

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Facultad de Medicina

Dpto. De Inmunología



Máster en Investigación Biomédica

**Análisis de subpoblaciones linfocitarias
periféricas y linfocitos intraepiteliales
en la conjuntiva tarsal**

TRABAJO FIN DE MÁSTER PRESENTADO POR

José Carlos Zarzuela Velasco

TUTORES

Dr. Alfredo Corell Almuzara

Dra. Carmen Martín Alonso

Valladolid, 2015

Índice

1. INTRODUCCIÓN	3
CALT: estructura y función	4
Sistema inmune en la superficie ocular e inflamación	5
Principales Subpoblaciones linfocitarias sistémicas y regionales	6
Marcadores de membrana	8
Caracterización de poblaciones celulares	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
Recogida de muestras	13
Recogida de lágrima	13
Células conjuntivales	13
Sangre periférica	14
Protocolos para la preparación de las muestras	14
Análisis de los tubos por citometría	14
Creación de un protocolo de adquisición y análisis	15
4. RESULTADOS	16
PARA CONTROLES	¡Error! Marcador no definido.
A. Fenotipo linfocitario en sangre periférica	16
B. Correlación entre sangre y brush	19
PARA CASOS	¡Error! Marcador no definido.
A. Estudios preliminares caso-control en sangre periférica	21
B. Fenotipo linfocitario en cepillado conjuntival-brush	23
C. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE UN CASO - Correlación entre Sangre y Brush	25
5. DISCUSIÓN	27
6. CONCLUSIONES	31
7. BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXO 1 - Consentimiento Informado	35
ANEXO 2 - Criterios de Inclusión/Exclusión	40
ANEXO 3 - Cuaderno de recogida de datos	41
ANEXO 4 - Anticuerpos	47
ANEXO 5 - Citometría	48
ANEXO 6 - Análisis estadístico	54
ANEXO 7 - Valores en sangre	55
ANEXO 8 - Tabla de resultados	56

1. INTRODUCCIÓN

El tejido linfoide asociado a las mucosas o MALT (del inglés "mucosal associated lymphoid tissue") constituye la primera línea de defensa en muchos tejidos del organismo. Al igual que en el aparato respiratorio o aparato digestivo, en el ojo la defensa contra agentes infecciosos o cuerpos extraños es llevada a cabo por el EALT "eye associated lymphoid tissue" y su estructura es similar a la de otras regiones del MALT.

El EALT está formado por el CALT ("Conjuntiva") de la conjuntiva, el LDALT ("Lacrimal Drainage") del sistema de drenaje lacrimal y el LGALT ("Lacrimal Gland") de la glándula lacrimal. Estos conforman una superficie continua que permite el intercambio de componentes solubles y células del sistema inmune entre unos y otros. Este complejo va a permitir un estado de homeostasis de la superficie ocular.¹

La conjuntiva se puede dividir en 3 zonas: la conjuntiva bulbar, que recubre la esclerótica anterior; la conjuntiva palpebral, que envuelve el interior de los párpados superior e inferior y se divide en tarsal (zona más cerca del borde palpebral) y orbital (entre el fornix y la tarsal); y el fornix, que une las dos anteriores¹ (Figura 1).

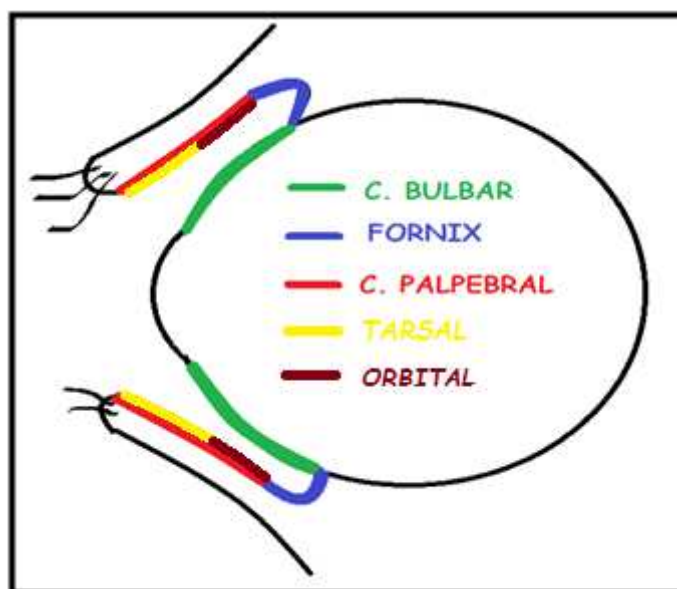


Figura 1 Partes de la conjuntiva (elaboración propia)

A su vez, la conjuntiva, está formada por dos capas claramente diferenciadas. Una capa de **tejido epitelial** con células caliciformes productoras de mucus en la zona más externa, una capa de tejido conectivo o **lámina propia** que consta de gran cantidad de vasos sanguíneos y de numerosas células características de la inmunidad innata (linfocitos, macrófagos, neutrófilos y mastocitos) y de la inmunidad adquirida (linfocitos, células plasmáticas y células dendríticas)¹.(Figura 2)

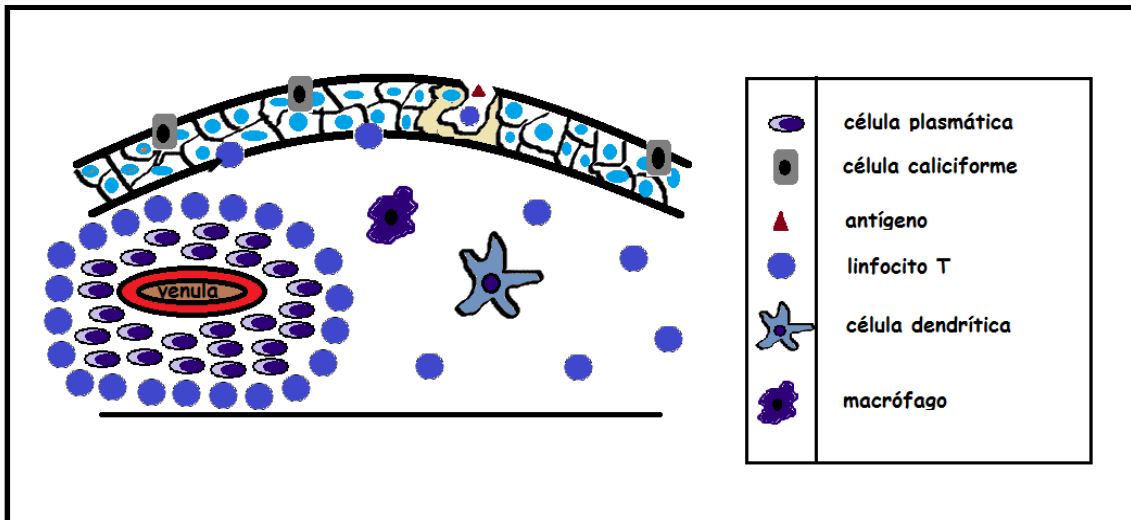


Figura 2 Esquema de la estructura del CALT. Apréciase los IELs (“IntraEpithelial Lymphocytes”) y el folículo linfóide. (elaboración propia)

CALT: estructura y función

El CALT, puede clasificarse de dos maneras según su organización: difusa o en folículos. El **tejido linfoide difuso** está formado principalmente por linfocitos T intraepiteliales (IELs) mayoritariamente citotóxicos¹ y linfocitos T del tejido conectivo y células plasmáticas productoras de IgA².

En cambio, **los folículos linfoides** son acúmulos de células linfoides organizados de tal manera que los linfocitos T envuelven periféricamente a las células plasmáticas que, a su vez, rodean las vénulas de endotelio alto² (Figura 2). El desarrollo y número de folículos linfoides está directamente relacionado con la edad, teniendo su pico más alto durante la adolescencia, donde hay un mayor número de folículos linfoides y disminuyendo gradualmente una vez pasada esta etapa³.

En cuanto a la topografía del tejido linfoide se observó, en un estudio en el año 2000 llevado a cabo por Knop y sus colaboradores, que el porcentaje de linfocitos variaba dependiendo de su localización en la superficie ocular. El número de linfocitos era mayor en la conjuntiva superior que en la inferior y vieron que en las zonas tarsal y orbital de la conjuntiva palpebral la probabilidad de encontrar tejido linfoide aumentaba nasalmente y disminuía a medida que nos acercábamos a la zona temporal.²

Por lo tanto, podemos afirmar que el CALT es el responsable de la captura de antígeno, su procesamiento, presentación y generación de la respuesta inmune apropiada que posteriormente favorecerá la inflamación de la superficie ocular.⁴ Esa inflamación va a provocar un aumento del número y del tamaño de los folículos linfoides,⁴ fenómeno relacionado con el desarrollo de patologías de carácter inmune tales como el síndrome de ojo seco, alergia ocular o incluso el rechazo en el trasplante de córnea. Por eso, el sistema inmune va a ser un arma de doble filo que combate lo ajeno pero está tan regulado y a veces es tan efectivo que puede volverse en contra de lo propio.

Cuando se produce el primer contacto del linfocito naïve con el antígeno en el folículo linfoide, este pone en marcha los procesos de proliferación y diferenciación a célula efectora si es un linfocito T o célula plasmática productora inmunoglobulina si es un linfocito B. Estos linfocitos una vez diferenciados pueden salir por los vasos linfáticos y pasar al torrente sanguíneo por el ducto torácico⁶ a la vena subclavia para su posterior transporte de nuevo al tejido por las vénulas de endotelio alto.⁷ El transporte del antígeno a través del epitelio asociado al folículo lo van a facilitar unas células especializadas llamadas células M que se intercalan entre las células del epitelio. Éste linaje celular forma un “bolsillo” citoplasmático que permite albergar células linfoides, que son las encargadas del reconocimiento del agente extraño⁸.

Sistema inmune en la superficie ocular e inflamación

En la superficie ocular se localizan algunas herramientas celulares y humorales implicadas en la respuesta inmune y la inflamación, desde moléculas solubles (citocinas) hasta células propias de la inmunidad innata (macrófagos) o adquirida (linfocitos).

Entre las citocinas más relevantes podemos encontrar el factor de crecimiento transformante (**TGF-β**), una molécula anti-inflamatoria producida por las células caliciformes de la conjuntiva y células T reguladoras. Esta citocina es la encargada de suprimir la maduración de las células dendríticas (DC) y de algunos linfocitos T como los Th1 y, por lo tanto, de mantener el estado de homeostasis. La interleucina 1 (**IL-1**) es sintetizada por las células epiteliales y tiene un efecto contrario a TGF-β, activando a las DC. En cambio, las citocinas como IL-17, IL-6, TNF o el interferón (α, β, y γ principalmente) son propias del proceso inflamatorio y aumentan la producción de más citocinas proinflamatorias y la activación de linfocitos efectores⁹.

En cuanto a las poblaciones celulares de la superficie ocular encontramos: células de la inmunidad innata fagocíticas como los macrófagos, presentadoras de antígeno como las células dendríticas o efectoras como las NK (linfocitos “*Natural Killer*”) y células de la inmunidad adquirida como linfocitos T (citotóxicos, reguladores o cooperadores) y linfocitos B.

Cualquier defecto del sistema inmune o patología asociada a este va a producir un cambio (aumento o disminución) en el número y funcionalidad de los distintos factores que intervienen en la respuesta inmune. Estudios recientes centran sus investigaciones en esta hipótesis. En un estudio llevado a cabo por Reinoso y colaboradores¹⁰ vieron que entre los linfocitos intraepiteliales, en las tres zonas de la conjuntiva, los linfocitos T predominaban sobre los B (T>75%, B<25%) mientras que los NK tenían valores en torno al 1% del total. En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos T, en el mismo estudio, pudieron observar que en conjuntiva superior los linfocitos CD8+ (citotóxicos) eran ligeramente superiores a los CD4+ (cooperadores). En el fornix, en cambio, ocurría lo contrario, 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 fornix inferior es una zona de inducción de respuesta inmune. (Figura 3)

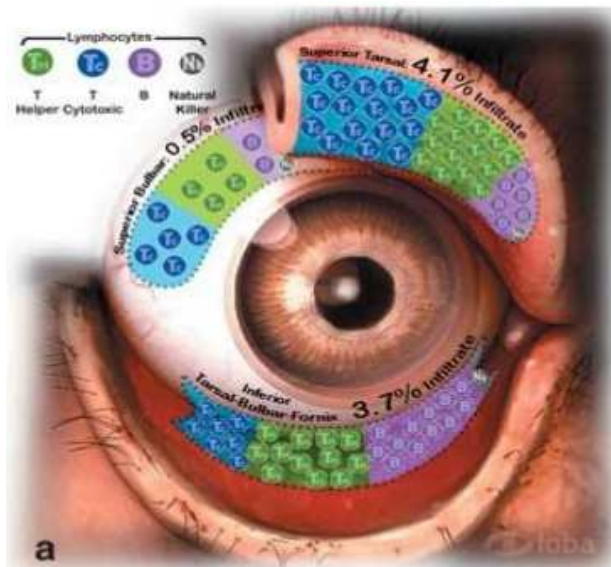


Figura 3 Distribución topográfica de linfocitos en la conjuntiva. Figura obtenida del estudio de Reinoso R.¹⁰

En cambio, en sangre periférica, en un estudio llevado a cabo en Suiza en 2004 por Bisset LR *et al*¹¹ en individuos sanos obtuvieron valores similares a los de Reinoso en cuanto a la predominancia de los linfocitos T (72,65% de media) sobre los B (10,70% de media), mientras que los linfocitos NK podían llegar a valores de entre 5.35% y 30.93%. En este mismo estudio los valores en sangre para CD4⁺ eran significativamente más altos que para CD8⁺, 47.95% y 23.20% de media respectivamente.

La inflamación de la conjuntiva es conocida como conjuntivitis y se caracteriza por hiperemia, edema y aumento de la mucosidad. Se pueden clasificar según su etiología en infecciosas (virales, bacterianas, etc.) y no infecciosas (como las alergias).¹²

La alergia es una hiperreactividad producida por una mecanismo de hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE, desencadenada tras la exposición a una sustancia “no tolerada” o alérgeno. En el ojo, los trastornos alérgicos se clasifican en: conjuntivitis alérgica (como la conjuntivitis estacional), conjuntivitis papilar gigante, queratoconjuntivitis vernal y queratoconjuntivitis atópica (asociada a dermatitis atópica).¹³

Como propósito principal de este estudio, queremos analizar las proporciones de subpoblaciones linfocitarias (inmunofenotipo) en sangre periférica de sujetos sanos y compararlas con las que se localicen en la conjuntiva de los mismos individuos.

Principales Subpoblaciones linfocitarias sistémicas y regionales

Linfocitos B. Son los encargadas de producir anticuerpos (inmunoglobulinas), que son la herramienta efectora principal de la inmunidad humoral adaptativa contra una ilimitada variedad de antígenos.¹⁴ Los linfocitos B necesitan activarse mediante su interacción con un linfocito T (Th2) para poder diferenciarse y actuar como células productoras de inmunoglobulinas o presentadoras de antígeno. Estas células van a expresar siempre el correceptor CD19, entre otros. Existen varios tipos de células B. Las que analizaremos en este estudio corresponden a las células B que expresan CD5

(Linfocitos B₁, CD5⁺) y las que no lo expresan (Linfocitos B₂, CD5⁻). B₁ se encuentran en los folículos y ejercen una respuesta rápida y producen anticuerpos de baja afinidad y su activación es T-independiente. Las células B₂, en cambio, se caracterizan por producir anticuerpos de gran afinidad y especificidad y su activación es T-dependiente.

15

Linfocitos NK. Estas células, propias de la inmunidad innata, están especializadas en combatir infecciones víricas y células tumorales mediante la liberación de citocinas por lo que tienen función efectora. Indirectamente regulan la maduración de las células dendríticas y pueden funcionar como células presentadoras de antígeno.¹⁶ Se caracterizan por expresar CD56 y CD16 en ausencia de CD3. 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. En cambio, las CD56^{dim}CD16⁺ son más abundantes en sangre que las anteriores y se van a caracterizar por su alta capacidad citotóxica. Existe una tercera subpoblación recientemente descubierta CD56⁻CD16⁺ con función citotóxica.^{17, 18}

LINFOCITOS T. Se caracterizan por expresar CD3 en su superficie y según su estado madurativo pueden clasificarse en linfocitos T de memoria cuando expresan CD45RO o vírgenes cuando expresan CD45RA. En cambio, según su receptor (TCR) podemos diferenciar dos grandes grupos: TCRαβ, que a su vez pueden expresar CD8 (citotóxicos) o CD4 (cooperadores) y TCRγδ que corresponde con los linfocitos intraepiteliales.

Según el correceptor, los linfocitos T se subdividen en **CD4⁺ Th, o cooperadores y CD8⁺, Tc o citotóxicos**¹⁹. 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 CD8.²⁰ Están relacionadas con respuestas autoinmunes y alérgicas.

