

Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Dpto. de Inmunología



Máster en Investigación en Ciencias de la Visión

Análisis de subpoblaciones linfocitarias y linfocitos intraepiteliales en sangre periférica y la conjuntiva tarsal

TRABAJO FIN DE MÁSTER PRESENTADO POR

María Inés Llorente González

TUTORES

Prof. Dr. Alfredo Corell Almuzara

Dra. Victoria Marqués Fernández

EQUIPO INVESTIGADOR

José Carlos Zarzuela Velasco

Índice

Contenido

Índice.....	2
Curriculum Vitae	3
Resumen.....	4
Introducción.....	5
Anatomía de la conjuntiva.....	5
Histología de la conjuntiva	6
El sistema inmune en el ojo.....	6
Hipótesis y objetivos.....	15
Material y métodos	16
Resultados	20
Discusión.....	31
Conclusiones.....	33
Bibliografía.....	34

Resumen

Introducción

El tejido linfoide de la conjuntiva CALT forma parte del sistema inmunitario del ojo y proporciona los mecanismos de defensa humorales y celulares, tanto innatos como adquiridos pero aún no se ha caracterizado por completo como varían los distintos tipos celulares en la sangre y la conjuntiva de sujetos sanos y las modificaciones en las distintas enfermedades que componen la alergia ocular.

Material y métodos

Se recogieron muestras de sangre periférica y conjuntiva tarsal superior mediante cepillado para 21 sujetos control y 10 sujetos alérgicos. Se analizaron mediante citometría de flujo y se caracterizaron la mayoría de poblaciones linfocitarias

Resultados

En sangre periférica de los sujetos sanos y alérgicos hay un predominio linfocitos CD4+ frente CD8+, de linfocitos B2 respecto a B1, de linfocitos T vírgenes respecto a los linfocitos T memoria y los linfocitos NK y NKT tienen fundamentalmente acción citotóxica.

En sangre conjuntiva de sujetos sanos y alérgicos hay un predominio linfocitos CD8+ frente CD4+, de linfocitos B1 respecto a B2, y los linfocitos NK y NKT tienen fundamentalmente acción citotóxica.

Los sujetos alérgicos muestran un aumento de las proporciones de Th17 y Th22 tanto en sangre periférica como en conjuntiva.

Conclusiones

Los hallazgos sugieren: 1) que las proporciones relativas de poblaciones linfocitarias de la conjuntiva tarsal son diferentes que las de la sangre periférica en los sujetos sanos. 2) que la proporciones relativas de las subpoblaciones linfocitarias se mantienen en general en la sangre de sujetos alérgicos respecto de los sanos a excepción de un aumento en las proporciones de linfocitos Th17, Th22 y linfocitos B 3) que la proporciones relativas de las subpoblaciones linfocitarias se mantienen en general en la conjuntiva de sujetos alérgicos respecto de los sanos a excepción de un aumento en las proporciones de linfocitos Th17, Th22 y linfocitos TCR $\gamma\delta$.

Introducción

Anatomía de la conjuntiva

La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que recubre la superficie interna de los párpados y la superficie del globo ocular hasta el limbo. [1] Topográficamente se divide en tres zonas:

Conjuntiva palpebral: comienza en la línea de unión mucocutánea y recubre la superficie interna del párpado. Está adherido fuertemente al tarso.

Conjuntiva de los fórnices: en los fondos de saco el tejido es redundante y se mueve libremente. En el párpado superior se entremezcla con fibras de la aponeurosis del músculo elevador del párpado superior y el músculo de Müller. En el párpado inferior, extensiones fibrosas de la vaina del músculo recto inferior forman el musculo tarsal inferior.

Conjuntiva bulbar: se mueve libremente. Se fusiona con la capsula de Tenon y se inserta en el limbo.[2]

Anatomía de la conjuntiva

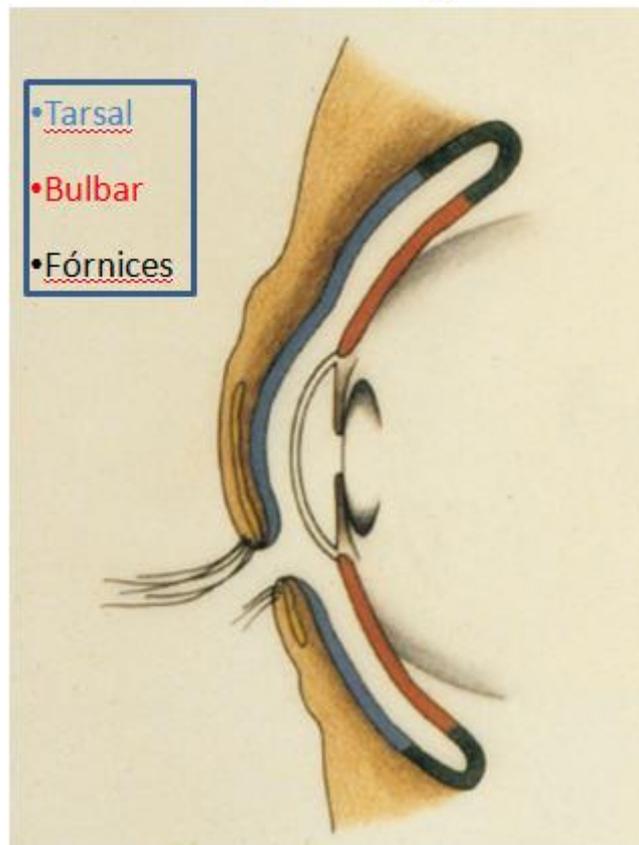


Figura 1. Topografía de la conjuntiva [2]

Histología de la conjuntiva

Histológicamente en la conjuntiva se diferencian el epitelio y el estroma (sustancia propia o “*lamina propria*”)

El epitelio es de tipo escamoso no queratinizado y tiene una profundidad de 2 a 5 capas. Las células prismáticas basales evolucionan a células poliédricas aplanadas antes de que se desprendan de la superficie. Dispersas en el epitelio se encuentran las células caliciformes, glándulas mucosas unicelulares y cuya función es la producción de moco.

En profundidad se encuentra la estroma (lamina propria) que consta de tejido conectivo laxo, que se encuentra profusamente vascularizada. En ella también está los vasos linfáticos y las células que forman parte de la inmunidad tanto innata como adquirida.[1]

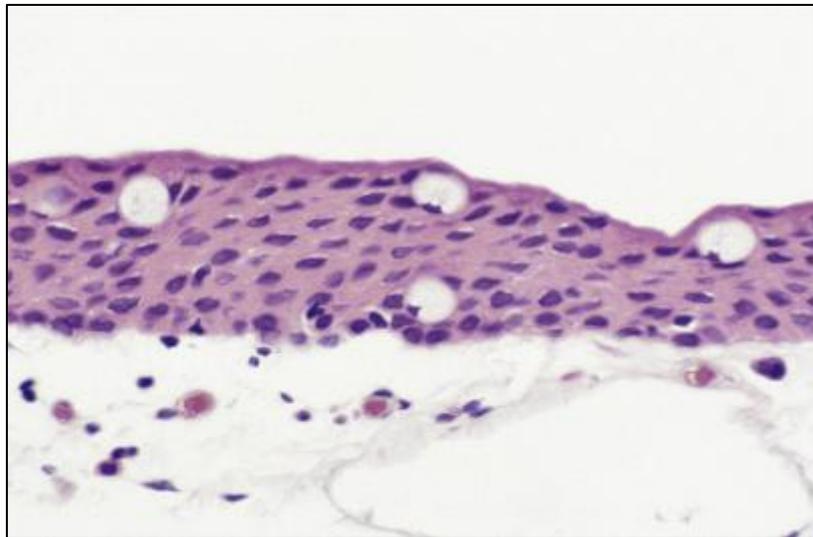


Figura 2. Histología de la conjuntiva [1]

El sistema inmune en el ojo

El tejido linfóide del ojo o EALT (“eye associated lymphoid tissue”) es uno de los denominados tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT) que están también presentes en las placas de Peyer del intestino delgado, amígdalas, en la capa mucosa de la vía aérea superior, bronquios y tracto genito-urinario [4]. En la superficie ocular hay una situación de privilegio inmunológico ya que, a diferencia del sistema inmune central, en el MALT hay un ambiente local inmunosupresor, con tolerancia e ignorancia inmunológica. [4]

En el MALT se distinguen dos tipos de estructuras, unas organizadas en la que los linfocitos se agrupan en folículos linfoides y otras difusas con linfocitos intraepiteliales sin distribución particular. [5]

Los **folículos linfoides** son acúmulos de linfocitos (mayoritariamente B) que se organizan en torno a las vénulas del endotelio. Rodeando a las vénulas se encuentran las células plasmáticas y periféricas a ellas los linfocitos T. [6]

Sin embargo el **tejido linfoide difuso** está formado principalmente por linfocitos T intraepiteliales (IELs) mayoritariamente citotóxicos y linfocitos T del tejido conectivo y células plasmáticas productoras de IgA2. En la lámina propia, en cambio, predominan los linfocitos T cooperadores. [7]

El EALT es la unión de los denominados CALT ("Conjuntiva") de la conjuntiva, LDALT ("Lacrimal Drainage") de la vía lagrimal y el LGALT ("Lacrimal Gland") de la glándula lagrimal. En el CALT se produce el procesamiento y presentación del antígeno y la inducción de la respuesta inmune adaptativa. [4]

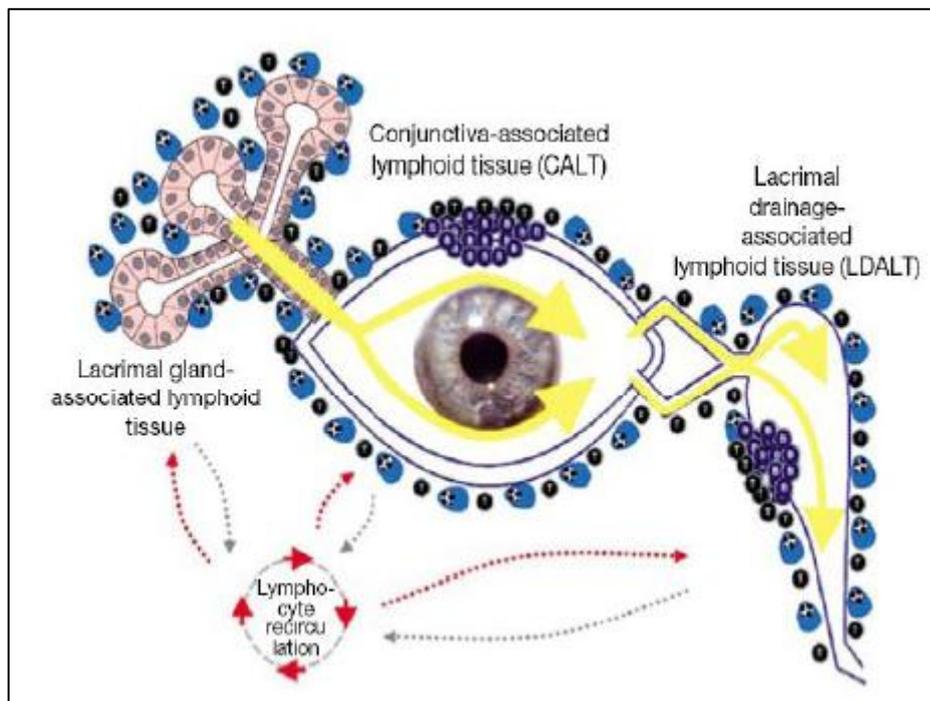


Figura 3: EALT y sus componentes [4]

En cuanto a la distribución de los linfocitos en la conjuntiva son más abundantes en la región tarsal superior que en la inferior. Así mismo son más numerosos en la región nasal de la conjuntiva que en la temporal [8]

Sistema inmune de la superficie ocular e inflamación

En la superficie ocular se han localizado herramientas celulares y humorales de la inmunidad tanto innata como adquirida.

Como representantes de la **inmunidad innata** celular se encuentran los macrófagos, las células dendríticas, los linfocitos NK y de la adquirida los linfocitos B y linfocitos T (tanto cooperadores como citotóxicos).

Dentro de la **inmunidad humoral** se han encontrado:

- **IgA secretora** (en la lágrima) es la inmunoglobulina por excelencia de la superficie mucosa de todo el organismo y con muy buena capacidad neutralizante de antígenos,
- **Péptidos anti-microbianos:** como la lisozima y las defensinas (auténticos antibióticos endógenos).
- **Citocinas:** moléculas de señalización intercelular (tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa). Entre otras se pueden destacar:
 - **Factor de crecimiento transformante β** (TGF- β) producida por las células caliciformes de la conjuntiva y las células T reguladoras. Tiene función antiinflamatoria al suprimir la maduración de las células dendríticas y los linfocitos Th1 (es la principal citocina reguladora junto a la IL-10).
 - **Interleucina 1** (IL-1) es sintetizada por las células epiteliales y presenta una función proinflamatoria activando las células dendríticas.
 - **Otras citocinas proinflamatorias** son IL-17, IL-6, el factor de necrosis tumoral (TNF) y los interferones α , β , y γ . [4]

Como ya observaron *Bisset et al* la proporción de las células linfoides es diferente en sangre (sistema inmune sistémico) que en los tejidos linfoides regionales como es el CALT. También vieron que en sangre periférica de individuos sanos predominaban los linfocitos T sobre los linfocitos B y que los valores de linfocitos T CD4+ eran significativamente mayores a los de los linfocitos T CD8+. [9]

Reinoso R. et al, pioneros en la caracterización linfoide del CALT vieron que en la conjuntiva los linfocitos T predominan sobre los B (T>75%, B<25%) mientras que los NK tenían valores en torno al 1% del total. En conjuntiva superior los linfocitos CD8+ (citotóxicos) eran ligeramente superiores a los CD4+ (cooperadores).

En el fórnix los CD4+ superaban significativamente a los CD8+. Este hecho les condujo a la teoría de que la zona de la conjuntiva bulbar y tarsal es una zona efectora mientras que el fórnix inferior es una zona de inducción de respuesta inmune. [8]

Poblaciones linfocitarias

Como ya hemos mencionado antes, existen varias poblaciones de linfocitos con funciones muy diferentes. A continuación haremos una breve descripción de los distintos principales tipos y subtipos de linfocitos y que tienen cabida en este estudio, haciendo especial hincapié en la función y los marcadores de linaje que expresan.

Linfocitos T

Son células clave en la inmunidad junto con los linfocitos B. Expresan CD3 en su superficie acompañando al receptor de la célula T, que es su marcador de linaje.

Se pueden clasificar según distintos criterios:

-Según el **estado madurativo:** los linfocitos T se pueden considerar vírgenes (o naïve por no haberse activado previamente): expresan CD45RA y linfocitos T activados o de memoria: expresan CD45RO.

-Según el **receptor** que expresan TCR $\alpha\beta$, que a su vez pueden expresar el correceptor CD8+ o CD4+, y TCR $\gamma\delta$ que corresponde con los linfocitos intraepiteliales y es un receptor más primitivo, menos específico y en sangre no supera el 5%. En algunas patologías intestinales se ha visto que puede alcanzar hasta el 30%. Los linfocitos TCR $\gamma\delta$ en su gran mayoría no expresan correceptor pero si lo hacen, este es siempre CD8+.

