

**DETERMINACION DE LA RESPUESTA INMUNE POR CITOMETRIA DE  
FLUJO EN SANGRE PERIFERICA EN PACIENTES CON PSORIASIS**



**JEMID GASCA VARGAS.  
HENRY NAVARRO HUELGAS.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2008**

DETERMINACION DE LA RESPUESTA INMUNE POR CITOMETRIA DE FLUJO  
EN SANGRE PERIFERICA EN PACIENTES CON PSORIASIS

JEMID GASCA VARGAS.  
HENRY NAVARRO HUELGAS.

Trabajo de grado como requisito  
parcial para optar al título profesional de Biólogo

DIRECTOR  
JULIO CESAR KLINGER HERNÁNDEZ,  
M.D Internista.; Esp. En Citometría de Flujo y  
Ms Sci. En Inmunología y Microbiología

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2008

**Nota de aceptación:**

---

---

---

**Director**

---

**JULIO CESAR KLINGER Dr.**

**Jurado**

---

**PATRICIA VELEZ M. Sc.**

**Jurado**

---

**HAROLD JOFRE BOLAÑOS Dr.**

Fecha de Sustentación: Popayán, Junio 24 de 2008

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por ser mi guía incondicional para lograr con éxito culminar una etapa más en nuestras vidas.*

*A nuestros padres, hermanos y parientes por su paciencia, respaldo colaboración y sobre todo el amor que nos brindaron para seguir adelante y no decaer en los momentos difíciles.*

*A nuestro director Dr. Julio Cesar Klinger en especial a la Bacterióloga Gloria Avila y al grupo de investigación de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Cauca por su apoyo, su amistad y enseñanzas.*

*A nuestros jurados, los profesores Patricia Vélez y Harold Bolaños por sus enseñanzas, tolerancia y colaboración.*

*A cada uno de los profesores del Departamento de Biología por ser guías en el transcurso de la carrera especialmente al profesor Silvio Carvajal.*

*A todas las personas que hacen parte de nuestra formación y que permitieron que lográramos culminar una etapa más en nuestra vidas.*

*Gracias.*

*“Sólo un exceso es recomendable en el mundo: el exceso de gratitud.”  
Jean de la Bruyère.*

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
SIGLAS .....	10
RESUMEN .....	11
INTRODUCCION .....	12
1. DEFINICION DEL PROBLEMA .....	13
1.1 Naturaleza y Magnitud del Problema .....	13
1.2 Definición del Problema de Investigación.....	13
2. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO .....	15
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 General.....	17
4.2 Específicos .....	17
5. MARCO TEÓRICO .....	18
5.1 Psoriasis.....	18
5.2 Histopatología .....	19
5.3 Fisiopatología .....	20
5.4 Inmunopatogenesis .....	22
5.5 Etiopatología .....	25
5.6 Sistema Inmune .....	26
5.6.1 Sistema inmune Inespecífico.....	28
5.6.2 Inflamación .....	29
5.6.3 La respuesta Inmune Adaptativa .....	29
5.6.3.1 Linfocitos T.....	30
5.6.3.2 Linfocitos B.....	31
5.6.4 Moléculas CD .....	33
5.6.5 Complejo Mayor de histocompatibilidad (MHC).....	33
5.7 Citometría de Flujo .....	34
5.7.1 Estructura Básica De Un Citómetro De Flujo.....	35
5.7.2 Ventajas de la Citometría de Flujo.....	35
6. ANTECEDENTES.....	37
7 MATERIALES Y METODOS.....	39

7.1 Tipo de Estudio .....	39
7.2 Parámetros de exclusión e Inclusión.....	39
7.3 Tamaño y selección de Población Objeto de Muestra .....	40
7.4 Toma de Muestras y Pruebas de Laboratorio .....	40
7.4.1 Conteo de leucocitos .....	41
7.4.2 Protocolo para Tinción de Superficie por Citometría de Flujo .....	41
7.5 Plan de Procesamiento y Análisis Estadístico.....	43
7.6 Consideraciones Éticas .....	44
8. DATOS Y RESULTADOS .....	45
10. CONCLUSION .....	52
BIBLIOGRAFIA.....	53

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla I. Genética de psoriasis.....	21
Tabla II. Fluorescencia utilizadas por Citometría de flujo.....	42
Tabla III. Comparación de sangre de piel y sangre circulante de pacientes.....	46
Tabla IV. Comparación de sangre periférica de pacientes y controles.....	48

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. <i>Psoriasis</i> .....	18
Figura 2. Tipos de <i>psoriasis</i> .....	19
Figura 3. Histología de las capas de la piel. ....	20
Figura 4. Mecanismo inmunológico de psoriasis 1 .....	23
Figura 5. Mecanismo inmunológico de Psoriasis 2 .....	24
Figura 6. Representación de los diferentes mecanismos de defensas.....	27
Figura 7. Células maduras del sistema inmune. ....	27
Figura 8. Fundamento de la CTF.....	35
Figura 9. Análisis celular en software (programa Cell Quest Pro) en 3D y 2D.....	36
Figura 10. Toma de muestra de la lesión.....	41
Figura 11. CTF. FACScalibur Becton Dickinson .....	43
Figura 12. Resultados de análisis por Citometría de flujo por Dot-Plot.....	45
Figura 13. Graficas de barras de comparación estadística de sangre de la lesión y sangre circulante de las personas con psoriasis.....	47
Figura 14 Grafica de barras de comparación estadística de sangre circulante de la población de estudio (personas con psoriasis) y la población control.....	48

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO I Consentimiento Informado.....	61
ANEXO II Anamnesis.....	64
ANEXO III Reporte de citometría por paciente.....	66

## SIGLAS

ADC: Conversor Análogo Digital

APC: Células presentadoras de antígeno (antigen presenting cells)

CD: Grupos de diferenciación (Clusters of Differentiation)

CMF: La Citometría de Flujo

CN: Condición Normal

FSC: Luz incidente (Forward Scatter)

HLA-DR: Antígenos leucocitarios o de histocompatibilidad humanos región D y R (human leukocyte-associated antigen).

IGA: Inmunoglobulina Tipo A

Md: Medicina

MHC I: Complejo mayor de histocompatibilidad clase I (Major Histocompatibility complex class I).

MHC II: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II (Major Histocompatibility complex class II).

NK: Células naturales asesinas (Natural Killer)

PBS: Buffer Fosfato Salino (Phosphato Buffer Salino)

PMN: Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (Polymorphonuclear leukocyte neutrophil)

SSC: Luz dispersada (Side Scatter)

TCR: Receptor de célula T (Receptor Cells T)

ACTH: Hormona adrenocorticotropa secretada por el lóbulo anterior de la hipófisis. Su función específica es estimular el crecimiento y las secreciones de la glándula suprarrenal

## RESUMEN

Psoriasis es una enfermedad inflamatoria de la piel, que afecta 2–3% de la población<sup>1,2</sup>, generalmente entre los 20 y 30 años de edad<sup>3</sup>, sus causas son desconocidas y no bien entendidas científicamente<sup>4</sup>, en su desarrollo está involucrado el sistema inmune, específicamente los linfocitos T de memoria que infiltran la dermis y epidermis, secretando citocinas en la lesión; existe susceptibilidad genética para padecer psoriasis<sup>4</sup>. Actualmente las investigaciones se han centrado en patologías de gran repercusión como: enfermedades cardiovasculares, SIDA, tuberculosis y cáncer, que opacan otras enfermedades que deterioran la calidad de vida, como la *psoriasis*<sup>1</sup>. El **objetivo** de este estudio fue conocer y comparar la actividad de sub-poblaciones de linfocitos T CD4+, T CD8+ y B1; en sangre circulante y de lesiones de pacientes con *psoriasis* y sangre periférica de individuos sanos in situ, por medio de Citometría de Flujo.

**Metodología** se incluyó como casos: 14 personas mayores de 18 años, con *psoriasis* en fase crónica en proceso de exacerbación, sin distinción de género y 12 personas sanas como controles, teniendo en cuenta parámetros de exclusión e inclusión; los procedimientos a seguir fueron: Previo consentimiento informado a la población del estudio, se le extrajo 3 mL de sangre periférica por venopunción y sangre de las placas psoriasicas por punción directa con un capilar (levantando la placa Psoriásica) y 3 mL de sangre periférica por venopunción a personas sanas. Las muestras se tiñeron con anticuerpos monoclonales fluorescentes en tres tubos de ensayo así:

Tubo 1: anti-CD4 PE / anti-CD8 FITC, tubo 2: anti-CD3 FITC / anti-HLA-DR PerCP, y Tubo 3: anti-CD5 PE / anti-CD19 FITC; finalmente, se paso la muestra por Citometría de flujo. El análisis de los datos se realizo por el paquete estadístico SPSS (Programa SPSS para Windows, versión 10. SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Por *t* Student y U de Man N-Witney.

**Resultados:** Los datos obtenidos indican que hay diferencias entre el inmunofenotipo de los pacientes con *psoriasis* versus el grupo control, con alta significancia estadística, así:

1. La relación CD4/CD8 fue mayor en el grupo de pacientes con *psoriasis*: (pacientes  $\bar{X} = 1.97$  vs sanos  $\bar{X} = 1.65$ ) ( $p = 0.002$ ), 2. La expresión de HLA-DR por los linfocitos T CD3 fue mayor en los pacientes con *psoriasis*: (pacientes  $\bar{X} = 14\%$  vs sanos  $\bar{X} = 9\%$ ) ( $p = 0.000$ ) y 3. El porcentaje de linfocitos B1 fue mayor en los enfermos de *psoriasis* (pacientes  $\bar{X} = 11\%$  vs sanos  $\bar{X} = 5\%$ ) ( $p = 0.000$ ).

En pacientes con *psoriasis* el inmunofenotipo de sangre periférica vs. el inmunofenotipo de las lesiones fue diferente, con alta significancia estadística; se encontró: mayor expresión de HLA-DR en sangre periférica (sangre  $\bar{X} = 14\%$  vs lesión  $\bar{X} = 11\%$ ) ( $p = 0.000$ ) y mayor porcentaje de linfocitos B1 en sangre periférica (sangre  $\bar{X} = 11\%$  vs lesión  $\bar{X} = 10\%$ ) ( $p = 0.001$ ). La relación CD4/CD8 fue mayor en sangre de la lesión (sangre  $\bar{X} = 1.97$  vs lesión  $\bar{X} = 2.14$ ) con significancia ( $p = 0.007$ ).

**Conclusión:** Existen diferencias en el inmunofenotipo de personas con *psoriasis*, siendo mayor la activación de linfocitos T (CD4+ - CD8+) a nivel local (piel) y mayor la presencia de linfocitos B1 a nivel sistémico en pacientes con *psoriasis* indicando hiperactivación del sistema inmune y presencia de autoinmunidad en comparación con individuos controles.

## INTRODUCCION

En medicina humana existen enfermedades complejas de difícil manejo, que están afectando a buena parte de la población y que aun no tienen cura, porque se desconoce o no se entienden sus causas y mecanismos básicos de inicio del desarrollo de la enfermedad. En este grupo están las enfermedades inmunológicas que son de dos tipos: por hipersensibilidad o alergia y las inmunodeficiencias<sup>5</sup>. El sistema inmune defectuoso puede destruir o dañar células y sustancias solubles normales o propias del individuo, lo cual induce enfermedades graves. Dentro de estas enfermedades, hay algunas que son comunes en la población mundial; como el lupus eritematoso, artritis, la diabetes tipo I, la esclerosis múltiple y la *psoriasis*<sup>6</sup>, esta última es tema y objeto del presente estudio.

## 1. DEFINICION DEL PROBLEMA

### 1.1 Naturaleza y Magnitud del Problema

La *psoriasis* es una enfermedad superficial inflamatoria que afecta el 2–3% de la población mundial<sup>7</sup>, de la cual el 1-3% padece de *psoriasis artrítica*<sup>8</sup>, por lo que es de gran consideración, ya que cualquier persona sin importar su origen puede ser afectada. En algunos países desarrollados como en el norte y este de Inglaterra la incidencia es del 1.7%; en USA se ha estimado en 0.67%<sup>1</sup>, sin embargo, los datos no son confiables, debido a la heterogeneidad de la enfermedad, así como la falta de criterio para el diagnóstico acertado, inclusive algunos casos se confunden con otras enfermedades como micosis y lepra<sup>9</sup>. En USA hay más de 7 millones de pacientes, 250,000 casos nuevos por año<sup>3</sup>. En México, es una de las 15 enfermedades de la piel más frecuentes<sup>10</sup>. Aunque se presenta entre los 20 y los 30 años<sup>3</sup>, la incidencia del género es por igual<sup>11</sup>, la predisposición genética parece ser un facilitador importante en la expresión de la patología<sup>12</sup>. Aproximadamente un tercio de los afectados tienen por lo menos a un pariente de primer grado con la enfermedad<sup>13</sup>.

### 1.2 Definición del Problema de Investigación

La *psoriasis* es una enfermedad crónica de la piel, común y enigmática que puede transmitirse genéticamente con la expresión del fenotipo confinado<sup>3,14</sup>. Clínicamente, la *psoriasis* es considerada una enfermedad de la piel, aún desconocida y no muy bien entendida en el mundo científico<sup>15</sup>, actualmente las investigaciones se han centrado en patologías infecciosas de gran repercusión;

como SIDA, tuberculosis entre otras, que son enfermedades que día a día cobran más víctimas, dejando a un lado otras patologías implicadas en el deterioro de calidad de vida<sup>1,16</sup>.

Esta enfermedad de la piel, afecta la autoestima. Los enfermos de *psoriasis* tienden a padecer baja autoestima y deterioro de su imagen, permanecen deprimidas y ansiosas, viven en un ambiente diario de vergüenza, culpa, turbación, y miedo de pensar en ser “sucio e infeccioso” y algunas veces hasta contemplan el suicidio<sup>1,17</sup>. El nivel de estigmatización que ellos experimentan es mayor que el de personas con otras enfermedades. La enfermedad no es fatal; sin embargo, produce gran impacto psicosocial y discapacidad, sumados a los gastos que origina.

Otra gran dificultad que enfrentan los pacientes<sup>i</sup> con *psoriasis* es la falta de tratamiento efectivo, porque se desconocen los factores inmunológicos que la estimulan. Además muchas terapias se asocian con toxicidad acumulativa significativa<sup>11</sup>.

Debido a que se desconoce, que expresión de linfocitos B1 y T en piel y sangre circulante puede ser diferente, se busca un perfil determinado de expresión inmunológica para la *psoriasis*. Para ello, se formula como **primera pregunta de investigación**; ¿Que notables diferencias podemos encontrar en el comportamiento inmunológico de linfocitos T y B1 en sangre circulante vs. Local (sobre la placa Psoriásica) en pacientes con *psoriasis* (casos)?. Como **segunda pregunta de investigación**; ¿Cual es la diferencia en el perfil inmunológico de los Casos vs. Controles a nivel celular en sub-poblaciones de linfocitos T y B1?

---

<sup>i</sup> Adj. Se dice del sujeto que recibe o padece la acción del agente

## 2. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

La *psoriasis*, además de ser frecuente (8 de cada 10.000 personas)<sup>18</sup> no tiene cura<sup>9</sup> dada su complejidad y su comportamiento multifactorial<sup>ii</sup>, su perfil inmunológico no es claro, es decir cuales antígenos, anticuerpos o células están implicados en su aparición. Por ello, se busca conocer la actividad de las subpoblaciones de linfocitos T, y B, para tener una idea más cercana, sobre qué y cómo se llega a la expresión de *psoriasis*.