Subtipos de linfocitos CD4⁺ estudiados:

Las Th0 o naïve son células T CD4⁺ que aun no han tenido contacto con un antígeno. Se caracterizan por expresar CD45RA, y CD127 en ausencia de CD25. Estas células una vez activadas pueden diferenciarse, dependiendo de las citocinas del ambiente, principalmente en linfocitos T cooperadores propiamente dicho: Th1, Th2, Th22, Th17, Th9 y reguladores: iTreg, entre otros.²¹

Th1 que han llegado a su estado diferencial gracias a la IL-12 e IFN-γ del ambiente se caracterizan por ser, principalmente, productoras de IFN-γ, IL-2 y TNF-α. Son responsables de la activación de los fagocitos y regulan la producción de anticuerpos responsables de la opsonización y activación del complemento frente a patógenos.²¹

En cambio, **Th2** que necesitan IL-4 y IL-2 para llegar a ese estado diferencial van a liberar mayoritariamente IL-4, IL-5, IL-13 y TNF-α. Regulan las respuestas de inmunidad adaptativa humoral. Estas células están relacionadas con el desarrollo de enfermedades de origen alérgico como el asma y son una buena defensa contra parásitos extracelulares. Mediante la liberación de citocinas inducen la activación de

macrófagos y mastocitos, el reclutamiento de eosinófilos e interactúan con células epiteliales.²²

Th17 son productoras de IL-17A, IL-17F, IL-22 y en menor medida de IL-21, reclutan y activan granulocitos que son la principal defensa frente a hongos y bacterias.²³ Necesitan de TGF- β y IL-6 para diferenciarse a Th17. Estas células juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.²⁴ Recientemente se ha descubierto que Th17 tienen gran plasticidad y en presencia de IL-12 pueden diferenciarse en **Th17/Th1**, un subtipo de Th que se caracteriza por sintetizar IL-17 e IFN- γ .²⁵

Tregs regulan a Th17 y provienen de la activación de una célula T naïve CD4⁺ por presencia de TGF- β e IL-2. Los Tregs son buenos productores de TGF- β .²⁶

Recientemente se han descubierto otros dos subtipos de células T reguladoras: Th22 y Th9. Las células Th9 son linfocitos pro-inflamatorios que llegan a su estado diferencial gracias a la presencia de IL-4 y TGF- β .²⁷ Juegan un papel importante en enfermedades autoinmunes y en inflamación de origen alérgico.²⁸ En cambio, **Th22** se caracterizan por liberar IL-22 pero no IL-17 y están relacionados con la inmunidad intestinal.²⁹

Subtipos de linfocitos CD8⁺ estudiados:

NKT. Los linfocitos NKT pertenecen a la inmunidad innata y expresan marcadores de membrana propios de las NK (CD56, CD16) y de las células T (TCR, $\alpha\beta$). En este grupo existen dos subpoblaciones: NKT de tipo I o invariantes (iNKT) que regulan las Th1, Th2 y Th17 o NKT tipo II. Se caracterizan por su rápida producción de altos niveles de citocinas inmuno-reguladoras (IL-4, IFN- γ y TNF).¹⁹

Marcadores de membrana linfocitarios

En este estudio, y como hemos descrito antes los fenotipos a estudio vienen definidos por los siguientes marcadores de membrana son los siguientes:

MARCADOR	EXPRESIÓN
CD45	Panleucocitario y en mayor densidad linfocitos T, B y NK.
CD45RA	Linfocitos vírgenes.
CD45R0	Linfocitos de memoria.
CD3	Linfocitos T.
CD4	Linfocitos T cooperados (efectores y reguladores).
CD8	Linfocitos T citotóxicos y/o reguladores (NKT entre otros).
CD19	Linfocitos B.
CD16	NK, NKT, neutrófilos y macrófagos.
CD56 (NCAM)	NK Y NKT.
CD25 (IL-2R α)	Linfocitos T (Treg, constitutiva) y en B y macrófagos (inducible)
CD5	Linfocitos T y B ₁
CD127 (IL-7R)	Linfocitos B y T.
CD183 (CXCR3)	NK, linfocitos T (Th1) y fagocitos.
CD196 (CCR6)	Linfocitos B, T (Th17) y cél. Dendríticas.
CD194 (CCR4)	Linfocitos NK, T (Th17 y Th2) y fagocitos.
CCR10	Cél. Epiteliales y Th22
TCR $\gamma\delta$	Linfocitos T ₁ .

Tabla 1. Tabla con los marcadores de superficie que analizaremos y tipos de células que los expresan.

Caracterización de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias

En el presente estudio mediante citología por cepillado estudiaremos las características de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias de la superficie ocular a nivel de la conjuntiva tarsal superior en pacientes sanos y compararlos entre sí.

Para ello, elegimos la **citología por cepillado** ya que es una técnica mínimamente invasiva en la cual se puede tomar una pequeña muestra de células epiteliales mediante la fricción que ejerce el cepillo sobre la superficie conjuntival del ojo. Es una técnica que no ocasiona grandes molestias a los sujetos y puede realizarse de manera repetitiva, lo que nos da grandes ventajas sobre otras técnicas como las biopsias o la citología de impresión. Aunque sea mínimamente invasiva necesita la instilación de anestésico local en colirio. En cuanto a las ventajas del cepillado frente a la citología de impresión cabe destacar que la primera técnica permite aislar poblaciones celulares con una viabilidad mayor.

Para realizar la caracterización de las distintas poblaciones celulares de la conjuntiva tarsal utilizaremos la citometría de flujo. Esta técnica nos permite diferenciar subtipos celulares mediante la dilución de la muestra celular con anticuerpos modificados químicamente para que puedan emitir señal luminosa. Estos anticuerpos van a unirse a proteínas de membrana expresadas de manera exclusiva para una población o subpoblación determinada.

Cada anticuerpo utilizado va a unirse a una proteína marcadora de linaje o maduración determinada y va a emitir una señal luminosa a una longitud de onda concreta. El citómetro va a reconocer esa longitud de onda, separando las distintas células en poblaciones dependiendo de la señal emitida. Además los fotomultiplicadores del citómetro pueden medir la complejidad y tamaño de las células obtenidas en la muestra permitiéndonos diferenciar las poblaciones de linfocitos del resto. Por lo tanto, gracias al citómetro, de una misma muestra vamos a poder analizar varios parámetros a la vez con gran fiabilidad.

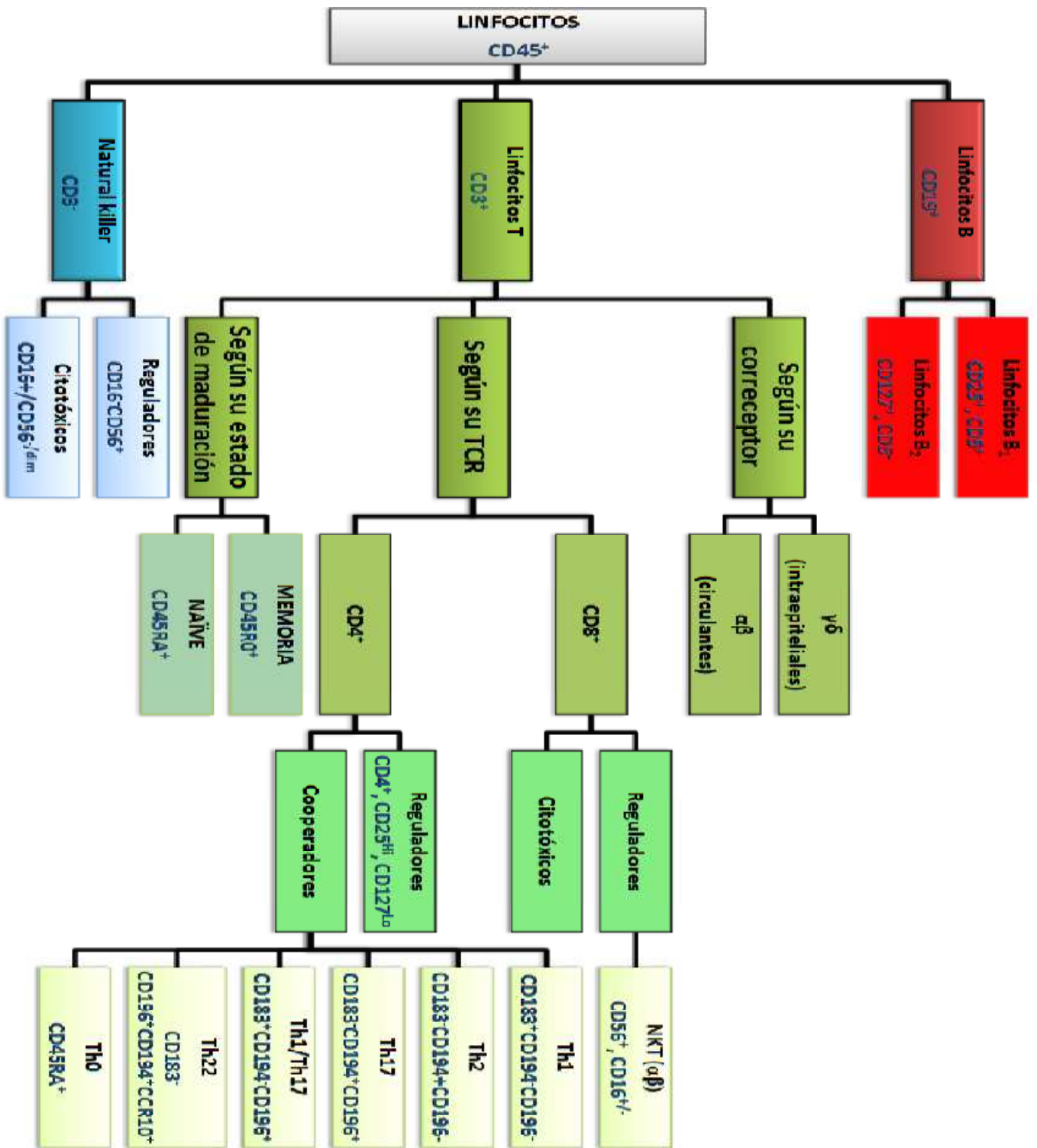


Figura 4. Esquema de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias que vamos a analizar.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Preámbulo

El sistema inmune en general y las subpoblaciones linfocitarias en particular tienen variaciones intra- (ciclos circadianos) e inter- individuales y este hecho puede estar influenciado por factores tales como: la genética, el entorno ambiental, la alimentación, la actividad física, el consumo de diferentes sustancias y/o fármacos, el historial de infecciones del individuo, el sexo y la edad entre otros. El reparto de estas subpoblaciones en el cuerpo humano no es homogéneo, es decir, varía según su localización en las distintas regiones anatómicas. Así por ejemplo, la proporción de linfocitos T CD8⁺ en sangre puede ser muy diferente a la que se aprecia en los linfocitos intraepiteliales de las mucosas (tanto intestinal, como respiratoria o conjuntiva) dentro del individuo ya sea éste sano o padezca alguna enfermedad de carácter inmunitario.

Estas diferencias en la distribución anatómica de los linfocitos resultan interesantes, sobre todo a la hora de diagnosticar a un paciente con sospecha de alguna enfermedad ya que podemos analizar las poblaciones linfocitarias, cuantificarlas y caracterizarlas tomando una muestra de un tejido sólido accesible o de sangre. Por lo tanto, en un futuro muy próximo con un simple análisis de sangre o la toma de una muestra de tejido conjuntival podríamos diagnosticar una patología o alergia ocular de manera rápida y efectiva.

En este trabajo queremos empezar caracterizando las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en individuos sanos para el estudio de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias. Existen varios estudios previos en los que se analizan y calculan los porcentajes para cada fenotipo. Pero nosotros, sin embargo, daremos un paso más, no solo analizaremos un gran número de subtipos linfocitarios de las tres estirpes (T, B y NK), sino que además compararemos los valores obtenidos en la sangre con los obtenidos en tejido conjuntival en individuos sanos y, posteriormente, analizaremos los cambios que se observan en diversas patologías oculares asociadas a alergias.

Hipótesis

Nuestra hipótesis de partida es que las subpoblaciones de linfocitos T, B y NK tanto en la conjuntiva tarsal superior como en sangre periférica cambian en pacientes con alergia ocular con respecto a individuos sanos. Deberíamos ser capaces de detectar variaciones fenotípicas entre estos dos grupos. Además proponemos que no hay correlación directa entre las subpoblaciones linfocitarias sistémicas (sangre) con las regionales (conjuntiva).

Para realizar el contraste de hipótesis caracterizaremos las subpoblaciones linfocitarias en sangre y conjuntiva de individuos sanos, así como de pacientes con patología alérgica con clínica ocular. Posteriormente realizaremos la comparación de los resultados entre los diferentes tejidos y grupos de poblaciones.

Objetivos:

1. Caracterizar las distintas poblaciones linfocitarias T, B y NK en sangre y en conjuntiva y diferenciar fenotípicamente los distintos subtipos y sus proporciones.
2. Comparar y correlacionar (para cada individuo) el fenotipo linfocitario sistémico (sangre) y regional (conjuntiva tarsal).
3. Analizar la influencia de factores intrínsecos o extrínsecos (edad, sexo o patología alérgica) en las subpoblaciones linfocitarias sistémicas y regionales.
4. Evaluar cómo las proporciones de las subpoblaciones estudiadas podrían utilizarse como posibles biomarcadores diagnóstico de enfermedades alérgicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El reclutamiento de voluntarios se llevó a cabo en el Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV), el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA, Valladolid) y el Hospital Universitario Río Hortega. Después de dar a conocer la naturaleza del estudio y los procedimientos estipulados se ofreció y procedió con la firma del consentimiento informado por el propio sujeto o su tutor legal en caso de minoría de edad en el que se informa de los objetivos, la confidencialidad y los posibles riesgos ([Anexo 1, Consentimiento informado](#)). El protocolo fue presentado a la Comisión de Investigación del IOBA y aprobado por el comité ético del HCUV.

Acto seguido, se pasó a completar un cuestionario que consta de una serie de preguntas y un test OSDI (*ocular surface disease index*) para ojo seco con el fin de evaluar las características del paciente y realizar la selección de inclusión/exclusión ([Anexo 2, criterios de inclusión/exclusión](#) y [Anexo 3, Cuaderno de recogida de datos](#)). Una vez completado, se procedió con las pruebas oculares para ver el estado de la superficie ocular y la lágrima y la obtención de las muestras por el siguiente orden:

1. Recogida de lágrima hasta completar 2 capilares de 4µL de cada ojo.
2. TBUT (*Tear Break-Up Time*/ tiempo de rotura lacrimal).
3. Instilación de anestesia tópica. 1 gota de anestésico al 0,5% (5 mg de tetracaína clorhidrato y 0,5 mg de nafazolina clorhidrato).
4. Test de Schirmer.
5. Citología por cepillado.
6. Evaluación de la superficie corneal y conjuntival con Fluoresceína.
7. Evaluación de la superficie corneal y conjuntival con Rosa de Bengala.
8. Recogida de sangre periférica por venopunción.

Recogida de muestras

Recogida de lágrima

La obtención de la lágrima se realizó en el menisco temporal inferior con un microcapilar de 4µl a intervalos de 2-3 minutos hasta obtener dos capilares completos para cada ojo. La muestra se vació en un eppendorf con buffer (DPBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ + 10mg/mL BSA y pH=7.4) y se congeló para su posterior análisis.³⁰

Células conjuntivales

Previa instilación de anestésico se revirtió el párpado para la toma de muestra mediante citología por cepillado de la conjuntiva tarsal superior. Mediante rotación circular del cepillo 3 veces durante 30 segundos conseguimos desprender las células epiteliales e intraepiteliales y conservarlas en un eppendorf con 1,4mL de medio de cultivo (DMEM/F12 suplementado con 1mg/mL de insulina pancreática bovina, 2ng/mL de factor de crecimiento epidérmico humano (EGF), 0,1mg/mL de toxina colérica, 5mg/mL de hidrocortisona, suero fetal bovino (FBS) al 10%, 50U/mL de penicilina, 50mg/mL de estreptomina y 2,5mg/mL de anfotericina B).^{10, 31}

Sangre periférica

Se obtuvo sangre preferentemente de una vena de la parte interior del codo o del dorso de la mano y se conservó en un tubo estéril con anti-coagulante (EDTA).

Protocolos para la preparación de las muestras

El procesado y análisis se realizó para muestras de sangre periférica y conjuntiva de individuos sanos, dejando las muestras de lágrima congeladas en buffer para su estudio a posteriori.

SANGRE

Una vez obtenida la muestra sanguínea se repartió en 5 tubos para ser incubados con una serie de 5 anticuerpos cada uno según el siguiente protocolo:

Repartimos 50µL de sangre a cada tubo y después añadimos la cantidad indicada por el fabricante de cada anticuerpo según la tabla 1, dejamos incubar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y añadimos 500µL de solución de lisis (FACS Lysing solution, BD FACS™, Becton Dickinson). Incubamos otros 15 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Por último, centrifugamos 3mL de la sangre sobrante para extraer el plasma y congelarlo a -80°C para su posterior análisis.

CEPILLADO

Para la muestra de células conjuntivales el proceso es similar. Para ello necesitamos repartir 200µL de muestra en cada tubo y después añadirle 2mL de solución de lavado (Cell Wash solution) para eliminar restos del medio de cultivo. A continuación centrifugamos durante 5 minutos a 500g para decantar las células y separarlas del medio. Retiramos el sobrenadante y añadimos la cantidad de anticuerpos recomendada por el fabricante según la tabla 1, dejamos 15 minutos incubando a temperatura ambiente y condiciones de oscuridad. Por último, añadimos 500µL de solución de lisis (FACS Lysing solution) y dejamos incubando 15 a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad.

Análisis de los tubos por citometría

Cada tubo preparado nos servirá para analizar distintas subpoblaciones.

En el **tubo 1** veremos los subtipos **Th** (CD4) y **Tc** (CD8) así como **estado madurativo** de los linfocitos T, diferenciando, dentro de las CD3⁺, CD4⁺ CD45RA⁺ (cooperadores vírgenes), CD4⁺ CD45R0⁺ (cooperadores de memoria), CD8⁺ CD45RA⁺ (citotóxicos vírgenes), CD8⁺ CD45R0⁺ (citotóxicos de memoria).

En el **tubo 2** analizaremos las principales subpoblaciones de **los linfocitos T cooperadores** (CD4⁺): Th1 (CD183⁺ CD194⁻ CD196⁻), Th2 (CD183⁻ CD194⁺ CD196⁻), Th1/Th17 (CD183⁺ CD194⁻ CD196⁺), Th22 (CD183⁻ CD194⁺ CD196⁺ CCR10⁺), Th17 (CD183⁻ CD194⁺ CD196⁺).

En el **tubo 3** nos centraremos en los linfocitos T reguladores (**Tregs**) CD127^{Lo}CD25^{Hi}.