-Según el **correceptor** que expresen, los linfocitos T $\alpha\beta$ se subdividen en CD4+ y CD8+. Los linfocitos CD8+ también llamados citotóxicos aunque dentro de los CD8+ también hay linfocitos reguladores. Mención especial para los linfocitos NKT, una subpoblación de linfocitos CD8+ pertenecen a la inmunidad innata y expresan marcadores de membrana propios de las NK (CD56,CD16) y de las células T (TCR $\alpha\beta$).

Los linfocitos CD4+

Los linfocitos Th son los encargados de mediar la inmunidad adaptativa. Interactúan, mediante presentación de antígeno, con los linfocitos B para que puedan producir anticuerpos y regulan la actividad de los macrófagos y linfocitos T CD8+. En la tabla 1 se recogen las distintas subpoblaciones de linfocitos CD4+.

Linfocitos B

Los linfocitos B son elementos clave de la inmunidad adquirida. Son células presentadoras de antígenos y ejercen su acción efectora mediante la síntesis de inmunoglobulinas. Expresan su superficie CD19, que es su marcador de linaje.

Dentro de los linfocitos B se pueden identificar dos subpoblaciones B1 y B2. Los linfocitos B1 (CD5+) producen una respuesta rápida, su activación no depende de la interacción con un linfocito T y los anticuerpos que sintetizan son de baja afinidad. Sin embargo, los linfocitos B2 (CD5-) producen una respuesta más lenta, para ser activados requieren la interacción con un linfocito T. Los anticuerpos que sintetizan son de mayor afinidad. Son los mayoritarios en sangre

Linfocitos NK

Son células que forman parte de la inmunidad innata y como tales presentan una serie de características: se activan de modo inmediato, no son específicos de antígenos, no son clonales, no son capaces de tener memoria inmunológica y no actúan frente a lo propio.

Están implicadas en la inmunidad viral y antitumoral.

Llevan a cabo su función efectora mediante la producción de citocinas y regulan indirectamente la maduración de células dendríticas.

Los linfocitos NK no expresan el receptor CD3 en su superficie.

Podemos clasificarlos en tres subpoblaciones en base a los marcadores de superficie que expresen.

-Las células NK CD56+CD16-, van a tener función inmuno-reguladora y son más abundantes en tejido que en sangre.

- Las células NK CD56dimCD16+ son más abundantes en sangre que las anteriores y se van a caracterizar por su alta capacidad citotóxica

-Células NK CD56-CD16+ con función citotóxica.

	Célula a partir de la cual se diferencian	Citocinas que promueven su diferenciación	Citocinas que producen	CD	Función
Th0				CD45RA+	
Th1	Th0	IL-12 e IFN- γ	IFN- γ , IL-2 y TNF- α , IL-10	CD45R0+ CD183+ CD194- CD196- CCR10-	Activación de los fagocitos Opsonización Activación del complemento
Th2	Th0	IL-4 y IL-2	IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 y TNF- α .	CD45R0+ CD183- CD194+ CD196- CCR10-	Regulación las respuestas de inmunidad adaptativa humoral Defensa contra parásitos extracelulares Activación de macrófagos y mastocitos Reclutamiento de eosinófilos Interacción con células epiteliales.
Th17	Th0	TGF- β y IL-6	IL-17A, IL-17F, IL-22 y IL-21,	CD45R0+ CD183- CD194+ CD196+ CCR10-	Activación granulocitos
Th17/Th1	Th17	IL-12	IL-17 e IFN- γ .	CD45R0+ CD183+ CD194- CD196+ CCR10- CD183- CD194+ CD196+ CCR10+	
Th22		IL-6, IL-21			
Treg[10]	Th0	TGF- β e IL-2	IL-10, TGF- β , IL-2, IL-5, IFN- γ		Supresión respuesta inmune

Tabla 1. Tabla resumen de los subtipos de linfocitos T cooperadores

Alergia ocular y Conjuntivitis

La alergia es una enfermedad muy prevalente en la sociedad actual, cerca de un 20-30%, pero sólo algo más de la mitad tendrá pruebas de alergia positivas. Las manifestaciones oculares estarán presentes en aproximadamente el 50% de los sujetos alérgicos. [11]

Existe un mayor riesgo de ser alérgico si la historia familiar es positiva [12]. Los alérgenos más frecuentes en nuestro medio son los pólenes (gramíneas, oleáceas, parietarias, plátanos de sombra), insectos (heces ácaros del polvo, la cucaracha y sus heces y huevos) y epitelio de animales como gato, perro y caballo.

La prevalencia de la alergia ha aumentado en las sociedades occidentales. Se ha postulado la hipótesis de la higiene (en los países con mayor higiene y menos contacto con grandes parásitos el sistema inmunitario ha buscado otras sustancias frente a las que reaccionar)[14], en la que el equilibrio entre respuestas Th1/Th2 se rompe a favor de las Th2. Otros factores que parecen estar implicados son la contaminación especialmente las partículas de combustión de motores diesel.

La alergia ocular se clasifica en función de criterios clínicos (intermitente, persistente o crónica) e inmunopatológicos, en función de si está mediada por IgE, no mediada por IgE o comparte ambos mecanismos. [13]

		Criterios inmunopatológicos		
		Mediado IgE	Mediado IgE y no mediado IgE	No mediado IgE
Criterios clínicos	Intermitente	Conjuntivitis alérgica estacional		
	Persistente	Conjuntivitis alérgica perenne	Queratoconjuntivitis vernal	Conjuntivitis papilar gigante
	Crónica		Queratoconjuntivitis atópica	Blefarconjuntivitis de contacto

Tabla 2: Clasificación alergia ocular. Traducido de [13]

Conjuntivitis

La conjuntivitis es el proceso inflamatorio de la conjuntiva. Se caracteriza por hiperemia y quémosis conjuntival así como un aumento de las secreciones.

Podemos clasificar las conjuntivitis siguiendo múltiples criterios. Las conjuntivitis pueden ser una manifestación más dentro de un proceso sistémico, como la fiebre adenofaringoconjuntival y el penfigoide ocular cicatricial, o una afección localizada como la queratoconjuntivitis epidémica. [1]

Atendiendo a la patogenia: infecciosas, inmunomediadas (alérgicas, autoinmunes) y otro grupo en el que no hay un mecanismo infeccioso ni inmunológico como son las reacciones a fármacos locales o sistémico, las tóxicas, las irritativas y las cicatriciales.

Las conjuntivitis infecciosas pueden ser clasificadas a su vez desde distintos puntos de vista: según etiología (bacterianas, víricas, fúngicas y parasitarias), según el tipo de secreción (serosas, mucosas, mucopurulentas y purulentas), según el tipo de reacción

tisular (papilares y foliculares), o según evolución (hiperagudas, agudas y crónicas) [12]

Conjuntivitis alérgica estacional y perenne

La conjuntivitis alérgica estacional y perenne son procesos mediados por IgE, se clasifican por tanto como una reacción de hipersensibilidad de tipo I.

Los individuos con CAE y CAP suelen comenzar con síntomas en la infancia, aunque la mitad mejora hasta la pubertad. La incidencia máxima se produce en la tercera década de la vida (18-35 años).

En la conjuntivitis alérgica estacional el alérgeno suele ser un aero-alérgeno (pólenes) y va ser distinto en función de la época del año y de la localización geográfica. En primavera es frecuente que la alergia sea ocasionada por pólenes de árboles, en los meses de mayo a julio, gramíneas y en otoño, polen de arbusto. Es habitual que estos pacientes asocien síntomas nasales o faríngeos. La afectación es asimétrica, con un inicio gradual y variable.

En la forma perenne la etiología está relacionada con esporas de mohos, ácaros, pólenes de parietarias y restos epiteliales de animales domésticos. Se suele asociar más característicamente con rinitis. Los síntomas son menos severos que en la forma estacional y estarán presentes todo el año, pero puede haber exacerbaciones estacionales.

El síntoma principal en la conjuntivitis alérgica es el picor que suele ir acompañado de lagrimeo, escozor, sensación de cuerpo extraño. Como signos en la exploración oftalmológica encontraremos hiperemia y quémosis conjuntival, edema palpebral y papilas en la conjuntiva tarsal. Tanto la CAE y la CAP se caracterizan por no tener afectación corneal.

El diagnóstico es eminentemente clínico. Las pruebas alérgicas serán útiles para identificar el alérgeno, pero no está recomendado hacerlas en niños menores de 10 años ya que suelen ser negativas.

Queratoconjuntivitis vernal

La queratoconjuntivitis vernal se caracteriza por presentar una afectación bilateral aunque muy asimétrica. Afecta fundamentalmente a pacientes jóvenes. Es más prevalente en los varones prepúberes, pero la prevalencia entre hombres y mujeres se equilibra después de la pubertad.[15]

Es más frecuente que presente un curso estacional pero también puede hacerlo de forma perenne.

Tiene mayor incidencia en la cuenca mediterránea, oeste de África, India y Sudamérica. En España también se constata este aumento en torno al Mediterráneo.

Los sujetos de raza negra la QCV se puede presentar con mayor gravedad y atipicidad

En la QCV existe mecanismo de hipersensibilidad tipo I pero también de tipo IV.

Como consecuencia de un mecanismo de hipersensibilidad tipo I se encuentran valores de Ig E más elevados en suero. El prick es test positivo en la mitad de los pacientes con QCV. Además se han encontrado niveles elevados de histamina e IgE en lágrima, baja

actividad de histaminasa y mastocitos degranulados en el epitelio y lamina propia de la conjuntiva de sujetos con QCV.

También se ha hallado un mayor número de linfocitos citotóxicos, macrófagos, células epitelioides y células gigantes multinucleadas, todo ello consecuencia del mecanismo de hipersensibilidad tipo IV.

Clínicamente se caracteriza por un prurito muy intenso, con continuo frotamiento que agrava el picor. Se suele acompañar de secreciones mucosas, lagrimeo y fotofobia.

Según la afectación conjuntival se describen tres formas: tarsal, limbar y mixta.

Un hallazgo característico de esta patología son los nódulos de Trantas, que son acúmulos de eosinófilos en el limbo. En la exploración es frecuente encontrar papilas tarsales gigantes, a veces con moco entre ellas, lo que se conoce como signo de Maxell-Lyons. Aunque menos habitual, también se pueden encontrar papilas en conjuntiva bulbar.

El daño corneal se produce fundamentalmente por dos proteínas producidas por los eosinófilos, la proteína eosinófila catiónica y la proteína mayor básica.

Dentro de la afectación corneal podemos encontrar conjuntivalización corneal superior, queratitis epitelial de Tobgy que puede evolucionar a úlcera en escudo. Es excepcional que las úlceras en escudo se sobreinfecten.[16]

Queratoconjuntivitis atópica

La queratoconjuntivitis atópica es la manifestación crónica de una serie de alteraciones de la superficie ocular en el contexto de dermatitis atópica.

El 25-40% de los pacientes con dermatitis atópica tienen afectación ocular. [17]

La afectación ocular es bilateral y simétrica. Afecta a pacientes en edad adulta (30 a 50 años) con antecedente de dermatitis atópica en la infancia, no habiendo relación entre la severidad de la dermatitis y la de la conjuntivitis. La QCA Es más prevalente en el sexo masculino y en sujetos de raza blanca, en zonas frías y áreas urbanas.

Hay una hipersensibilidad tipo I junto con una depresión de la inmunidad celular lo que predispone a estos pacientes a infecciones virales cutáneas (sobre todo herpética) e infecciones en la superficie ocular. [19]

Como síntomas los pacientes contarán picor, epifora, y fotofobia.

En la exploración se pueden encontrar signos de afectación de párpados, conjuntiva, cornea y cristalino

En los párpados se describen dermatitis, meibomitis, blefaritis, queratinización del borde libre, entropión y ectropión

La conjuntiva se presenta hiperémica y edematosa, las secreciones son mucosas. Aparecen papilas tanto en conjuntiva tarsal superior como en inferior, que son de menor tamaño que en la QCV. En casos más graves aparece conjuntivitis cicatrizante con fibrosis subepitelial, acortamiento de los sacos y simbléfaron.

En la córnea puede existir, conjuntivalización corneal, úlceras, que es más característico que se infecten que las úlceras corneales de la QCV, melting corneal, pudiendo llegar incluso a la perforación. Las infecciones herpéticas son más frecuentes. Pueden llegar a desarrollar insuficiencia límbica como consecuencia de los defectos epiteliales persistentes que presentan.

Es más frecuente la aparición de cataratas, sobre todo subcapsular anterior, aunque también subcapsulares posteriores. [18]

Justificación:

Como ya se ha dicho previamente, la alergia ocular es una patología muy frecuente en los países desarrollados. Si bien la mayor parte de los casos son formas leves y el abordaje terapéutico no es muy costoso. Sin embargo, en las formas más graves, aunque menos frecuentes, se requieren tratamientos más caros y complejos.

Por lo tanto, tener un mejor conocimiento del funcionamiento del sistema inmunitario de la mucosa ocular puede arrojar luz a comprender los mecanismos celulares y moleculares, en una patología de gran impacto socio-sanitario.

Si además el estudio de células y moléculas en la sangre correlaciona de modo positivo o negativo con las de la superficie ocular nos podría ayudar a esclarecer los mecanismos inmunitarios que actúan en cada tipo de alergia; y finalmente se podrían localizar biomarcadores que nos ayuden a realizar un mejor diagnóstico y tratamiento de las conjuntivitis alérgicas.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

Las subpoblaciones de linfocitos T, B y NK tanto en sangre periférica como en conjuntiva tarsal superior, varían en sujetos con alergia ocular respecto a sujetos sanos.

No existe correlación entre las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica con las de conjuntiva tarsal superior

Objetivos:

1. Caracterizar fenotípica y funcionalmente, mediante citometría de flujo, las poblaciones linfocitarias T, B y NK presentes en sangre periférica y en conjuntiva tarsal superior.
2. Comparar y correlacionar el fenotipo linfocitario sistémico (sangre venosa periférica) y el regional (conjuntiva tarsal superior).
3. Analizar la influencia de la edad, el sexo y la patología alérgica en las subpoblaciones linfocitarias sistémicas y regionales.
4. Analizar como las proporciones de subpoblaciones linfocitarias estudiadas podrían utilizarse como posible biomarcador en el diagnóstico de enfermedades alérgicas oculares.

Material y métodos

Pacientes

Previo al reclutamiento de pacientes se solicita aprobación del estudio al comité Ético de Investigación Clínica Área de Salud Valladolid Este (CEIC-VA-ESTE-HCUV), al comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud Valladolid Oeste (CEIC-VA-OESTE-HURH) y a la Comisión de Investigación del el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) Obteniéndose informe favorable. (Anexo 1. Comités Éticos).

El reclutamiento de pacientes se lleva a cabo en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) y los servicios de Oftalmología y Alergología del Hospital Universitario Rio Hortega. Asimismo se hace una campaña de difusión del estudio en centros de salud de las áreas de salud este y oeste de Valladolid y por mail a la comunidad universitaria de la Universidad de Valladolid (Anexo 2. Cartel difusión)

Cada paciente es informado del objetivo, riesgos del estudio, características del proceso de obtención de muestras y participación voluntaria. El proceso de información se lleva a cabo por el mismo investigador que va a recoger las muestras. Tras aceptar la participación voluntaria en el estudio los pacientes firman y datan el consentimiento informado. En caso de menores lo llevan a cabo el padre/madre/tutor legal. (Anexo 3. Consentimiento Informado)

Para formar parte del estudio los pacientes deben cumplir los criterios de inclusión y no tener criterios de exclusión (Anexo 4. Criterios de inclusión y exclusión).

