7.
47. Andrea Leonardi. Vernal keratoconjunctivitis: pathogenesis and treatment. *Progress in Retinal and Eye Research* 21 (2002) 319-339
48. Tan , D . T . , Tang , W . Y . , Liu , Y . P . , Goh , H . S . & Smith , D .R . Apoptosis andapoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium . *Br. J. Ophthalmol.* 84 , 212 – 6 (2000).
49. Efron N, Al-Dossari M, Pritchard N. In vivo confocal microscopy of the palpebral conjunctiva and tarsal plate. *Optom Vis Sci*. 2009 Nov;86(11):E1303-8.

50. Efron N, Al-Dossari M, Pritchard N. In vivo confocal microscopy of the bulbar conjunctiva. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2009 May;37(4):335-44.
51. Stern ME, Schaumburg CS, Dana R, Calonge M, Niederkorn JY, Pflugfelder SC. Autoimmunity at the ocular surface: pathogenesis and regulation. *Mucosal Immunol*. 2010 Sep;3(5):425-42. doi: 10.1038/mi.2010.26. Epub 2010 May 19.
52. Giebel , J . , Woenckhaus , C . , Fabian , M . & Tost , F . Age-related differential expression of apoptosis-related genes in conjunctival epithelial cells . *Acta Ophthalmol. Scand*. 83 , 471 – 6 (2005). Ç
53. Khalfaoui , T . , Basora , N . & Ouertani-Meddeb , A . Apoptotic factors (Bcl-2 and Bax) and diabetic retinopathy in type 2 diabetes . *J. Mol. Histol*. 41 , 143 – 52 (2010).

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio: Alteraciones del compartimento epitelial del sistema inmune de la mucosa ocular en Queratoconjuntivitis vernal (QCV).

Nº de estudio: IOBAXXX-2013

Coordinadores: Dra. Margarita Calonge (Tf. 983 184 763); Dra. Carmen Martín Alonso (Tf. 983 184 755).

Centro: 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 padecen queratoconjuntivitis vernal.

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 fenotípica y funcional, mediante citometría de flujo, de las células conjuntivales obtenidas, evaluando el linaje celular, la viabilidad y la fase del ciclo celular del epitelio, y la comparación de la función inmunológica entre la conjuntiva ocular de pacientes con QCV y la de individuos sanos.

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. 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), que se colocarán en el canto externo de un único ojo. A continuación, se realizará una única extracción de células de conjuntiva. 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, la misma zona que su médico evalúa rutinariamente en la consulta. 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.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

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.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Título del Estudio: Alteraciones del compartimento epitelial del sistema inmune de la mucosa ocular en Queratoconjuntivitis vernal (QCV).

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 Dra. Carmen Martín Alonso, 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)

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio: Caracterización del componente epitelial del CALT en niños 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 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.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

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.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

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 _____

(Debe ser firmado y fechado por el paciente)

Fecha _____

Nombre del representante legalmente autorizado

Firma _____

(Debe ser firmado y fechado por el representante legalmente autorizado -si aplica-)

Fecha _____

Nombre del Investigador

Firma _____

(Debe ser firmado y fechado por el investigador)

Fecha _____

Nombre de la persona que participó en la discusión del CI

Firma _____

(Debe ser firmado y fechado por la persona que explicó el consentimiento informado)

Fecha _____

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____