En el **tubo 4** analizaremos tanto **NK** (CD16⁺ CD56⁺), dentro de los linfocitos CD3⁺, como **NKT** (CD16⁺ CD56⁺), dentro de los CD3⁺.

Y, finalmente, en el **tubo 5** analizaremos **linfocitos T** más primitivos (**TCR $\gamma\delta$ ⁺**) y **linfocitos B** (CD19⁺) y sus dos subpoblaciones: B1 (CD5⁺) y B2 (CD5⁻).

Fotodet.	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5
FL1	CD45RA-FITC	CD183-FITC	CD127-FITC	CD16-FITC	CD19-FITC
FL2	CD45R0-PE	CD196-PE	CD25-PE	CD8-PE	TCR $\gamma\delta$ -PE
FL3	CD8-ECD	CD4-ECD	CD45-ECD	CD45-ECD	CD45-ECD
FL4	CD4-APC	CCR10-APC	CD4-APC	CD56-APC	CD5-APC
FL5	CD3- APC- alexafuor 750	CD194-APC- Vio770	CD3- APC- alexafuor 750	CD3- APC- alexafuor 750	CD3- APC- alexafuor 750

Tabla 2 Anticuerpos utilizados y distribución. FITC: Fluoroisotiocianato de Fluoresceína, PE: Ficoeritrina, ECD: Ficoeritrina-Texas Red-X (Beckman Coulter). APC: Alofocianina.

En el "[Anexo 4, anticuerpos](#)" se muestra la distribución de los anticuerpos en los tubos, las casas comerciales y el clon utilizado.

Creación de un protocolo de adquisición y análisis

Elaboramos los protocolos de adquisición y análisis para el citómetro Beckman Coulter FC-500 del área de inmunología de la Universidad de Valladolid, calibrando los voltajes y ajustando las compensaciones para los distintos fotomultiplicadores. Usamos la técnica de "*gating*" para seleccionar y separar las distintas subpoblaciones para cada tubo como se muestra en el "[Anexo 5 - Citometría](#)".

4. RESULTADOS

Siguiendo los criterios de inclusión/exclusión obtuvimos muestras de sangre de 10 participantes (8 controles, 1 con alergia estacional, 1 con dermatitis atópica) y 4 muestras de tejido conjuntival (3 controles y 1 con alergia estacional).

* Todos los resultados estadísticos se recogen en el "[Anexo 6 - Análisis estadístico](#)"

Grupo	Sexo	Edad	Muestra	
			Brush	Sangre
CONTROL	H	26	✓	✓
	H	26		✓
	H	25	✓	✓
	H	24		✓
	M	21		✓
	M	25		✓
	M	58		✓
	M	60	✓	✓
ALERGIA	H	30	✓	✓
DERMATITIS	M	26		✓

Tabla 3. Participantes del estudio donde se reflejan datos como sexo, edad, patología y las muestras obtenidas.

ESTUDIOS EN SUJETOS SIN PATOLOGÍA OCULAR

A. Fenotipo linfocitario en sangre periférica

Los valores obtenidos por citometría se reflejan en la tablas a continuación. Los porcentajes se muestran en proporción a los linfocitos totales (CD45⁺).

En la población de adultos sanos dentro de los linfocitos T cooperadores (Th) los linfocitos Th1 son los más numerosos mientras que los Th2 tienen los valores más bajos. Para los linfocitos T encontramos un notable predominio de los CD4⁺ (Th) sobre los CD8⁺ (Tc), tal y como comprobaron antes en sangre periférica otros autores¹³. En cuanto al estado madurativo de los linfocitos T se pudo ver que la mayoría son vírgenes tanto en los Th como en los Tc. Dentro de los linfocitos B se encontró que los B2 son más comunes que los B1, con unos valores en torno al 96%; y por último entre los linfocitos NK predominan las células citotóxicas (CD16⁺/CD56⁻ o CD56^{dim}) frente a las reguladoras. Los detalles se muestran en el "[Anexo 7 - Valores en sangre](#)".

EFEECTO DE LA EDAD

Se dividieron los sujetos control en dos grupos, menores de 50 años (<50) y mayores de 50 (>50) para poder comparar nuestros resultados con valores de referencia para las subpoblaciones que han utilizado esta división de edades.¹³ Al ser una muestra con n<30 realizaremos la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras independientes. Consideraremos valores de: p<0,05 diferencia significativa (*); 0,05<p<0,2 tendencia (#); p>0,2 sin diferencia.

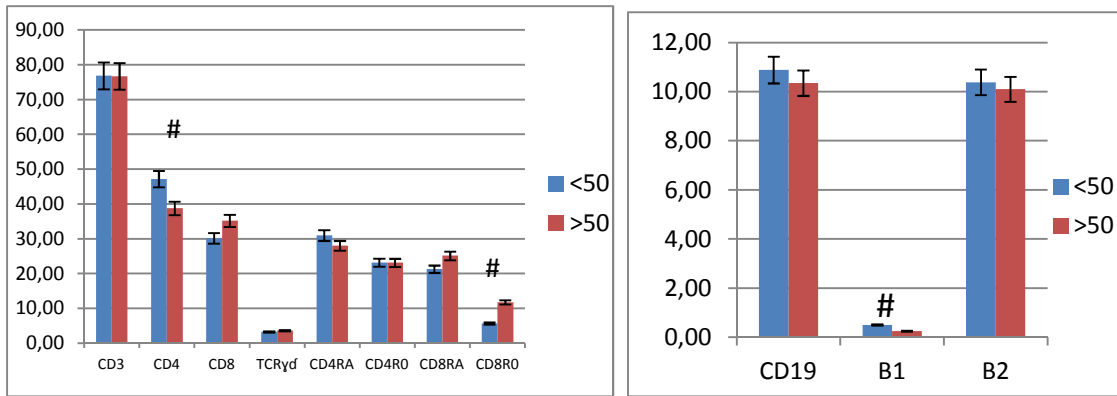
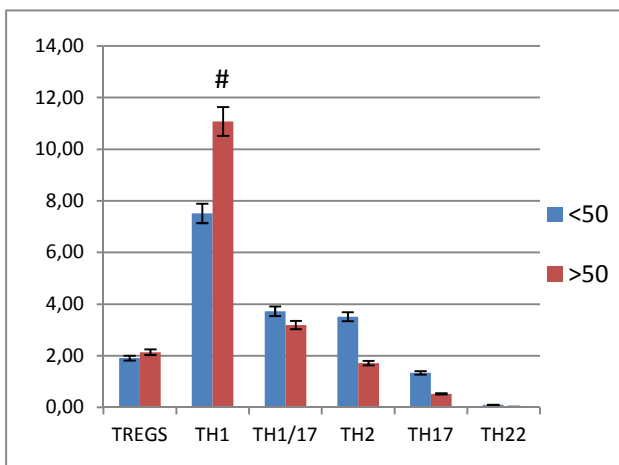


Figura 10 Gráfico de barras en el que se comparan las medias obtenidas para las subpoblaciones de linfocitos T y B en sangre en controles agrupados según el rango de edad. CD4, CD8RO y B₁ tienden a variar dependiendo la edad.

Únicamente los CD8RO ($p=0,071$) podrían estar aumentados en los sujetos mayores de 50 y los CD4 ($p=0,071$) disminuidos, tal y como se ha descrito en poblaciones envejecidas para CD4³² y para CD8RO³³ aunque estas diferencias no son significativas, seguramente debido a la baja potencia estadística al tratarse de un estudio preliminar en que sólo hay 2 individuos mayores de 50.

El porcentaje de células B₁ ($p=0,143$) en menores de 50 años podría estar aumentado. Con respecto a los B totales, B₁ representan el 5% mientras que en mayores de 50 están en torno al 2%.



También se observó que en el grupo de mayor edad podrían aumentar los linfocitos Th1 ($p=0,143$), aunque no se analizaron células, esto fue descrito en el año 2000,³⁴ en un estudio de citocinas donde se observó una disminución de IFN- γ e IL-2. En cambio, en los subtipos Th2, Th17 y Th22 no hay diferencias, si bien habría que confirmar estos datos con un grupo de controles >50 más numeroso.

Figura 11 Gráfico de barras donde aparecen los linfocitos CD4 memoria y en el que se comparan las medias obtenidas en sangre en controles agrupados según el rango de edad.

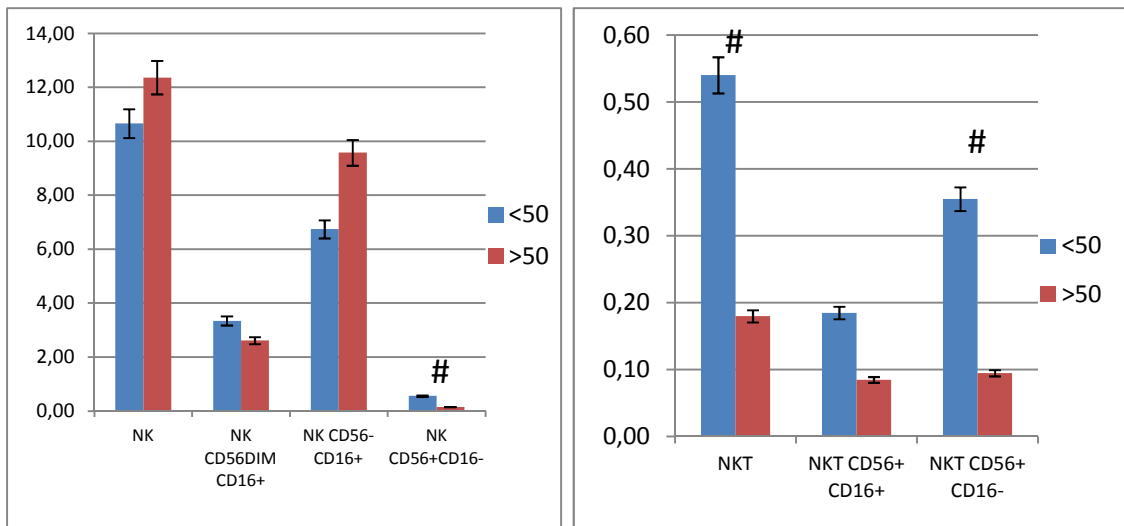


Figura 12 Gráfico de barras en el que se comparan las medias obtenidas para los subtipos de NK y NKT en sangre en controles agrupados según el rango de edad.

Las células NKT ($p=0,071$) están elevadas y su proporción aumenta en menores de 50 años. Dentro de los subtipos de NK y NKT se encontró que los $CD56^+CD16^-$ ($p=0,143$ y $p=0,71$, respectivamente) podrían estar reducidos en mayores de 50. Esto fue descrito tanto para los NK³⁵ como para las NKT³⁶.

EFECTO DEL SEXO

Se dividieron los sujetos control según su sexo en hombres y mujeres dentro de un mismo rango de edad (<50).

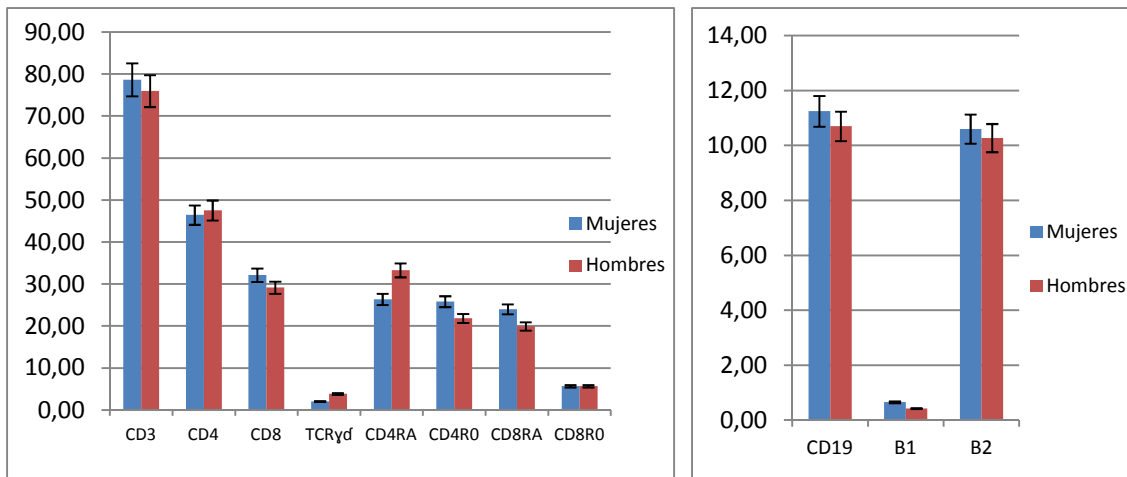
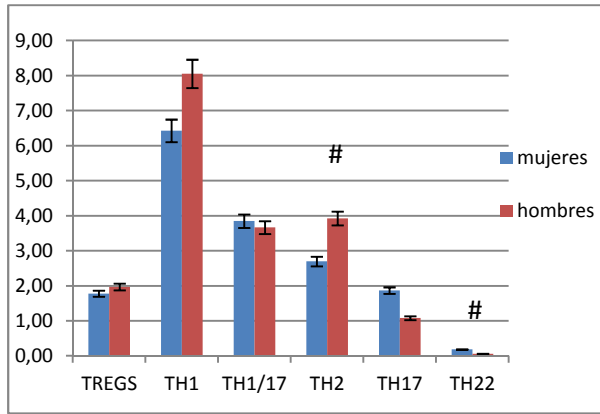


Figura 13 Gráfico de barras en el que se comparan las medias obtenidas para subpoblaciones T y B en sangre en controles agrupados según el sexo: Hombres (n=4) y Mujeres (n=2). Sin significación estadística.

Como se puede observar, no hay ninguna diferencia significativa asociada al sexo en las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T y B.



Para los linfocitos T CD4 de memoria encontramos, como se muestra en la gráfica que el porcentaje de Th2 ($p=0,133$) podría estar más alto y Th22 ($p=0,133$) más bajo en hombres.

Figura 14 Gráfico de barras en el que se comparan las medias obtenidas para linfocitos CD4 de memoria en sangre en controles agrupados según el sexo. Th2 es significativamente mayor en hombres que en mujeres.

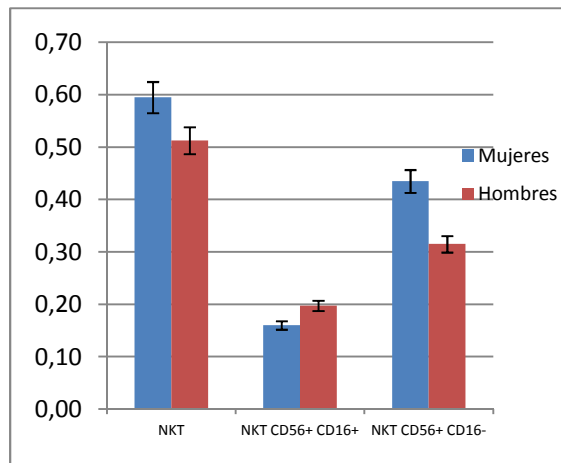
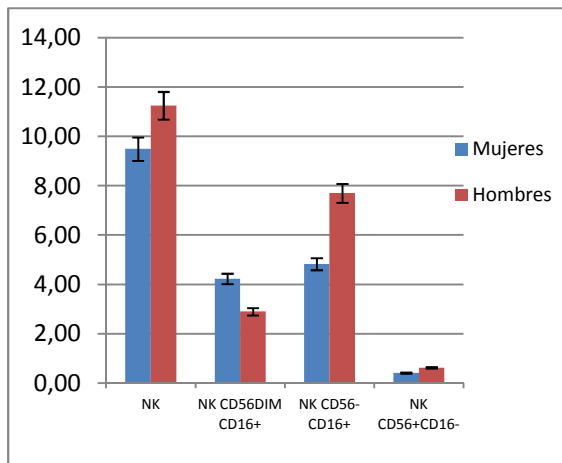


Figura 15 Gráfico de barras en el que se comparan las medias obtenidas para los subtipos de NK y NKT en sangre en controles agrupados según el sexo.

Para los subtipos de NK y NKT no encontramos valores significativos ni tendencias. Por lo tanto se descartan las diferencias por sexo en este rango de edad.

B. Correlación entre sangre y brush

A continuación analizaremos si las subpoblaciones linfocitarias encontradas en la sangre de sujetos sanos están relacionados con los IELs de la conjuntiva tarsal.

Para este estudio se emplearon sólo los datos de los participantes de los que obtuvimos ambas muestras de sangre y brush ($n=3$) y se compararon las medianas. Utilizamos la prueba de correlaciones de Pearson. Consideraremos valores de: $p < 0,05$ diferencia significativa (*); $0,05 < p < 0,2$ tendencia (#); $p > 0,2$ sin diferencia.

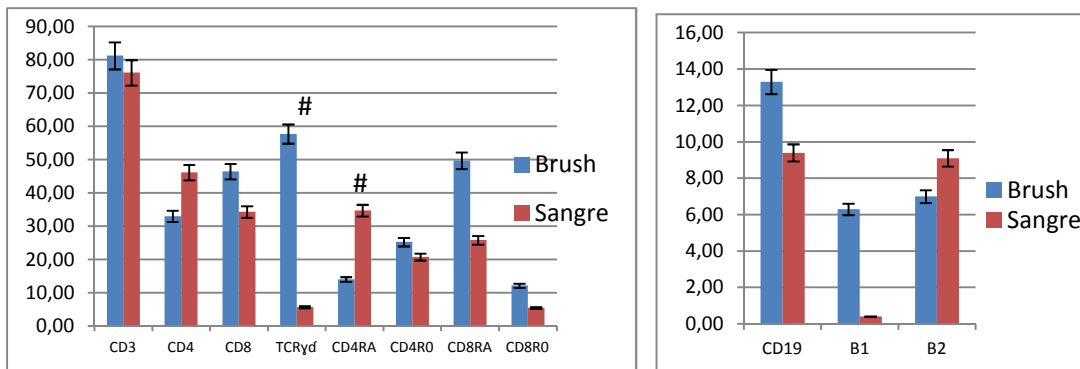
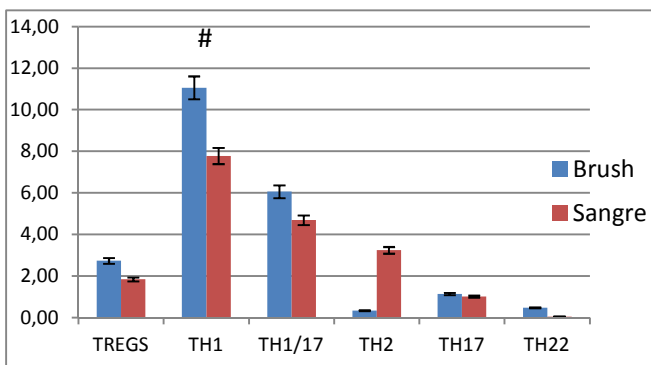


Figura 16 Comparación de las medianas obtenidas de las subpoblaciones de linfocitos T Y B para sangre y brush de individuos sanos.