Se realiza una encuesta sobre hábitos de vida y se recogen los antecedentes personales y familiares sistémicos, prestando especial atención a procesos alérgicos e historia oftalmológica (Anexo 5. Cuaderno recogida de datos)

Obtención y procesamiento de muestras

Cada muestra se etiquetará de manera que no sea posible revelar la identidad del paciente

Obtención de muestras (Anexo 5. Cuaderno recogida de datos)

Recogida de lágrima: se recogen dos tubos capilares de 4 µl por cada ojo (capilares de 4 µl glass capillary micropipettes; Drummond, REF DRUM 1-000-0040, 4 µl, 32 mm VWR 53440-067) que se colocan en el canto externo. Se guardan en un tubo roscado para criogénesis, se etiquetan, se preservan en frío durante el transporte hasta su congelación a -80°C

Examen de la conjuntiva:

1. TBUT (Tear Break Up Time) con fluoresceína en segundos
2. Evaluación de la presencia de papilas en la conjuntiva
3. Evaluación de tinción de fluoresceína córnea y conjuntiva según escala de Oxford

A continuación se procede a lavado ocular con suero fisiológico

Instilación de anestesia tópica con Colircusí Anestésico doble colirio en solución 1mg/ml oxibuprocaina hidrocioruro + 4mg/ml tetracaína hidrocioruro.

Test de Schirmer tipo II (Alcon standardized Schirmer tear test strips): se anotan los milímetros que la tira se impregna con lágrima en 5 minutos

Citología por cepillado de la conjuntiva tarsal superior: se procedió a la rotación suave del cepillo (Cytobrush® plus GT, Medscand Medical, Sweden) sobre la conjuntiva tarsal superior tras evertir el parpado superior. 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]. [20] Este proceso se repite tres veces.

Extracción de sangre periférica mediante venopunción: se recogen en tubo Vacuette™® de 9 ml. Se conserva a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su procesamiento

Procesamiento de muestras

Las muestras se procesan en el Laboratorio InmunoLab de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid

Procesamiento de sangre

1. Se homogenizan las muestras para conseguir una distribución uniforme de las células (invirtiendo los tubos varias veces). Se verifica que no contiene coágulos
2. Se etiquetan 5 tuyos de ensayo y se deposita 50 µl de sangre-EDTA
3. Se añaden los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos a cada uno de los tubos (Anexo 6. Anticuerpos monoclonales).
4. Se agita mediante vórtex e incuba 15 minutos en oscuridad a T^a ambiente.
5. Se añade 1 ml de FACS-LYSING 1X (Becton Dickinson 349202).
6. Se agita mediante vórtex e incuba 15 minutos en oscuridad a T^a ambiente y a continuación se pueden procesar en el citómetro FC 500 Beckman-Coulter.

	Anticuerpo anti-Fluorocromo	Cantidad (µl)
Tubo 1	CD45RA-FITC	20
	CD45R0 - PE	20
	CD8-ECD	10
	CD4 - APC	10
	CD3 - Ax 750	10
Tubo 2	CD183-FITC	5
	CD196 - PE	5
	CD4 - ECD	10
	CCR10 - APC	5
	CD194 - PE/Cy7	5
Tubo 3	CD127 - FITC	10
	CD25 - PE	5
	CD45-ECD	10
	CD4 - APC	10
	CD3 - Ax 750	10
Tubo 4	CD16 - FITC	10
	CD8 - PE	10
	CD45 - ECD	10
	CD56 - APC	20
	CD3 - Ax 750	10
Tubo 5	CD45RA- FITC	20
	CD45R0 - PE	20
	CD8 - ECD	10
	CD4 - APC	10
	CD3 - Ax 750	10

Tabla 3: FITC: Fluorotioisocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; ECD: Ficoeritrina-Texas-Red-X; APC: Aloficocianina; Ax 750: Alexafluor 750; PE/Cy7: Ficoeritrina/Cianina

Citometría de Flujo

Ambas muestras se analizaron mediante citometría de flujo, dividiendo ésta en 5 tubos, los cuáles detectarán distintas poblaciones linfoides.

Tubo 1: se detectan los linfocitos T helper (CD4+) y los linfocitos citotóxicos (CD8+). Para cada uno de ellos se diferencia según estado madurativo. Linfocitos T helper vírgenes (CD3+CD4+ CD45RA+) linfocitos T helper de memoria (CD3+CD4+CD45R0+), linfocitos T citotóxicos vírgenes (CD3+CD8+ CD45RA+) y linfocitos T citotóxicos de memoria (CD3+CD8+ CD45R0+).

Tubo 2: se detectan los subtipos de linfocitos T helper. Th1 (CD4+ CD183+ CD194- CD196- CCR10-), Th1/Th17 (CD4+CD183+ CD194- CD196+CCR10-), Th2 (CD4+CD183- CD194+ CD196-CCR10-), Th22 (CD4+CD183- CD194+ CD196+ CCR10+), Th17(CD4+CD183- CD194+ CD196+CCR10-).

Tubo 3: se detectan los linfocitos T reguladores (**Tregs**)(CD3+CD4+ CD127-CD25+)

Tubo 4: se detectan los linfocitos NK (CD45+CD3-) ,y NKT (CD 45+ CD3+ CD8+). De los linfocitos NK detectamos las siguientes subpoblaciones CD56+CD16-, CD56^{dim}CD16+, CD56-CD16+. De los linfocitos NKT detectamos dos subpoblaciones (CD56+CD16+ y CD56+CD16-)

Tubo 5: Se detectan linfocitos TCR $\gamma\delta$ (CD45+ CD3+ TCR $\gamma\delta$ +), linfocitos B (CD45+CD19+) y sus subpoblaciones B1 (CD45+ CD19+ CD5+) y B2 (CD45+ CD19+ CD5-)

Extracción de plasma:

Se toman 3mL de la sangre sobrante y se centrifuga a 4000g – 15 minutos. Se recoge el sobrenadante en un tubo se etiqueta y congela a -80°C

Procesamiento de cepillado conjuntival

1. Se comprueba que la muestra está correctamente etiquetada, se agita mediante vórtex el tubo eppendorf que la contiene.
2. Se etiquetan 5 tubos de ensayo y se añaden 200 μ L de muestra en cada tubo
3. Se añaden 2mL de Cell WASH o PBS frío a cada tubo
4. Se centrifuga durante 5 minutos a 1.200 r.p.m. a temperatura de 4°C. Se decanta el sobrenadante y se añaden los anticuerpos de la misma manera que en sangre, pero reduciendo las cantidades de cada anticuerpo a la mitad de volumen.
5. Se agita mediante vórtex y se incuba durante 15 minutos en oscuridad a T^a ambiente.
6. Se añaden 500 μ L de FACS-LYSING 1X en cada tubo
7. Se vuelve a agitar mediante vórtex e incubar 15 minutos en oscuridad a T^a Ambiente.
8. Se procesan las muestras mediante citometría de flujo con citómetro FC 500 Beckman Coulter

Protocolos de análisis

Se utilizan los protocolos de análisis de células y determinación de las diferentes subpoblaciones) que se han puesto a punto para cada uno de los 5 tubos descritos y que nos permiten el Análisis detallado de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y linfocitos intraepiteliales en la conjuntiva tarsal superior utilizando técnicas de “gating” (Anexo 8. Citometría de flujo)

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos disponemos del software IBM SPSS Statistics versión 24.0.0.0. Se consideran valores estadísticamente significativos para $p < 0,05$ y tendencias para $p < 0,2$.

Resultados

Una vez aplicados los criterios de inclusión y exclusión obtuvimos un total de 21 muestras de sangre periférica y conjuntiva por cepillado conjuntival de sujetos sanos y 10 de pacientes alérgicos. Dentro de los alérgicos, 8 fueron diagnosticados de conjuntivitis alérgica (4 estacionales y 4 perennes) y 2 de queratoconjuntivitis atópica. En el Anexo Tablas de Resultados (Tabla 1 del Anexo Tablas) recogemos, para cada sujeto alérgico, los datos demográficos y de anamnesis y exploración más relevantes.

Todos los porcentajes obtenidos por citometría de flujo fueron representados con respecto a los linfocitos CD45+ totales.

Se realizaron distintas pruebas analíticas para comprobar: 1) la influencia de factores como la edad, el sexo y la patología en las distintas poblaciones linfoides y; 2) si existe correlación entre poblaciones linfoides sistémicas (sangre periférica) y regionales (conjuntiva).

● Sujetos sin patología en la superficie ocular

Presentamos los valores, expresados como porcentaje sobre linfocitos CD45+, de las distintas subpoblaciones linfocitarias encontradas en sangre periférica y citología por cepillado conjuntival de sujetos sanos utilizando la técnica de citometría de flujo. (Anexo 7. Tablas: Tabla 5. Media y desviación estándar (DE) para porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en sangre y conjuntiva para sujetos control)

○ Sangre en pacientes sin patología ocular

En sangre periférica de sujetos sin patología ocular encontramos mayor proporción de linfocitos T CD4+ respecto a los linfocitos T CD8+. En cuanto al estado madurativo de los linfocitos T, son más frecuentes los linfocitos vírgenes que los linfocitos memoria. Entre los linfocitos T CD4+ (cooperadores) predomina la subpoblación Th1, siendo la menos frecuente la subpoblación Th2. Dentro de los linfocitos T CD8+ (citotóxicos), en concreto dentro de los NKT, predominan los citotóxicos (CD16+) frente a los que tienen función inmunorreguladora. Los linfocitos TCR $\gamma\delta$ son menores de 5% en sangre periférica.

Los linfocitos B son menos numerosos que los linfocitos T, siendo la relación linfocitos T (CD3+)/ Linfocitos B (CD19+) 7/1 aproximadamente. La subpoblación linfocitaria B2 (más evolucionada) es predominante sobre la subpoblación de linfocitos B1.

Los linfocitos NK representan aproximadamente un 13% (12,79 % \pm 4,31%), de los cuales las subpoblaciones NK con función citotóxica (CD16+) se encuentran en mayor proporción respecto a las subpoblaciones que tienen función inmunorreguladora.

- Estudio influencia de la edad en las poblaciones linfocitarias de sangre periférica

Dividimos los sujetos control en dos grupos, menores de 50 años y mayores de 50 años, siguiendo el mismo punto de corte para la edad que Bisset et al. [9]. Realizamos la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes y obtuvimos los siguientes resultados: los linfocitos T cooperadores Th1 aumentan con la edad ($p < 0,05$). Los linfocitos T cooperadores Th1/Th17 y los linfocitos B2 muestran tendencia a aumentar con la edad, aunque no alcanzan la significación estadística (Th1 ($p = 0,08$) y Linfocitos B2 ($p = 0,055$)).

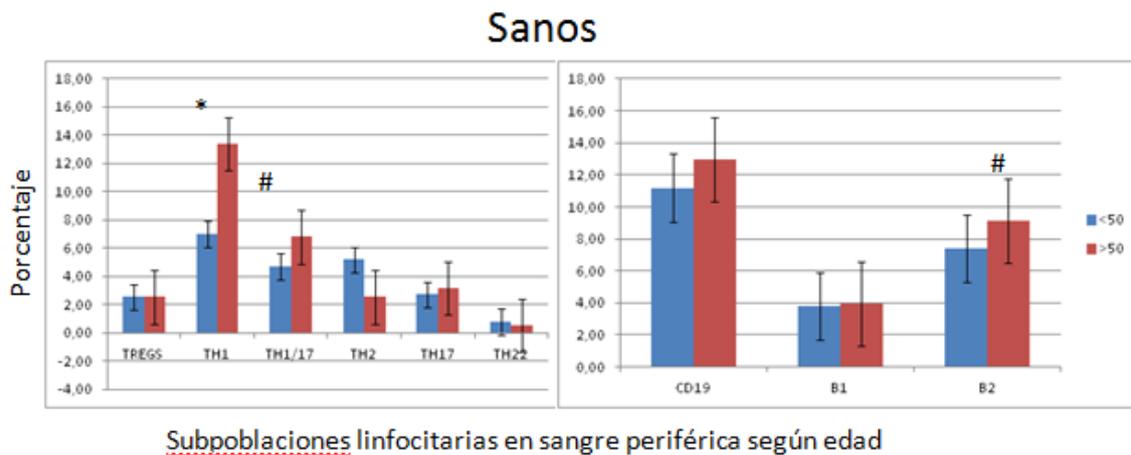


Figura 4: Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica según edad. * $p < 0,05$ # indica tendencia ($p < 0,20$)

- Estudio influencia del sexo en las poblaciones linfocitarias de sangre periférica

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica al realizar la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes.

- Conjuntiva en pacientes sin patología ocular

Presentamos los valores, expresados como porcentaje sobre linfocitos CD45+, de las distintas subpoblaciones linfocitarias encontradas en citología por cepillado conjuntival de sujetos sanos utilizando la técnica de citometría de flujo (Anexo 7. Tablas. Ver **Tabla 5. Media y desviación estándar (DE) para porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en sangre y conjuntiva para sujetos control**)

En la conjuntiva de sujetos sin patología ocular encontramos mayor proporción de linfocitos T CD8+ respecto a los linfocitos T CD4+, al contrario de lo que ocurre en sangre. En cuanto al estado madurativo de los linfocitos T, los linfocitos CD4+ memoria son más abundantes que los linfocitos CD4+ vírgenes. Sin embargo, encontramos los linfocitos CD8+ memoria y vírgenes en proporciones similares. Entre los linfocitos T CD4+ cooperadores predominan los linfocitos Tregs, siendo los menos frecuentes los linfocitos Th22.

En cuanto a los linfocitos T CD8+, en la subpoblación NKT predominan los citotóxicos frente a los que tienen función inmunorreguladora. Hallamos los linfocitos TCR $\gamma\delta$ en una proporción cercana al 40%.

Los linfocitos B son menos numerosos que los linfocitos T. Siendo la relación linfocitos T (CD3+)/ Linfocitos B (CD19+) 19/1 aproximadamente. Encontramos la subpoblación linfocitaria B1 en mayor porcentaje que la subpoblación B2.

Los linfocitos NK son aproximadamente el 13% (12,86% \pm 7,24) del total de los linfocitos. Hallamos las subpoblaciones NK con función inmunorreguladora en mayor proporción respecto a las que tienen función citotóxica.

○ Correlación sangre – conjuntiva en pacientes sin patología ocular

Para los sujetos sin patología en la superficie ocular estudiamos la correlación de cada subpoblación linfocitaria en sangre y conjuntiva. Obtenemos correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para el coeficiente de correlación de Pearson entre CD4CD45RA sangre y CD4CD45RA conjuntiva y CD8CD45RA sangre y CD8CD45RA conjuntiva. La correlación entre los valores de sangre y conjuntiva de CD4CD45RA es positiva pero no fuerte (P de Pearson = 0,516). La correlación para CD8CD45RA es también positiva no fuerte (P de Pearson=0,45).