Este proyecto permitirá entender la respuesta inmune a nivel de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4+, CD8+), linfocitos B1 (CD5+, CD19+) y la activación celular (por expresión de HLA-DR), mediante técnicas moleculares como la Citometría de Flujo.

La Citometría es una tecnología de trabajo multiparametrico que es utilizada en la evaluación inmune, especialmente su componente celular. Con esta herramienta deseamos aportar evidencia científica de cómo son las sub-poblaciones de linfocitos T y B1 en sangre periférica y en lesiones de *psoriasis*, para obtener una visión más cercana sobre el comportamiento molecular que desencadena esta enfermedad, y así en futuras investigaciones no sólo ayudar a pacientes con *psoriasis*, si no también aplicar estos conocimientos y técnicas para entender ampliamente otras enfermedades inmunológicas, que parecen compartir mecanismos similares a nivel celular y molecular.

---

<sup>ii</sup> Diversos factores que desencadenan la expresión psoriásica, como genéticos, estrés y ambientales y alteraciones del sistema inmune por otras patologías (infecciosos).

### 3. HIPÓTESIS

Dadas las alteraciones sufridas en la piel y el posible riesgo para el desarrollo de *psoriasis*, el presente estudio busca encontrar asociaciones (similitudes o diferencias) en la respuesta inmune de personas con *psoriasis*, sangre circulante y local (sobre la placa Psoriásica) e individuos sanos. Con el fin de proporcionar nuevo conocimiento científicos de esta patología y colocar pautas, que permitan a futuro realizar estudios más completos para encontrar nuevas y mejores alternativas a los tratamientos ya existentes, que mejoren la calidad de vida de las personas que presentan *psoriasis*<sup>17</sup>.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Establecer asociaciones en sub-poblaciones de linfocitos T, B1; en pacientes con *psoriasis* y individuos sanos mediante la técnica de Citometría de Flujo.

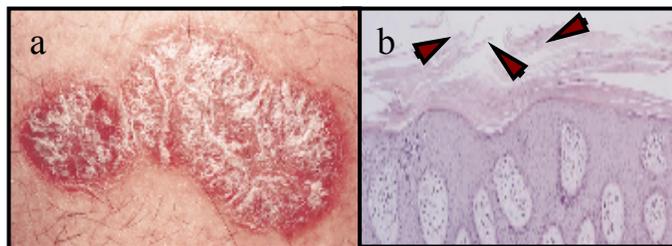
### 4.2 Específicos

- Determinar patrones inmunológicos característicos de sub-poblaciones de linfocitos T CD4+, T CD8+ y B1; en sangre circulante y de lesiones de pacientes con *psoriasis*, por medio de Citometría de Flujo.
- Estandarizar un protocolo para identificar el perfil inmunológico (CD4+, CD8, CD3+, HLA-DR+ y CD5+, CD19+) mediante la técnica de Citometría de Flujo en la patología psoriásica.
- Aportar parámetros representativos de sub-poblaciones de linfocitos T y B1, en personas con *psoriasis* vs. controles.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Psoriasis

La *psoriasis* es una enfermedad inflamatoria no contagiosa de la piel, caracterizada por formación de placas<sup>19</sup> de las cuales se desprenden escamas conformadas por células muertas (Figura 1). Estas escamas son de color blanquecino o plateado; las placas están formadas por cúmulos de células que forman engrosamiento de la piel, que en contraste con la piel normal, se reproducen y mueren con gran rapidez<sup>20</sup>.



**Figura 1.** *psoriasis*. **a**, Placa Psoriásica. **b**, descamación de células.

Las placas de *psoriasis* pueden desarrollarse de diferentes maneras y de varias formas: *psoriasis en placas*, *psoriasis en gotas* que son pequeñas y numerosas lesiones en el tronco o en las extremidades<sup>20</sup>, *psoriasis pústular*<sup>9</sup> que deja pequeñas cavidades con pus, *psoriasis inversa* que se observa en los pliegues de la piel, *psoriasis eritrodérmica* (3% de los casos) caracterizada por enrojecimiento generalizado con dolor y comezón (Figura 2) y la *artritis psoriásica* que es una artritis inflamatoria (artropatía) que se presenta en aproximadamente 5% de los afectados de *psoriasis*<sup>21</sup>.



**Figura 2.** Tipos de *psoriasis*<sup>22</sup>. **a**, *psoriasis pustulosa*, palmas de las manos. **b**, *artritis psoriásica*, dedos y uñas. **c**, *psoriasis en gotas*. **d,h**, *psoriasis en placas*. **e**, *psoriasis eritrodérmica*. **f**, *psoriasis pustulosa generalizada zona*. **g**, *psoriasis invertida*.

## 5.2 Histopatología

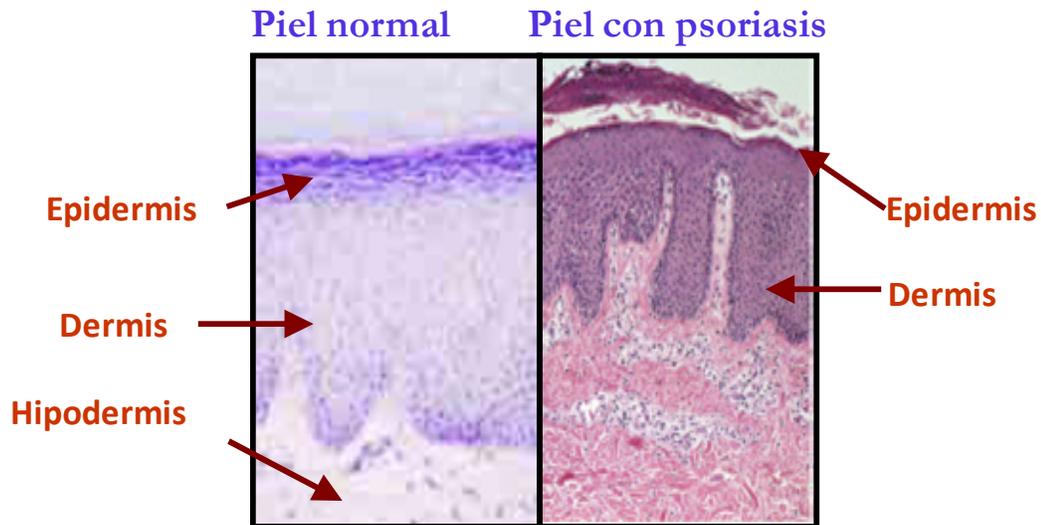
La piel normal está constituida por tres zonas: Epidermis, dermis, hipodermis (Figura 3). La epidermis es la parte más superficial constituida por dos grupos de células: queratinocitos o células no dendríticas y células dendríticas.

Los queratinocitos cumplen varias funciones, la más conocida es producir queratina, además sintetizan otras sustancias, como: interferón alfa, prostaglandinas, factores estimulantes de colonias de granulocitos-monocíticas, factor activador de los timocitos, derivado de las células epidérmicas<sup>23</sup>.

En la piel con *psoriasis* se observa pérdida ligera de la capa granular celular y aumento de epidermis por dilatación, a consecuencia de la inflamación (Figura 3), generando diferenciación incompleta de los queratinocitos<sup>20,24,25</sup> lo que origina las placas psoriásicas crónicas. Lo anterior resulta en hiperplasia<sup>iii</sup> epidérmica al

<sup>iii</sup> Hiperplasia Med. Excesiva multiplicación de células normales en un órgano o en un tejido.

generarse 35.000 células por milímetro cuadrado por día comparado con 1218 células por día en la piel normal<sup>26</sup>.



**Figura 3.** Histología de las capas de la piel. **a**, Piel normal. **b**, piel psoriásica (Inflamación de la epidermis).

### 5.3 Fisiopatología

En condiciones normales, la piel se renueva cada 28 días por división celular o ciclo celular, mecanismo que utilizan todos los organismos vivos para la reproducción y crecimiento de los tejidos y del individuo. La célula se divide en dos células hijas genéticamente idénticas (Mitosis), manteniendo el número cromosómico y la identidad genética de la especie<sup>27</sup>. En organismos pluricelulares la división celular se convierte en un proceso cíclico destinado a la producción de múltiples células, idénticas, que permite el aumento del número de células y a partir de esas células lograr una especialización y una funcionalidad concreta. En personas con *psoriasis* hay división celular acelerada, cada 4 días<sup>20</sup>, esta mitosis acelerada resulta en hiperplasia de queratinocitos<sup>20</sup>, al parecer relacionado a un componente genético hereditario (Tabla I)<sup>28,29</sup>.

**Tabla I.** Genética de *psoriasis*

<b>Susceptibilidad genética a <i>psoriasis</i></b>		
<b>Locus</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Otras patología asociadas</b>
Psors1	6p21.3	Asma
Psors2	17q25	Eczema
Psors3	4q24	-
Psors4	1q21	Eczema
Psors5	3q21	Artritis reumatoide
Psors6	19p13	-
Psors7	1p	-

Actualmente se considera la *psoriasis* como una enfermedad modulada por el sistema inmune, cuyo evento final es una hiperproliferación epidérmica, con diferenciación anormal de los queratinocitos<sup>30</sup>, eventos asociados a un fenómeno inflamatorio mediado por prostaglandinas y leucotrienos<sup>iv</sup>.

En general el prurito<sup>v</sup> es escaso, la aparición y la distribución de la erupción es variable, siendo las zonas más afectadas: el cuero cabelludo, codos, rodillas, manos (nudillos), uñas, región lumbosacra y en menor medida las palmas de las manos y pies<sup>20</sup> (Figura 2).

Es muy raro, que se presente generalización de la enfermedad, la extensión puede ser de apenas un par de lesiones, hasta la diseminación por todo el cuerpo, inclusive puede aparecer *artritis psoriásica* que puede iniciarse de forma lenta y con síntomas moderados que se controlan muy bien con anti-inflamatorios,

---

<sup>iv</sup> Son moléculas lineales que tienen un pequeño anillo de oxano los leucotrienos son derivados del ácido araquidónico sintetizados por la vía lipooxigenasa. Los leucotrienos son constrictores extremadamente potentes de la musculatura lisa, además participan en los procesos de inflamación crónica aumentando la permeabilidad muscular y favoreciendo el edema de la zona afectada, debe su nombre de que originalmente fueron aislados a finales de los 70 a partir de los leucocitos.

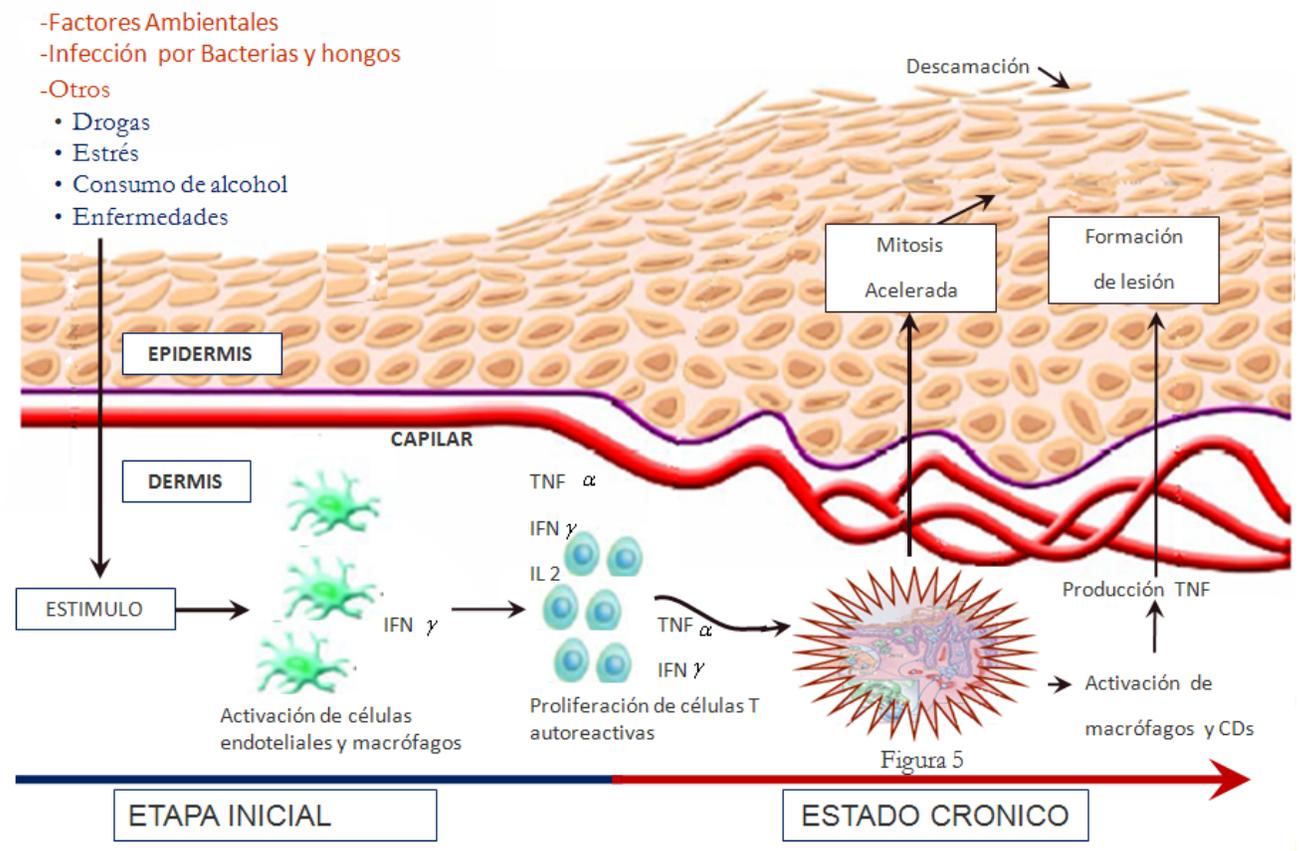
<sup>v</sup> *Med.* Comezón, picazón.

pasando muchas veces desapercibido su diagnóstico<sup>20</sup>. En ocasiones sigue un curso progresivo que puede llevar a la incapacidad funcional del individuo<sup>16</sup>.