Con la prudencia de haber analizado sólo 3 muestras, parece que todas las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos T aparecen conservadas entre sangre periférica y cepillado conjuntival salvo CD4⁺CD45RA⁺ ($p=0,148$) en el que se observa una posible disminución en brush y un notable incremento de TCRγδ ($p=0,096$), como era esperable, ya que son propios de los epitelios y tal y como se refleja en otros estudios en mucosas.³⁷ El cociente CD4/CD8 en brush aparece invertido, tal y como encontraron Reinoso y colaboradores¹⁰, donde el número de células T CD8 era mayor que el de las células T CD4.



En brush no se puede descartar un aumento en Th1 ($p=0,173$) en conjuntiva. Sin embargo, debería ampliarse la n del estudio para llegar a conclusiones más sólidas.

Figura 17 Comparación de las medianas obtenidas de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 memoria para sangre y brush de individuos sanos.

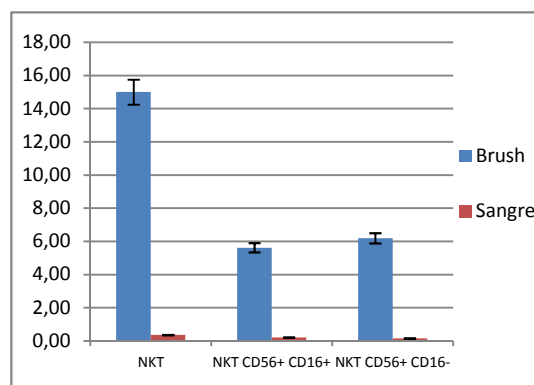
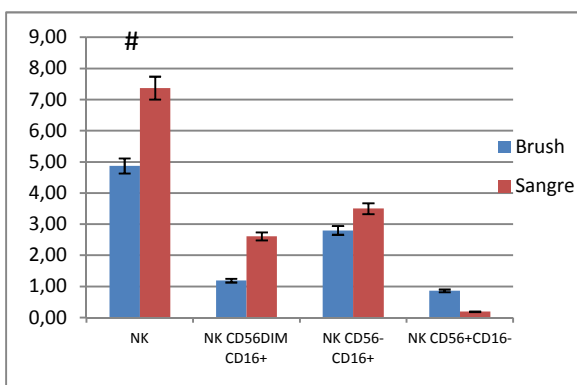


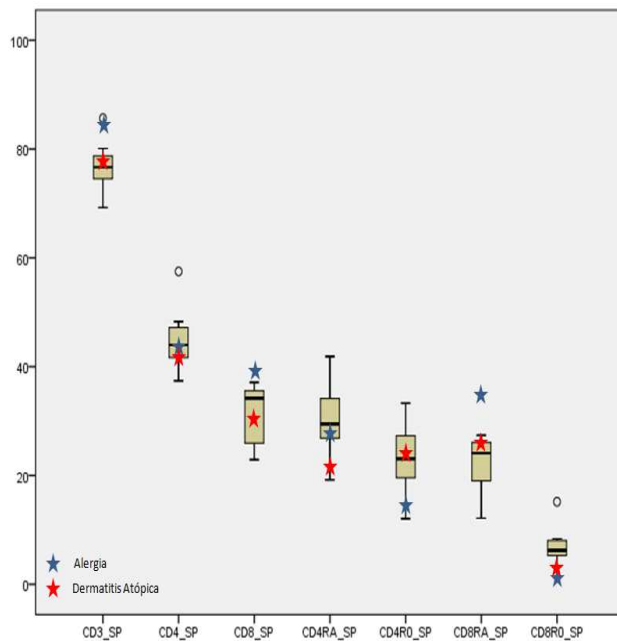
Figura 18 Comparación de las medianas obtenidas de las subpoblaciones de linfocitos NK y NKT para sangre y brush de individuos sanos.

Por otro lado, se encontró una posible disminución de los NK ($p=0,131$) en conjuntiva tal y como encontraron Reinoso R.¹⁰

ESTUDIOS EN SUJETOS CON PATOLOGÍA ALÉRGICA

A. Estudios preliminares caso-control en sangre periférica

Para este análisis se compararán los valores obtenidos en sangre en nuestros sujetos control (n=8) con las demás patologías. Al contar con un solo caso de alergia y uno de dermatitis, se decidió hacer una aproximación estudiando el intervalo de confianza para la media ($\alpha=0,05$) para cada variable en sanos. En las siguientes figuras se representarán los resultados en un diagrama de cajas y bigotes y representaremos los valores obtenidos para alergia (n=1, azul) y dermatitis (n=1, rojo) para comprobar si están dentro o fuera del intervalo.



Como se muestra en la gráfica en el sujeto con alergia la proporción de células T activadas está disminuida, cosa que no se observa en el caso de dermatitis atópica, con valores análogos a los de los controles. En cambio, para el sujeto con dermatitis atópica encontramos que las Th vírgenes están disminuidas. Con estos resultados preliminares, el porcentaje de CD4 quedaría descartado como marcador al no aportar información sobre los casos.

Figura 19 Valores obtenidos en sangre periférica. Gráfico de cajas en el que se representa la media, el valor máximo y el mínimo, el intervalo de confianza y los *outliers* (valores extremos). En azul se representan los valores obtenidos para nuestro sujeto alérgico y en rojo nuestro paciente con dermatitis atópica.

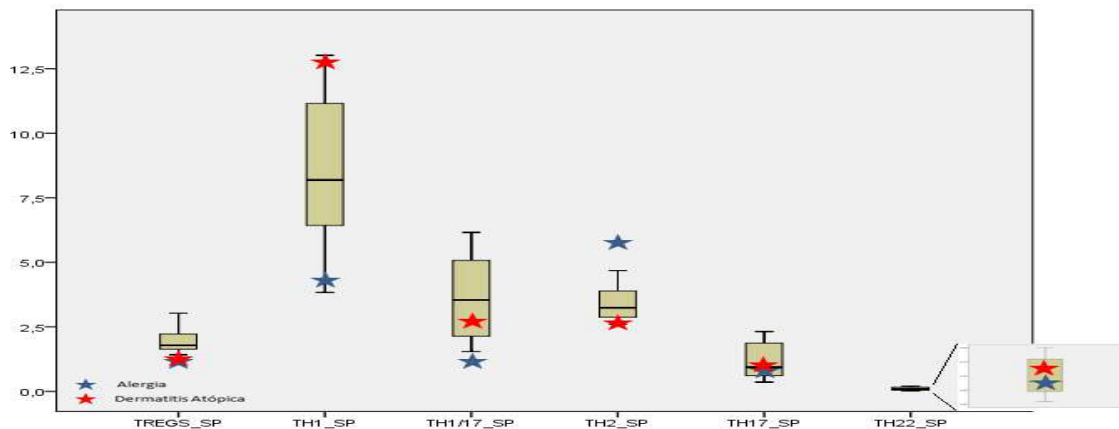
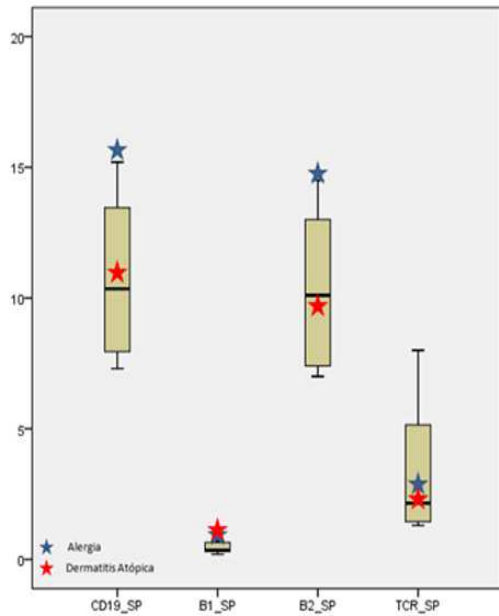


Figura 20 Valores obtenidos en sangre periférica. Gráfico de cajas en el que se representa la media, el valor máximo y el mínimo y el intervalo de confianza. En azul se representan los valores obtenidos para nuestro sujeto alérgico y en rojo nuestro paciente con dermatitis atópica. A la derecha el valor de Th22 aumentado.

Los linfocitos T CD4 de memoria se encontraron notablemente disminuidos en el caso de alergia, siendo normales en dermatitis atópica. Los Tregs en ambas patologías estaban ligeramente disminuidos. En cuanto a los Th1 podrían ser el marcador más informativo de los analizados si se confirman estas observaciones preliminares. En alergia los Th1 están claramente disminuidos mientras que en dermatitis se encontraban aumentados, ocurriendo el efecto contrario (y esperable, aunque en menor magnitud) con los Th2.



En el sujeto alérgico se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos B (control: 11% vs alergia: 15%) pero la proporción B₁/B₂ apenas variaba con respecto a los controles.

Por otro lado, para el paciente con DA se vio que tenía una mayor proporción de células B1, donde pudimos ver que un 10% de linfocitos B eran B₁ frente al 4% de los sujetos control.

Figura 21 Valores obtenidos en sangre periférica. Gráfico de cajas en el que se representa la media, el valor máximo y el mínimo y el intervalo de confianza. En azul se representan los valores obtenidos para nuestro sujeto alérgico y en rojo nuestro paciente con dermatitis atópica.

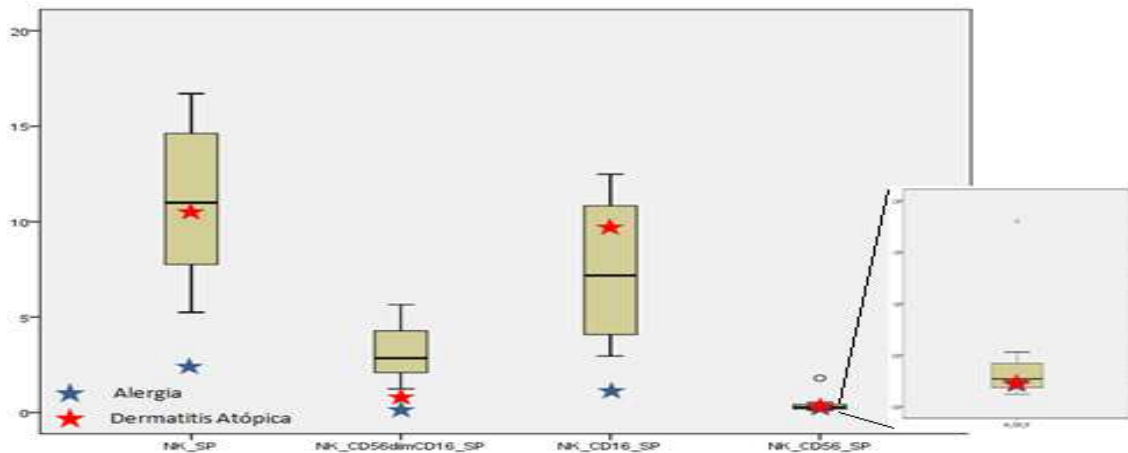
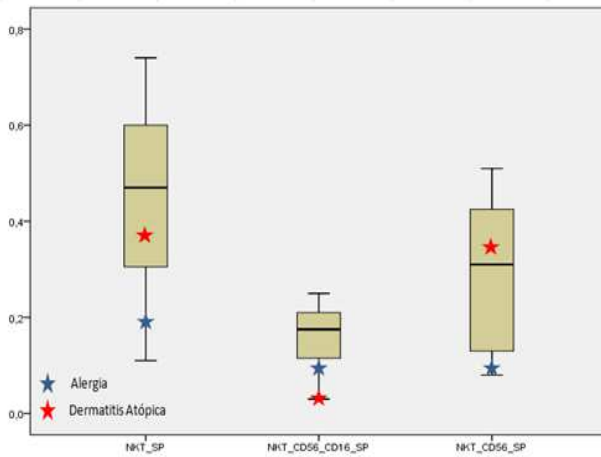


Figura 22 Valores obtenidos en sangre periférica. Gráfico de cajas en el que se representa la media, el valor máximo y el mínimo y el intervalo de confianza. En azul se representan los valores obtenidos para nuestro sujeto alérgico y en rojo nuestro paciente con dermatitis atópica.

En alergia se observó una disminución de linfocitos NK (control:11% vs alergia: 2%), tal y como vieron Lambiase A. y colaboradores,³⁶ donde son los NK citotóxicos los que disminuyen. En dermatitis, en cambio, observamos una disminución de los CD56^{dim}CD16⁺.



Para los NKT en alergia se observó una reducción en ambos subtipos mientras que para dermatitis la reducción es solamente por parte de los NKT dobles positivos.

Figura 23 Valores obtenidos en sangre periférica. Gráfico de cajas en el que se representa la media, el valor máximo y el mínimo y el intervalo de confianza. En azul se representan los valores obtenidos para nuestro sujeto alérgico y en rojo nuestro paciente con dermatitis atópica.

B. Fenotipo linfocitario en cepillado conjuntival-brush

Para el estudio de las poblaciones linfocitarias en conjuntiva tarsal se contó con 4 participantes, 3 de ellos sanos y 1 alérgico. El método estadístico usado será el mismo que en el apartado anterior.

ESTUDIO CASO-CONTROL

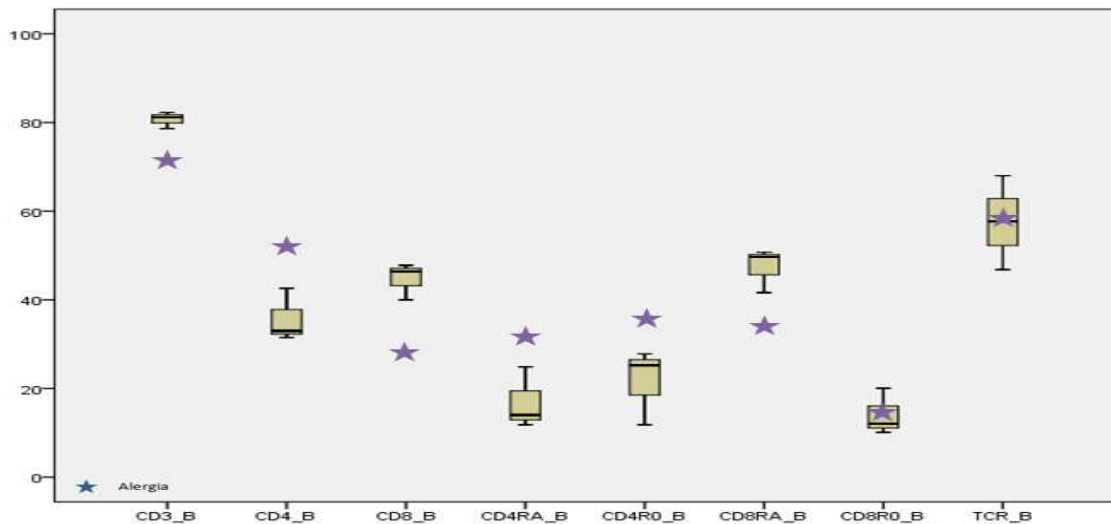


Figura 24 Valores obtenidos en conjuntiva tarsal. Gráfico de cajas en el que se representa la media, el valor máximo y el mínimo y el intervalo de confianza. En azul se representan los valores obtenidos para nuestro sujeto alérgico.

Como vimos antes en controles, los valores de CD8 y CD4 en cepillado conjuntival están invertidos con respecto a sangre periférica. En el caso alérgico no se invierten sino que CD8 sigue con valores más bajos que CD4. Además, otro dato curioso es que, al igual que en sanos, las CD4 memoria van a seguir siendo más frecuentes que las vírgenes. La mayoría de los parámetros analizados difieren de los valores encontrados en conjuntiva sana, pero es necesario ratificar estas diferencias aumentando la n en el estudio en ambos grupos.

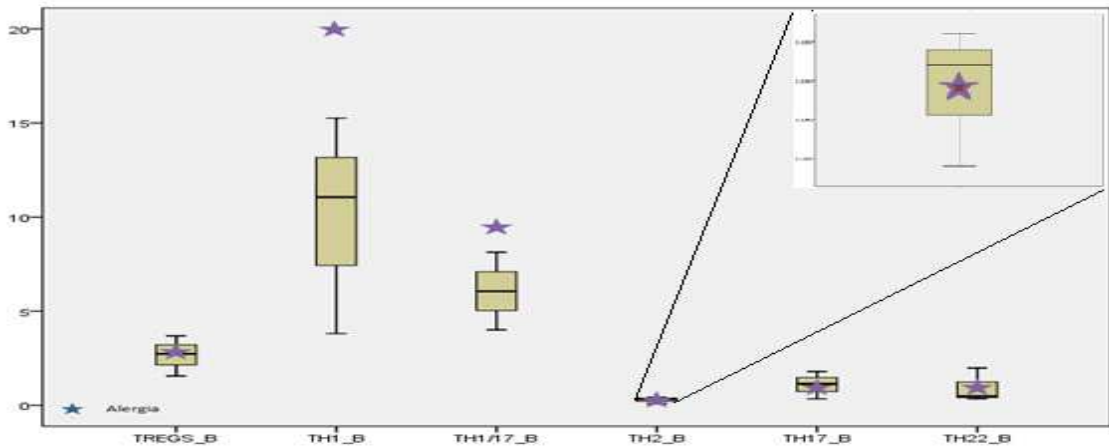


Figura 25 Valores obtenidos en conjuntiva tarsal. Gráfico de cajas en el que se representa la media, el valor máximo y el mínimo y el intervalo de confianza. En azul se representan los valores obtenidos para nuestro sujeto alérgico.