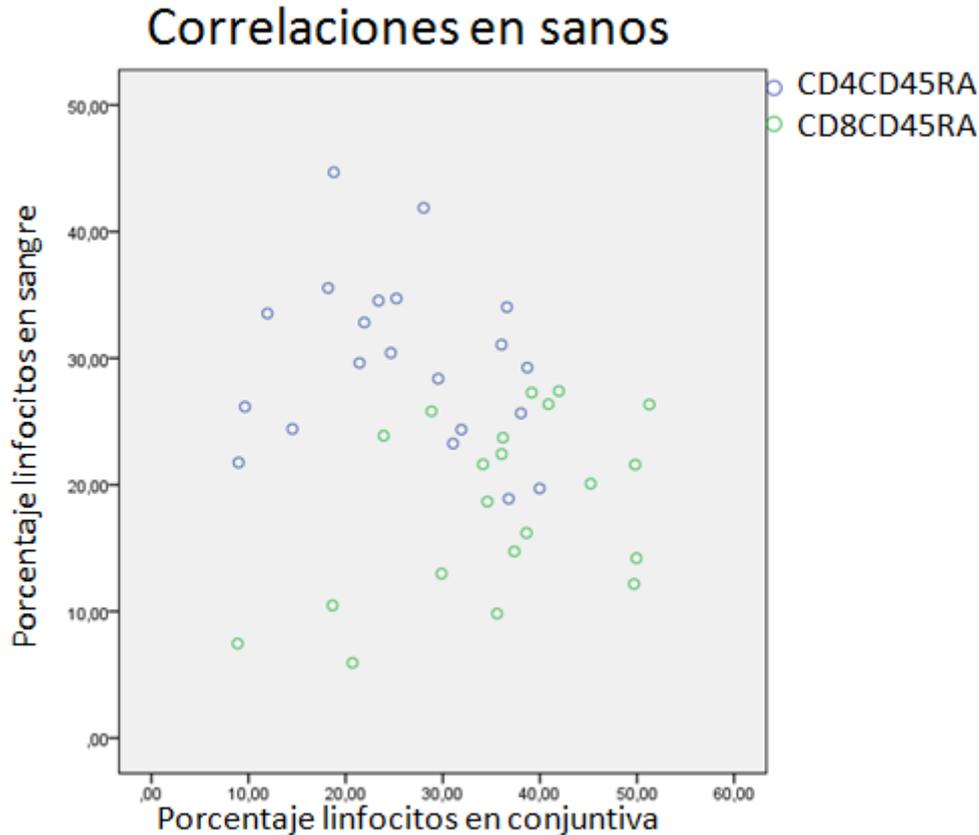
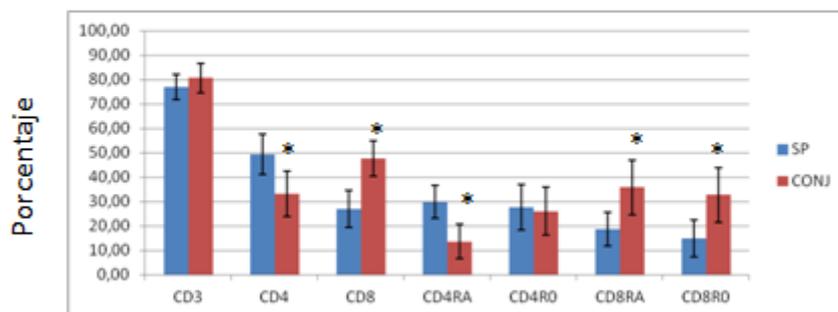


Figura 5. Correlación de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva para sujetos sanos. Se muestran las poblaciones estadísticamente significativas

Realizando un test de Wilcoxon para 2 muestras relacionadas no podemos establecer diferencia estadísticamente significativa (ya que no se cumple que $\alpha < 0,05$) en las subpoblaciones de linfocitos CD3+, CD4CD45R0, Th2, Th22, NK, NKCD56-CD16+ NKCD56+CD16-, NKT CD56+CD16- y B de sangre periférica y de conjuntiva en sujetos sanos. En el resto de poblaciones sí establecemos diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de linfocitos en sangre periférica y conjuntiva de sujetos sanos.

En sangre periférica hay mayor proporción de linfocitos CD4+ que de CD8+, invirtiéndose esta relación en conjuntiva (Ver Figura 6) En las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores en sangre resulta mayoritaria Th1, sin embargo en conjuntiva la mayoritaria es son los linfocitos T reguladores. La subpoblación minoritaria tanto en sangre periférica como conjuntiva es Th22 (Ver Figura 7). Los linfocitos NKT se encuentran en mayor proporción en conjuntiva, dentro de ellos predominan las subpoblaciones con función citotóxica (Figura 8). Respecto de los linfocitos B, en sangre periférica predominan los linfocitos B2 y en conjuntiva los hacen los B1. Los linfocitos con receptor TCR $\gamma\delta$ están en proporción mucho mayor en conjuntiva que en sangre periférica (Ver Figura 9).

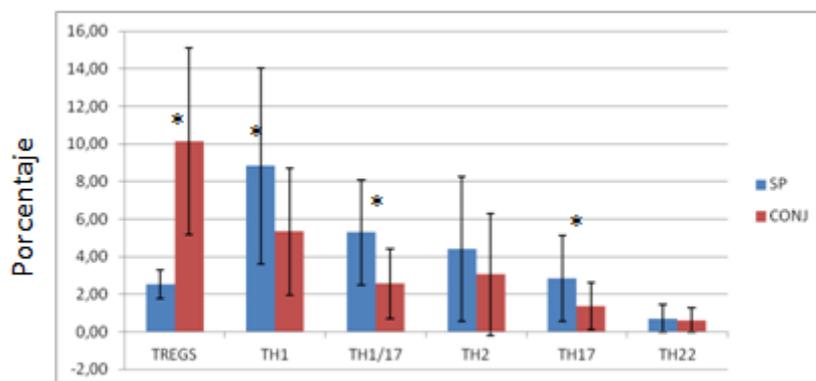
Sanos



Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva en sanos

Figura 6. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva en sujetos sanos. * $p < 0,05$

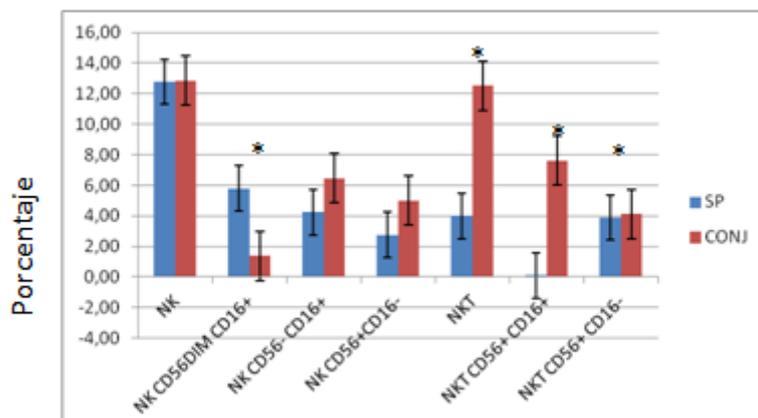
Sanos



Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva

Figura 7. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva en sujetos sanos. * $p < 0,05$

Sanos



Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva

Figura 8. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva en sujetos sanos. * $p < 0,05$

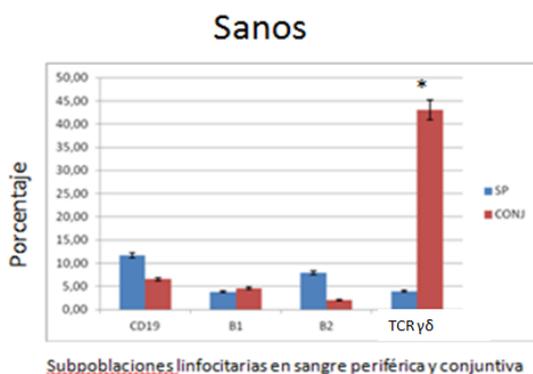


Figura 9. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva en sujetos sanos. * $p < 0,05$

● Sujetos con alergia ocular

Presentamos los valores, expresados como porcentaje sobre linfocitos CD45+, de las distintas subpoblaciones linfocitarias encontradas en sangre periférica y citología por cepillado conjuntival en pacientes con sintomatología alérgica ocular utilizando la técnica de citometría de flujo. (Ver **Tabla 6. Media y desviación estándar (DE) para porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en sangre y conjuntiva para sujetos alérgicos** Anexo Tablas)

○ Sangre periférica en sujetos con alergia ocular

Presentamos los valores, expresados como porcentaje sobre linfocitos CD45+, de las distintas subpoblaciones linfocitarias encontradas en sangre periférica que se encuentran resumidos en **Tabla 6. Media y desviación estándar (DE) para porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en sangre y conjuntiva para sujetos alérgicos**)

En los adultos con alergia ocular encontramos en sangre periférica mayor proporción de linfocitos T CD4+ respecto a los linfocitos T CD8+. En cuanto al estado madurativo de los linfocitos T no encontramos diferencia. Entre los linfocitos T CD4+ (cooperadores) predomina la subpoblación Th17, siendo la menos frecuente la subpoblación Treg. En cuanto a los linfocitos T CD8+, y en particular en las subpoblaciones NKT predominan los citotóxicos frente a los que tienen función inmunorreguladoras. Los linfocitos TCRγδ son menores del 5% en sangre periférica.

Los linfocitos B son menos numerosos que los linfocitos T. Siendo la relación linfocitos T (CD3+)/ Linfocitos B (CD19+) 3/1 aproximadamente. Hallamos la subpoblación linfocitaria B2 en mayor porcentaje que la subpoblación de linfocitos B1.

Los linfocitos NK son aproximadamente el 13% del total de los linfocitos. Las subpoblaciones NK con función citotóxica se encuentran en mayor proporción respecto a las subpoblaciones que tienen función inmunorreguladora.

○ Conjuntiva en sujetos con alergia ocular

Presentamos los valores, expresados como porcentaje sobre linfocitos CD45+, de las distintas subpoblaciones linfocitarias encontradas en sangre periférica que se encuentran resumidos en **Tabla 6. Media y desviación estándar (DE) para porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en sangre y conjuntiva para sujetos alérgicos**

En la conjuntiva de sujetos con alergia ocular hay mayor proporción de linfocitos T CD8+ respecto a los linfocitos T CD4+. En cuanto al estado madurativo de los linfocitos T, los linfocitos T memoria son más abundantes que los linfocitos T vírgenes. Entre los linfocitos T CD4+ cooperadores predominan los linfocitos Tregs, siendo los menos frecuentes los linfocitos Th22. En cuanto a los linfocitos T CD8+, en la subpoblación NKT predominan los que tienen función inmunorreguladora frente a los que tienen función citotóxica. Los linfocitos TCR $\gamma\delta$ se encuentran en una proporción mayor del 60%.

Los linfocitos B son menos numerosos que los linfocitos T. Siendo la relación linfocitos T (CD3+) / Linfocitos B (CD19+) 20/1 aproximadamente. La subpoblación linfocitaria B1 se encuentra en mayor porcentaje que la subpoblación B2.

Los linfocitos NK son aproximadamente el 10% del total de los linfocitos. Las subpoblaciones NK con función citotóxica se encuentran en mayor proporción respecto a las que tienen función inmunomoduladora.

○ Correlación sangre -conjuntiva en sujetos con alergia ocular

Para los pacientes con alergia ocular estudiamos la correlación de cada subpoblación linfocitaria en sangre y conjuntiva. Obtuvimos correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para el coeficiente de correlación de Pearson entre CD8 sangre y CD8 conjuntiva y CD8CD45RA sangre y CD8CD45RA conjuntiva. La correlación entre los valores de sangre y conjuntiva de CD8 es positiva pero no fuerte (P de Pearson= 0,677). La correlación para CD8CD45RA es positiva fuerte (P de Pearson=0,892).

Correlaciones alérgicos

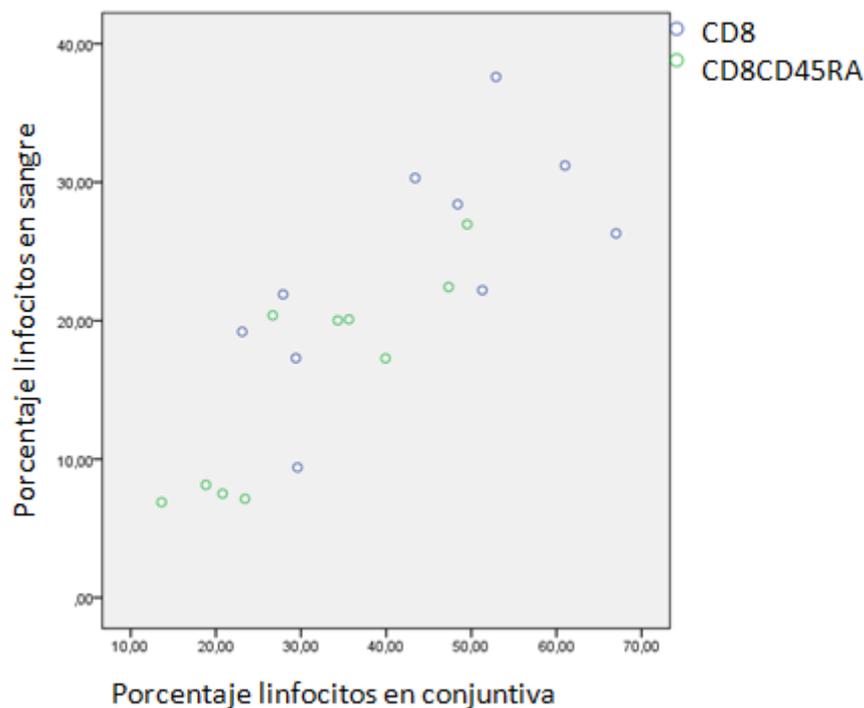
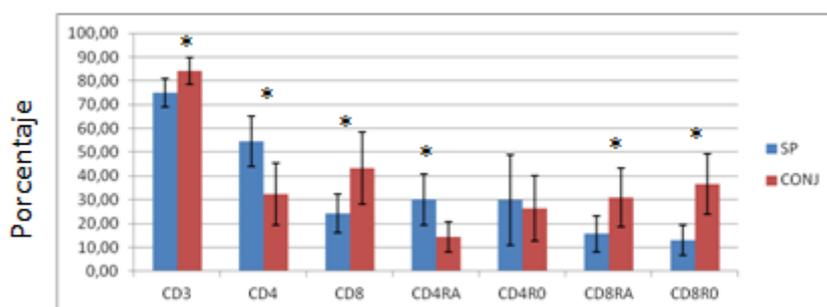


Figura 10. Correlación de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva para sujetos sanos. Se muestran las poblaciones estadísticamente significativas

Realizando un test de Wilcoxon para 2 muestras relacionadas no pudimos establecer diferencias estadísticamente significativas, entre las subpoblaciones de linfocitos CD4CD45R0, Th1, Th2, Th17, Th1/Th17, Th22, NK, NKCD56-CD16+ NKCD56+CD16-, y NKT CD56+CD16+ y B1 de sangre periférica y de conjuntiva de pacientes alérgicos. En el resto de poblaciones sí se observaron diferencias significativas entre las proporciones de linfocitos en sangre periférica y en conjuntiva de pacientes alérgicos. (Ver Figura 11, Figura 12, Figura 13 y Figura 14)