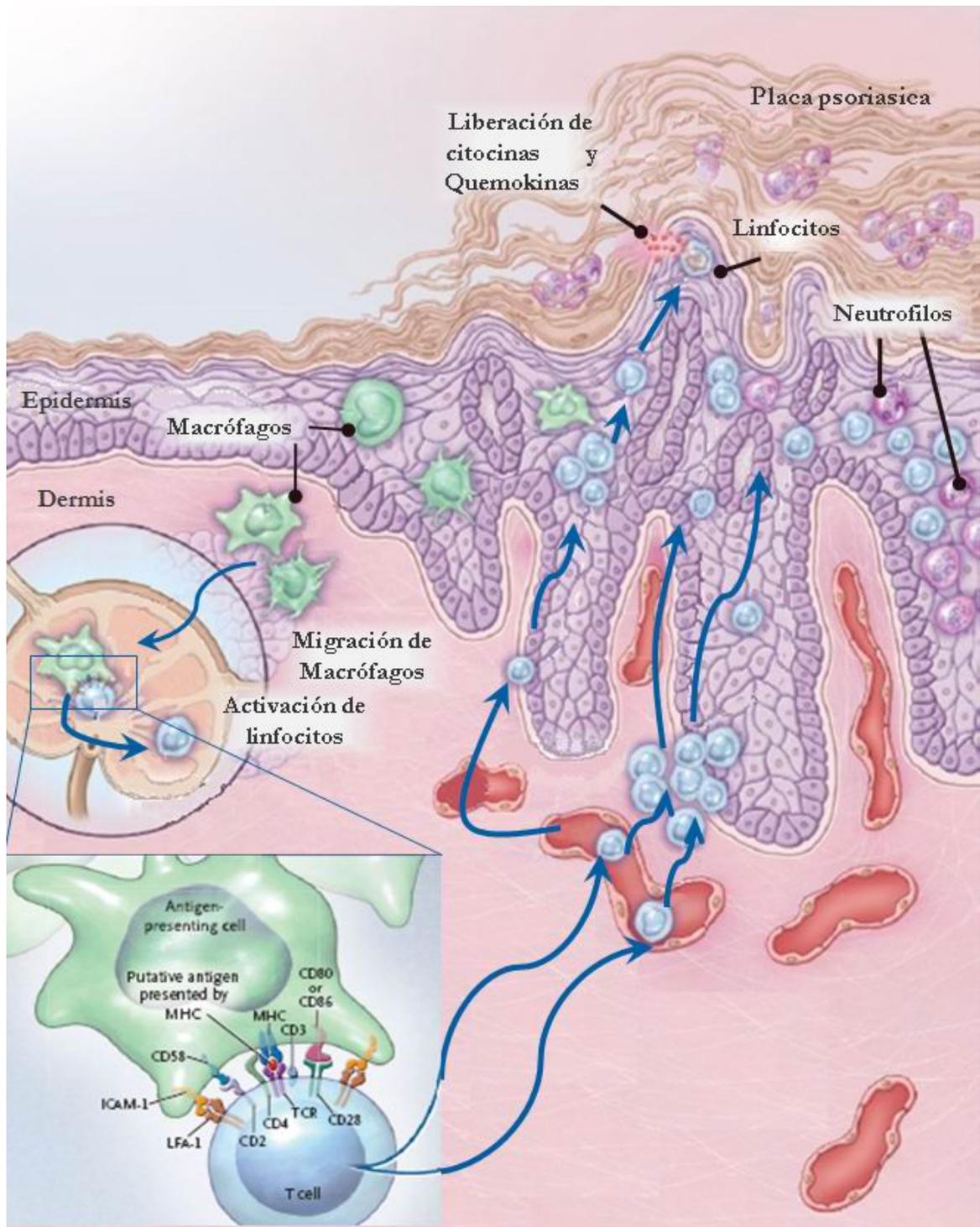
#### 5.4 Inmunopatogenesis

La participación del sistema inmune, más exactamente el sistema inmune específico, es evidente por la presencia de linfocitos T<sup>19</sup> y sus sub-poblaciones en epidermis y dermis, a consecuencia de la activación molecular por células presentadoras de antígenos (APC) y macrófagos (figura 4)<sup>20,31,32</sup>, otro factor a considerar son microorganismos como bacterias, que producen superantígenos que estimulan los linfocitos T en respuesta a péptidos bacterianos como *Streptococcus*<sup>33,34</sup>.

En diversos estudios, se ha observado que las lesiones de *psoriasis*, se caracterizan por infiltración cutánea de células T de memoria CD3+, CD8+ en epidermis y CD4+ en dermis, con predominio de sub-poblaciones de células Th1 sobre Th2, acompañado de angiogenesis y engrosamiento de la epidermis<sup>3,9</sup>. Los linfocitos T en *psoriasis* se activan por comunicación con células presentadoras de antígenos (APC), quienes presentan antígenos transportados por medio de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HLA o MHC), a los linfocitos T<sup>20</sup>. Las Citocinas procedentes de las células T activadas inducen factores de crecimiento que estimulan proliferación excesiva de queratinocitos; una sub-población específica de linfocitos T como los Th1, son los que predominan en las lesiones; liberando Citocinas proinflamatorias junto con células (APC)<sup>35,36</sup> como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interferón- $\gamma$ , interleucinas (IL) 2, 6, 8 y el factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF) que lesionan la piel<sup>37</sup>.



**Figura 4.** Mecanismo inmunológico de psoriasis 1



**Figura 5.** Mecanismo inmunológico de Psoriasis 2

## 5.5 Etiopatología

Cada día parece más claro que *psoriasis* es una enfermedad del sistema inmune o de defensas que no tiene cura definitiva<sup>2,38</sup>. Aunque no se ha demostrado un anticuerpo<sup>vi</sup>, todo apunta a que se trata de una enfermedad inmune o de autoagresión, atribuido al papel o rol que juegan las células T<sup>9</sup>.

Su etiopatología como se ha indicado no se conoce con precisión, pero se sabe que se trata de una enfermedad multifactorial o cosmopolita, que implica factores genéticos, inmunológicos y ambientales<sup>20</sup>, estableciendo un ciclo celular acelerado y aumento de la mitosis de células epidérmicas, en zonas determinadas del cuerpo (placas psoriasicas).

Otros factores influyen en la génesis de la *psoriasis*, ellos son: traumatismos, medicamentos<sup>13,20</sup>, enfermedades cardiacas, diabetes<sup>13</sup>, SIDA (VIH)<sup>39</sup>, alteraciones metabólicas e infecciones por bacterias<sup>4</sup>, cambios climáticos, consumo excesivo de alcohol, tabaquismo, depresión y estrés (30% a 40% de los enfermos relacionan el inicio de su enfermedad con estrés)<sup>40</sup>.

A través de décadas de observación, pacientes y médicos han aprendido que los eventos estresantes y los factores psicosociales son de vital importancia en el comienzo, perpetuación y exacerbación de la *psoriasis*.

En 1974 se describió que 33% de 5600 pacientes padecieron nuevas lesiones psoriasicas relacionadas al aumento de las preocupaciones (emocionales)<sup>40</sup>. En el 2000, se publicó que los pacientes con alto nivel de estrés emocional tienen mayor área corporal con *psoriasis* que los pacientes con relativa estabilidad emocional<sup>40</sup>.

Aún no existe un razonamiento claro pero en 1986 se propuso un rol para los neuropéptidos en la patogénesis de *psoriasis*, sugiriendo que liberación de SP (Sustancia p) y otros neuropéptidos desde las terminaciones de fibras nerviosas

---

<sup>vi</sup> Anticuerpo o proteína producida por el cuerpo contra un órgano propio.

sensoriales no mielinizadas en piel, causa inflamación neurogénica local que inicia *psoriasis* en personas genéticamente predispuestas<sup>40</sup>.

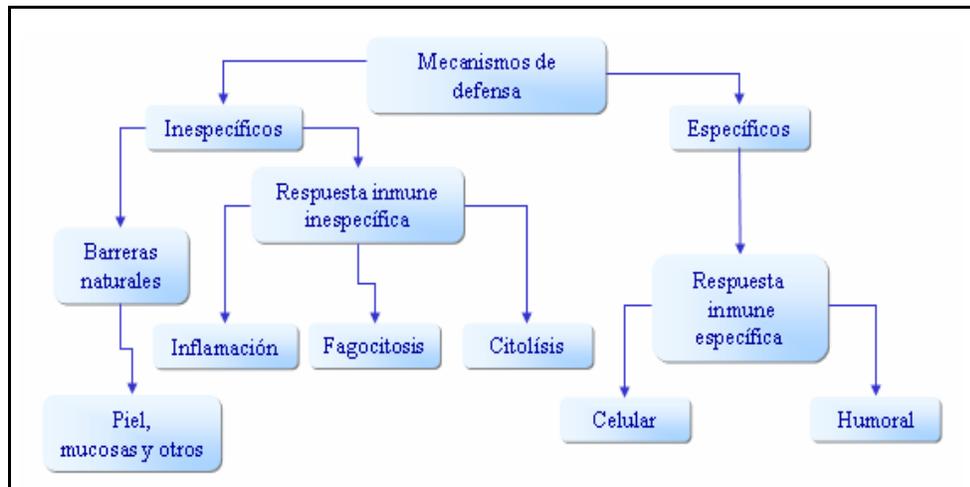
Los eventos estresantes alteran los niveles de SP en el sistema nervioso central y en nervios periféricos, cuando existen condiciones estresantes, se estimula el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, resultando un incremento sanguíneo de ACTH, corticosteroides y adrenalina. Resultados recientes sugieren que además de estos cambios endocrinos convencionales, existe una elevación significativa en los niveles de Factor de crecimiento nervioso (NGF) durante varias condiciones estresantes, posiblemente en un intento de neuroprotección. El NGF produciría reacción inflamatoria en un número indeterminado de vías de señalización intercelular, esto estaría relacionado con los mecanismos de proliferación y activación de Linfocitos T y desgranulación de mastocitos. Algunos autores proponen, que en pacientes con *psoriasis*, moléculas neurohormonales como la SP y el NGF, inducidas por estrés, pueden contribuir significativamente a los procesos inflamatorios de *psoriasis*<sup>40</sup>.

## 5.6 Sistema Inmune

El sistema inmune es un conjunto de células y moléculas intercomunicadas y reguladas, para la vigilancia, defensa y homeostasis del organismo, la inmunidad en sentido amplio comprende un conjunto de mecanismos inespecíficos y específicos estrechamente relacionados (Figura 5), que impiden el ingreso y la permanencia de agentes foráneos<sup>vii</sup> al organismo.

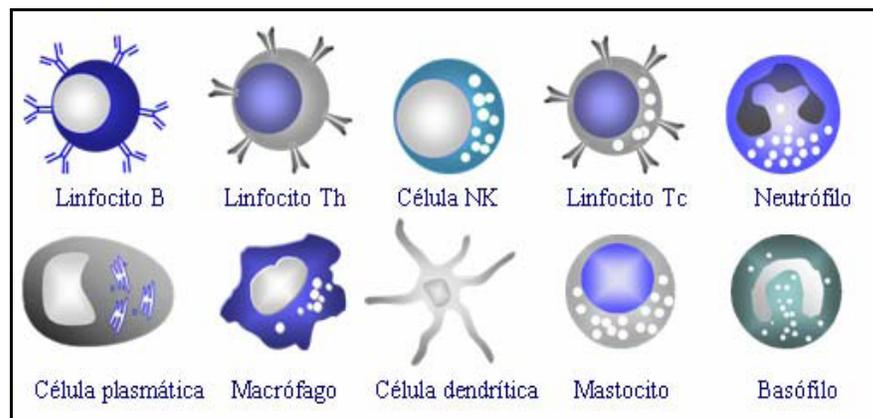
---

<sup>vii</sup> Agente invasor extraño a un sistema.



**Figura 6.** Representación de los diferentes mecanismos de defensas inmunológica.

Estos mecanismos están conformados por un grupo de células (Figura 6) y proteínas que se dividen en dos grandes sistemas: 1- **Sistema inespecífico o innato o inflamatorio**, formado por barrera muco-cutánea, el pH, sistema de complemento y la inflamación. 2- **Sistema inmune específico o adaptativo o adquirido**: se subdivide en dos grandes grupos, el sistema inmune humoral y el celular, el humoral neutraliza gérmenes de crecimiento extracelular y antígenos solubles, mientras el celular elimina gérmenes con crecimiento intracelular o antígenos complejos<sup>41,42</sup>.



**Figura 7.** Células maduras del sistema inmune que participan en la respuesta tipo específica e inespecífica.

El sistema inmune es como un ejército que tiene jerarquías, una vez las barreras naturales son sobrepasadas por gérmenes o moléculas extrañas, el sistema inmune innato dado por los macrófagos, fagocita los gérmenes y los elimina, como una barrera militar inicial de encuentro, pero si este sistema innato es ineficiente y la infección o el germen está desbordando esta línea inespecífica de defensa, las células presentadoras de antígenos realizan el contacto entre el sistema inmune inespecífico con el específico, presentando los antígenos al sistema específico particularmente a los linfocitos T CD4, si el germen crece en fagosomas y a linfocitos CD8 si el germen crece en el citoplasma (por ejemplo virus). Los linfocitos CD4 se llaman T helper o T ayudadores o Th, estos ayudan a la inmunidad humoral dada por los linfocitos B, para la producción de las diferentes clases de inmunoglobulinas, así el linfocito Th o CD4 es el jefe del sistema inmune que decide qué tipo de inmunidad se va a generar humoral o celular.

### **5.6.1 Sistema inmune Inespecífico.**

La piel y las mucosas son barreras físicas eficientes en impedir el ingreso de agentes injuriantes. Ambas se integran con los mecanismos inespecíficos y específicos de la inmunidad. Así, en la dermis se encuentran todos los elementos que permiten la activación del complemento y la respuesta inflamatoria.

En la epidermis existen células presentadoras de antígeno (células de Langerhans) y linfocitos capaces de iniciar una respuesta específica.

Las mucosas del tracto respiratorio tienen cilios que impulsan partículas y mucus hacia el exterior, los que serán eliminados por la tos y el estornudo. Así mismo células especializadas secretan mucus que provee una barrera mecánica y química que impide la adherencia de microorganismos y otras partículas a la superficie celular.

En otras mucosas, como en el sistema digestivo y genito urinario tienen importancia el pH bajo y la presencia de bacterias comensales (flora normal). El

tejido conectivo vascularizado y los tejidos linfoides en la submucosa permiten la activación de otros mecanismos defensivos a los que se ha hecho referencia, la inflamación y la respuesta inmune adaptativa<sup>41</sup>.

### **5.6.2 Inflamación**

Inflamación es una compleja serie de eventos originados cuando un antígeno atraviesa o rompe las barreras naturales e ingresa al medio interno, los fagocitos (neutrófilos, monocitos e incluso linfocitos B) ingieren el germen y producen citoquinas proinflamatorias que magnifican la reacción inmunitaria, si hay mayor invasión del germen el sistema innato involucra al sistema inmune adaptativo, presentando los antígenos a los linfocitos CD4 o Th que dirigen la respuesta inmune específica.

Durante la inflamación se describen 5 signos cardinales: calor, rubor, tumor, dolor e impotencia funcional, todos ellos reflejan los tres principales hechos fisiopatológicos de la inflamación: 1- Vasodilatación y eritema, 2- Aumento de la permeabilidad vascular que permite el escape de líquidos, células y macromoléculas hacia el tejido, 3- Quimiotaxis de leucocitos hacia la lesión, se acumulan células y bacterias que aumentan el volumen del tejido y generan exudado y pus<sup>41</sup>.

### **5.6.3 La respuesta Inmune Adaptativa**

Es un sistema especializado de células llamadas linfocitos T y B, originadas por el sistema linfoepitelial y linforeticular, que conforman órganos linfoides centrales y periféricos respectivamente. Los linfocitos T ejecutan inmunidad celular y los B producen las inmunoglobulinas o anticuerpos que constituyen la inmunidad humoral.