Para el paciente alérgico se encontró un notable aumento del porcentaje de Th1 y Th1/Th17 en brush al contrario de lo que encontrábamos en sangre periférica.

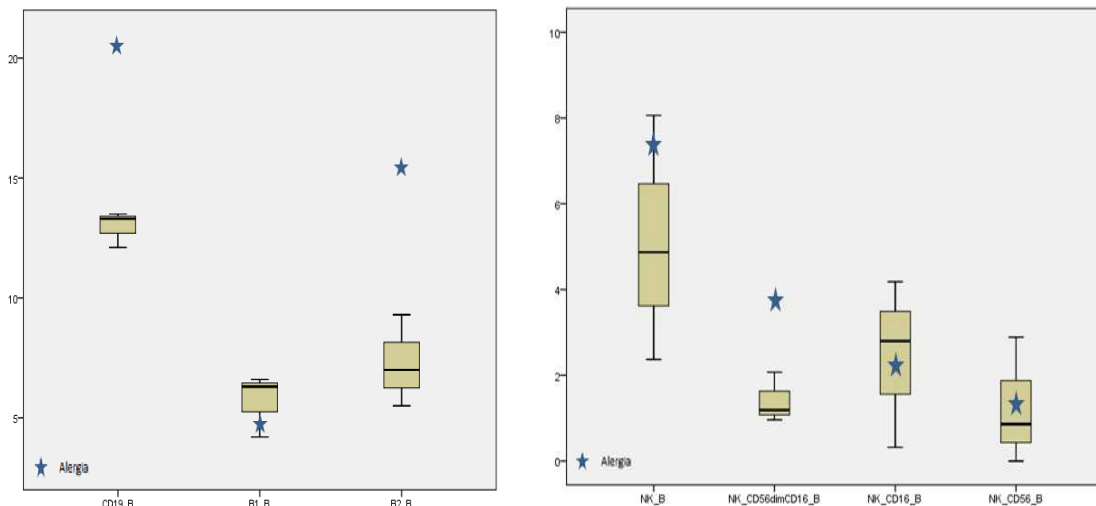
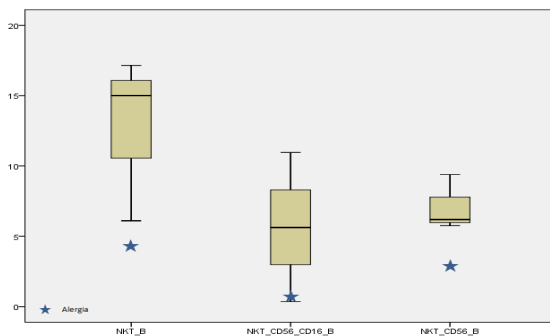


Figura 26 Valores obtenidos en conjuntiva tarsal. Gráfico de cajas en el que se representa la media, el valor máximo y el mínimo y el intervalo de confianza. En azul se representan los valores obtenidos para nuestro sujeto alérgico.

Dentro de los linfocitos B, los B₂ aparecen aumentados respecto a los controles tal y como ocurría en sangre periférica. Los resultados muestran un aumento de los NK de los cuales son los CD56^{dim}CD16⁺ los que aumentan. Esta variación fue observada también en otros estudios.³⁸



También se observa una disminución de los NKT en conjuntiva tarsal alérgica que no se apreciaba en sangre periférica.

Figura 27 Valores obtenidos en conjuntiva tarsal. Gráfico de cajas en el que se representa la media, el valor máximo y el mínimo y el intervalo de confianza. En azul se representan los valores obtenidos para nuestro sujeto alérgico.

C. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE UN CASO - Correlación entre Sangre y Brush

Varón alérgico, 30 años, diagnosticado de alergia a pólenes y gramíneas.

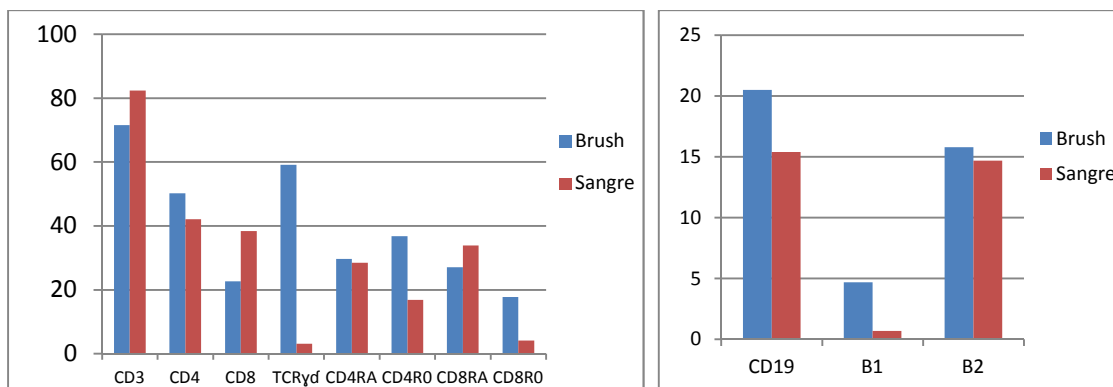
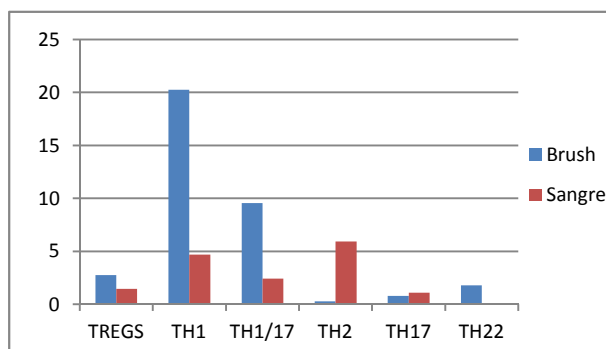


Figura 28 Comparación de los valores obtenidos de las subpoblaciones de linfocitos T y B para sangre y brush de alérgico.

Para nuestro sujeto alérgico observamos en conjuntiva tarsal una mayor proporción respecto a sangre periférica de las CD4, tanto vírgenes como memoria, y CD8 memoria. En cambio existe una disminución de CD8 y de éstas disminuyen las CD8 vírgenes. Al igual que ocurría en sujetos control, los linfocitos TCRγδ son más frecuentes en brush. Los valores de B1 son más altos pero no superan a los B2.



En este caso, en conjuntiva de alérgico obtuvimos valores de Tregs, Th22 y Th1/Th17 más altos y, al contrario que en sangre, los Th1 superan a los Th2.

Figura 29 Comparación de los valores obtenidos de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 memoria para sangre y brush de alérgico.

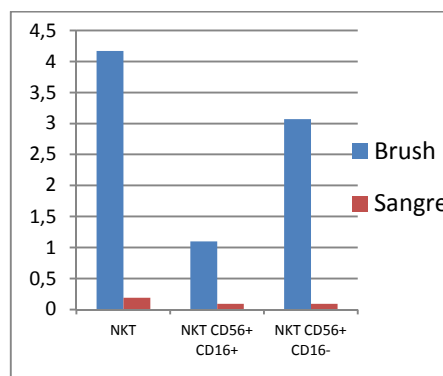
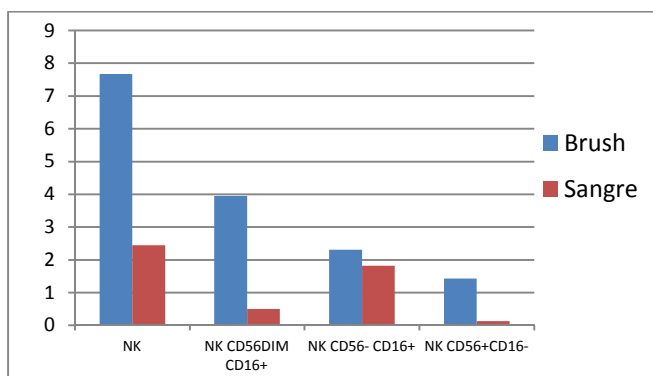
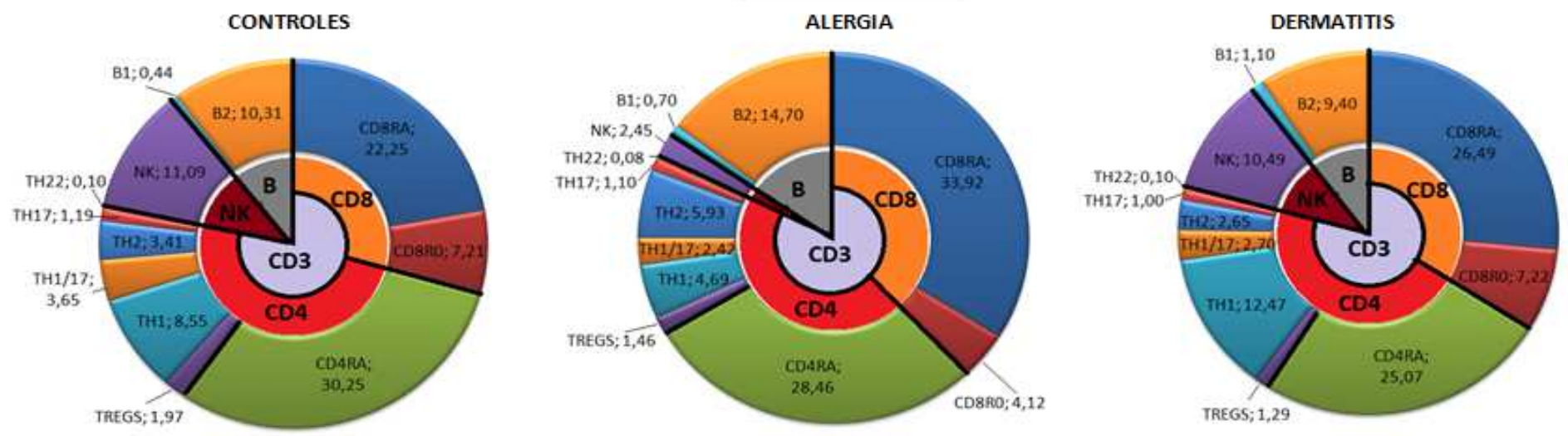


Figura 31 Comparación de los valores obtenidos de las subpoblaciones de linfocitos NK y NKT, B para sangre y brush de alérgico.

En sangre los NK más comunes son los CD56⁻CD16⁺ mientras que en conjuntiva son los CD56^{dim}CD16⁺. Al igual que ocurría en sujetos control, los NKT se ven aumentados en brush.

SANGRE



BRUSH

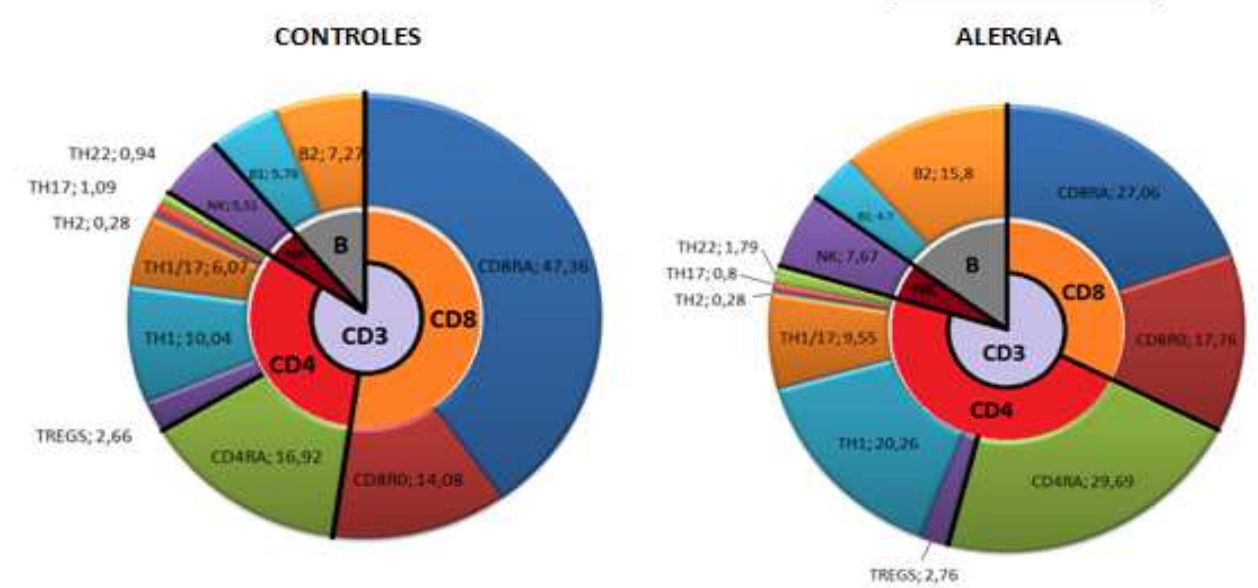


Figura 32 Resumen de los valores obtenidos para las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos escogidos en un gráfico de sectores.

5. DISCUSIÓN

Con este estudio hemos podido analizar la mayoría de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en sangre y conjuntiva tarsal con técnicas mínimamente invasivas como es la citología por cepillado.

Los valores obtenidos **en sangre de sujetos sanos** nos muestran un predominio de linfocitos T sobre el resto y que los NK y B van a tener proporciones similares. Además, los Th (CD4) predominan sobre los Tc (CD8) y, dentro de estos, los linfocitos T vírgenes van a tener proporciones mayores a los de memoria. Esto ya fue descrito por [Bisset *et al.*](#)¹³ en un análisis de subpoblaciones linfocitarias en sangre de sujetos sanos. Para los linfocitos B obtuvimos un predominio de los linfocitos B₂ sobre los B₁, al igual que describieron previamente [Ghia P. *et al.*](#)³⁹ en 2003. Dentro de los subtipos de Th encontramos que en sangre control los Th1 tenían los valores más altos seguido de los Th17/Th1, Th2, Th17 y Th22 volviendo a concordar con un estudio llevado a cabo por [Truchetet M-E *et al.*](#)⁴⁰ en esclerosis sistémica donde se observa en los sujetos control la misma relación, salvo Th17/Th1 que no fue analizado.

Estas subpoblaciones sistémicas pueden variar según la edad, el sexo o la patología de los sujetos en estudio.

Como hemos visto en los resultados, en poblaciones envejecidas (>50) hay una menor frecuencia en sangre de: CD4 coincidiendo con [Andreu-Ballester JC *et al.*](#)³² (donde además se observó una disminución de TCR $\gamma\delta$), NKT al igual que observaron [DelaRosa O. *et al.*](#)³⁶ y linfocitos B₁ como ya demostraron [Ginaldi L. *et al.*](#) en sujetos sanos.⁴¹ En este último estudio vieron como las CD3 vírgenes y las B totales también disminuían con la edad. En cambio, para Th1(aunque no se analizaron células, esto fue descrito en el año 2000,³⁴ en un análisis de citocinas) y CD8 memoria (coincidiendo con [Ferrando-Martínez S *et al.*](#)³³), existe una mayor proporción de estas células en sangre de poblaciones envejecidas. Además como ya observaron [Borrego F. *et al.*](#) también hemos encontrado una menor proporción de NK CD56⁺ (fenotipo con actividad más reguladora) en sangre de individuos envejecidos.

Según el sexo, se observó que existe una mayor proporción de Th2 en hombres que en mujeres. Este dato no se pudo contrastar con ningún otro estudio previo.

Las proporciones de subpoblaciones IELs encontradas en la **conjuntiva tarsal superior de individuos sanos** nos muestran -al igual que en sangre- un predominio de linfocitos T sobre el resto; con la diferencia que en conjuntiva los NK son bastante más bajos (5,5%) en comparación con los B (más del doble, 13%). Además, los Tc (CD8) predominan sobre los Th (CD4), al contrario que en sangre. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por [Reinoso R. *et al.*](#)¹⁰ donde vieron que los valores de NK eran muy bajos (en torno al 1%) y los B tenían valores del 25% aproximadamente. Dentro de los subtipos de Th encontramos que en conjuntiva de sujetos sanos, las células Th1 son las más abundantes, y en cambio, Th2 pasaba a última posición teniendo los valores más bajos. Sobre este último resultado no hemos encontrado ningún estudio en el que se estudiaran los subtipos de Th en conjuntiva; puesto que nuestro análisis es pionero en este campo. Hemos observado que en conjuntiva los

linfocitos T CD4 de memoria tenían valores más altos que los vírgenes pero tampoco encontramos estudios en el que se relacionara los subtipos de CD4. Por otro lado encontramos que los linfocitos B₁ son mucho más frecuentes que en sangre periférica y representarían el 44% del total de los B, mientras que en sangre estaban en torno al 4%. Con la prudencia debida a la limitación del estudio (3 sujetos analizados en sangre y conjuntiva) podemos resaltar que este resultado podría apuntar a una nueva localización –mucosa- de los linfocitos B primitivos y embrionariamente primordiales como son los B₁, que se sabe se localizan en las cavidades pleurales y peritoneales, y que se diferencian fundamentalmente durante la vida embrionaria ^{15,39}.

Los Th1 y los linfocitos T con receptor TCR $\gamma\delta$ son más frecuentes en conjuntiva que en sangre. Este aumento de TCR $\gamma\delta$ sobre las células más abundantes en sangre (TCR $\alpha\beta$) fue observado también en epitelio pulmonar por Augustin A. *et al.*³⁵ Tanto en el subtipo Th2 y como en las CD4 vírgenes encontramos una menor proporción de células con respecto a los valores obtenidos en sangre periférica.