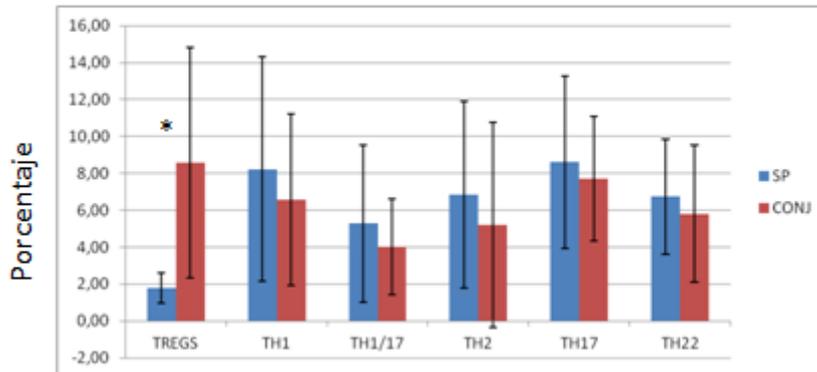
Alérgicos



Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva

Figura 11. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva en sujetos alérgicos. * $p < 0,05$

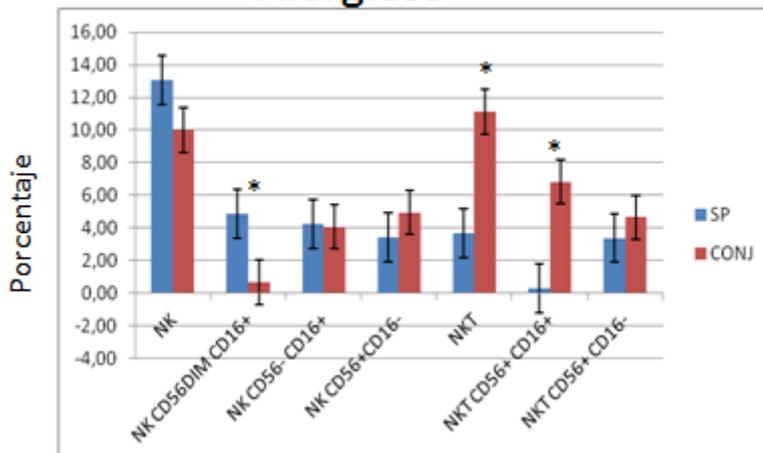
Alérgicos



Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva

Figura 12. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva en sujetos alérgicos. * $p < 0,05$

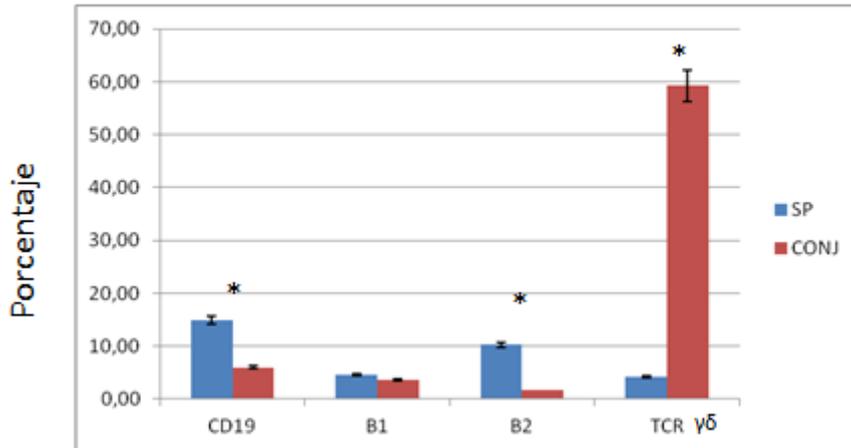
Alérgicos



Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva

Figura 13. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva en sujetos alérgicos. * $p < 0,05$

Alérgicos



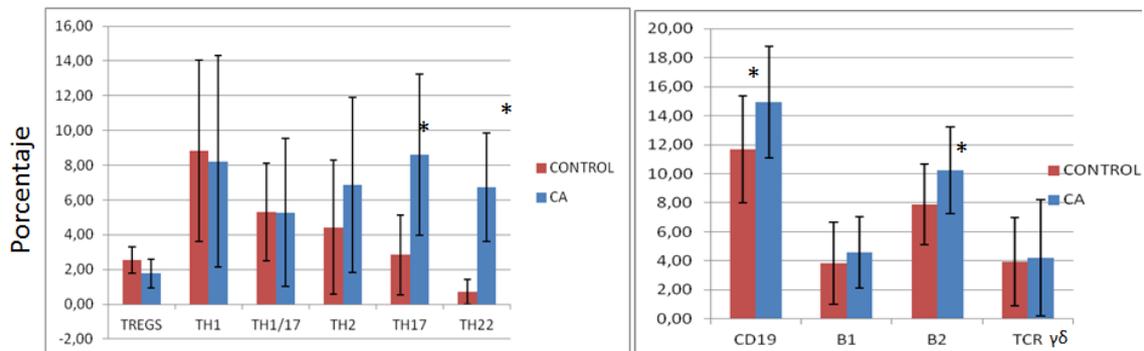
Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva

Figura 14. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y conjuntiva en sujetos alérgicos. * $p < 0,05$

- Comparación entre sujetos sanos y alérgicos
- Comparación de las subpoblaciones de sangre periférica

Comparamos la sangre periférica de sujetos sanos y sujetos alérgicos, para ello realizamos la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes. Las subpoblaciones linfocitarias de linfocitos T cooperadores Th17 y Th22 y los linfocitos B y su subtipo B2 están aumentados en alérgicos respecto a los controles sanos. ($p < 0,05$). En el resto de subpoblaciones T, B y NK no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

Sangre periférica



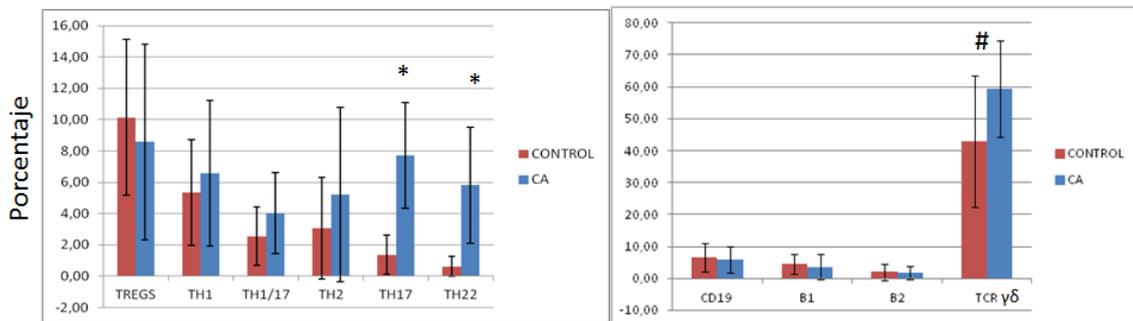
Subpoblaciones linfocitarias control vs alérgico

Figura 15. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica sujetos sanos y sujetos alérgicos. * $p < 0,05$

○ Comparación de las subpoblaciones linfocitarias de la conjuntiva

En sujetos con alergia ocular hay un aumento de linfocitos Th22 y linfocitos Th17 respecto de la conjuntiva de controles sanos ($p < 0,05$). También se aprecia una tendencia al aumento de los linfocitos TCR $\gamma\delta$ ($p = 0,083$). En el resto de subpoblaciones T, B y NK no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

Conjuntiva



Subpoblaciones linfocitarias control vs alérgico

Figura 16. Subpoblaciones linfocitarias en conjuntiva de sujetos sanos y sujetos alérgicos. * $p < 0,05$; # $p < 0,2$

Discusión

En este estudio hemos podido estudiar las poblaciones linfocitarias presentes en conjuntiva y sangre periférica de sujetos sin patología de la superficie ocular y sujetos con conjuntivitis de etiología alérgica.

En la *sangre periférica de sujetos sin patología de la superficie ocular* hemos encontrado un predominio de linfocitos T frente a los linfocitos B, y dentro de los T son mayoritarios los linfocitos T CD4+ frente a linfocitos T CD8+, datos estos que coinciden con lo descrito previamente [9]. En cuanto al estado madurativo el porcentaje de linfocitos vírgenes es mayor que el porcentaje de linfocitos memoria, lo que ya se había descrito también[9]. Los linfocitos B2 predominan sobre los linfocitos B1 como era de esperar [21].

En lo que se refiere a las poblaciones de linfocitos T cooperadores, los linfocitos Th1 se presentan en mayor porcentaje, seguidos de Th1/Th17, Th2, Th17 y Th22 que también coincide con otros estudios previos [22]. Se han descrito variaciones en la proporción de linfocitos TCR $\gamma\delta$ en sangre periférica en función de la etnia, en caucásicos la media es aproximadamente del 5% [23], en nuestro estudio encontramos valores parecidos. Con respecto de la edad, se ha descrito un descenso de los linfocitos CD8+ con la edad [24], en nuestro estudio sólo se encontró un aumento de Th1. No hemos encontrado diferencias entre las proporciones de las distintas subpoblaciones linfocitarias, que sí se han descrito en algunas etnias [25]. Estos hallazgos que no coinciden con los estudios previos, bien se podrían deber a que nuestra muestra es aún de un tamaño reducido.

En la conjuntiva de los sujetos sanos hemos encontrado un predominio de los linfocitos T sobre los B y de los linfocitos T CD8+ sobre los T CD4+, como ya había sido descrito previamente en nuestro grupo [8]. Dentro de las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ se encontró que predominaba la subpoblación de T reguladores, algo que no hemos encontrado descrito en la literatura, hasta el momento, y que postularía un papel de tolerancia y regulación de la respuesta inmunitaria en la superficie ocular. Reinoso et al [8] describió en conjuntiva que la proporción de linfocitos NK es mucho menor que en sangre periférica, en nuestro estudio no hemos sido capaces de demostrar esa diferencia ya que nuestras proporciones en sangre y conjuntiva son similares; y esto puede deberse a que se ha utilizado otro protocolo de marcado de las células en superficie en el que se han incluido otros anticuerpos monoclonales. Se halló que los linfocitos con función citotóxica se encuentran en mayor proporción que los que tienen función inmunomoduladora, tanto para la subpoblación NKT como para la NK (descrito por [8]). Los linfocitos B1 en conjuntiva predominan respecto a los B2, este hallazgo tampoco estaba descrito previamente; y resulta de gran relevancia puesto que las células B1 son menos evolucionadas que B2, tienen menor especificidad las inmunoglobulinas que sintetizan, no son capaces de cambiar de clase y se pueden asociar con respuestas autoinmunes; incluso –por carecer de las propiedades más relevantes de las B2- se las puede considerar células innatas. También hemos encontrado una mayor proporción de

linfocitos TCR $\gamma\delta$ en conjuntiva que en sangre, previamente descrito en pacientes con penfigoide ocular [26], y muy por encima de la proporción de linfocitos T $\gamma\delta$ de otras mucosas como la gastrointestinal (donde no superan el 10%)[27]. Este hallazgo es muy relevante y concuerda con lo que hemos discutido para los linfocitos B2 y B1. Las células T con receptor $\gamma\delta$ son más primitivas, menos específicas que las que tienen el receptor $\alpha\beta$; este hallazgo fortalece la idea de una agrupación de células en la superficie ocular con menor especificidad, y más tolerantes.

En la sangre de los pacientes con conjuntivitis alérgica encontramos proporciones semejantes de las diferentes subpoblaciones linfocitarias analizadas cuando las comparamos con las obtenidas en sujetos sanos. Sin embargo, se constata un aumento significativo de las proporciones de Th17, Th22 y de linfocitos B y B2 *en la sangre de los alérgicos respecto de la sangre de los sanos*. Estos hallazgos son nuevos, salvo omisión, pues no se habían estudiado las subpoblaciones linfocitarias del CALT a un nivel tan exhaustivo como lo hacemos en el presente trabajo.[8]

En la conjuntiva de los sujetos alérgicos encontramos proporciones parecidas de la mayoría de subpoblaciones linfocitarias cuando las comparamos con la obtenida en la conjuntiva de sujetos sin patología de la superficie ocular. Sin embargo, si se evidencian *aumentos de las proporciones de los linfocitos Th17 y Th22* en la conjuntiva de sujetos con conjuntivitis alérgica respecto a sujetos sanos. Estos hallazgos son concordantes con estudios en los que se han descrito aumentos de Th17 y Th22 en enfermedades dermatológicas inmuno-mediadas tales como dermatitis atópica, dermatitis de contacto y psoriasis. [28] En los sujetos con conjuntivitis alérgica también hallamos una tendencia (creemos que no se alcanza la significación estadística debido al bajo número de individuos alérgicos estudiados hasta el momento) al *aumento de los linfocitos TCR $\gamma\delta$ en conjuntiva*, pero no en sangre periférica; hechos similares se han descrito en la mucosa nasal de sujetos con rinitis alérgica perenne [29], y en la mucosa gastrointestinal en pacientes con enfermedad de Crohn [27] si bien en ambos casos las células TCR $\gamma\delta$ no superan el 20% y el 10% respectivamente, y en nuestros pacientes con alergia ocular suponen casi el 60% del infiltrado T.

Limitaciones del estudio:

El trabajo de investigación desarrollado en este TFM se ha desarrollado en el marco de un proyecto amplio, financiado por el Instituto de Salud Carlos III; en el contexto de este proyecto, hay que aumentar la muestra tanto de sujetos sanos, como de individuos con patología ocular alérgica para conseguir que las diferencias o analogías que se detecten tengan significación estadística, y por lo tanto se puedan postular realmente marcadores del diagnóstico diferencial, de pronóstico o de éxito/fracaso terapéutico.