Las principales características de la respuesta inmune adaptativa son la especificidad (I) y la memoria inmunológica (II). La especificidad es la existencia de un amplio repertorio de receptores presentes en linfocitos que son capaces de reconocer particularmente regiones moleculares de estructuras propias y ajenas denominadas genéricamente epitopes o determinantes antigénicos, así el sistema inmune puede discriminar alrededor de  $10^9$  determinantes antigénicos diferentes. La especificidad se pone de manifiesto cuando los epitopes son reconocidos por linfocitos T y B durante la inducción y durante la fase efectora de la respuesta inmune<sup>41</sup>.

### **5.6.3.1 Linfocitos T**

Los linfocitos T son una población celular muy heterogénea formada por tres tipos de células. Nacen en medula ósea y migran al timo donde maduran y adquieren el receptor CD3+, que identifica a linfocitos T maduros. No todos los linfocitos T son idénticos entre sí. Analizando las características funcionales de los linfocitos T, se observan tres comportamientos distintos, que deben basarse en diferencias moleculares y estructurales de estas células. Los tres tipos de linfocitos T funcionalmente distintos son: Células T de colaboración (Th) o CD4+, células T citotóxicas (Tc) o células CD8+, células T supresoras (Ts) y/o reguladoras o células CD8+.

#### **5.6.3.1.1 Células T de colaboración (Th)**

El linfocito Th o CD4+ participa de forma importante en la iniciación y desarrollo de la respuesta inmune, tanto humoral como celular, debido a su capacidad de producción de linfocinas, entre las que destacan la interleucina-2 (IL-2), la interleucina-4 (IL-4) e interferón gamma.

Fenotípicamente, la característica de esta subpoblación linfocitaria viene definida por la presencia de la molécula CD4+ en la superficie celular. Esta molécula es de gran importancia funcional y también se utiliza para cuantificación de esta subpoblación. Se distinguen dos poblaciones diferentes de estas células según el perfil de secreción de citocinas: Th1 y Th2. La Th1 produce IL-2 e interferón gamma que son mediadoras de inmunidad celular, mientras que las células Th2 producen IL-4, 5, 6, 10, 13 que modulan los linfocitos B o inmunidad humoral.

#### **5.6.3.1.2 Células T citotóxicas (Tc).**

Una vez activada esta subclase de linfocitos T, adquiere capacidad citotóxica, siendo los principales responsables de los fenómenos de citotoxicidad de la respuesta inmune celular. Estas células se caracterizan por expresar el marcador CD8+.

#### **5.6.3.1.3 Células T supresoras (Ts) y/o reguladoras.**

Este tipo de célula posee acción reguladora de la respuesta inmune. La regulación de la actividad del sistema inmune es de gran importancia en todo el comportamiento del mismo y sobre todo, en el desarrollo de tolerancia frente a los componentes propios del organismo, expresan en su membrana moléculas CD8+ al igual que lo hacen los linfocitos T citotóxicos y su mecanismo de acción no es bien conocido en la actualidad

#### **5.6.3.2 Linfocitos B**

Los linfocitos B se identifican por varias moléculas CDs destacándose la CD19+. Existen diferentes poblaciones de linfocitos B maduros con capacidad para

producir anticuerpos: 1) linfocitos B convencionales también conocidos como linfocitos B foliculares o linfocitos B2 o linfocitos B0, 2) linfocitos B1<sup>43</sup>.

Las células B1, responsables de la producción de IgM sérica, constituyen una población de linfocitos B con ubicación anatómica y características fenotípicas y funcionales particulares<sup>44</sup>. Los linfocitos B1 se ubican mayoritariamente en cavidad peritoneal y pleural<sup>45,46</sup>.

Dentro de las células B1 se distinguen dos sub-poblaciones: la de los linfocitos B1a que expresan el marcador pan-T, CD5, y aquella que no lo expresa correspondiente a los linfocitos B1b. Sin embargo, los linfocitos B1a y B1b son similares en cuanto a la expresión de los otros marcadores de superficie celular. Los linfocitos B1a son numéricamente superiores a los B1b y es por ello que la mayoría de la información disponible sobre los linfocitos B1 se refiere a la población B1a<sup>47,48</sup>.

#### **5.6.3.2.1 Función de las células B1**

Una de las funciones principales de las células B1 es la producción de inmunoglobulinas, que actúan como una fuente primaria de anticuerpos frente a diferentes infecciones.

La información sobre los mecanismos que regulan la secreción de anticuerpos en las células B1 es controvertida. Mientras algunos investigadores han informado que los linfocitos B peritoneales secretan espontáneamente Igs al medio extracelular<sup>49</sup> otros indican que estas células deben migrar a los nódulos mesentéricos u otros órganos linfáticos secundarios para diferenciarse en células secretantes del anticuerpo<sup>50</sup>.

Estos anticuerpos conocidos como “naturales” están codificados por genes que se encuentran en línea germinal y cumplen un papel fisiológico, ya que están implicados en remoción de células envejecidas, apoptóticas, en mecanismos de inmunomodulación<sup>51</sup> y un papel protector contra infecciones.

#### **5.6.4 Moléculas CD**

Son proteínas o receptores presentes en las superficies leucocitarias, se identifican por anticuerpos monoclonales marcados con enzimas y fluorescencia; así, es posible valorar cuantitativa y cualitativa las diferentes sub-poblaciones leucocitarias, además son útiles para aislar células en investigación y terapia, por ejemplo; todos los linfocitos T post-tímicos o maduros son CD3+, pero un gran porcentaje son CD4+ y el resto son CD8+; por ello su nombre y su sigla en inglés (cluster differentiation = diferenciación de grupo).

Las moléculas CD se identifican marcando células con anticuerpos monoclonales específicos unidos a moléculas fluorescentes para detección. Igualmente se pueden marcar los anticuerpos con quimioluminiscencia, enzimas que cambien de color los substratos e isótopos radiactivos, así la célula marcada con ellos será identificada con equipos y microscopios de fluorescencia, detectores de quimioluminiscencia, colorímetros o espectrofotómetros y contadores de radioactividad; los más utilizados son microscopios de fluorescencia y Citómetro de flujo<sup>41</sup>.

#### **5.6.5 Complejo Mayor de histocompatibilidad (MHC)**

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC en animales o HLA en humanos) o antígenos leucocitarios o de histocompatibilidad son proteínas del tipo chaperonina (porque transportan o protegen otras proteínas), que limpian los compartimientos celulares y transportan los antígenos a la superficie celular, se conocen dos clases<sup>52</sup>:

- MHC clase I expresadas en todas las células nucleadas del organismo, están compuestas por los loci A, B y C, limpian el citoplasma (lugar de crecimiento viral) y presentan antígenos a linfocitos T CD8+ o T citotóxico-supresor (Tc/s).

- MHC clase II compuesta por los loci D y pueden ser DR, DQ, DP limpian los fagosomas y presentan antígenos a linfocitos T CD4+ o T ayudadores Th (helper).

Las moléculas MHC clase I se expresan de forma constitutivamente en todas las células nucleadas del organismo, pues ellas son las encargadas de limpiar el citosol celular de proteínas lesionadas o degeneradas, estas moléculas son reconocidas por los linfocitos CD8+ en la presentación de antígenos citosólicos. En cambio las MHC clase II solo se expresan constitutivamente en 3 tipos de células: las presentadoras de antígenos: mononúcleos, células dendríticas, linfocitos B y cuando están activados también en linfocitos T y NK, porque las MHC clase II limpian los fagosomas, y presentan antígenos que son identificados por linfocitos Th CD4+, estos linfocitos para poder ser estimulados por la célula presentadora de antígeno deben expresar HLA-DR, siendo este en linfocitos T, un marcador de activación celular<sup>41</sup>.

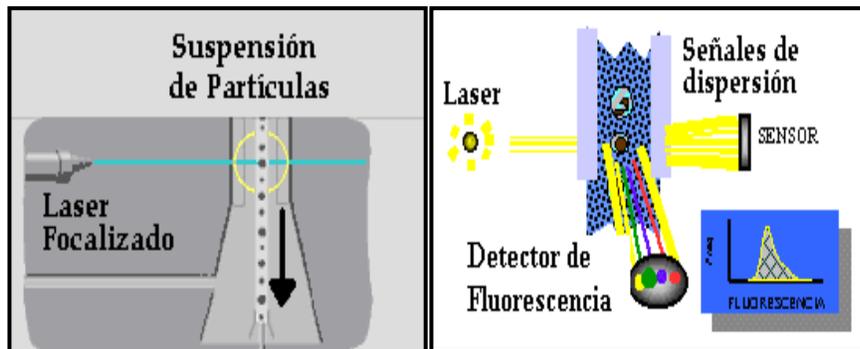
## 5.7 Citometría de Flujo

Citometría de Flujo<sup>53</sup> (CMF) es una técnica reciente de análisis celular multiparamétrico<sup>viii</sup> cuyo fundamento se basa en que las células pasan en fila (“fila india”) frente a un rayo láser y se producen tres fenómenos: 1- Se proyecta una sombra, 2- las organelas celulares dispersan la luz, 3- Se activan marcadores fluorescentes que estén identificando una estructura interna o externa de células, la primera nos permite tener idea del tamaño celular, la segunda da idea de la complejidad celular y la tercera identifica antígenos, receptores, etc. Por medio de

---

<sup>viii</sup> Ofrece información simultánea de un gran número de parámetros de cada una de las células que se analizan y la relación entre células.

sondas o anticuerpos monoclonales fluorescentes (inmunofenotipo)<sup>ix</sup>. Estos eventos se convierten en señales electrónicas, que posteriormente serán digitalizadas, así permiten la medición simultánea de varios parámetros en una misma célula o población celular (Figura 7) observada en un computador<sup>53</sup>.



**Figura 8.** Fundamento de la CTF

### 5.7.1 Estructura Básica De Un Citómetro De Flujo<sup>54</sup>

Está compuesto por tres partes:

- a. Sistema Fluidos
- b. Sistema Óptico
- c. Sistema Eléctrico

### 5.7.2 Ventajas de la Citometría de Flujo

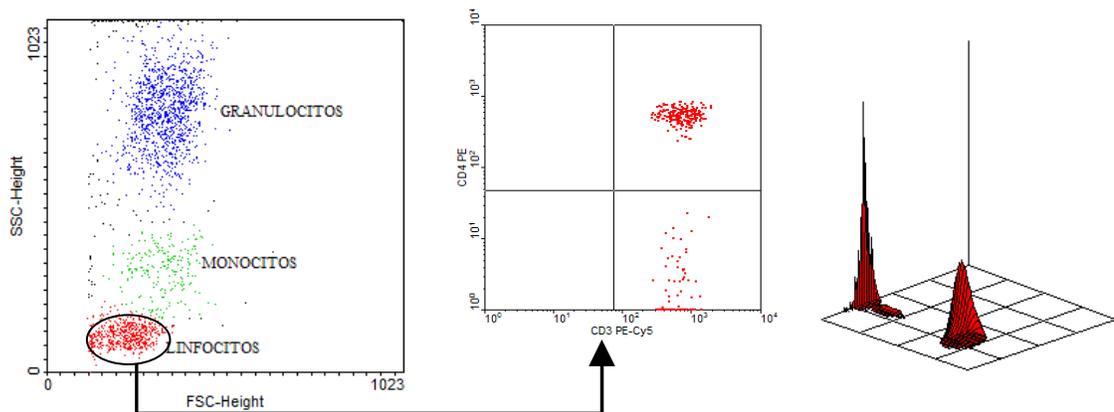
La CMF presenta múltiples ventajas frente a técnicas como microscopia de fluorescencia, estas son:

- Posibilidad de analizar una, dos o tres o varias fluorescencias (diferentes canales) dependiendo del equipo, para el análisis de dos o más fluorescencias

<sup>ix</sup> Es el conjunto de estructuras propias de la célula con funciones varias y que actúan como antígeno. Estas estructuras pueden estar localizadas en la membrana, intracitoplasmicos y nucleares.

utilizando dos cuadros: uno inicial donde se separan los grupos celulares por tamaño (FSC) y complejidad (SSC) determinados por la detección de la sombra y la dispersión de la luz celular mencionados anteriormente, una vez separadas las células, se abre una ventana o “gate” sobre la población deseada para analizar las fluorescencias en cuadros de cuatro cajones, donde el cajón inferior izquierdo se contabilizan las células que no adquieren fluorescencia, en el cuadrante inferior derecho se contabilizan las células que toman la primera fluorescencia, en el cuadrante superior izquierdo se localizan células que toman la segunda fluorescencia y en el superior derecho se localizan las células que toman las dos fluorescencias(Figura 8).

- Posibilidad de analizar un elevado número de partículas en un corto período de tiempo (5000 partículas/segundo).
- Mayor sensibilidad y objetividad que le permiten detectar enfermedades y caracterizar poblaciones celulares poco abundantes en condiciones normales.
- Posibilidad de analizar poblaciones celulares y epitopes<sup>x</sup> celulares.



**Figura 9.** Análisis celular en software (programa Cell Quest Pro) en 3D y 2D

<sup>x</sup> Es la parte de una macromolécula que se reconoce por el sistema inmunológico, específicamente por los anticuerpos, células B, y citotóxicas las células de T. Aunque normalmente los epitopes son derivado de las proteínas.

## 6. ANTECEDENTES

La *psoriasis* se describió desde Hipócrates (460-377 A. de C.)<sup>9</sup> usando el término “psora” que significa “picazón” desde entonces se ha tratado de observar su expresión patológica, diferenciándola de la lepra por no ser contagiosa.

A mediados de siglo XX con avances de la inmunología, permitió ver con más detalle el proceso patológico de autoinmunidad<sup>55</sup>, estudiando el estrato corneo, observando infiltración de células del sistema inmune<sup>56</sup> por inmunofluorescencia de biopsias tomadas a pacientes psoríasis<sup>57</sup>, observando presencia de linfocitos<sup>58</sup>, polimorfo-nucleares<sup>59</sup> y sistemas de complemento C3<sup>60, 61</sup>.

Valdimarson y colegas<sup>62</sup> estudiaron lesiones cutáneas por inmunofluorescencia en biopsias de personas psoriásicas, observando infiltración y activación de CD8+ y CD4+ frente a controles; que producía proliferación anormal de queratinocitos, hipótesis que se corroboró posteriormente por diversos autores, en que los linfocitos T son los protagonistas que desencadenan la enfermedad activados por diferentes ligandos de membranas<sup>63,64</sup>.

Diversos autores en otros estudios; con inmunofluorescencia y PCR describieron una marcada expresión de HLA-DR<sup>65,66</sup> con respecto a niveles normales, observando la presencia de MHC II<sup>67</sup>.

Durante los últimos años se ha intensificado el estudio *psoriasis*, donde se ha identificado presencia de altos niveles de diversas citocinas proinflamatorias<sup>68</sup> como TNF- $\alpha$ , IFN, IL6,<sup>69</sup> IL8, IL12, IL17, IL18 por diversas técnicas moleculares como Elisa<sup>70</sup> y (PCR con primers específicos para regiones que codifican ciertas citocinas)<sup>71</sup>, comparado con rangos normales de controles.

En estudios similares se han descrito infiltraciones de linfocito B<sup>72</sup> sin especificar una subclase celular de esta línea, dado a su reciente identificación.