En cuanto a los cambios en patologías de etiología alérgica, en nuestro **sujeto con alergia estacional** encontramos que en sangre los linfocitos Th (CD4) superaban ligeramente a los Tc (CD8), por lo que no se descartó el posible aumento de CD8 en alergia. En conjuntiva tarsal los CD8 eran bastante más bajos que los CD4. Este aumento de los CD4 en conjuntiva alérgica fue reflejado también en un estudio realizado por Metz DP *et al.*⁴² Por otro lado los linfocitos B estaban elevados tanto en sangre (como ya demostraron Leonardi A. *et al.*⁴³) como en conjuntiva con respecto a los sujetos control. Los linfocitos B en sangre tenían valores más altos que en conjuntiva y esa diferencia parece estar relacionada con el incremento de linfocitos B₁, que estaban muy elevados. En cuanto a los linfocitos T CD4 de memoria, en sangre, el subtipo efector Th2 estaba aumentado y tenían los valores más altos mientras que en conjuntiva eran los menos abundantes. Las células CD4 de memoria parecen más elevadas que las vírgenes en la conjuntiva de este individuo alérgico (aunque no hay diferencias significativas ni tendencias dado lo limitado de nuestro estudio). Este último dato es comparable con estudios previos, donde en algunas alergias oculares -como ya han publicado otros autores ⁴³- se produce este efecto. Sin embargo, en este mismo estudio encontraron una mayor proporción de IL-4 con respecto a IFN- γ tanto en sangre como en conjuntiva en sujetos alérgicos diagnosticados de queratoconjuntivitis vernal, lo que sugiere que en ambas localizaciones hay una mayor proporción de células Th2 sobre Th1. En nuestro caso, esta tendencia sólo se aprecia en sangre periférica, y no así en conjuntiva, donde las células Th2 eran minoritarias. Sin duda, puede deberse al hecho de que sólo hemos estudiado un caso, y no sea representativo (o el tipo de afectación alérgica no sea equiparable con los otros casos publicados).

Para nuestro sujeto con **dermatitis atópica** encontramos que en sangre los linfocitos Th (CD4) superaban a los Tc (CD8). Los linfocitos B₁ y Th1 estaban aumentados con respecto a los sujetos control (lo cual era contrario a lo encontrado en la literatura ⁴⁴, donde se relata un predominio de Th2 sobre Th1). El patrón de células Th efectoras en este sujeto era muy parecido al encontrado en individuos sanos; esto nos hace pensar que la paciente pudiera estar mal diagnosticada, o alternativamente bajo tratamiento inmunosupresor o anti-alérgico (aunque no lo relató durante la entrevista médica).

En primer lugar, vamos a tratar de explicar las diferencias obtenidas entre sangre y conjuntiva tarsal.

Como sabemos, el cuerpo humano es un organismo que tras muchos años de evolución se ha ido adaptando a las características del medio, y no debido al azar sino a las interacciones entre el propio organismo y su entorno. El sistema inmunitario se ha especializado en detectar las agresiones externas, para lo que la distribución de las células de este sistema se ha supraespecializado (hay células inmunitarias que se localizan en tejidos linfoides primarios y otras que residen fundamentalmente en órganos periféricos, entre los que se encuentran todos los tejidos linfoides asociados a las mucosas).

Las mucosas (digestiva, respiratoria, genitourinaria, ocular,...) al ser superficies de contacto directo con el ambiente y, por tanto, susceptibles a agentes infecciosos y alérgenos, es lógico pensar que necesitarán responder de manera rápida y efectiva contra patógenos.

En nuestro caso concreto, en la mucosa conjuntival de sujetos sanos la mayor proporción de los IELs CD8 con respecto a los CD4 nos hace pensar que es necesaria una respuesta rápida citotóxica contra agentes extraños. Las NKT (que son un subtipo de linfocitos T CD8+) también están aumentadas y recordemos que tienen gran flexibilidad funcional: desde la acción citotóxica pura a la producción de citocinas inmunorreguladoras.

Pero además, aunque la proporción de linfocitos T CD4 sea menor que en sangre, las células CD4 memoria superan a las vírgenes (al contrario de lo que sucedía en sangre), lo que nos lleva a proponer que la conjuntiva necesita tener mayor actividad efectora T.

Dentro de los subtipos Th, en los IELs conjuntivales vemos más proporción de Th1, encargadas de activar respuestas inflamatorias y de la inmunidad innata, y contrariamente apreciamos una disminución del perfil Th2. Recordemos que las Th2 son las responsables de las respuestas mediadas por anticuerpos y especializadas en infecciones por grandes parásitos, afección poco común en superficie ocular. También hemos encontrado un incremento del perfil Th22 –en conjuntiva respecto a sangre– que no sorprende, puesto que las células Th22 son características de las mucosas y son las encargadas de liberar IL-22, una citocina con función reparadora de epitelios.

Dentro de los subtipos B, en conjuntiva hay una mayor proporción B₁/B₂, es decir, hay más células B₁ que en sangre. Las células B₁ son primitivas, menos específicas (para algunos autores incluso “innatas”) y contribuyen a la primera línea de defensa contra agentes infecciosos extracelulares produciendo anticuerpos naturales.

Todos estos datos, en conjunto, parecen decir que la conjuntiva tarsal está pre-armada para desarrollar ante una infección una defensa rápida y efectiva. Tanto por el incremento de las células citotóxicas, Th1 y reparadoras del epitelio como por el incremento relativo de células innatas (de acción inmediata vs a las células adaptivas) y de células pre-activadas/memoria vs células vírgenes.

Pero veamos que ocurre cuando hay una alergia con afección ocular:

En sangre de un individuo alérgico, hemos visto un desequilibrio con una mayor proporción de Th2 y, por consiguiente, una disminución de células Th1. Como ya hemos comentado, las células Th2 van a ser responsables de respuestas mediadas por anticuerpos (incluida la IgE de las respuestas inflamatorias alérgicas) y van a activar a las células B, de ahí que haya también una mayor proporción de los linfocitos CD19 y por consiguiente de las células B₂ que son las encargadas de producir anticuerpos específicos de gran afinidad para el alérgeno. Las células NK disminuyen en sangre lo que nos hace pensar que en alergia no son los actores principales y se necesita una respuesta más específica.

Sin embargo, en la conjuntiva de alérgicos encontramos un perfil muy similar al de conjuntivas sanas. Si lo comparamos con los datos sistémicos (sangre), en conjuntiva aumentan los subtipos Th1, Th22, T memoria, NKT y B₁. Lo que nos lleva a pensar que en alérgicos prevalecen algunas condiciones propias de una conjuntiva sana.

Las características regionales propias de esta patología se resumirían como el aumento de células B₂ y CD4 totales. Al contrario de lo apreciado en individuos sanos, donde CD4 era menos frecuente que CD8, en la conjuntiva de individuos alérgicos los linfocitos CD4 son mayoritarios frente a los CD8. Este aumento de CD4, puede estar asociado al incremento del subtipo B₂, productoras de anticuerpos de alta especificidad. No se aprecia en el individuo estudiado el incremento esperable de células Th2 conjuntivales (que si se detectó en sangre); pensamos que puede tratarse de un caso aislado y hay que aumentar –claramente- el número de sujetos alérgicos en estudio; pero sabemos que le hemos estudiado en un momento sin “brote” alérgico estacional, y que el incremento de células con un perfil más inmunorregulador (B₁, NKT, Th22 entre otras) tuvieron a las Th2 bajo control. Otra posible explicación de esta aparente contradicción es que en nuestro análisis de células Th2, no se ha analizado (por imposibilidad técnica) la síntesis intracelular de IL-4, que es el parámetro más universalmente utilizado, sino presencia de receptores de quimiocinas de superficie.

Finalmente, las células NK CD56^{dim}CD16⁺ (citotóxicas) parecen más abundantes en alérgicos que en conjuntivas de individuos sanos.

Todas estas teorías necesitan estudiarse más a fondo y podrían variar en mayor o menor grado ya que nuestro número de participantes es todavía muy reducido y en la mayor parte de los casos mencionados en el estudio las diferencias entre subpoblaciones no alcanzan significación estadística.

6. CONCLUSIONES

1. Hemos sido capaces de caracterizar fenotípicamente los distintos tipos y subtipos de linfocitos T, B y NK tanto en sangre periférica como “intraepiteliales” de la conjuntiva tarsal en sujetos sanos e individuos con patología alérgica.
 - Hemos encontrando que la distribución relativa de las distintas subpoblaciones linfocitarias concuerda mayoritariamente con estudios previos tanto en sangre periférica, como en los IELs conjuntivales. La única salvedad es la menor proporción de Th2 obtenida en conjuntiva alérgica, contraria a lo descrito previamente.
 - Para muchos subtipos linfocitarios de la conjuntiva, los datos obtenidos son pioneros y no se han podido contrastar con estudios previos, por no existir.
2. Hemos sido capaces de comparar y correlacionar el fenotipo linfocitario sistémico (sangre) con el regional (conjuntival) encontrando diferencias, que en algunos casos estaban ya descritas para otras mucosas (aumento de células TCR $\gamma\delta$ en GALT) y en otros casos han resultado completamente novedosas (aumento de linfocitos B₁ y Th1).
3. Podemos decir que tanto la edad, como el sexo y la patología de etiología alérgica son factores que influyen en las proporciones relativas de las subpoblaciones linfocitarias tanto en el sistema inmunitario sistémico (sangre) como regional (conjuntiva). Si bien, las diferencias en muchos casos no alcanzan significación estadística, dado el escaso número de sujetos analizados.
4. Con los resultados obtenidos, podríamos postular posibles marcadores diagnósticos, como por ejemplo:
 - En pacientes con alergia se aprecia en sangre un predominio de Th2 sobre Th1 junto con una disminución de NK y aumento de los linfocitos B. Si se diagnosticara mediante brush conjuntival, la inversión de CD4/CD8 junto con un aumento de las CD4 efectoras/memoria (CD45R0), Th1 y linfocitos B totales podrían ser útiles.
 - En el caso de la dermatitis atópica, sólo detectamos en sangre un aumento de Th1 con respecto a los sujetos sanos; es muy precipitado sacar conclusiones para un diagnóstico diferencial.

Este TFM se ha desarrollado en el marco de un proyecto amplio; ha servido como puesta a punto del estudio de las diferentes subpoblaciones linfocitarias. En el contexto de este proyecto, hay que aumentar la n tanto de sujetos sanos, como de pacientes 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.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat* 2005; 206:271–85.
2. Knop N, Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *InvestOphthalmol Vis Sci* 2000; 41:1270–9.
3. Kessing SV (1968) Mucous gland system of the conjunctiva. A quantitative normal anatomical study. *ActaOphthalmol (Copenh) Suppl* 95: 91+
4. Knop E, Knop N. A functional unit for ocular surface immune defense formed by the lacrimal gland, conjunctiva and lacrimal drainage system. *AdvExpMed Biol.* 2002; 506:835–44.
5. Darrell RW (1985) Follicular conjunctivitis. In: Darrell RW, editor. *Viral Diseases of the Eye*. Philadelphia: Lea &Febiger. pp. 296–311.
6. Pabst R, Westermann J. Lymphocyte traffic to lymphoid and non-lymphoid organs in different species is regulated by several mechanisms. In: Hamann A, editor. *Adhesion Molecules and Chemokines in Lymphocyte Trafficking*. Amsterdam: HarwoodAcademicPublishers; 1997. pp. 21–37.
7. Kraal G, Mebius RE. High endothelial venules: lymphocyte traffic control and controlled traffic. *Adv Immunol.*1997;65:347–395.
8. Knop N, Knop E. Ultrastructural anatomy of CALT follicles in the rabbit reveals characteristics of M-cells, germinal centres and high endothelial venules.*Journal of Anatomy* 2005;207(4):409-426.
9. Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Archives of ophthalmology* 2012;130(1):90-100.
10. Reinoso R, Martín-Sanz R, Martino M, Mateo ME, Blanco-Salado R, Calonge M, Corell A. Topographical distribution and characterization of epithelial cells and intra epithelial lymphocytes in the human ocular mucosa. *MucosalImmunol.* 2012;5:455-67.
11. 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.
12. Azari AA, Barney NP. Conjunctivitis: A Systematic Review of Diagnosis and Treatment. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2013;310(16):1721-1729. doi:10.1001/jama.2013.280318.
13. Calonge M. Classification of ocular atopic/allergic disorders and conditions: an unsolved problem. *Acta Ophthalmol Scand Suppl.* 1999;(228):10
14. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development.*J AllergyClinImmunol.* 2013 Apr;131(4):959-71.
15. Mabbott NA, Gray D. Identification of co-expressed gene signatures in mouse B1, marginal zone and B2 B-cell populations. *Immunology.* 2014;141(1):79-95. doi:10.1111/imm.12171.
16. Solana R, Campos C, Pera A, Tarazona R. Shaping of NK cell subsets by aging. *CurrOpinImmunol.*2014 Aug;29:56-61.

17. E.O. Long, H.S. Kim, D. Liu, M.E. Peterson, S. Rajagopalan. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *AnnuRevImmunol*, 31 (2013), pp. 227–258.
18. C. Campos, A. Pera, B. Sanchez-Correa, C. Alonso et al. Effect of age and CMV on NK cell subpopulations. *ExpGerontol*, 54 (2014), pp. 130–137.
19. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG..NKT cells: facts, functions and fallacies. *ImmunolToday* (2000) 21(11):573–83.10.1016/S0167-5699(00)01735-7.
20. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *AnnuRevImmunol*2010;28:445–489.
21. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *AnnuRevImmunol*1994;12:227–257.
22. Zhu J. Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation. *Immunology and cell biology*. 2010;88(3):244-249. doi:10.1038/icb.2009.114.
23. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*2010;115:335–343.
24. Oukka M. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Ann RheumDis*2008;67:26–29.
25. Cosmi, L., Maggi, L., Santarasci, V., Liotta, F. and Annunziato, F. (2014), T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry*, 85: 36–42. doi: 10.1002/cyto.a.22348
26. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annualreview of immunology*. 2010;28:445-489. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212.
27. Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, Jabeen R, McKinley C, Ahyi AN, Han L, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *NatImmunol*2010;11:527–534.
28. Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol*2009;183:7169–7177.
29. Wolff MJ, Leung JM, Davenport M, Poles MA, Cho I, Loke P (2012) T_H17, T_H22 and T_{Reg} Cells Are Enriched in the Healthy Human Cecum. *PLoS ONE* 7(7): e41373.
30. Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Molecular Vision*. 2010;16:862-873.
31. Martínez-Osorio H, Calonge M, Corell A, et al. Characterization and short-term culture of cells recovered from human conjunctival epithelium by minimally invasive means. *Molecular Vision*. 2009;15:2185-2195.
32. Andreu-Ballester JC¹, García-Ballesteros C, Benet-Campos C, Amigó V, Almela-Quilis A, Mayans J, Ballester F. Values for $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in healthy adult subjects: assessment by age and gender. *Cytometry B Clin Cytom*. 2012 Jul;82(4):238-44.
33. Ferrando-Martínez S, Ruiz-Mateos E, Hernández A, et al. Age-related deregulation of naive T cell homeostasis in elderly humans. *Age*. 2011;33(2):197-207. doi:10.1007/s11357-010-9170-8.

34. Sakata-Kaneko S, Wakatsuki Y, Matsunaga Y, Usui T, Kita T. Altered Th1/Th2 commitment in human CD4⁺ T cells with ageing. *Clinical and Experimental Immunology*. 2000;120(2):267-273. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01224.x.
35. Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, et al. NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Experimental Gerontology*. 1999;34(2):253–265.
36. DelaRosa O¹, Tarazona R, Casado JG, Alonso C, Ostos B, Peña J, Solana R. Valpha24+ NKT cells are decreased in elderly humans. *Exp Gerontol*. 2002 Jan-Mar;37(2-3):213-7.
37. Augustin A¹, Kubo RT, Sim GK. Resident pulmonary lymphocytes expressing the gamma/delta T-cell receptor. *Nature*. 1989 Jul 20;340(6230):239-41.
38. Lambiase A¹, Normando EM, Vitiello L, Micera A, Sacchetti M, Perrella E, Racioppi L, Bonini S, Bonini S. Natural killer cells in vernal keratoconjunctivitis. *Mol Vis*. 2007 Aug 30;13:1562-7.
39. 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.
40. 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. doi:10.1186/ar3486.
41. Ginaldi L¹, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto F, Modesti M, Quagliano D. Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis. *Am J Hematol*. 2001 Jun;67(2):63-72.
42. Metz DP¹, Bacon AS, Holgate S, Lightman SL. Phenotypic characterization of T cells infiltrating the conjunctiva in chronic allergic eye disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Sep;98(3):686-96.
43. Leonardi A¹, DeFranchis G, Zancanaro F, Crivellari G, De Paoli M, Plebani M, Secchi AG. Identification of local Th2 and Th0 lymphocytes in vernal conjunctivitis by cytokine flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Nov;40(12):3036-40.
44. Farrell AM¹, Antrobus P, Simpson D, Powell S, Chapel HM, Ferry BL. A rapid flow cytometric assay to detect CD4+ and CD8+ T-helper (Th) 0, Th1 and Th2 cells in whole blood and its application to study cytokine levels in atopic dermatitis before and after cyclosporin therapy. *Br J Dermatol*. 2001 Jan;144(1):24-33.

ANEXO 1 - 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 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.

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

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)

ANEXO 2 - Criterios de Inclusión/Exclusión

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.
- 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.