Conclusiones

1. Se ha realizado la caracterización fenotípica y funcional de las distintas subpoblaciones de linfocitos T, B y NK tanto en sangre periférica como en conjuntiva tarsal, en sujetos sanos e individuos con patología alérgica.
2. Se han comparado los fenotipos linfocitarios sistémicos (sangre) y regionales (conjuntiva) tanto en individuos sanos como en pacientes con conjuntivitis alérgica: en conjuntiva se objetiva una mayor proporción de linfocitos T CD8 y de células NK y NKT con función citotóxica, así como un predominio de linfocitos B1 frente a los B2. Igualmente se ha evidenciado una proporción muy elevada de células con receptor TCR $\gamma\delta$.
3. Se han encontrado subpoblaciones que se modifican con la edad y/o el sexo, como era de esperar, si bien no coinciden con algunas descritas previamente. En la comparación entre alérgicos y sanos, parece relevante que los linfocitos cooperadores Th17 y Th22 están incrementados en los individuos alérgicos (tanto en sangre como en conjuntiva)
4. Sería muy prematuro postular alguna de estas subpoblaciones como posible biomarcador diagnóstico de la enfermedad, en tanto en cuanto no se incrementen las muestras (tanto de individuos sanos como de pacientes alérgicos)

Bibliografía

- [1] Kanski J, Bowling B. Oftalmología clínica. 7ª ed. 2012. Madrid. Elsevier España
- [2] American Academy of Ophtalmology. Fundamentals and principles of Ophtalmology. Basic and Clinical Science Course 2016-2017.
- [3] Kindt T, Godlsby R, Osborne B. Inmunología de Kuby. 6ª ed. McGraw-Hill Interamericana de España 2007
- [4] 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
- [5] Knop E, Nadja Knop The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. J Anat. 2005 Mar; 206(3): 271–285 [6] Knop N, Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41:1270–9
- [7] Hingorani M, Metz D, Lightman SL. Characterisation of the normal conjunctival leukocyte population. Exp Eye Res 1997;64:905-12
- [8] Reinoso R, Martín-Sanz R, Martino M, et al. Topographical distribution and characterization of epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in the human ocular mucosa. Mucosal Immunol 2012;5:455-67
- [9] Bisset LR1, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. Eur J Haematol. 2004 Mar;72(3):203-12
- [10] Juan Manuel Guzmán-Flores y Diana Patricia Portales-Pérez. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras. Gaceta Médica de México. 2013;149:630-8
- [11] Azari AA, Barney NP. Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. JAMA 2013;310:1721-9
- [12] Benitez del Castillo JM, Duran de la Colina JA, Rodriguez Ares MT. Superficie Ocular.LXXX Ponencia oficial de la Sociedad Española de Oftalmología. 2004
- [13] Consensus Document on Allergic Conjunctivitis (DECA). Sánchez-Hernández MC, Montero J, Rondon C, et al. J Investig Allergol Clin Immunol 2015; Vol. 25(2): 94-106
- [14] Lichtenstein LM. Allergy and the immune system. Scientific Am. 1993;269:117-124
- [15] Sunil Kumar & Nitin Gupta & Anthony J. Vivian Modern Approach to Managing Vernal Keratoconjunctivitis. Curr Allergy Asthma Rep (2010) 10:155–162
- [16] Bonini S, Sacchetti M, Mantelli F, Lambiase A. Clinical grading of vernal keratoconjunctivitis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2007 Oct;7(5):436-41

- [17] Calonge M, Herreras JM. Clinical grading of atopic keratoconjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Oct;7(5):442-5
- [18] Chen JJ, Applebaum DS, Sun GS, Pflugfelder SC. Atopic keratoconjunctivitis: A review. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Mar;70(3):569-75
- [19]Borkar DS, Gonzales JA, Tham VM, Esterberg E, Vinoya AC, Parker JV, Uchida A, Acharya NR. Association between atopy and herpetic eye disease: results from the pacific ocular inflammation study.*JAMA Ophthalmol*. 2014 Mar;132(3):326-31
- [20] 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
- [21] Ghia P, Prato G, Scielzo C, et al. Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood* 2004;103(6):2337-2342
- [22] Truchetet M-E, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Research & Therapy*.2011;13(5):R166
- [23] Esin S, Shigematsu M, Nagai S, Eklund A, Wigzell H, Grunewald J Different percentages of peripheral blood gamma delta + T cells in healthy individuals from different areas of the world. *Scand J Immunol*. 1996 May;43(5):593-6°
- [24] Wee J. Chng, Guat B. Tan, Ponnudurai Kuperan . Establishment of Adult Peripheral Blood Lymphocyte Subset Reference Range for an Asian Population by Single-Platform Flow Cytometry: Influence of Age, Sex, and Race and Comparison with Other Published Studies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Jan; 11(1): 168–173
- [25] Choong ML, S H Ton SH, Cheong SK . Influence of Race, Age and Sex on the Lymphocyte Subsets in Peripheral Blood of Healthy Malaysian Adults. *Ann Clin Biochem*. 1995 Nov;32 (Pt 6):532-9
- [26] Bialasiewicz AA, Ventura A, Schaudig U, Ma JX, Richard G Alpha/beta and gamma/delta T-cell receptors--analysis of conjunctival tissue of patients with ocular pemphigoid. *Ophthalmology*. 1997 Mar;94(3):197-201
- [27] Verbeek WH, von Blomberg BM, Scholten PE, Kuik DJ, Mulder CJ, Schreurs MW. The presence of small intestinal intraepithelial gamma/delta T-lymphocytes is inversely correlated with lymphoma development in refractory celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2008 Dec;103(12):3152-8
- [28] Cavani A, Pennino D, Eyerich K. Th17 and Th22 in skin allergy. *Chem Immunol Allergy*. 2012;96:39-44
- [29] Pawankar RU, Okuda M, Suzuki K, Okumura K, Ra C. Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosal gamma delta T cells in allergic and infectious rinitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 May;153(5):1655-65

Anexo 1. Comités Éticos



CONFORMIDAD DE LA DIRECCIÓN DEL CENTRO

D. JOSE MIGUEL GARCIA VELA, Director Médico del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, y vista la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud de Valladolid Oeste

CERTIFICA:

Que esta Dirección ha conocido la propuesta para que se realice el Proyecto de Investigación (PI14/01886) titulado: **"Biomarcadores inflamatorios para el diagnóstico diferencial y seguimiento de conjuntivitis alérgica"**, Protocolo versión 4.0, Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado, versión 2.0, cuyo Investigador Principal en el Hospital Universitario Río Hortega es la **Dra. Alicia Armentia Medina**, y considera:

Que acepta la realización de dicho Proyecto en este Centro.

Lo que firma en Valladolid, a 10 de Febrero de 2017



Fdo. Dr. D. José Miguel García Vela
Director Médico



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Dña. ROSA Mª CONDE VICENTE, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud de Valladolid Oeste.

CERTIFICA:

Que este Comité, en su reunión del día 9 de Febrero de 2017, ha tenido conocimiento del Proyecto de Investigación (P114/01886) titulado: "**Biomarcadores inflamatorios para el diagnóstico diferencial y seguimiento de coajuntivitis alérgica**", Código Interno CEIC: 19/17, Protocolo versión 4.0, Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado, versión 2.0 y considera que:

Una vez evaluados los **aspectos éticos** del mismo, acuerda que no hay inconveniente alguno para su realización en el Hospital Universitario Río Hortega, por lo que emite **INFORME FAVORABLE**.

Este Proyecto de Investigación será realizado por la **Dra. Alicia Armentia Medina** como Investigadora Principal.

Lo que firmo en Valladolid, a 10 de Febrero de 2017.


Fdo. Dña. Rosa Mª Conde Vicente
SECRETARIO CEIC





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

Valladolid a 29 de Septiembre de 2016

En la reunión del CEIC ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE del 29 de Septiembre de 2016, se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente proyecto de Investigación.

PI -14-213	BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE CONJUNTIVITIS ALÉRGICA	IOBA – Inmunolab IP: ALFREDO CORELL ALMUZARA OTROS INVESTIGADORES EN IOBA: M. CARMEN MARTÍN ALONSO, ROBERTO REINOSO, JOSÉ MARÍA HERRERAS CANTALAPIEDRA, ANA VALLELADO, OTROS INVESTIGADORES: JOSÉ CARLOS ZARZUELA VELASCO, ALICIA ARMENTIA, VICTORIA MARQUÉS, SOLEDAD RUBIO Y MAGNOLIA CANO. RECIBIDO: 09-12-2014
------------	---	---

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

Se informa favorablemente, modificación de la carta de reclutamiento de pacientes.

Un cordial saludo.

F. Javier Álvarez

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



Anexo2. Cartel difusión

Se necesitan voluntarios sanos y/o alérgicos para colaborar con un estudio clínico sobre alergia ocular

En los Hospitales Clínico Universitario y Río Hortega, así como en el IOBA y la Facultad de Medicina estamos trabajando en un estudio de investigación clínica* para mejorar el diagnóstico y seguimiento de los procesos alérgicos oculares.

Se necesitan:

Hombres y mujeres de cualquier edad SANOS o que padezcan cualquier tipo de ALERGIA OCULAR.

Procedimiento:

Tras comprobar que cumple con los requisitos del estudio, se le tomará una única muestra de lágrima, otra muestra de sangre y una extracción de células de conjuntiva de la cara interior del párpado mediante la técnica de cepillado conjuntival. Las pruebas son indoloras, aunque se le instilará anestésico tópico para evitar las ligeras molestias que puedan surgir debido al cepillado conjuntival. El estudio incluye test de análisis de la lágrima y evaluación de la superficie ocular.

Su participación en este estudio es voluntaria y puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento. No se le administrará tratamiento extraordinario alguno.

La participación en este estudio no implica compensación económica alguna.

Si está interesado en colaborar con este estudio, o conoce a alguien que pueda estarlo, puede ponerse en contacto con nosotros de dos formas:

Número de teléfono: Alfredo Corell (Investigador Principal): 983423187; móvil 682280285

Correo electrónico: geclid.inmunolab.parque.cientifico@uva.es

MUCHAS GRACAS POR SU COLABORACIÓN.

*Proyecto financiado por el Instituto Carlos III, nº exp PI14/01886



Anexo 3. Consentimiento Informado

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio: BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE CONJUNTIVITIS ALÉRGICA.

Nº de estudio: PI-14-213

Coordinadores: Dra. Carmen Martín Alonso (Tf. 983 186399); Dr. Alfredo Corell Almuzara (Tf. 983423187)

Centro: DPTO. PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, PSIQUIATRÍA E HISTORIA DE LA CIENCIA, Facultad de Medicina Universidad de Valladolid Av/ Ramón y Cajal s/n 47005 Valladolid

Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid. Campus Miguel Delibes, Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Se le ha invitado (Vd. o su hijo/a) a participar en un estudio clínico coordinado por el IOBA y la Facultad de Medicina para pacientes que padecen procesos alérgicos oculares, ya sea queratoconjuntivitis vernal (QCV), queratoconjuntivitis atópica (QCA) y/o conjuntivitis alérgica aguda/crónica y su diagnóstico diferencial con otras patologías de la superficie ocular.

Este formulario de consentimiento describe el estudio y su papel (de Vd. o su hijo/a) 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.

Objetivo del estudio

Estudiar los linfocitos intraepiteliales en alergia ocular, en las muestras conjuntivales y en sangre. Analizar los mecanismos de activación de la respuesta inmune celular implicados en esta enfermedad. Encontrar marcadores para el diagnóstico y/o seguimiento en la lágrima de en las muestras conjuntivales y las presentes en sangrey si existe correlación entre las concentraciones lacrimales y plasmáticas de los diferentes marcadores inflamatorios

Participación voluntaria

Debe saber que su participación (de Vd. o su hijo/a) 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.

Descripción general del estudio. Procedimiento.

Para este procedimiento NO se le administrará tratamiento extraordinario alguno. Si acepta la participación (Vd. o su hijo/a) 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. Se le extraerá un máximo de 10mL de sangre periférica (1 tubo EDTA K3, 1 tubo de Heparina de Sodio)

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

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.

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

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Página 1 de 3

Estudio P14/213, Versión 2 Final, 28/05/2015

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 (de Vd. o su hijo/a) 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 (de Vd. o su hijo/a) información personal quedará restringido a los investigadores 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 (de Vd. o su hijo/a). 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. o su hijo/a. cede, serán destruidos en el plazo de 2 meses tras finalizar el estudio.

Otra información relevante

A partir de los estudios que se realicen se podría obtener información de importancia para su salud (de Vd. o su hijo/a) 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.

Riesgos

El cepillado conjuntival puede provocar alguna molestia o alguna irritación leve local también transitoria. La extracción de sangre periférica puede provocar algunas molestias, ansiedad transitoria o un hematoma o una hemorragia leves locales. No obstante, la cantidad de sangre extraída no causará ninguna otra molestia ni anemia, ni será perjudicial para su salud.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Página 2 de 3

Estudio PI14/213, Versión 2 Final, 28/05/2015

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Título del Estudio: BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE CONJUNTIVITIS ALÉRGICA.

Nº de estudio: PI-14-213

Coordinadores: Dra. Carmen Martín Alonso (Tf. 983 186399); Dr. Alfredo Corell Almuzara (Tf. 983423187)

Centro: DPTO. PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, PSIQUIATRÍA E HISTORIA DE LA CIENCIA , Facultad de Medicina Universidad de Valladolid Av/ Ramón y Cajal s/n 47005 Valladolid

Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid. Campus Miguel Delibes, Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

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 Mayo de 2015.
- 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
Responsables: S Rubio, M Cano, Dra V Marqués, Dr JM Herreras, Dra A Armentia, Dra. Carmen Martín Alonso y/o Dr. Alfredo Corell Almuzara Dirección: DPTO. PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, PSIQUIATRÍA E HISTORIA DE LA CIENCIA , Facultad de Medicina Universidad de Valladolid Av/ Ramón y Cajal s/n 47005 Valladolid; 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.
- 4) 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.
- 5) 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 _____

Anexo 4.

Criterios de inclusión y exclusión:

Criterios para controles

INCLUSIÓN

- Participación voluntaria y consentida tras ser informados de las características del estudio y resueltas las dudas que pudieran tener sobre cualquiera de sus aspectos.
- Edad entre 18 y 65 años. Excepto en el caso de controles sano para queratoconjuntivitis vernal, cuyas edades están comprendidas entre los 3 y los 18 años.
- Normalidad en Test OSDI.
- Normalidad en al menos 3 de los 4 test de superficie ocular.

EXCLUSIÓN

- Padecer patología crónica autoinmune o autoinflamatoria.
- Haberse sometido a algún tipo de cirugía ocular previa.
- Cuadros inflamatorios agudos de origen no-alérgico en las dos semanas previas.
- Pacientes con neoplasias hematológicas, trasplante de médula, radioterapia o quimioterapia.
- Uso prolongado (8h diarias) de LC en las 2 semanas previas.
- Consumo frecuente de alcohol o estupefacientes.

Criterios para pacientes con conjuntivitis alérgica

INCLUSIÓN

- Participación voluntaria y consentida tras ser informados de las características del estudio y resueltas las dudas que pudieran tener sobre cualquiera de sus aspectos.
- Edad entre 3 y 65 años. Excepto en el caso de pacientes de queratoconjuntivitis vernal, cuyas edades están comprendidas entre los 3 y los 18 años.
- Diagnóstico de queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica y/o conjuntivitis alérgica aguda/crónica.

EXCLUSIÓN

- Padecer patología crónica autoinmune o autoinflamatoria.
- Haberse sometido a algún tipo de cirugía ocular previa.
- Cuadros inflamatorios agudos de origen no-alérgico en las dos semanas previas.
- Pacientes con neoplasias hematológicas, trasplante de médula, radioterapia o quimioterapia.
- Uso prolongado (8h diarias) de LC en las 2 semanas previas.
- Consumo frecuente de alcohol o estupefacientes.