Se ha observado la presencia de linfocitos B1 en enfermedades autoinmunes como lupus y esclerosis múltiple, distintos estudios han descrito la presencia de altos niveles de inmunoglobulina G (IgG) con técnicas como Elisa donde persiste la producción de IL-8<sup>73</sup>.

Con avance de la tecnología durante estas últimas décadas, se ha podido conocer en más detalle la interacción de autoinmunidad en *psoriasis*, gracias a la existencia de técnicas versátiles como la citometría de flujo<sup>74</sup>, que permite medir con más precisión los niveles de citocinas, utilizando anticuerpos monoclonales con receptores específicos para diferentes interleucinas y células<sup>75,76</sup>, logrando observar sus altos niveles de expresión, que determinan el comportamiento celular de linfocitos T y células dendríticas<sup>77,78</sup> (APC) en *psoriasis*; donde se plantea que las citocinas más significativas encontradas en lesiones psoriasicas son TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 y IL12, responsables de la activación del mecanismo celular. Nuevos hallazgos encontrados por citometría de flujo, muestran altos porcentajes de células como: CD3+, CD4+<sup>79</sup>, CD8+<sup>80</sup>, CD45RO+ y CD69+, además de alta expresión para MCH II reconocidos por Grupos de diferenciación CD3+ Vs HLA-DR+, con respecto a un grupo control, de esta forma se plantea que los linfocitos T pueden inducir queratinosis sumado con moléculas de adhesión ICAM-1, CD11 y CD18<sup>81,82,83</sup> que juegan un papel fundamental para infiltración celular de linfocitos T. De igual forma, se está enfocando para futuras investigaciones el estudio in-vitro y en ratones, para observar con más detalle la patología psoriasica<sup>84,85,86</sup>, con el objetivo de identificar nuevos factores inmunológicos y nuevas vías que influyen en su exacerbación.

## 7 MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Tipo de Estudio

Estudio analítico, observacional, caso control<sup>87</sup>, no experimental (*post facto*) en la población Caucana afectada por *psoriasis*, donde se tuvo en cuenta parámetros de exclusión e inclusión. En la que se observó fundamentos multiparamétricos de acuerdo a fluorescencias mostradas en sus células inmunes. Y se describió la relación cuantitativa de la expresión en cada uno de ellos.

### 7.2 Parámetros de exclusión e Inclusión

Se incluyo como **Casos:** Personas mayores de edad (después de 18 años) con evolución de la enfermedad *psoriasis* de placas en face crónica<sup>xi</sup> en proceso de exacerbación, sin distinción de género.

**Controles:** personas sin la enfermedad, en buenas condiciones de salud y que puedan emparejarse con los casos según edad sexo y procedencia.

**Criterios de inclusión:** Personas con *psoriasis* de placas en etapa crónica, con diagnostico histopatológico, que cumplieron con los criterios ya definidos para caso y control, con conocimiento lectura y escritura, de cualquier procedencia sin tratamiento.

**Criterios de exclusión:** mujeres embarazadas o en lactancia; antecedentes de hepatitis, pielonefritis aguda; tuberculosis activa; portadores del virus VIH; inmunosuprimidos o en etapa de SIDA, enfermedad inmunológicas e infecciones cutáneas, personas limitadas por su estado de salud debido a enfermedades terminales, consumo de medicamentos que alteren niveles normales de defensa (antibióticos, corticoides, entre otros).

---

<sup>xi</sup> Dicho de una enfermedad de larga duración respecto al tiempo.

Las personas participantes para casos de *psoriasis*, fueron Clínicamente diagnosticadas por personal calificado (dermatólogo e internista).

### **7.3 Tamaño y selección de Población Objeto de Muestra**

Se estableció una población de 14 personas con *psoriasis* de placas y 12 personas sanas de la ciudad de Popayán (Colombia)., teniendo en cuenta algunos parámetros de exclusión e inclusión. A los cuales se informó detalladamente el estudio y firmaron el consentimiento informado (Anexo I), que explica el estudio. Al mismo tiempo se hizo una entrevista para obtener información acerca del estilo de vida, nivel de estrés y antecedentes personales y familiares de cada paciente (Anexo II).

### **7.4 Toma de Muestras y Pruebas de Laboratorio**

Se extrajo  $\pm 3$  mL de sangre por venopunción a todos los participantes (casos - controles) en tubos vacutainer de 5mL con Heparina y 50  $\mu$  L de sangre de lesión psoriásica, por capilaridad (levantando la placa Psoriásica en Tubo microhematocrito C/heparina) (figura 9), este procedimiento lo realizó personal calificado (bacterióloga o auxiliar de laboratorio) con todas la medidas asépticas. Las muestras fueron procesadas durante el transcurso no mayor de 12 horas.

Las muestras se tiñeron, con anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de superficie de los linfocitos, para el posterior análisis por Citometría de flujo y un recuento de linfocitos. El conteo de estas células se hizo en hemocitometro (cámara Neubauer) observadas en microscopio óptico.

Estas muestras fueron registradas y codificadas, asignando un numero único a cada pacientes y almacenadas correctamente para asegurar integridad y confidencialidad de las mismas.



**Figura 10.** Toma de muestra de la lesión

#### **7.4.1 Conteo de leucocitos**

El conteo de leucocitos fue así: 1- Preparación diluyente de Turck, con ácido acético al 3% en un matraz aforado, mezclando varias veces la muestra para homogenizar eliminando 3 a 4 gotas de la pipeta y se llevo a cámara de Neubauer para su conteo en microscopio (Nikon de inmunofluorescencias). 2- se contó los 4 cuadros cuadrículados esquineros de la cámara (16 cuadros c/u) y multiplicando por 100, donde se obtuvo el número de leucocitos por  $\text{mm}^3$ /sangre.

#### **7.4.2 Protocolo para Tinción de Superficie por Citometría de Flujo**

El procedimiento previo para correr la sangre por el Citómetro de Flujo comprendió tinción de superficie de leucocitos (con fluorescencia utilizadas para Citometría de flujo) (Tabla II).

##### **a. Tinción De Superficie**

Se agrego 50  $\mu\text{l}$  de sangre en 3 tubos PS 10 x 75mm - 5ml, tapa Snap<sup>®</sup> para luego agregar los anticuerpos así: 1- En un primer tubo se adiciono 3.5  $\mu\text{l}$  de anti-

CD4 PE / anti-CD8 FITC, en un segundo se adiciono 5  $\mu$ l de anti- CD3 FITC / anti- HLA-DR PerCP y en un tercer tubo 5  $\mu$ l de anti-CD5 PE / anti-CD19 FITC; Como lo indica el fabricante<sup>xii</sup>. Este panel se monto tanto para sangre periférica como para sangre de la placa Psoriásica y controles. 2- Se incubo 15-30 minutos a T° ambiente en la oscuridad.

### **b. Lisis de glóbulos rojos**

Se realizó adicionando 50  $\mu$ l de la solución fijación (Erythocyte Living Reagent A de Dakocytomatión) para cada muestra, mezclando e incubando por 10 minutos en oscuridad. Finalmente se adicionó 500  $\mu$ l de Solución Lisante ((Erythocyte Living Reagent B de Dakocytomatión). Se Mezcló e incubo 10 minutos a T° ambiente en la oscuridad <sup>xii</sup>.

### **c. Análisis de muestras**

Las muestras se pasaron por Citómetro de flujo FACSCALIBUR (Becton &. San José. Ca. U.S.A) (Figura 10) realizando adquisición de 10000 células por tubo, utilizando como fase estacionaria Buffer lavado PBS 1X (L) como lo indica el fabricante. Para la calibración del Citómetro de Flujo, se utilizo perlas de colores PerCP, PE y FITC (tabla II) con valores de referencia para adulto de CD4+: 800 - 1500 células/ $\mu$ l, CD8+: <600 células/ $\mu$ l. Relación CD4+/CD8+ con cifras normales de  $1.5 \pm 0.3$ . Células T activadas  $\leq 10\%$  y células B1  $\leq 5\%$  <sup>xii</sup>.

**Tabla II.** Fluorescencia utilizadas por Citometría de flujo

<b>Fluorocromo</b>	<b>Longitud de onda</b>
Fluoresceína (FITC)	519 nm (verde)
Ficoeritrina (PE)	578 nm (rojo)
Peridin–Clorofila (PerCP)	675 nm (morado)

<sup>xii</sup> Becton Dickinson De Colombia NIT 860.020.309-6 [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com).



**Figura 11.** CTF. FACScalibur Becton Dickinson

### **7.5 Plan de Procesamiento y Análisis Estadístico**

Se hizo a partir de resultados obtenidos por Citometría de flujo donde se imprimieron reportes de forma individual por paciente, dado por el programa Cell Quest Pro (Anexo III) de Citometría de Flujo y se analizó sacando solo la población de linfocitos T y B para el análisis por Dot-Plot como se indicó en la figura 8 en los diferentes niveles de respuesta inmune a nivel local y periférico, determinando el porcentaje de células que expresaron anticuerpos CD4+, DC8+, CD3+, HLA-DR+, CD5+ y CD19+; De acuerdo a la información obtenida, algunos datos cumplieron con criterios como normalidad, homogeneidad e independencia y se utilizaron pruebas paramétricas como *t* Student.

Otros datos no cumplieron con los anteriores criterios y fueron sometidos a pruebas no paramétricas como U de Man N-Witney, con una probabilidad menor u igual de 0.05 ( $p \leq 0.05$ ) como significativa. Se utilizó el programa estadístico SPSS (Programa SPSS para Windows, versión 10. SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Con variables cuantitativas y cualitativas que presentan los pacientes de acuerdo a su respuesta inmune y a las fluorescencias por Citometría de flujo dadas por cada persona.

## 7.6 Consideraciones Éticas

Para el desarrollo de este trabajo, se contó con el debido consentimiento informado a las personas que padecen *psoriasis* (anamnesis<sup>xiii</sup>, Anexo I). Las cuales proporcionaron información acerca de sus datos y antecedentes (Anexo II) Todos los procedimientos de investigación se realizaron teniendo en cuenta los principios bioéticos establecidos en la declaración de Helsinki<sup>88</sup>.

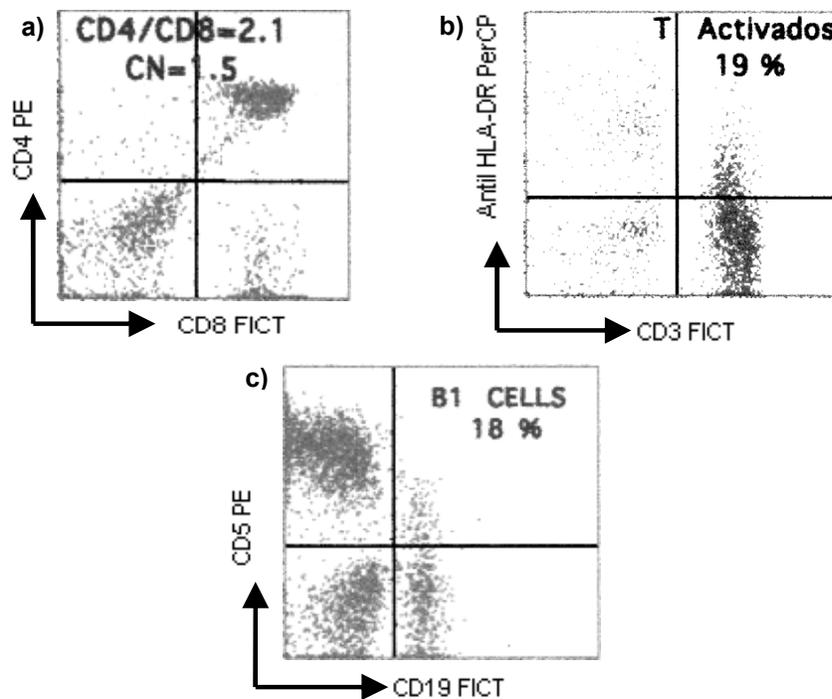
Además se contó con previa aprobación del comité de ética de la Universidad del Cauca.

---

<sup>xiii</sup> Conjunto de los datos clínicos relevantes y otros, del historial de un paciente.

## 8. DATOS Y RESULTADOS

El presente estudio incluyó un total de 26 individuos, 14 pacientes enfermos de *psoriasis* y 12 controles, sin distinción de género. Todas las personas que ingresaron al estudio viven en el área urbana de la ciudad de Popayán. Los datos se observaron en Dot-Plot (Figura 11. a, b y c) por citometría de flujo, de tres colores (FITC, PE, PerCP) y analizados mediante el paquete estadístico SPSS (Programa SPSS para Windows, versión 10. SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).



**Figura 12.** Resultados de análisis por Citometría de flujo por Dot-Plot. **a**, Dot-Plot para relación CD4/CD8. **b**, Dot-Plot para porcentaje de linfocitos T activados (HLA-DR). **c**, Dot-Plot para porcentajes de linfocitos B1

El estudio se dividió en dos partes: primero se comparó los inmunofenotipos CD4+, CD8+, CD3+, HLA-DR, y CD19+, CD5+, obtenidos en sangre periférica (venopunción) vs. Sangre de placas psoriasicas de 14 pacientes con *psoriasis*. La segunda parte comparó los inmunofenotipos de sangre periférica de 14 pacientes con *psoriasis* vs. 12 individuos sanos (controles).

Los resultados fueron los siguientes:

**A)** El análisis de los inmunofenotipos en sangre periférica (venopunción) y de sangre de las lesiones de pacientes con *psoriasis*:

- 1- La relación CD4/CD8 de pacientes con *psoriasis* en sangre periférica con un valor  $\bar{X} = 1.97$  y  $2.14$  en las lesiones (Figura 12. a), con una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.007$ ) (Tabla III).
- 2- La expresión de HLA-DR en linfocitos CD3+ fue de una  $\bar{X} = 14\%$  en sangre circulante y  $\bar{X} = 11\%$  en sangre de lesiones psoríicas (Figura 12.b), con diferencia estadísticamente significativo ( $p = 0.000$ ) (Tabla III).
- 3- Tercero, el porcentaje de linfocitos B1 en sangre circulante tuvo un valor de  $\bar{X} = 11\%$  y  $\bar{X} = 10\%$  en sangre de la lesión, (Figura 12. c ), con diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.001$ ) (Tabla III).
- 4- Todos los parámetros evaluados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.768$  (Tabla III) según la edad o el sexo de la población psoriásica.