Para pacientes con alergia ocular:

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.
- 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 3 - Cuaderno de recogida de datos

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

Patología:

Queratoconjuntivitis vernal

Queratoconjuntivitis atópica

Conjuntivitis alérgica

Diagnosticado (Prick test)

Dermatophagoides pteronyssinus

Soja

Lolium perenne

Aspergillus fumigatus

Dermatophagoides farinae

Avellana

Phleum pratense

Alternaria alternata

Gato

Gambas

Poa pratensis

Anisakis

Perro

Kiwi

Abeja (veneno)

Betula verrucosa

Clara de huevo

Melocotón

Avispa (veneno)

Olea europea

Leche de vaca

Lentejas

Cucaracha

Ambrosia artemisiifolia

Bacalao

Garbanzos

Látex

Artemisa vulgaris

Trigo

Dactylis glomerata

Cladosporium herbarum

Parietaria judaica

Cacahuete

Otros:

Sujeto Control:

Nº muestra:

Paciente:

Nº historia:

Edad:

Sexo: V M

Raza:

Fecha de recogida:

Lugar de recogida:

Ojo:

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: al 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.deBehçet 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, cómo por ejemplo cirugía refractiva?

SÍ NO

Especifique cuál.

4. ¿Está con algún tratamiento tópico ocular?(incluyendo 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 hora 5 horas 5- horas Más de horas

Test OSDI-Ojo Seco

El Test OSDI (ocular surfacediseaseindex) es un test sencillo creado para establecer una gravedad y clasificación del ojo seco según su sintomatología.

Conteste a las siguientes preguntas marcando la casilla que mejor represente su respuesta:

¿Ha experimentado alguna de las siguientes alteraciones durante la última semana?

	FRECUENCIA				
	En todo momento	Casi en todo momento	El 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento
Sensibilidad a la luz					
Sensación de arenilla en los ojos					
Dolor de ojos					
Visión borrosa					
Mala visión					

¿Ha tenido problemas en los ojos que le han limitado o impedido realizar alguna de las siguientes acciones durante la última semana?

	FRECUENCIA					
	En todo momento	Casi en todo momento	El 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	No Se
Leer						
Conducir de noche						
Trabajar con un ordenador o utilizar un cajero automático						
Ver la televisión						

¿Ha sentido incomodidad en los ojos en alguna de las siguientes situaciones durante la última semana?

	FRECUENCIA					
	En todo momento	Casi en todo momento	El 50% del tiempo	Casi en ningún momento	En ningún momento	No Se
Viento						
Lugares con baja humedad (muy secos)						
Zonas con aire acondicionado						

Puntuación total OSDI:

TOMA DE MUESTRA

Oftalmólogo/óptico:

1. LÁGRIMA	- Fecha y hora de recogida:
	- Fecha y hora del análisis:

(2 capilares = 4µL de cada ojo)

2. **TBUT:** seg.

3. **ANESTESIA TÓPICA**

4. **TEST SCHIRMER:** mm/5min

ANEXO 4 - Anticuerpos

		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 γ/δ -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	SFCI21Thy2D3	SFCI12T4D11	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: Milteyi Biotec (Auburn CA, USA). FITC: Fluoroisotiocianato de Fluoresceína, PE: Ficoeritrina, ECD: Ficoeritrina-Texas Red-X, APC: Alofocianina.

ANEXO 5 - Citometría

TUBO 1 - Tc, Th y Estado Madurativo

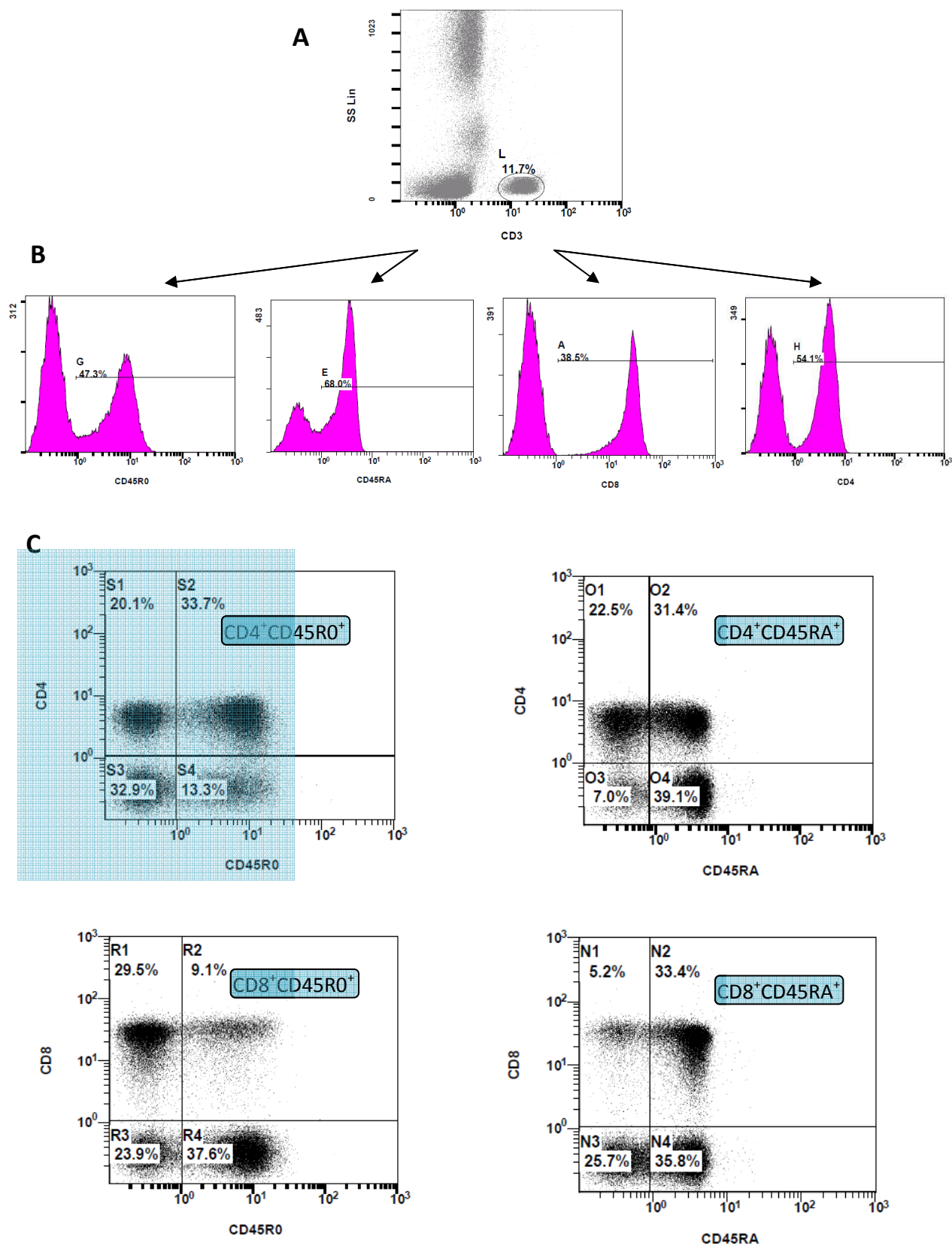


Figura 5. Dot plots e histogramas para la citometría de flujo del tubo 1. **A)** Side scatter (SS) frente a CD3, gate en L para seleccionar los linfocitos CD45⁺CD3⁺. **B)** Histogramas obtenidos para el tubo 1: CD45RA, CD45R0, CD8 y CD4. **C)** Separación de CD4 y CD8 en células vírgenes (CD45RA) y memoria (CD45R0).

TUBO 2 - Linfocitos T Cooperadores

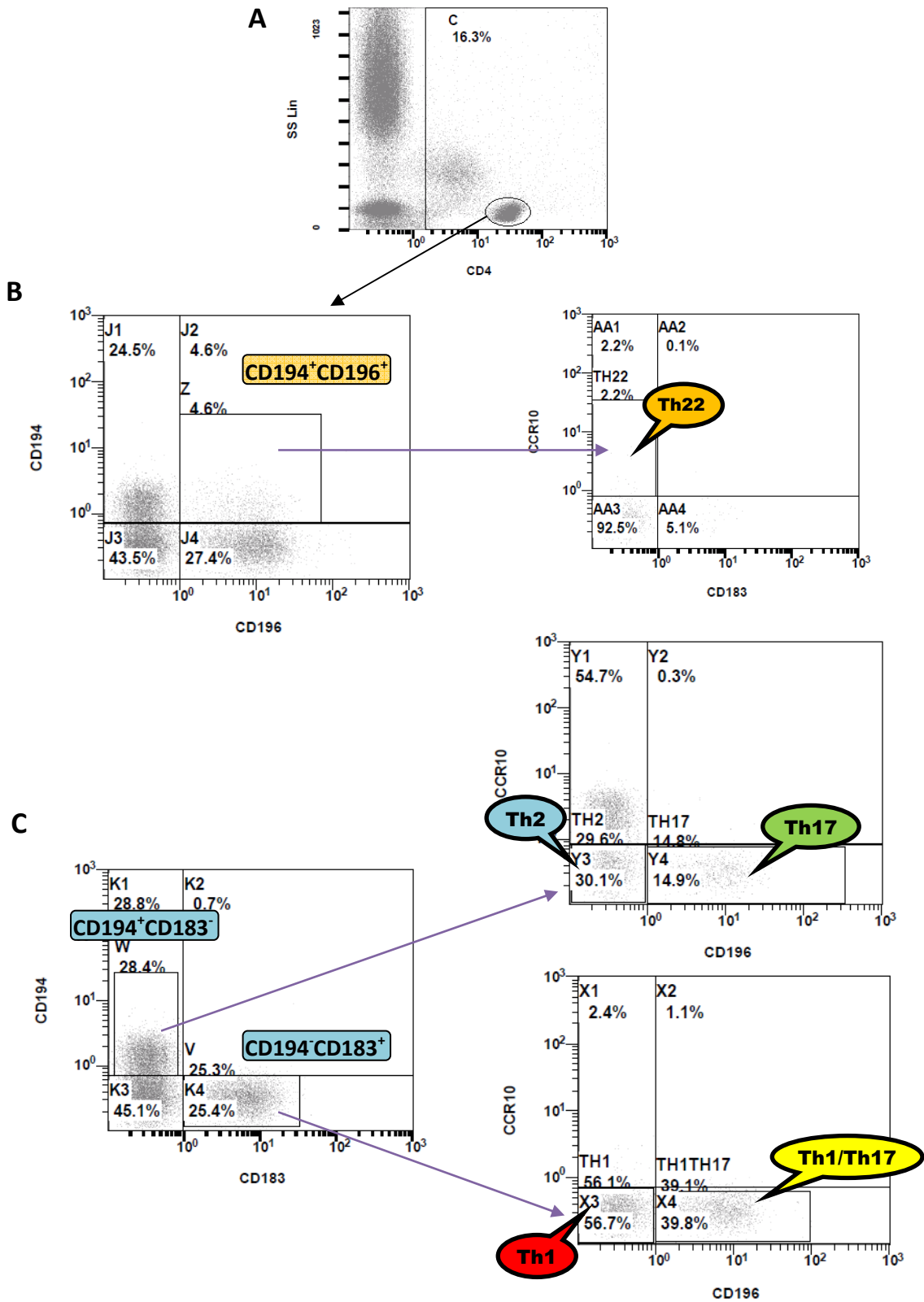


Figura 6. Dot plots para la citometría de flujo del tubo 2. **A)** Side scatter (SS) frente a CD4, gate para seleccionar los linfocitos CD45⁺CD4⁺. **B)** Gate "z" para seleccionar los linfocitos Th22 (CD196⁺CD194⁺CD183⁻CCR10⁺) **C)** Gate "w" para seleccionar Th2 (CD194⁺CD183⁻CD196⁻CCR10⁺), Th17 (CD194⁺CD183⁻CD196⁺CCR10⁺) y gate "v" para seleccionar Th1 (CD194⁻CD183⁺CD196⁻CCR10⁺) y Th1/Th17 (CD194⁻CD183⁺CD196⁺CCR10⁺)

TUBO 3 - Linfocitos T Reguladores

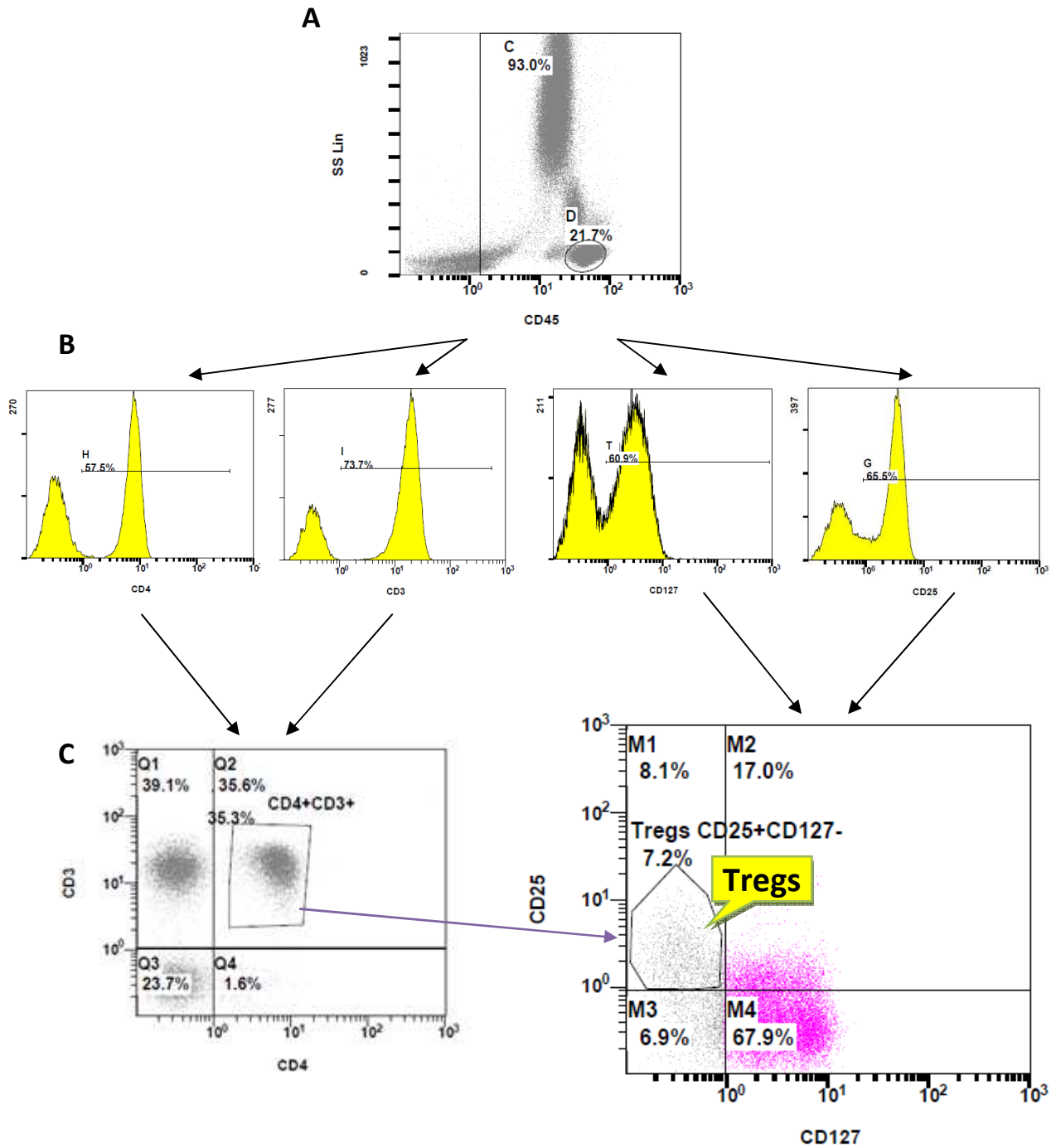


Figura 7. Dot plots e histogramas para la citometría de flujo del tubo 3. **A)** Side scatter frente a CD45, gate en D para seleccionar los linfocitos CD45⁺ **B)** Histogramas obtenidos para el tubo 3: CD4, CD3, CD127 y CD25. **C)** Gating para seleccionar los linfocitos CD3⁺CD4⁺ y de ahí obtener el porcentaje de Tregs (CD25⁺CD127⁻).