Anexo 5. Cuaderno recogida de datos



Biomarcadores inflamatorios para el diagnóstico diferencial y seguimiento de la conjuntivitis alérgica - AES



CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS: BIOMARCADORES INFLAMATORIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y SEGUIMIENTO DE LA CONJUNTIVITIS ALÉRGICA

Patología:

- Queratoconjuntivitis vernal
 Queratoconjuntivitis atópica
 Conjuntivitis alérgica

Sujeto Control:

Diagnosticado (Prick test)

- | | | | |
|--|--|---|---|
| <input type="checkbox"/> <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> | <input type="checkbox"/> Soja | <input type="checkbox"/> <i>Lolium perenne</i> | <input type="checkbox"/> <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| <input type="checkbox"/> <i>Dermatophagoides farinae</i> | <input type="checkbox"/> Avellana | <input type="checkbox"/> <i>Phleum pratense</i> | <input type="checkbox"/> <i>Alternaria alternata</i> |
| <input type="checkbox"/> Gato | <input type="checkbox"/> Gambas | <input type="checkbox"/> <i>Poa pratensis</i> | <input type="checkbox"/> Anisakis |
| <input type="checkbox"/> Perro | <input type="checkbox"/> Kiwi | <input type="checkbox"/> Abeja (veneno) | <input type="checkbox"/> <i>Betula verrucosa</i> |
| <input type="checkbox"/> Clara de huevo | <input type="checkbox"/> Melocotón | <input type="checkbox"/> Avispa (veneno) | <input type="checkbox"/> <i>Olea europea</i> |
| <input type="checkbox"/> Leche de vaca | <input type="checkbox"/> Lentejas | <input type="checkbox"/> Cucaracha | <input type="checkbox"/> <i>Ambrosia artemisiifolia</i> |
| <input type="checkbox"/> Bacalao | <input type="checkbox"/> Garbanzos | <input type="checkbox"/> Látex | <input type="checkbox"/> <i>Artemisa vulgaris</i> |
| <input type="checkbox"/> Trigo | <input type="checkbox"/> <i>Dactylis glomerata</i> | <input type="checkbox"/> <i>Cladosporium herbarum</i> | <input type="checkbox"/> <i>Parietaria judaica</i> |
| <input type="checkbox"/> Cacahuete | <input type="checkbox"/> Otros: | | |

Nº muestra:

Paciente:

Edad:

Sexo: V M

Fecha de recogida:

Ojo: OI OD

Nº historia:

Raza:

Lugar de recogida:

EVALUACIÓN DEL PACIENTE. ANAMNESIS

Hábitos de vida (tache lo que proceda): _____

1. ¿A qué tipo de población pertenece? Rural Urbana Semiurbano
2. ¿Consume usted alcohol?
 Nunca Una vez por semana 2-4 veces por semana 5 o más veces por semana
3. ¿Fuma usted? Sí No
4. ¿Consume usted estupefacientes?
 Nunca Una vez por semana 2-4 veces por semana 5 o más veces por semana
5. ¿Realiza usted actividad física?
 Nunca Una vez por semana 2-4 veces por semana 5 o más veces por semana
 En caso afirmativo, dónde practica la actividad física: Aire libre Recinto cerrado
 Cuál es la intensidad: Moderada (<180ppm) Intensa (>180ppm)
6. Cuáles de las siguientes comidas realiza:
 Desayuno Tentempie Almuerzo Merienda Cena Otras
7. ¿Cuántas horas duerme al día?
 Menos de 8 horas Entre 8 y 10 horas Más de 10 horas
8. ¿Toma usted suplementos nutricionales?:
 Sí. Indique cuál/es: _____ No

Salud general (tache lo que proceda): _____

1. ¿Padece alguna alergia medicamentosa? Sí NO
 ¿Cuál? _____
2. ¿Padece alguna alergia a alimentos? Sí NO
 ¿Cuál? _____
3. ¿Tiene o ha padecido alguna de las siguientes síntomas/patologías/tratamientos?:

<input type="checkbox"/> Asma,	<input type="checkbox"/> Esclerodermia,
<input type="checkbox"/> Bronquitis,	<input type="checkbox"/> Colitis ulcerosa,
<input type="checkbox"/> Rinitis,	<input type="checkbox"/> Enfermedad de Crohn,
<input type="checkbox"/> Dermatitis atópica,	<input type="checkbox"/> Neoplasias hematológicas,
<input type="checkbox"/> Artritis,	<input type="checkbox"/> Trasplantes,
<input type="checkbox"/> Enf. de Behçet u otra vasculitis,	<input type="checkbox"/> Transfusión,
<input type="checkbox"/> Tuberculosis,	<input type="checkbox"/> Quimioterapia,
<input type="checkbox"/> Sarcoidosis,	<input type="checkbox"/> Radioterapia
<input type="checkbox"/> Lupus,	<input type="checkbox"/> Embarazo
<input type="checkbox"/> Amiloidosis,	<input type="checkbox"/> Menopausia
<input type="checkbox"/> Enfermedades del colágeno,	<input type="checkbox"/> Patología autoinmune
<input type="checkbox"/> Síndrome de Sjögren,	
4. ¿Alguna de las anteriores está activa en el momento actual? Especifique cuál. _____

5. ¿Tiene o ha padecido algún cuadro inflamatorio agudo de origen no-alérgico en las dos semanas previas?
 Infección de oído, Infección de vías respiratorias, Sinusitis, Gastroenteritis aguda, Otra
6. ¿Toma normalmente o está tomando alguna medicación sistémica? (incluyendo los tres últimos meses)
 Sí NO
- ¿Cuál?
 - ¿Para qué?
 - ¿Desde cuándo?

Historia Oftalmológica: _____

1. ¿Padece o ha padecido alguno de los siguientes procesos oculares?

	OD	OI	¿Hace cuánto tiempo?
Ojo seco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Uveítis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Queratitis infecciosa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Conjuntivitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____

2. ¿Alguien de su familia ha tenido alguno de los procesos oculares anteriormente descritos?
 Especifique cuál _____

3. ¿Se ha sometido a algún procedimiento ocular quirúrgico/láser, ej.: cirugía refractiva?

Sí NO

Especifique cuál _____

4. ¿Está con algún tratamiento tópico ocular? (en los tres últimos meses).

	SÍ	NO	Nombre y dosis	¿Hace cuánto tiempo?
Antihistamínicos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
AINEs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Corticoides	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Ciclosporina A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Antibióticos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Antiglaucomatosos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Estabilizadores de membranas celulares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Inmunomoduladores	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Otros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____

5. ¿Usa lágrimas artificiales?

¿Cuántas veces al día? _____

¿A qué hora se ha puesto la última gota? _____

6. En caso de que use lentillas, ¿de qué tipo son?

Blandas; Desechables; Semirígidas; Duras.

7. ¿Cuánto tiempo al día utilizó las lentillas en la última semana?

0 horas 0-5 horas 5-10 horas Más de 10 horas

TOMA DE MUESTRA _____

Oftalmólogo/óptico:

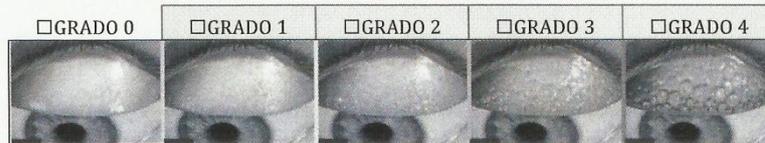
1. RECOGIDA DE LÁGRIMA

LÁGRIMA (2 capilares = 4µL de cada ojo)	- Fecha y hora de recogida:
	- Fecha y hora del análisis:

2. TBUT con fluoresceína: _____ seg.

*Valores normales a partir de 10seg

3. EVALUACIÓN DE EL ESTADO DE LA CONJUNTIVA TARSAL (PRESENCIA DE PAPILAS):



4. EVALUACIÓN DE TINCIÓN CON FLUORESCÉINA: (según Escala de Oxford)

Córnea Conjuntiva

PANEL	GRADO	CRITERIO
A	0	Tinción igual o menor que A
B	I	Tinción mayor que A y menor o igual que B
C	II	Tinción mayor que B y menor o igual que C
D	III	Tinción mayor que C y menor o igual que D
E	IV	Tinción mayor que D y menor o igual que E
>E	V	Tinción mayor que E

5. EVALUACIÓN DE TINCIÓN CON ROSA DE BENGALA: (según Escala de van Bijsterveld)

GRADUACIÓN DE VAN BIJSTERVELD												
Conjuntiva bulbar temporal				Área corneal				Conjuntiva bulbar nasal				
A				B				C				
A				B				C				
0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
Puntuación global = A + B + C =												
Valore el punteado utilizando la escala de 0 a 3:												
0 = Sin puntos coloreados				2 = Zonas coloreadas bien definidas								
1 = Presencia de algunos puntos				5 = Coloreado total								

Anexo 6 . Anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos

Nombre abreviado	Nombre completo	Longitud onda excitación máxima (nm)	Longitud onda emisión máxima (nm)	Tipo de laser (nm)
FITC	Fluoroisotiocianato de fluoresceína	490	525	488
PE	Ficoeritrina	565	578	488
ECD	Ficoeritrina-Texas-Red-X	596 (Texas red)	615	488
APC	Aloficocianina	650	660	633
Ax 750	Alexa fluor 750	749	775	633
PE/Cy7	Ficoeritrina/Cianina	496	785	488

		TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5
FL1	Ac	CD45RA-FITC	CD183-FITC	CD127-FITC	CD16-FITC	CD19-FITC
	Clon	L48	G025H7	R34.34	3G8	4G7
	Ig	IgG1, K BD	IgG1, K BL	IgG1 BC	IgG1 IS	IgG1, K BD
FL2	Ac	CD45R0-PE	CD196-PE	CD25-PE	CD8-PE	TCR pan y/d-PE
	Clon	UCHL1	G034E3	BC96	3B5	IMMU510
	Ig	IgG2a, K BD	IgG2b, K BL	IgG1, K BL	IgG2a Cal	IgG1 BC
FL3	Ac	CD8-ECD	CD4-ECD	CD45-ECD	CD45-ECD	CD45-ECD
	Clon	SFC121Thy2D3	SFC112T4D11	J33	J33	J33
	Ig	IgG1 BC	IgG1 BC	IgG1 BC	IgG1 BC	IgG1 BC
FL4	Ac	CD4- APC	CCR10-APC	CD4-APC	CD56-APC	CD5-APC
	Clon	13B8.2	6588-5	13B8.2	MEM-188	L17F12
	Ig	IgG1 BC	IgG BL	IgG1 BC	IgG2a, K IS	IgG2a IS
FL5	Ac	CD3-APC-Alexa 750	CD194-APC-Vio770	CD3-APC-Alexa 750	CD3-APC-Alexa 750	CD3-APC-Alexa 750
	Clon	UCHT1	REA294	UCHT1	UCHT1	UCHT1
	Ig	IgG1K BC	NO DISPONIBLE Mi	IgG1K BC	IgG1K BC	IgG1K BC
FL6	Ac	CD45-Pacific Blue	CD45-Pacific Blue			
	Clon	J33	J33			
	Ig	IgG1 BC	IgG1 BC			

Tabla 1. Distribución y características de los anticuerpos en los distintos tubos y fotomultiplicadores del citómetro. FL: Fotomultiplicador, BD: becton dickinson (San José, California, USA), BL: BioLegend (San Diego, CA, USA), BC: Beckman Coulter (Marseille, France), IS: Immunostep (Salamanca, Spain), Cal: Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA), Mi: Militec Biotec (Auburn CA, USA), FITC: Fluoroisotiocianato de Fluoresceína, PE: Ficoeritrina, ECD: Ficoeritrina-Texas Red-X, APC: Aloficocianina.

Anexo 7. Tablas

Dco.	Edad	Sexo	Alergia	Enf. sistémicas	OSDI	Papilas	BUT	Oxford	Schirmer
CAP	54	M	Ambiental: Epitelio animal y proteína bovina	No	8,33	2	>10	1	20
CAE	57	H	No realizado	No	4,16	2	8	1	10
CAE	64	M	Ambiental: Cipres, epitelio animal malezas, plátanos sombra Alimentos: Caseína, lactoferrina, avellana	No	4,16	1	>10	0	15
CAP	19	H	Ambiental: Lolium perenne Dermatophagoides pteronyssinus Dermatophagoides farinae Alimentos: Piña, kiwi, naranja y plátano	No	0	1	>10	0	6
QCA	14	M	Ambiental: D. pteronyssinus D. farinae Epitelio animal Centeno L. destructor Medicamentos: Amoxicilina	Dermatitis atópica Asma	0	2	>10	0	10
CAP	67	M	Ambiental: D. pteronyssinus D. farinae Alimentos: Anisakis Medicamentos: amoxicilina	Asma	6,25	0	9	1	13
CAE	32	H	Ambiental: Poaceae (gramíneas)	Rinitis	2,5	1	>10	0	10
CAP	58	M	Ambiental: Epitelio animal	Rinitis	0	1	4	1	8
CAE	23	H	Ambiental: No recuerda	Rinitis	4,16	2	>10	0	8
QCA	21	M	Ambiental: Olea europea, plátano sombra, cipes, alternaría alternata. Epitelio animal	Asma Rinitis Dermatitis atópica	4,16	2	13	0	30

Tabla 4. Resumen sujetos alérgicos. CAE: Conjuntivitis alérgica estacional. CAP: Conjuntivitis alérgica perenne. QCA: Queratoconjuntivitis atópica

SANOS		SANGRE		CONJUNTIV A	
		Medi a	DE	Media	DE
Linfocitos	T totales	77,03	5,10	80,69	6,05
	CD4+	49,45	8,28	33,18	9,38
	Th1	8,83	5,22	5,34	3,37
	Th2	4,43	3,85	3,06	3,25
	Th1/Th17	5,30	2,79	2,55	1,86
	Th17	2,83	2,29	1,36	1,25
	Th22	0,72	0,73	0,62	0,65
	Treg	2,54	0,75	10,14	4,99
	CD4CD45R A	29,75	6,75	13,62	7,11
	CD4CD45R0	27,52	9,31	25,97	9,89
	CD8+	26,98	7,63	47,59	7,17
	CD8CD45R A	18,53	6,91	35,78	11,13
	CD8CD45R0	15,00	7,62	32,71	11,27
	NKT	4,00	4,45	12,51	7,05
	CD56+CD16 +	0,10	0,07	7,63	4,68
	CD56+CD16- -	3,90	4,48	4,11	4,91
	TCRgammadelt a	3,94	3,05	42,99	20,59
CD4/CD8	2,08	0,97	0,74	0,30	
Linfocito	B	11,69	3,67	6,57	4,36
	B1	3,84	2,84	4,57	3,11
	B2	7,90	2,77	2,00	2,55
	B2/B1	5,58	7,91	0,44	0,54
CD3/CD1 9	7,17	2,15	18,37	12,82	
Linfocitos	NK	12,79	4,31	12,86	7,24
	CD56dimCD16 +	5,80	2,81	1,38	1,97
	CD56+CD16- -	2,76	2,29	4,99	6,06
	CD56-CD16+ +	4,25	2,47	6,47	5,24