**Tabla III.** Comparación de sangre de piel y sangre circulante de pacientes.

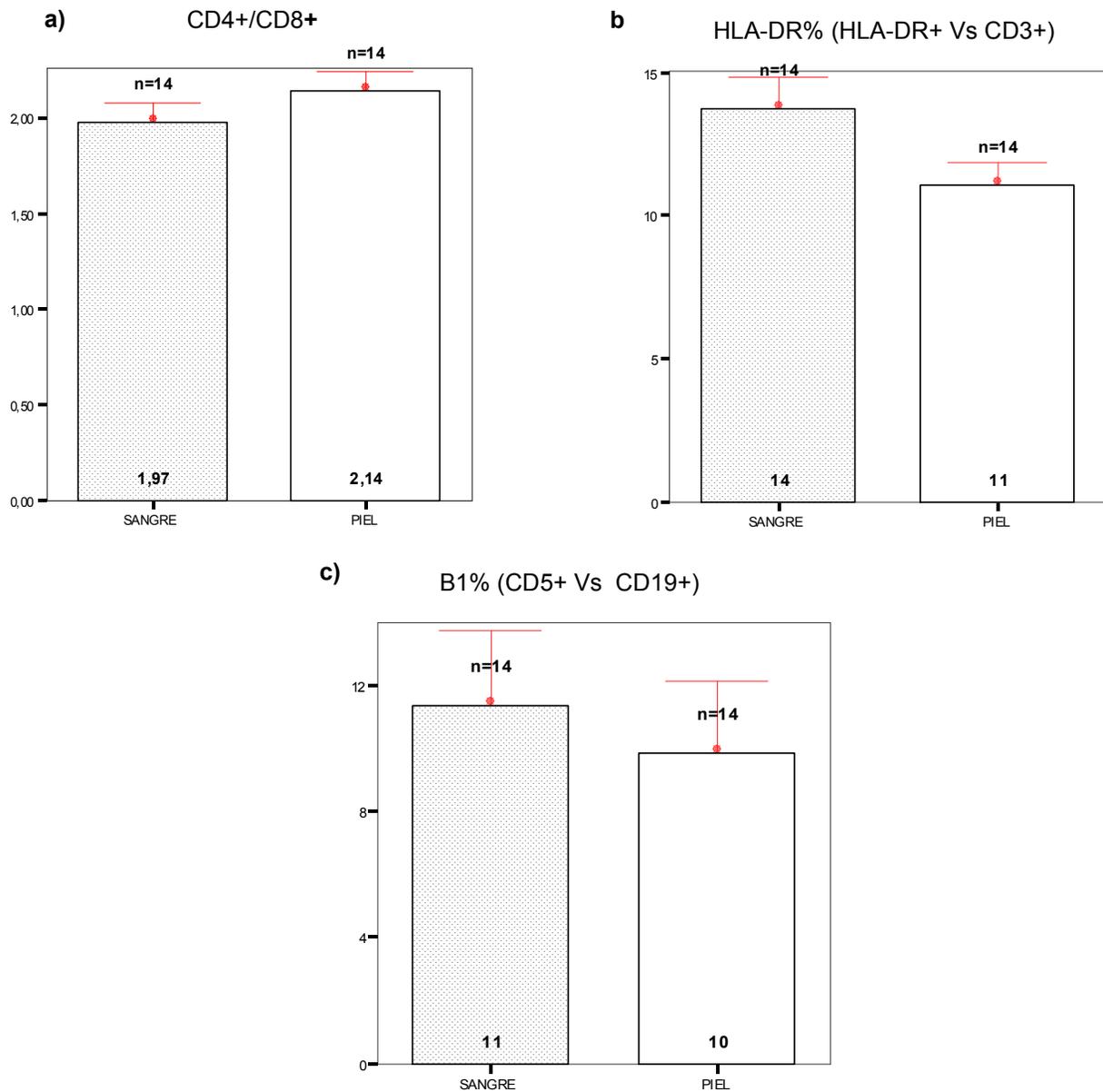
Variables	N	Media	Desviación típica	Error típica de la media	P
<b>Parámetros</b>					
<b>Media – D</b>		<b>-0,1686</b>	<b>0,19674</b>	<b>0,05258</b>	<b>0,007<sup>a</sup></b>
CD4/CD8 S.C	14	1,9743	0,38512	0,10293	
CD4/CD8 S.P.	14	2,1429	0,38579	0,10311	
<b>Media – D</b>		<b>2,6429</b>	<b>1,90575</b>	<b>0,50933</b>	<b>0,000<sup>a</sup></b>
HLA-DR (%) S.C	14	13,7143	4,23227	1,13112	
HLA-DR (%) S.P.	14	11,07	2,973	0,795	
<b>Media – D</b>		<b>1,50</b>	<b>1,345</b>	<b>0,359</b>	<b>0,001<sup>a</sup></b>
B1 (CD5-CD19) S.C	14	11,36	8,906	2,380	
B1 (CD5-CD19) S.P.	14	9,86	8,520	2,277	
<b>Sujetos</b>					
Edad (Años)					
Masculinos	12	44,54	5,158		
Femenino	2	30,1	19,799		<b>0,768<sup>a</sup></b>

**S.C:** Sangre circulante.

**S.P:** Sangre de la lesión.

**D:** Diferencia de medias

<sup>a</sup>: Prueba paramétrica t Student



**Figura 13.** Graficas de barras de comparación estadística de sangre de la lesión y sangre circulante de las personas con psoriasis. **a**, relación CD4/CD8 **b**, expresión de porcentaje de linfocitos T activados (HLA-DR). **c**, expresión de linfocitos B1

**B) Análisis de los inmunofenotipos de pacientes con psoriasis frente a los inmunofenotipos de 12 individuos sanos (controles):**

- 1- La relación CD4/CD8 tuvo valor de  $\bar{X} = 1.97$  para pacientes con psoriasis y  $\bar{X} = 1.65$  para la población control (Figura 13. a) con un alta significancia estadística entre los dos grupos ( $p = 0.002$ ) (Tabla IV).

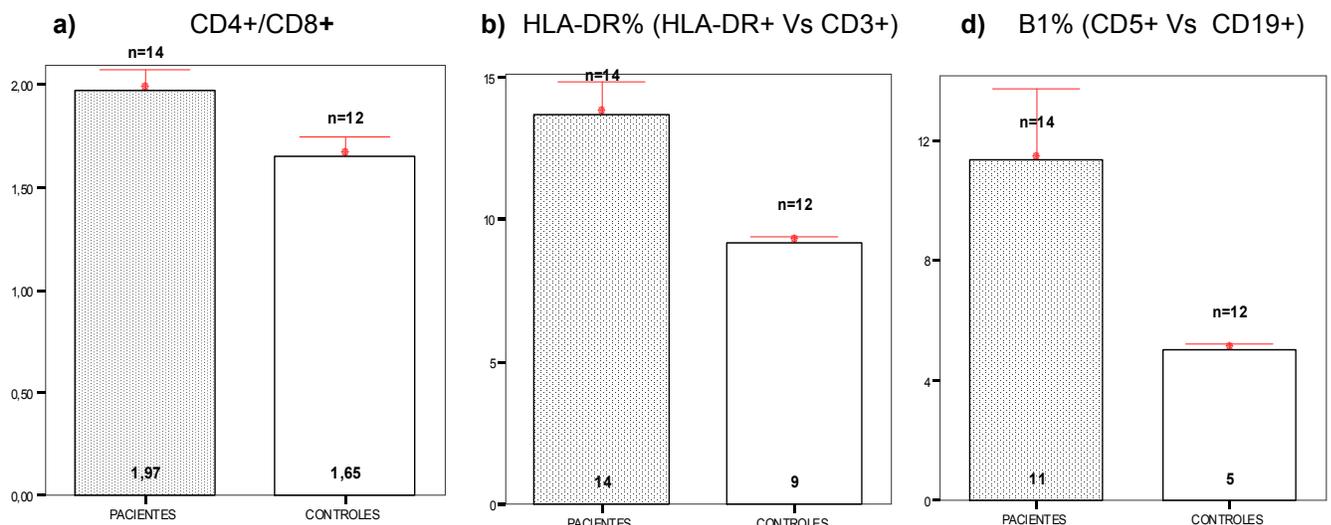
- 2- La expresión de HLA-DR en linfocitos T CD3+ en pacientes con *psoriasis* mostró un valor de  $\bar{X} = 14\%$  y  $\bar{X} = 9\%$  para individuos sanos (control) (Figura 13. *b*) con significancia estadística entre los dos grupos ( $p = 0.000$ ) (Tabla IV).
- 3- El porcentaje de linfocitos B1 en pacientes fue de  $\bar{X} = 11\%$  y de  $\bar{X} = 5\%$  para la población control (Figura 13. *c*) con alta significancia estadística entre los dos grupos ( $p = 0.000$ ) (Tabla IV).
- 4- Todos los parámetros evaluados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.774$  (Tabla III) según la edad o el sexo de la población psoriásica y controles.

**Tabla IV.** Comparación de sangre periférica de pacientes y controles.

	CD4/CD8	HLA-DR (%)	B1 (CD5-CD19)	EDAD
<b>U de Mann-Whitney</b>	25,500	16,000	13,500	
<b>Sig. asintót. (bilateral)</b>	0,002	0,000	0,000	
<b>p</b>	<b>0,002<sup>a</sup></b>	<b>0,000<sup>a</sup></b>	<b>0,000<sup>a</sup></b>	<b>0,774<sup>b</sup></b>

<sup>a</sup>: Prueba paramétrica t Student

<sup>b</sup>: prueba no paramétrica de Mann-Whitney



**Figura 14** Gráfica de barras de comparación estadística de sangre circulante de la población de estudio (personas con psoriasis) y la población control. **a**, relación CD4/CD8 . **b**, expresión de linfocitos T activados(HLA-DR). **c**, activación de linfocitos B1.

## 9. DISCUSION

Al observar diferencias entre individuos sanos y pacientes con *psoriasis* en parámetros como CD4+, CD8+, HLA-DR+, más la expresión de linfocitos B1 (CD5+, CD19+). Este estudio mostró alta significancia estadística en estos grupos de edades, aunque otros estudios de observación han indicado la falta de consistencia y acuerdo entre los diferentes valores obtenidos en las muestra de sangre circulante cuando se someten a una cuantificación de anticuerpos como CD4+, CD8+, HLA-DR+, y poder clasificar o ver un comportamiento regular en la expresión del perfil inmunológico de pacientes con *psoriasis*.

Sin embargo nuestro estudio muestra consistencia, al ser estadísticamente diferente y significativo en los tres parámetros evaluados: En primer lugar, los rangos normales para una relación celular de CD4+/CD8+ es de 1.5 ( $\pm$  0.3)<sup>89</sup> que fue comprobado por el grupo control, sano. Mientras que los pacientes con *psoriasis* la relación fue por encima de 1.8, en sangre periférica y piel; si la relación es <1 posiblemente existe un ataque viral indicado por aumento y predominio de linfocitos CD8+, ello se ve en VIH y en menor grado en otras enfermedades virales, si esta relación está por encima de 1.8, indica hiperactividad CD4+ e hipoactividad CD8+, vista en alergias<sup>89</sup>. De esta forma, se evidencia activación de linfocitos T CD4+, como lo observaron otros autores<sup>90,91</sup>. Sospechando la actividad de posibles fenotipos confinados a la *psoriasis*<sup>92</sup>.

En segundo lugar la detección de MCH clase II por anticuerpos marcados con HLA-DR+; en el grupo de pacientes con *psoriasis* se encontró altos niveles, sobrepasando los niveles normales (< 8% (+ 2) comparado con la expresión normal de HLA-DR en los linfocitos de sujetos sanos. Al respecto del significado de la expresión de HLA-DR, es pertinente conocer que si existe infección por bacterias extracelulares la expresión HLA-DR es de 10 -15%, si el germen es de crecimiento intracelular 20 - 40% y si hay súper antígenos es más del 40% (HIV,

TBC, EBV)<sup>89</sup>. Los niveles de expresión de HLA-DR en los pacientes con *psoriasis* fue mayor, pero no supero el 15%, lo que indica que hay activación inmune pero no tan intensa como las generadas por superantígenos y por gérmenes de crecimiento intracelular, posiblemente esto se deba a que la activación de la enfermedad muchas veces se origina por la presencia de bacterias como el *Streptococcus*.

Respecto la expresión de B1 se puede inferir que se presenta una autoinmunidad humoral a consecuencia de expresión de CD5+ y CD19+ de linfocitos B1, derivado de este resultado los porcentajes encontrados en el estudio estuvieron por encima del 5%; porcentaje considerado normal<sup>89</sup>, su aumento mayor del 5% esta asociado a enfermedades por antianticuerpos. De esta forma también se puede deducir una posible participación de este grupo celular en la exacerbación de la patología. Posiblemente la activación de los B1 indique producción de inmunoglobulinas que contribuyan a la exacerbación de la *psoriasis*, como es observado en otras enfermedades relacionadas con autoinmunidad, donde el número y función alterada que mostraron estas células en ciertas enfermedades, estuvo implicadas en patologías como artritis reumatoidea, lupus (LES), y síndrome de Sjögren<sup>93</sup>. Caracterizadas por la presencia de autoanticuerpos que podrían tener un papel importante en el daño tisular. A consecuencia que las células B1 tienen una conducta similar a la de las células B anérgicas, ya que no responden a la estimulación vía BCR.

Evidencias científicas señalan que las células B anérgicas expresan bajos niveles de CD5+, y esta baja expresión de CD5+ ayuda a mantener las características de no respuesta. En función de estos datos se ha propuesto que, en una enfermedad autoinmune que involucre anticuerpos, las células B1 productoras de autoanticuerpos de baja afinidad recibirían ayuda de células T<sup>94</sup>. Por esta razón posiblemente las células B1 contribuirían a enfermedades autoinmunes, al actuar como células presentadoras de antígenos propios a células T auto-reactivas.

Esto soporta la hipótesis de que hay asociaciones en sangre de lesión y sangre periférica además existe marcada diferencias frente a personas sanas; en linfocitos T, en la patología *psoriásica*, a consecuencia de la activación de diferente número de células en subpoblación de linfocitos T, donde persiste activación de linfocitos que posiblemente con llevan a un síntoma que es la inflamación crónica en piel. Resaltando que la edad no es un factor significativo de la expresión de enfermedad.

En el presente estudio, la diferencia estadísticamente significativa encontrada en la expresión inmunológica a nivel sistémico como local, podría deberse a que existe un comportamiento inmunológico diferente tanto a nivel sistémico como a nivel de la lesión, que daría pie a replantear los tratamientos existentes a nivel general, de forma más específica ya sea una clase de tratamiento en forma sistémica y otra clase de tratamiento en forma local. Dado al origen, complejidad y la naturaleza de la enfermedad.

Por tanto es importante realizar estudios para elucidar el comportamiento inmunológico de la patología *psoriásica* en la población caucana y en Colombia en general. Ya que existen evidencias limitadas en Colombia y en el resto del mundo, para extrapolar o comparar los datos que permita soportar la asociación obtenida.

## 10. CONCLUSION

Existen diferencias en el inmunofenotipo de personas con *psoriasis*, siendo mayor la activación de linfocitos T (CD4+, CD8+) a nivel local (piel) y mayor la presencia de linfocitos B1 a nivel sistémico en pacientes con *psoriasis*.

Los tres parámetros estudiados, mostraron diferencias objetivas y estadísticas; la relación CD4+/CD8+, la expresión de +HLADR y presencia de linfocitos B1; fue notablemente mayor en pacientes con *psoriasis*; indicando hiperactivación del sistema inmune y presencia de autoinmunidad, estos datos son importantes porque: primero, es un aporte para justificar nuevos estudios de mayor profundidad para el entendimiento de la inmunopatogenesis de *psoriasis* y en segundo lugar, el inmunofenotipo puede servir como un marcador de respuesta al tratamiento de *psoriasis*.

Tanto en la población psoriásica como los individuos sanos no presentan una interacción entre la edad y la expresión inmunológica, todos los parámetros evaluados mostraron asociaciones estadísticamente no significativas.