TUBO 4 - NK y NKT

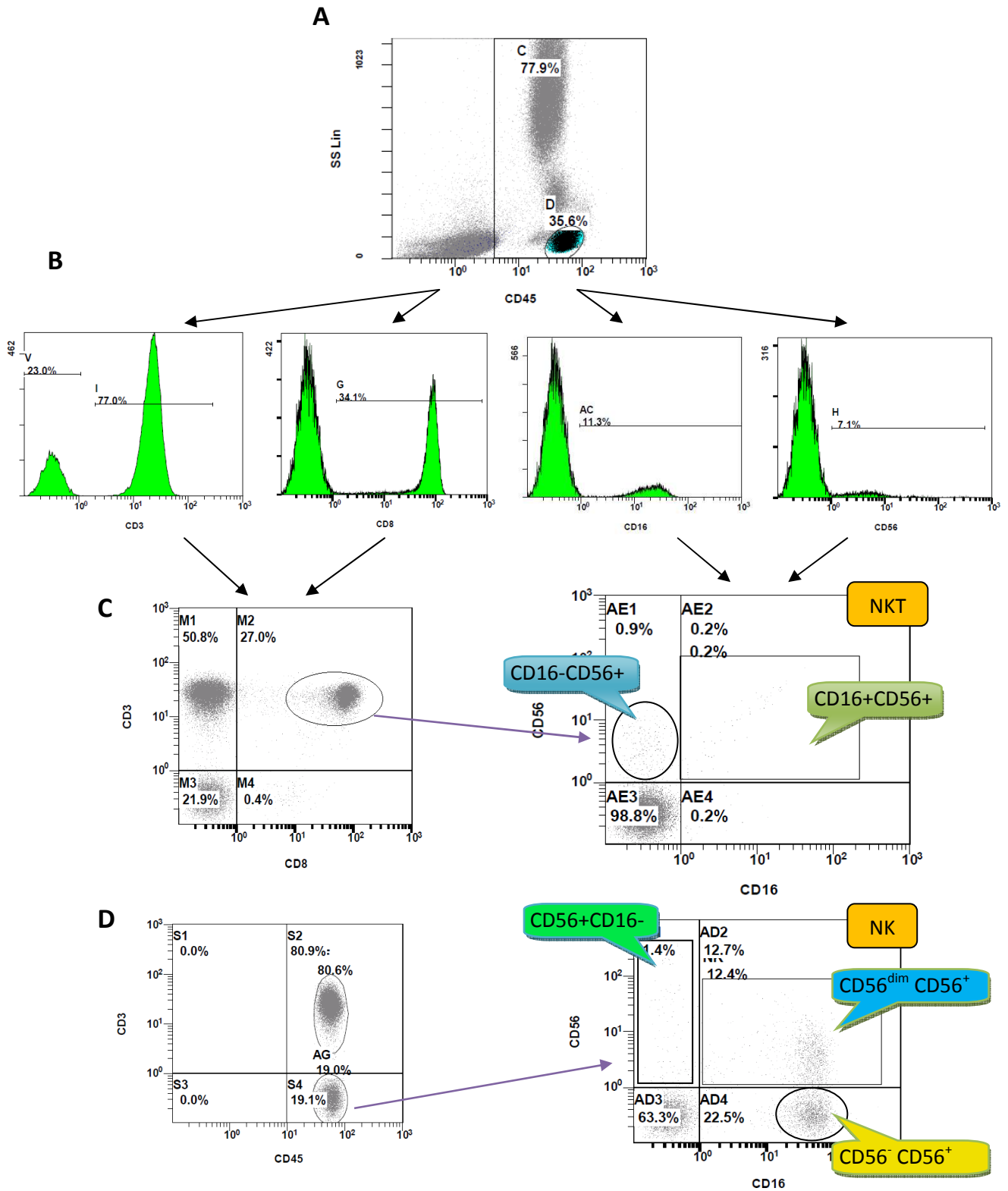


Figura 8. Dot plots e histogramas para la citometría de flujo del tubo 4. **A)** Gate en D para seleccionar los linfocitos CD45⁺ **B)** Histogramas obtenidos para el tubo 4: CD16, CD8, CD3 y CD56. **C)** Gating para seleccionar los linfocitos CD3⁺CD8⁺ (izquierda) y obtener los NKT, dos subpoblaciones: CD16⁻CD56⁺ y CD16⁺CD56⁺ (derecha) **D)** Gating para seleccionar los linfocitos CD3⁻ (izquierda) y obtener los NK, tres subpoblaciones CD56^{dim}CD56⁺ y CD56⁻CD56⁺ con función citotóxica y CD56⁺CD16⁻ con función reguladora.

TUBO 5 - Linfocitos B y TCR $\gamma\delta$

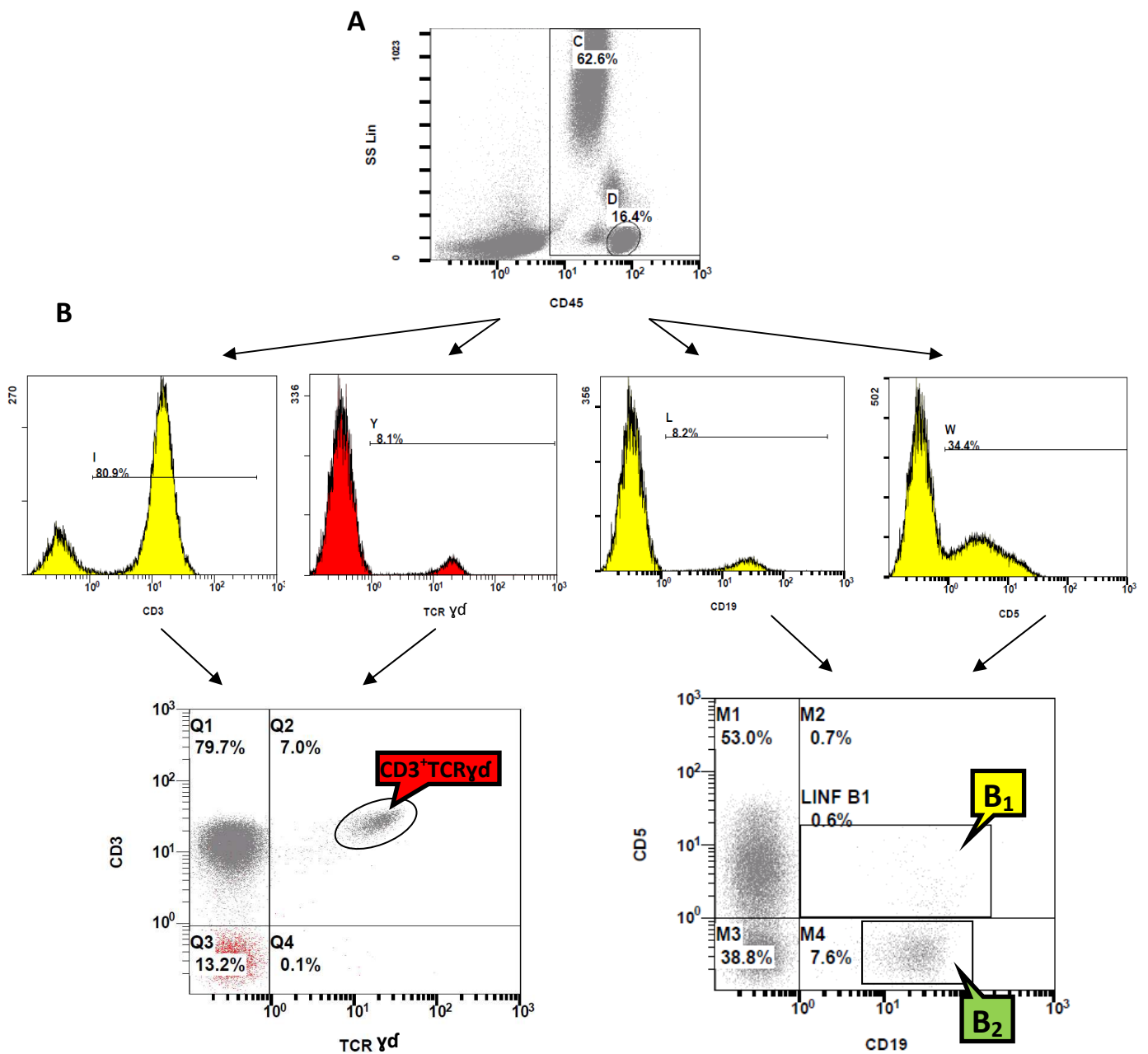


Figura 9. Dot plots e histogramas para la citometría de flujo del tubo 5. **A)** Gate en D para seleccionar los linfocitos CD45⁺ **B)** Histogramas obtenidos para el tubo 5: CD19, TCR $\gamma\delta$, y CD3. **C)** Gating para seleccionar las subpoblaciones de linfocitos B (CD19⁺), B₁ (CD5⁺) y B₂ (CD5⁺).

Anexo 6 - Análisis estadístico

Para el análisis estadístico usamos la versión 18.0 del software IBM SPSS Statics. Se realizó un estudio descriptivo de los resultados y pruebas no paramétricas para n<30. Prueba de Mann Whitney para muestras no relacionadas y Análisis de correlación de Pearson para muestras relacionadas.

Mann Whitney- Estadísticos de contraste - Valores para sangre de sujetos control agrupados por sexo

	CD3	CD4	CD8	TREGS	TH1	TH1/17	TH2	TH17	TH22	NK	NKT	CD19	B1	B2	TCR	CD4RA	CD4R0	CD8RA	CD8R0	NK_CD56 CD16	NK CD16	NK CD56	NKT_CD56 CD16	NKT CD56
U de Mann-Whitney	2,00	3,00	2,00	3,00	2,00	4,00	0,00	2,00	0,00	4,00	3,50	3,00	1,50	3,00	3,00	2,00	3,00	3,00	3,00	2,00	4,00	2,00	2,00	1,00
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,533	,800	,533	,800	,533	1,00	,133	,533	,133	1,00	,800	,800	,267	,800	,800	,533	,800	,800	,800	,533	1,000	,533	,533	,267

Mann Whitney- Estadísticos de contraste - Valores para sangre de sujetos control agrupados por edad

	CD3	CD4	CD8	TREGS	TH1	TH1/17	TH2	TH17	TH22	NK	NKT	CD19	B1	B2	TCR	CD4RA	CD4R0	CD8RA	CD8R0	NK_CD56 CD16	NK CD16	NK CD56	NKT_CD56 CD16	NKT CD56
U de Mann-Whitney	5,00	0,00	4,00	4,00	1,00	6,00	4,50	4,00	4,00	4,00	0,00	6,00	1,00	6,00	4,00	4,00	6,00	4,00	0,00	4,00	4,00	1,00	2,00	0,00
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,857	,071	,643	,643	,143	1,000	,643	,643	,643	,643	,071	1,000	,143	1,000	,643	,643	1,000	,643	,071	,643	,643	,143	,286	,071

Análisis de correlación de Pearson - Valores para de sujetos control agrupado por muestra (Sangre vs Brush)

	CD3	CD4	CD8	TREGS	TH1	TH1/17	TH2	TH17	TH22	NK	NKT	CD19	B1	B2	TCR	CD4RA	CD4R0	CD8RA	CD8R0	NK_CD56 CD16	NK CD16	NK CD56	NKT_CD56 CD16	NKT CD56
C. de Pearson	,007	,047	-,526	,882	-,963	,332	-,939	-,281	-,495	,979	,473	-,936	,771	-,623	,989	,973	-,175	-,444	-,282	-,279	,723	-,726	,363	-,487
Sig. (bilateral)	,996	,970	,647	,312	,173	,784	,224	,819	,670	,131	,686	,230	,439	,572	,096	,148	,888	,707	,818	,820	,486	,483	,764	,676
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Anexo 7 - Valores en sangre

Tabla 4 * Valor medio \pm Desviación típica (Valor Mínimo - Valor Máximo)

VALORES EN SANGRE PARA INDIVIDUOS SANOS		
FENOTIPO	DESCRIPCIÓN	PORCENTAJE*
CD3 ⁺	Linfocitos T	76,85 \pm 4,80 (69,23 - 85,67)
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	Linfocitos T _h	45,08 \pm 6,05 (37,40 - 57,50)
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	Linfocitos T _c	31,43 \pm 5,59 (22,90 - 37,10)
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /CD127 ⁻	Linfocitos T reguladores	1,97 \pm 0,54 (1,42 - 3,03)
CD4 ⁺ /CD183 ⁺ /CD194 ⁻ /CD196 ⁻	Th1	8,55 \pm 3,15 (3,83 - 13,02)
CD4 ⁺ /CD183 ⁺ /CD194 ⁻ /CD196 ⁺	Th17/Th1	3,65 \pm 1,69 (1,54 - 6,16)
CD4 ⁺ /CD183 ⁻ /CD194 ⁺ /CD196 ⁻	Th2	3,41 \pm 0,73 (0,49 - 4,68)
CD4 ⁺ /CD183 ⁻ /CD194 ⁺ /CD196 ⁺	Th17	1,19 \pm 0,73 (0,36 - 2,32)
CD4 ⁺ /CD183 ⁻ CD194 ⁺ CD196 ⁺ CCR10 ⁺	Th22	0,10 \pm 0,07 (0,01 - 0,20)
CD3 ⁺ /CD56 ⁺ /CD16 ⁺	Linfocitos NK	11,09 \pm 4,06 (5,25 - 16,71)
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD56 ⁺ /CD16 ⁺	Linfocitos NKT	0,45 \pm 0,21 (0,31 - 1,24)
CD19 ⁺	Linfocitos B	10,75 \pm 3,06 (7,30 - 15,20)
CD19 ⁺ /CD5 ⁺	Linfocitos B1	0,44 \pm 0,20 (0,20 - 0,70)
CD19 ⁺ /CD5 ⁻	Linfocitos B2	10,31 \pm 2,99 (7,00 - 14,50)
CD3 ⁺ /TCR $\gamma\delta$ ⁺	Linfocitos TCR $\gamma\delta$	3,35 \pm 2,50 (1,30 - 8,00)
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD45RA ⁺	Th vírgenes	30,25 \pm 6,73 (19,20 - 41,88)
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD45RO ⁺	Th memoria	23,16 \pm 6,50 (12,06 - 33,30)
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD45RA ⁺	Tc vírgenes	22,25 \pm 5,35 (12,17 - 27,41)
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD45RO ⁺	Tc memoria	7,21 \pm 3,57 (3,34 - 15,17)
CD3 ⁻ /CD56 ^{DIM} /CD16 ⁺	NK CD56 ^{DIM} CD16 ⁺	3,17 \pm 1,49 (1,24 - 5,65)
CD3 ⁻ /CD56 ⁻ /CD16 ⁺	NK CD56 ⁻ CD16 ⁺	7,45 \pm 3,84 (2,96 - 12,48)
CD3 ⁻ /CD56 ⁺ /CD16 ⁻	NK CD56 ⁺ CD16 ⁻	0,46 \pm 0,56 (0,12 - 1,80)
CD3 ⁺ /CD56 ⁺ /CD16 ⁺	NKT CD56 ⁺ CD16 ⁺	0,16 \pm 0,07 (0,03 - 0,25)
CD3 ⁺ /CD56 ⁺ /CD16 ⁻	NKT CD56 ⁺ /CD16 ⁻	0,29 \pm 0,17 (0,08 - 0,51)

Anexo 8 - Tabla de resultados

edad	sexo	CD3	CD4	CD8	TREG	TH1	TH1/ TH17	TH2	TH17	TH22	NK	NKT	CD19	B1	B2	TCR	CD4RA	CD4R0	CD8RA	CD8R0	NK CD56 ^{DIM} CD16 ⁺	NK CD56 ⁻ CD16 ⁺	NK CD56 ⁺ CD16 ⁻	NKT CD56 ⁺ CD16 ⁺	NKT CD56 ⁺ CD16 ⁻	Patol.
30	H	82,33	42,10	38,40	1,46	4,69	2,42	5,93	1,10	0,08	2,45	0,19	15,40	0,70	14,70	3,10	28,46	16,86	33,92	4,12	0,50	1,82	0,13	0,09	0,09	A
24	H	75,77	43,20	34,80	1,60	12,02	2,13	4,32	0,86	0,05	15,67	0,48	7,30	0,30	7,00	1,30	28,54	23,11	23,78	7,73	2,87	12,48	0,24	0,21	0,27	S
25	H	73,30	57,50	22,90	1,84	7,78	5,46	4,68	2,32	0,05	7,37	0,74	15,20	0,70	14,50	1,50	34,72	29,14	12,17	5,42	2,61	2,96	1,80	0,25	0,49	S
26	H	69,23	43,40	24,70	1,42	8,60	3,95	3,46	0,78	0,11	16,71	0,47	12,70	0,30	12,40	4,60	28,06	23,06	16,33	6,30	4,55	11,86	0,30	0,12	0,35	S
26	H	85,67	46,10	34,30	3,03	3,83	3,13	3,24	0,36	0,04	5,25	0,36	7,60	0,40	7,20	8,00	41,88	12,06	27,41	3,34	1,58	3,50	0,18	0,21	0,15	S
26	M	79,53	44,00	34,10	1,29	12,47	2,70	2,65	1,00	0,10	10,49	0,38	10,50	1,10	9,40	3,90	25,07	26,95	26,49	7,22	0,82	9,47	0,16	0,03	0,35	DA
21	M	80,10	44,60	37,10	1,89	5,34	1,54	2,80	1,88	0,20	10,83	0,72	8,30	0,70	7,60	2,70	33,54	18,38	26,34	5,14	5,65	4,66	0,53	0,21	0,51	S
25	M	77,23	48,30	27,20	1,67	7,52	6,16	2,60	1,86	0,17	8,15	0,47	14,20	0,60	13,60	1,40	19,20	33,30	21,70	6,20	2,82	5,00	0,31	0,11	0,36	S
58	M	77,37	40,10	34,10	2,55	13,02	2,15	2,95	0,44	0,01	11,16	0,11	11,30	0,20	11,10	1,60	25,66	25,47	24,45	15,17	1,24	9,80	0,12	0,03	0,08	S
60	M	76,10	37,40	36,30	1,73	10,29	4,69	3,24	1,01	0,15	13,57	0,25	9,40	0,30	9,10	5,70	30,42	20,78	25,81	8,37	4,00	9,36	0,19	0,14	0,11	S

edad	sexo	CD3	CD4	CD8	TREGS	TH1	TH1/17	TH2	TH17	TH22	NK	NKT	CD19	B1	B2	TCR	CD4RA	CD4R0	CD8RA	CD8R0	NK CD56 ^{DIM} CD16 ⁺	NK CD56 ⁻ CD16 ⁺	NK CD56 ⁺ CD16 ⁻	NKT CD56 ⁺ CD16 ⁺	NKT CD56 ⁺ CD16 ⁻	Patol.
30	H	71,57	50,2	22,7	2,76	20,26	9,55	0,28	0,8	1,79	7,67	4,17	20,5	4,7	15,8	59,1	29,68	36,82	27,05	17,75	3,95	2,31	1,43	1,1	3,07	A
25	H	82,27	33	47,8	2,73	11,06	8,13	0,08	1,14	1,99	4,87	17,15	12,1	6,6	5,5	46,8	14,03	25,23	49,69	20,07	2,07	2,8	0	10,96	6,19	S
26	H	81,17	42,6	40	3,72	15,38	6,06	0,48	1,82	0,48	2,37	6,1	13,3	6,3	7	68	25,09	28,03	41,96	12,15	1,19	0,32	0,86	0,35	5,75	S
60	M	78,63	31,5	46,4	1,58	3,85	4,05	0,34	0,34	0,34	8,06	15	13,5	4,2	9,3	57,7	11,95	11,95	51,27	10,22	0,96	4,18	2,89	5,62	9,39	S