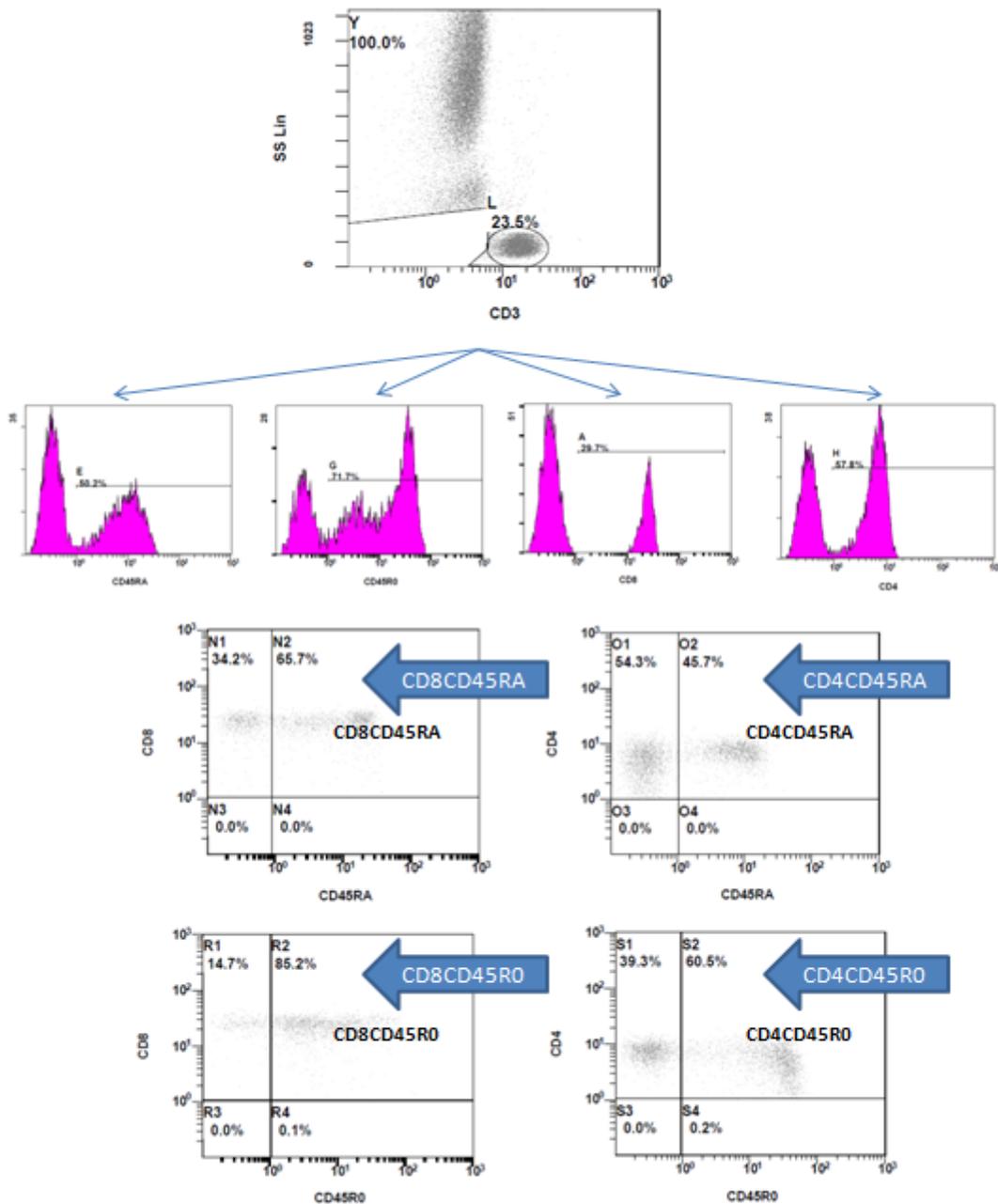
Tabla 5. Media y desviación estándar (DE) para porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en sangre y conjuntiva para sujetos control

ALÉRGICOS		SANGRE		CONJUNTIVA	
		Media	DE	Media	DE
Linfocitos	T totales	74,93	5,91	84,15	5,76
	CD4+	54,70	10,59	32,30	13,02
	Th1	8,23	6,09	6,59	4,66
	Th2	6,87	5,06	5,22	5,57
	Th1/Th17	5,27	4,25	4,02	2,58
	Th17	8,60	4,65	7,71	3,39
	Th22	6,74	3,13	5,81	3,71
	Treg	1,78	0,83	8,58	6,24
	CD4CD45RA	56,66	21,63	14,48	6,33
	CD4CD45RO	52,31	24,86	26,41	13,62
	CD8+	24,38	8,09	43,40	15,21
	CD8CD45RA	63,60	20,11	31,01	12,26
	CD8CD45RO	70,45	23,80	36,62	12,80
	NKT	3,68	4,73	11,13	11,47
	CD56+CD16+	0,29	0,24	6,83	9,25
	CD56+CD16-	3,39	4,58	4,65	3,12
	TCRgammadelta	4,19	4,00	59,25	15,07
	CD4/CD8	2,61	1,33	0,93	0,69
Linfocito	B	14,95	3,83	5,98	4,07
	B1	4,58	2,47	3,58	3,88
	B2	10,24	2,99	1,72	2,04
	B2/B1	3,15	2,36	0,96	1,27
CD3/CD19		5,44	1,90	22,54	20,90
Linfocitos	NK	13,07	3,91	9,99	6,36
	CD56dimCD16+	4,88	2,76	0,66	1,09
	CD56+CD16-	3,44	1,95	4,96	6,01
	CD56-CD16+	4,22	1,70	4,08	2,25

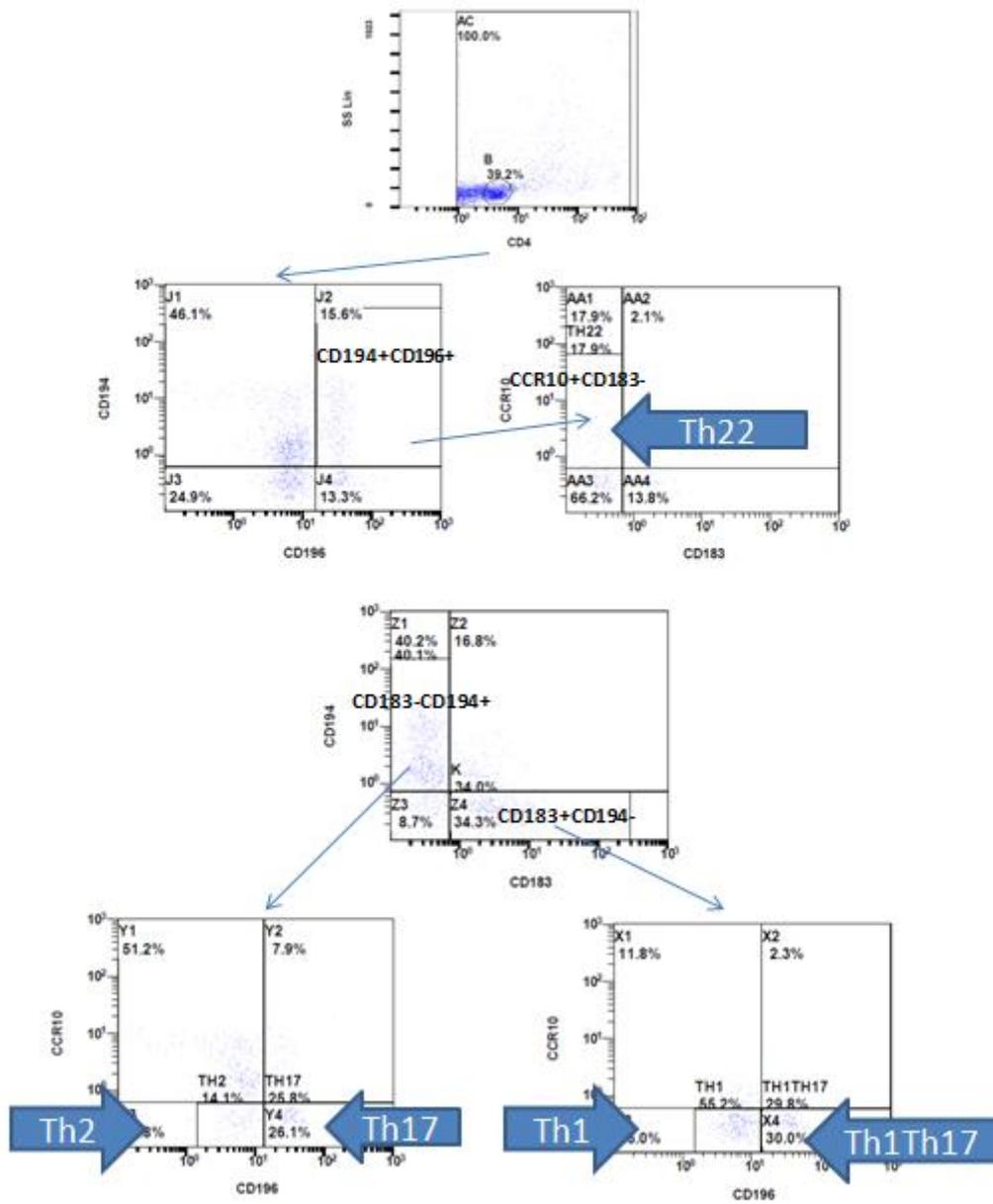
Tabla 6. Media y desviación estándar (DE) para porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en sangre y conjuntiva para sujetos alérgicos

Anexo 8. Citometría de flujo

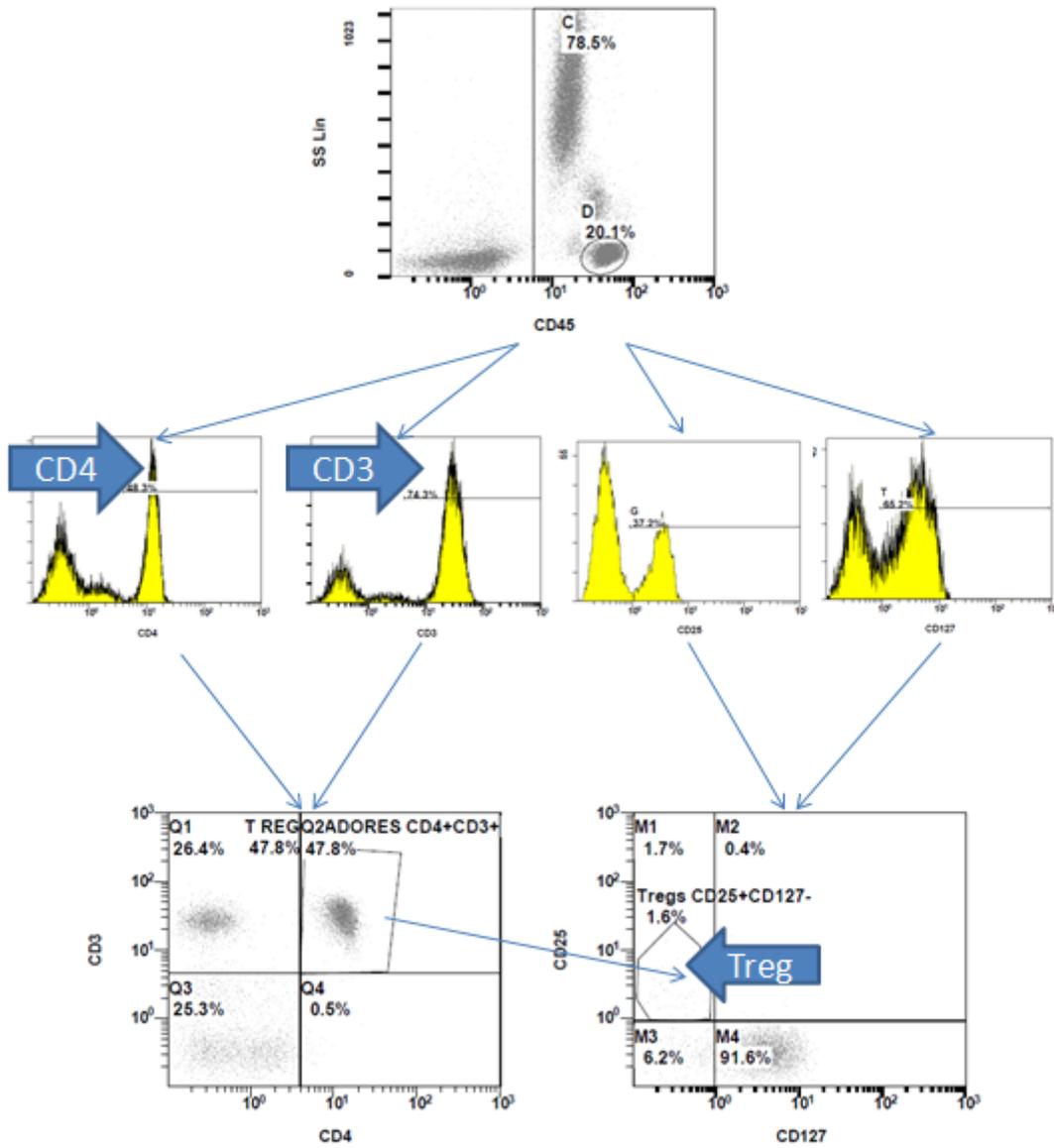
Tubo 1



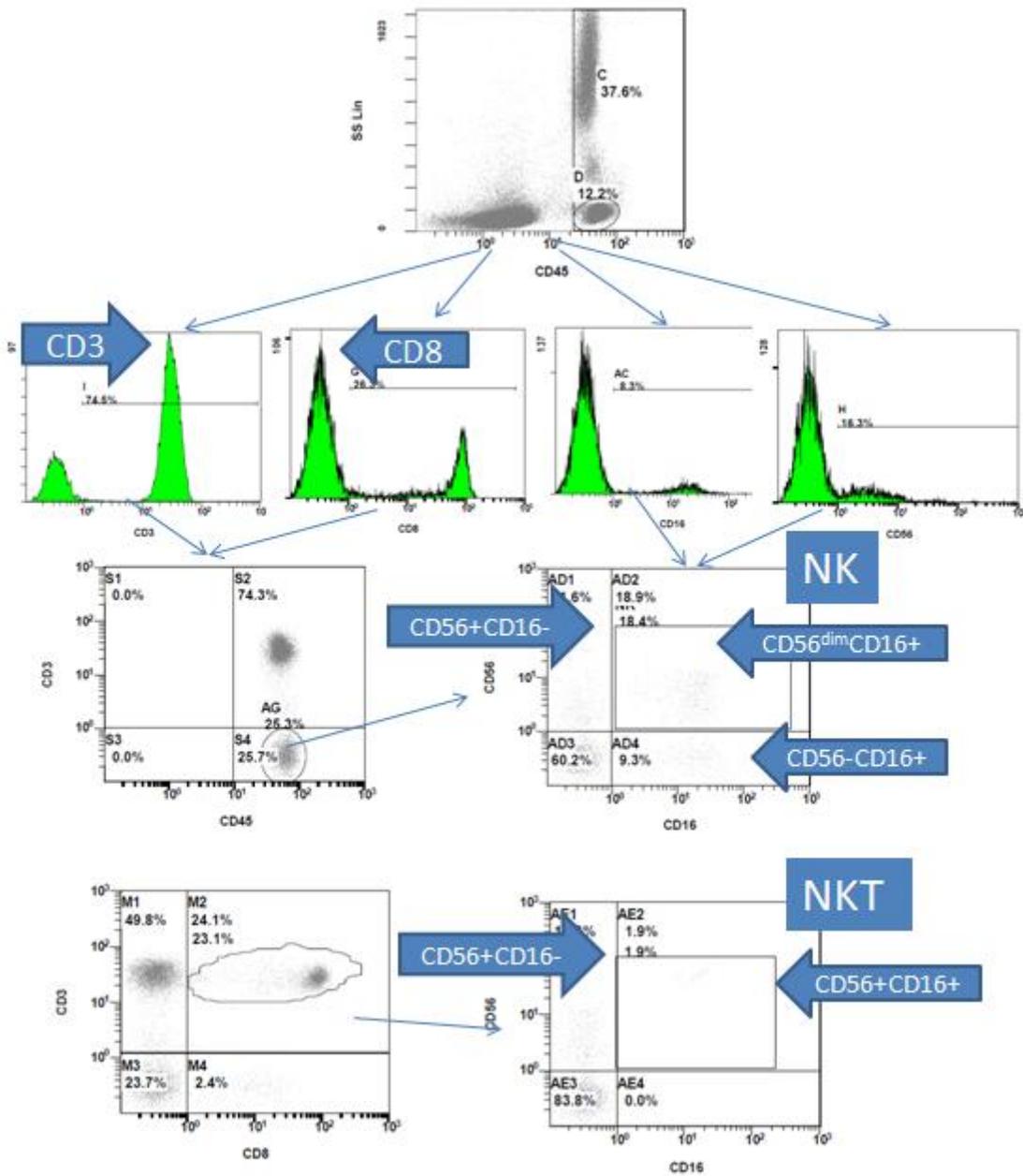
Tubo 2



Tubo 3



Tubo 4



Tubo 5