## BIBLIOGRAFIA

- 
- [1] BHOSLE, Monali J. Et al. Quality of life in patients with psoriasis. En *Biomed Centra*. Vol. 4 No 35 (Jun 2006); p 1-7.
- [2] FRANCESCA, Chamian. Et al. Alefacept reduces infiltrating T cells, activated dendritic cells, and inflammatory genes in psoriasis vulgaris. En: *PNAS*. Vol. 102, No. 6 (Feb. 2005); p 2075–2080.
- [3] CHRISTOPHER, E. M; GRIFFITHS, MD. Y FRCP John. Psoriasis, T cells and autoimmunity. En: *Journal Of The Royal Society Of Medicin*. Vol. 89 (Jun. 1996); p. 315
- [4] KRUEGER, J G. and BOWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. En: *Ann Rheum Dis*; Vol. 64, No 2 (2005);p 30-36
- [5] BUCKLEY, R. H., Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes. En: *N. Eng. J.Med*. Vol. 343 (2000); p.1313.
- [6] HAUSMANN, S., and K. W. Wucherpfennig.. Activation of autoreactive T cells by peptides from human pathogens. En: *Curr. Opin. Immunol*. Vol.9 (1997); p.831.
- [7] CL Leonardi, Et al; tanercept Psoriasis Study Group. Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. En: *N Engl J Med* Vol. 349 (2003); p. 2014–22.
- [8] BARTON, C. Anne. Review : Genetic epidemiology Psoriatic arthritis : Arthritis Rheumatism Campaign Epidemiology Research Unit, University of Manchester, UK. En: *BioMed. Central Ltd* Vol 4 (Jan. 31 2002); p. 247-251. ISSN 1465-9913.
- [9] NICKOLOFF Brian J. and NESTLE Frank O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. En: *The journal of clinical investigation*. Vol 113, No 12 (Jun 2004); p 1664-1675
- [10] JURADO, Fermin. Psoriasis. En: *Representaciones Mex-America S.A de C.V.* (2000); p. 1-8
- [11] CASSELL, Sarah. and KAVANAUGH, Arthur. Psoriatic arthritis: Pathogenesis and novel immunomodulatory approaches to treatment. En : *Biomed Centra*. Vol. 3 No 6 (Jul 2005); p 1-9.
- [12] ALAN, N Elias.; VANDA, S. Nanda. And RAJ, Pandian. Serum TNF- $\alpha$  in psoriasis after treatment with propylthiouracil, an antithyroid thioureylene. En: *BMC Dermatology*. Vol. 4, No 4 (Apr. 2004); p. 1. Citado por: KRUEGER GG. And DUVIC,

- 
- M. Epidemiology of psoriasis: clinical issues. En: *J Invest Dermatol*. Vol 102 (1994); p.14-18.
- [13] NICKOLOFF, Brian J. Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe?. En: *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 104, No 9 (Nov 1999); p 1161-1164
- [14] WRONE-SMITH Tamara and NICKOLOFF Brian J. Dermal Injection of Immunocytes Induces Psoriasis. En: *Journal. Clinical. Investigation*. Volume 98, No 8 (Oct 1996); p 1878–1887
- [15] KOKS, S. Et al. Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and -20 genes: relationship to plaque-type psoriasis. En: *genes and immunity* Vol.5 (2004); p.662-667
- [16] KRUEGER G. Et al. The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patientmembership survey. En: *Arch Dermatol* Vol. 137 (2001); p.280-4.
- [17] KORTE, J. Et al. Quality of life in patients with psoriasis: a systematic literature review. En: *J Investig Dermatol Symp Proc* Vol. 9 (2004); p.140-7.
- [18] PAIXÃO, Maurício P. Et al. Linear pustular psoriasis X ILVEN - Case report. En : *An Bras Dermatol*. Vol. 80 No 6 (May. 2005 ) ; p.607-10.
- [19] EUGENE, Braunwald. Et al. Principios de Medicina Interna. 15 ed. Vol I. Mexico. Mcgraw-Hill Interamericana. 2002. p 367-368 ISBN 0-07-007272-8
- [20] SCHÖN, Michael P. Et al. Psoriasis. Review articles En: *The new england journal Of medicine*. Vol. 352, No 18 (May 2005); p. 1899-1912
- [21] PITZALIS, C. Et al. Psoriasis. Arthritis. En: *Journal of the Royal Society Medicine*. Vol. 93, No 18 (Aug 2000); p. 1899-1912
- [22] MARTÍNEZ, Walter. LODEIRO, L. Cristina. Et al. Fisterra.com. Guías clínicas- Psoriasis. [En línea]. Área Sanitaria de Coruña- SERGAS- España. 1 ed 2003. n.s. Abril. 2003. Actualizado 2006. [Citado 08 de May,. 2007]. Disponible en internet:< <http://www.fisterra.com/guias2/psoriasis.asp#es>>
- [23] FRANCO Gisela Navarrete. Histología de la piel. En: *Rev Fac Med UNAM*. Vol.46 No.4 (Jul- Agosto, 2003); p.130-133
- [24] VALDÉS, M. del Pilar. Et al. Eficacia y seguimiento en el largo plazo de pacientes con psoriasis vulgar moderada a severa en tratamiento con infliximab (Remicade®). En: *Rev Méd Chile* Vol. 134 (2006); p. 326-331
- [25] ABRAMS, Judith R. Et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. En: *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 103, No 9 (May 1999); p 1243-1252

- 
- [26] MONTAÑO, E. M<sup>a</sup> Adelaida Nuevos avances de la terapia biológica en la psoriasis  
New advances in biologic therapy of psoriasis: En: *Med Cutan Iber Lat Am* Vol. 33. No  
1 (2005); p. 7-17
- [27] CLAUDE, Ville. Et al. Biología de ville. 5 ed. Mexico : Mcgraw-Hill Interamericana.  
1998. p 214-27, 76-938
- [28] RAJAN, P. Nair. Et al. Localization of Psoriasis-Susceptibility Locus PSORS1 to a  
60-kb IntervalTelomeric to HLA-C. En: *The American Society of Human Genetics*.  
Vol. 66 (2000); p. 1833–1844
- [29] VEAL, C D. Et al. Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and  
evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. En: *J Med Genet*. Vol.  
38 (2001); p. 7–13
- [30] KOKS, S. Et al. Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and 20  
genes:relationship to plaque-types psoriasis. En: *Genes and immunity*. Vol. 5 (Oct.  
2004); p. 662-667
- [31] CLARK, Rachael A. and KUPPER, Thomas S. Misbehaving macrophages in the  
pathogenesis of psoriasis. En : *The Journal of Clinical Investigation* Vol. 116, No 8  
(Aug 2006); p 2084-2087
- [32] GUDJONSSON J. E. Et al. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. En: *Clinical  
and Experimental Immunology*. Vol,135, No 135 (Sep 2004);p 1-8
- [33] Helgi Valdimarsson, Et al. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced  
by streptococcal superantigens?. En *Immunology today* Vol.16. No.3. (1995); p.145-  
150
- [34] ROLA, Ajib. Et al. HLA Allele Associations and V-Beta T-Lymphocyte Expansions in  
PatientsWith Psoriasis, Harboring Toxin-Producing Staphylococcus aureus. En :  
*Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Vol. 4 (2005) ; p 310-315
- [35] TREPICCHIO, William L. Interleukin-11 therapy selectively downregulates type I  
cytokine proinflammatory pathways inpsoriasis lesions. En: *The Journal of Clinical  
Investigation*. Vol. 104 No. 11 (Dec. 1999); p.1527- 1537
- [36] VALDÉS, María del Pilar . Et al. Efficacy of infliximab in patients with moderate and  
severe psoriasis treated with infliximab (Remicade®). En: *Rev Méd Chile*. Vol.134  
(2006); p. 326-331
- [37] AUSTIN, Lisa M. Et al. The Majority of Epidermal T Cells in Psoriasis Vulgaris  
Lesions can Produce Type 1 Cytokines, Interferon-g,Interleukin-2, and Tumor  
Necrosis Factor-a, Defining TC1 (Cytotoxic T Lymphocyte) and TH1 Effector  
Populations:1 a Type 1 Differentiation Bias is also Measured in Circulating Blood T  
Cells in Psoriatic Patients. En: *J Invest Dermatol*. Vol. 113 (1999); p. 752–759,

- 
- [38] DONN, Rachele P. Et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Gene Polymorphism is Associated with Psoriasis. En: *J Invest Dermatol*. Vol. 23 No 3 (Sep. 2004); p.484 –487
- [39] D. Jaffe. W et al. Staphylococcal sepsis in HIV antibody seropositive psoriasis patients. En: *Journ al of the American Academy of Dermatology*, Vol. 24 (1991); p. 970-972
- [40] CALVO, Joan. La inflamación neurogénica en la psoriasis:una nueva hipótesis fisiopatológica. En : *Rev Psiquiatría Fac Med Barna*. Vol. 32, No 3 (2005); p.120-132. Citado por: EM, Farber. ML, Nall. The national history of psoriasis in 5,600 patients. En: *Dermatologica*; Vol 148, (1974); p.1-18.;
- [41] KUBY, Janis. Immunology. 3 ed. New York, United Status Of América : Freeman, 1997. p 663. ISBN 0-7167-2868-0
- [42] REGUEIRO José, LOPEZ, L. Carlos. Inmunología. 1 ed. España: Editorial Medica Panamericana, 1996. p. 159-158. ISBN 84-7903-220-0
- [43] RR., Hardy. K., Hayakawa. B cell development pathways. En: *Annu Rev Immunol* Vol. 19 (2001); p. 595-621.
- [44] BERLAND, R. WORTIS, HH. Normal B-1a cell development requires B cell-intrinsic NFATc1 activity. En: *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 100 (2003); p. 13459-64.
- [45] KROESE FG, Et al. Location and function of B-cell lineages. En: *Ann N Y Acad Sci* Vol. 651 (1992); p. 44-58.
- [46] ABRAHAO, TB. Et al. Morphological characterization of mouse B-1 cells. En: *Immunobiology* Vol. 208 (2003); p.401-11.
- [47] RR., Hardy. K., Hayakawa. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. En: *Adv Immunol* Vol. 55 (1994); p.297-339.
- [48] AB, KANTOR. HERZENBERG, LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev* En: *Immunol* Vol. 11 (1993); p.501-38.
- [49] K., Hayakawa. Et al. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. En: *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 81 (1984); p.2494-98.
- [50] TUMANG JR, Et al. Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. En: *J Immunol* Vol. 174 (2005); p.3173-77.
- [51] COUTINHO, A. Et al. Natural autoantibodies. En: *Curr Opin Immunol* Vol. 7 (1995); p812-8.
- [52] Margulies, D.. The major histocompatibility complex. In *Fundamental Immunology*, 4th ed. W. E. Paul, ed. Lippincott Raven, Philadelphia, 1999.

- 
- [53] RUBIO, Isaac Martín. Citometria de flujo (CMF). Hematología.[En línea]. 1 ed. 2001. n.s. Actualizado en Ago. del 2006.[Citado 03 de Abr., de 2007]. Disponible en internet:<<http://www.citometriadeflujo.com/HTML/principal.htm>>
- [54] FERNÁNDEZ, L. Víctor H. Immunocyte. Principios De La Citometría De Flujo. [En línea]. 1 ed 2005.[ Citado 16 de Abr., de 2007]. Disponible en internet:<<http://www.inmunoweb.unicauca.edu.co/principioscitometria.htm>>
- [55] ROAR , B. J Et al. Characterization of mononuclear cells infiltrates in psoriatic lesions. En: *The Journal Of Investigative Dermatology* Vol. 71 (1978); p. 340-343.
- [56] BEUTER, BH. Et al. Studies in immunodermatology. IV, IF of autoantibodies to the stratum corneum and of *in vivo* fixed IgG in stratum corneum of psoriatic lesion. En: *Int Arch Allergy Appl Immunol.* Vol. 48 (1975); p. 301-333.
- [57] TAGAMI, H. Et al. Studies Characterization of a leukotactic factoe derived from psoriatic scales. En: *Br J. Dermatol.* Vol. 97 (1977); p. 509-518.
- [58] BJERKE JR. Et al. Characterisation of mononuclear cell infiltrate in psoriatic lesions. En: *J Invest Dermatol* Vol. 71 (1978); p. 340.
- [59] CORMANE, RH. Et al. The role of lymphocytes cells and polymorphonuclear . leukocytes in the phatogenesis of psoriatic En: *J. Dermatol.* Vol. 3 (1976); p. 247-259.
- [60] BRAUN-FALCO, O. Et al. Immunoelectromicroscopical demonstration of *in vivo* bound complement C3 in psoriatic lesions. En: *Arch dermatol Res.* Vol. 260 (1977); p. 57-62.
- [61] ROSS, GD. Et al. Two different complement recertors on human lymphocytes. One specific for C3b and one specific for inactivator-cleaved C3b En: *J. Exp. Med.* Vol. 138 (1973); p. 798-811.
- [62] Valdimarsson H, et al. Psoriasis: a disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. En: *Immunol Today.* Vol. 7 (1986); p. 256-9
- [63] BAADSGAARD O. Et al. UM4D4 (CD60) T cells are compartmentalized into psoriatic skin and release lymphokines that induce a keratinocyte phenotype expressed in psoriatic lesions. En: *J Invest Dermatol* Vol 95 (1990); p.275-82
- [64] STRANGE P. Et al. T-lymphocyte clones initiated from lesional psoriatic skin release growth factors that induce keratinocyte proliferation. En *J Invest Dermatol.* Vol. 101 (1993); p.695-700
- [65] BOER O.J, Et al..Reappraisal of in situ immunophenotypic analysis of psoriasis skin: interaction of activated HLA-DR+ immunocompetent cells andendothelial cells is a major feature of psoriatic lesions. En: *Arch Dermatol Res* Vol. 286 (1994); p. 286-87

- 
- [66] GRIFFITHS CEM, Et al. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin. Modulation by recombinant gamma interferon and tumour necrosis factor. En: *J Am Acad Dermatol* Vol. 20 (1989); p.617-623
- [67] TRAVERS B.Jeffrey. Et al. Epidermal HLA-DR and the enhancement of cutaneous reactivity to superantigenic toxins in psoriasis. En: *J. Clin. Invest.* Vol. 104 (1999); p.1181–1189
- [68] NICKOLOFF BJ. The cytokine network of psoriasis. En: *Arch Dermatol* Vol. 127 (1991); p.871-84.
- [69] Neuner P, Urbanski A, Trautinger F, et al. Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. En: *J Invest Dermatol* Vol. 97 (1991); p.27-33.
- [70] OZER, Arican. Et al. Serum Levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients With Active Psoriasis and Correlation With Disease Severity : Mediators of Inflammation. En: *Research Communicatio.* Vol. 5 (2005), p. 273–279
- [71] JNWN Barrer. Et al. Detection of interferon-gamma mRNA in psoriatic epidermis by polymerase chain reaction. En: *J Dermatol Sci* Vol. 2 (199); p. 106-11.
- [72] FRANAK, M. Microarray Analyses of Peripheral Blood Cells Identifies Unique Gene Expression Signature in Psoriatic Arthritis. En: *Molecular Medicine.* Vol. 11, No 1 – 1 2 (Jan. -Dec. 2005); p. 21. Citado por: GLADMAN, DD et al. Psoriatic arthritis : Epidemiology, clinical features, course, and outcome. En: *Ann. Rheum. Dis.* Vol. 64, No 2 (2005); p.14-7.
- [73] E. A. O'TOOLE. Et al. Induction of keratinocyte IL-8 expression and secretion by IgG autoantibodies as a novel mechanism of epidermal neutrophil recruitment in a pemphigus variant. En: *Clin Exp Immunol* Vol. 119 (2000); p. 217–224
- [74] M. Friedrich. Et al. Flow cytometric characterization of lesional T cells in psoriasis: intracellular cytokine and surface antigen expression indicates an activated, memory/effector type 1 immunophenotype. En: *Arch Dermatol Res* Vol. 292 (2000); p.519–521
- [75] K, Asadullah. Et al. The pathophysiological role of cytokines in psoriasis. *Drugs Today.* Vol. 35 (1999); p. 913–924
- [76] LM, AUSTIN Et al. The majority of epidermal T cells in psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines. interferon-gamma. interleukin-2. and tumour necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. En: *J Invest Dermatol.* Vol. 113 (1999); p. 752–759

- 
- [77] ZHOU, Xianghong. Et al. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. En: *Physiol Genomics* Vol. 13 (2003); p. 69–78
- [78] O, Frank. Et al. Characterization of Dermal Dendritic Cells in Psoriasis Autostimulation of T Lymphocytes and Induction of Thi Type Cytokines. En: *J. Clin. Invest.* Vol. 94 (1994); p..202-209.
- [79] SUGIYAMA, Hideaki. Et al. Dysfunctional Blood and Target Tissue CD4, CD25 high Regulatory T Cells in Psoriasis: Mechanism Underlying Unrestrained Pathogenic Effector T Cell Proliferation. En: *The Journal of Immunology.* (Oct 13, 2005); p164-173
- [80] SIGMUNDSDOTTIR, J. E H. Et al. The frequency of CLA CD8 T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. En: *Clinical and experimental immunology.* Vol 126 (Agu 2001); p 365-369.
- [81] L. Ackermann. Et al. Mast cells of psoriatic and atopic dermatitis skin are positive for TNF- $\alpha$  and their degranulation is associated with expression of ICAM-1 in the epidermis. En: *Arch Dermatol Res* Vol. 290 (1998); p. 353–359
- [82] Gottlieb A.B. Et al. Phase 1 trial of psoriasis with an anti-CD11A (LFA-1) monoclonal antibody (MAB). En: *J. Invest. Dermatol.* (1998); p.110-679
- [83] KESS. Daniel. Et al. CD4+ T Cell-Associated Pathophysiology Critically Depends on CD18 Gene Dose Effects in a Murine Model of Psoriasis<sup>1</sup>. En: *The Journal of Immunology,* Vol 171 (2003); p. 5697–5706.
- [84] STRATIS, Athanasios. Et al. Pathogenic role for skin macrophages in a mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation. En : *The journal of clinical investigation.* Vol.116, No 8 (Aug 2006) ; p 2094-2104
- [85] WANG Honglin. Et al. Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasiform skin inflammation. En: *The Journal of Clinical Investigation* Vol. 116 No. ( Aug 2006); p. 2105-2114
- [86 ] DJALILIAN, R. Ali. Et al. Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. En: *The Journal of Clinical Investigation.* Vol.116 No. 5 (May 2006); p. 1243-1253
- [87] FERNÁNDEZ Pita S. Tipos de estudios clínico epidemiológicos. Universidad de Alicante: 1995. p. 25-47. Actualización 28/02/2001.
- [88] WORLD MEDICAL ASSOCIATION. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Nurs Ethics* 9(1). 2002; p.105-9
- [89] Fleisher TA. Thomas RH. Introduction to Diagnostic Immunology. En: *JAMA.* Vol. 278 (1997); p.1823-1834

- 
- [90] K. Ferenczi. Et al. CD69, HLA-DR and the IL-2R identify persistently activated T cells in psoriasis vulgaris lesional skin: Blood and skin comparisons by flow cytometry. En: *J Autoimmun* Vol. 14 (2000); p.63–78.
- [91] BOER O.J. Et al. Reappraisal of in situ immunophenotypic analysis of psoriasis skin: interaction of activated HLA-DR+immunocompetent cells and endothelial cells is a major feature of psoriatic lesions. En: *Arch. Dermatol. Res.* Vol. 286 (1994); p. 87–96
- [92] I, Ikaheimo. Et al. Immunogenetic profile of psoriasis vulgaris: Association with haplotypes A2,B13,Cw6, DR7,DQA1\*0201 and A1,B17,Cw6, DR7,DQA1\*0201. En: *Arch Dermatol Res* Vol. 288 (1996); p.63–67.
- [93] P., Youinou. PM., Lydyard. CD5+ B cells in nonorganspecific autoimmune diseases: a fresh look. En: *Lupus* Vol. 10 (2001); p. 523-5.
- [94] BERLAND, R. WORTIS, HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. En: *Annu Rev Immunol* Vol. 20 (2002); p. 253-300

# **ANEXOS**



## **ANEXO I**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

YO \_\_\_\_\_, mayor de edad. He sido informado anticipadamente por los estudiantes del grupo de investigación en Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Cauca, donde se me ha pedido que participe como sujeto en una investigación llamada "DETERMINACION DE LA RESPUESTA INMUNE POR CITOMETRIA DE FLUJO EN SANGRE PERIFERICA EN PACIENTES CON PSORIASIS" bajo la dirección del Dr. Julio Cesar Klinger Hernández, y sus colaboradores de laboratorio de Inmunología, Biología molecular y Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán.

**OBJETIVO Y PROPÓSITO:** El propósito de este estudio es identificar y evaluar el tipo respuesta inmune que desencadena la enfermedad catalogada como Psoriasis en el departamento del Cauca, Los resultados de este estudio son de gran utilidad por que permiten motivar y aportar una idea cercana de lo que ocurre en la enfermedad, para en futuros estudios se logre dar mejor claridad del mecanismo inmunológico de la patología Psoriasica

**PROCEDIMIENTOS:** Entiendo que completaré un cuestionario sobre estilo de vida y estado de salud. Si califico para participar en el estudio, yo donaré una muestra de sangre de 3 mL. Obtenidos de la vena de mi brazo (Venopunción) y de la placa Psoriasica (Punción directa) extracción por capilaridad, para su estudio por Citometría de Flujo.

**NUMERO DE PARTICIPANTES:** El número de 14 casos y 12 controles

**BENEFICIOS AL SUJETO:** Entiendo que no recibiré beneficio directo por mi participación voluntaria en este estudio. Los datos del estudio serán confidenciales y no me podrán ser relevados ya que este estudio es de tipo poblacional, y no diagnóstico, y por lo tanto sus conclusiones solo serán extrapolados a la población total (26 sujetos).

**BENEFICIOS A LA SOCIEDAD:** El beneficio a la sociedad será la información obtenida acerca de la respuesta autoinmune que se desarrolla con la enfermedad, con el fin de Aportar evidencia científica, para estudios posteriores, se logre dar mejor claridad del mecanismo inmunológico de la patología Psoriasica

**RIESGOS POR PARTICIPACIÓN:** Entiendo que los riesgos potenciales de mi participación en este estudio son sangrado o infección en los sitios de toma de muestras, los cuales serán evitados mediante el uso de técnicas asépticas por personal clínico calificado y experimentado.

CONFIDENCIALIDAD: Entiendo que la información del cuestionario y todas las muestras serán identificadas con un código para proteger mi nombre y datos personales. Esta información será mantenida bajo estricta confidencialidad por parte del director de la investigación (Dr. Julio Cesar Klinger Tel. (092) 8232999 / 8232333 Cr 7 # 18n-23 Popayán E-mail. [Juceclin@msn.com](mailto:Juceclin@msn.com)).

CLAUSULAS: Puedo decidir no participar o retirarme del estudio en cualquier momento. En caso de llegar a retirarme, el investigador principal y su equipo de profesionales, se comprometen a cancelar todos los datos inmunológicos que tengan sobre mí en sus registros y/o bases de datos

Entiendo que el consentimiento voluntario es requerido para todas las personas en este proyecto. Los procedimientos principales, me los han explicado en un lenguaje que yo puedo entender. Me han explicado los riesgos e incomodidades de los procedimientos. Me han explicado los beneficios de este estudio. Me han ofrecido responder a todas las preguntas que yo pueda tener acerca de los procedimientos antes de ingresar al estudio. Si tengo una pregunta durante o después del procedimiento puedo contactar al Dr. Julio Cesar Klinger Tel. (092) 8232999 / 8232333 Cr 7 # 18n-23 Popayán E-mail. [Juceclin@msn.com](mailto:Juceclin@msn.com).

Me han dicho que la Universidad del Cauca no tiene mecanismos de compensación si algún daño físico ocurriera como resultado directo de esta investigación para los sujetos de investigación. Sin embargo, entiendo que tratamientos de emergencia disponibles para el público en general están disponibles para mí también. Yo tengo el derecho a la privacidad y confidencialidad de toda la información obtenida con relación a este estudio. La información obtenida de este estudio que pueda identificarme será sólo aportada al investigador principal, quien podrá tener acceso a mi historia clínica si es necesario. Los resultados de este estudio pueden ser divulgados en eventos nacionales y/o internacionales ó ser publicados en revistas científicas sin identificarme por mi nombre y no serán utilizados para discriminación étnica, religiosa, política, social, laboral ni de ninguna índole.

Acepto voluntariamente participar como sujeto de investigación en el proyecto antes mencionado. Entiendo que se me dará una copia de este consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del sujeto

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del Director del Proyecto  
**JULIO CESAR KLINGER**

MD. Epc, En Medicina Interna y Citometría de flujo.  
Ms Sci. En Inmunología y Microbiología



## ANEXO II

### DETERMINACION DE LA RESPUESTA INMUNE POR CITOMETRIA DE FLUJO EN SANGRE PERIFERICA EN PACIENTES CON PSORIASIS

Fecha

#### I. DATOS PERSONALES

Nombres y Apellidos: \_\_\_\_\_ No I.D. \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_ Vivienda: Rural  Urbana

Origen: \_\_\_\_\_ Procedencia: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

1. Sexo: M  F

2. Fecha Y Lugar De Nacimiento    \_\_\_\_\_

3. Edad (años): \_\_\_\_\_ Meses: \_\_\_\_\_

4. Estado civil: Casado  Soltero  Divorciado  Otros: \_\_\_\_\_

5. Nivel de educación Primaria  Secundarias  Universidad  Otros: \_\_\_\_\_

#### II. PREGUNTAS REFERENTES A SU ESTADO DE SALUD

6. ¿Ha tenido problemas de salud? SI  NO  Cuales: \_\_\_\_\_

7. ¿Ha tenido enfermedades virales recientes gripas severas sarampión u otro etc.?  
(Últimos 6 meses) SI  NO   
¿Cual(es)? \_\_\_\_\_

8. ¿Consumes algún tipo de medicamento (drogas para la presión etc.)? SI  NO   
¿Cual(es)? \_\_\_\_\_

9. ¿En su familia existe problemas de salud hereditario (*infarto, miocardio Dabeties mellitus o cáncer* etc.)? SI  NO   
¿De que tipo? \_\_\_\_\_



### III. ANTECEDENTES PERSONALES DE SALUD

10. ¿Usted ha padecido algunas enfermedades? SI  ¿ál(es)?

A.  Pulmonares (Neumonía, Asma Bronquitis Catarro): \_\_\_\_\_

B.  Sanguíneas (Anemias hepatitis, Diabetes): \_\_\_\_\_

C.  De la piel (Micosis Eczema, Pie de atleta): \_\_\_\_\_

D. PSORIASIS Que tipo? \_\_\_\_\_

En que sitios? \_\_\_\_\_

Otras: \_\_\_\_\_

11. ¿Hay antecedentes de algún tipo de lesión en la piel como Psoriasis u otras en algún familiar? SI  NO

A.  PSORIASIS Que tipo? \_\_\_\_\_

En que sitios? \_\_\_\_\_

B.  Alergias \_\_\_\_\_

C.  Descamación \_\_\_\_\_

D.  Resequedad \_\_\_\_\_

12. ¿Qué generación? I  II  ó III

13. ¿Tiene confirmación histopatología?

### IV. NIVELES DE ESTRES

SI NO

12.

a) ¿Se siente cansado aunque haya dormido suficiente?.....

b) ¿Se siente de mal genio, irritado o impaciente por pequeños inconvenientes?...

c) ¿Tiende a sentirse enfermo?.....

d) ¿Esta alimentándose bien?.....

e) ¿La comunicación con su jefe, compañeros, amigo, o familias es conflictiva?.....

f) ¿Se siente aburrido?.....

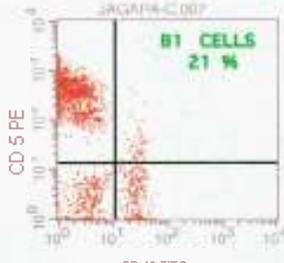
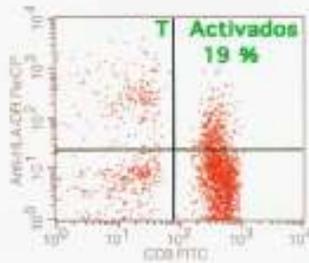
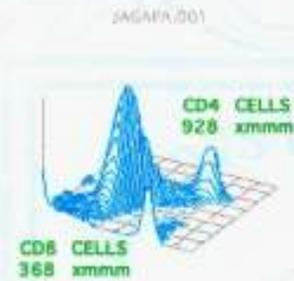
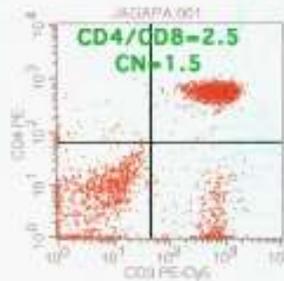
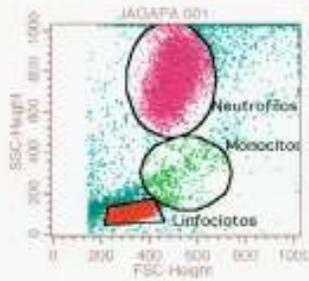
g) ¿NO duerme pensando en sus problemas o en lo que hay que hacer mañana?

**ANEXO III  
 REPORTE DE CITOMETRÍA POR PACIENTE**

File: JAGAPA.001  
 Sample ID: JAGAPA  
 Tube: Unt000  
 Acquisition Date: 06-Sep-07  
 Gated Events: 10000  
 X Parameter: FSC-Height (Linear)

Region	Eventos	% Gated	% Total
Linfocitos	2719	27.19	27.19
Monocitos	324	3.24	3.24
Neutrofilos	4942	49.42	49.42

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**Inmunología**  
 FACSCalibur Flowcytometer, B&D, USA  
 Popayan - Colombia



**Reporte:**

Se observa:

- 1- Relacion CD4/CD8 aumentada.
- 2- Linfocitos T CD4 normales.
- 3- Linfocitos T CD8 normales.
- 4- Porcentaje de LT activados aumentado.
- 5- Porcentaje de linfocitos B1 aumentado

Este reporte sugiere:

- 1- Activacion inmune antibacterial.
- 2- Autoinmunidad secundaria.

Dr. JULIO CESAR KLINGER H.  
 Bact. GLORIA INES AVILA C.