



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO I.A.P.
HOSPITAL “LUIS SÁNCHEZ BULNES”

TESIS

PARA OPTAR POR LA ESPECIALIDAD EN OFTALMOLOGÍA

PRESENTA

LIC EN MED. JESSICA ROGEL RODRÍGUEZ

ESTANDARIZACIÓN DE LA TITULACIÓN DE ANTICUERPOS DE
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNES
EN HUMOR VÍTREO, EN PACIENTES CON PARS PLANITIS

TUTOR PRINCIPAL: Dra. Matilde Ruíz Cruz

JEFE DE INVESTIGACIÓN
ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO I.A.P.

COMITÉ ASESOR: M en C. Karla Tovar Hernández
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO I.A.P.

M en C. Elvira Pitén Isidro
Dra. Perla Mariana del Río Estrada
Dr. Santiago Ávila Ríos
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS (CIENI)

CD.MX, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

I. ÍNDICE DE FIGURAS	4
II. ÍNDICE DE TABLAS	5
III. ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Antecedentes generales	7
1.1.1 Pars planitis (PP)	7
1.1.2 Epidemiología	8
1.1.3 Manifestaciones clínicas	8
1.1.4 Diagnóstico	9
1.1.5 Tratamiento.....	9
1.2. Antecedentes particulares	10
1.2.1 CD133	10
1.2.2 HLADR	10
1.2.3 CD117 (c-kit).....	11
1.2.4 CD44	11
1.2.5 CD38	12
1.2.6 CD19	12
1.2.7 CD3	13
1.2.8 CD14	13
1.2.9 CD8	13
1.2.10 CD16	14
1.2.11 CCR6.....	14
1.2.12 CD69	15
1.2.13 CD56	15
1.2.14 CD4	15
1.2.15 CCR2.....	16
1.2.16 CD103	16
1.2.17 CD15	16
1.2.18 CCR7.....	17
2. HIPÓTESIS	18
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19

4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos particulares	19
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Líneas celulares.....	21
6.2 Compensaciones	21
6.3 Titulación de anticuerpos	23
7. RESULTADOS	23
7.1 Procesamiento celular	23
7.2 Titulaciones de anticuerpos	25
7.2.1 Anticuerpos titulados en PBMCs.....	25
7.2.2 Anticuerpo titulado en línea celular Y-79.....	27
7.2.3 Anticuerpo titulado en línea celular ARPE.....	27
8. DISCUSIÓN	29
9. CONCLUSIÓN	33
10. REFERENCIAS	34

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Esquema representativo de la anatomía del ojo en condiciones normales y en Pars Planitis.

Fig 2. Imágenes de citometría de flujo del análisis de expresión de HLADR; CD38, CD19; CD3; CD14; CD8; CD16; CCR6; CD69; CD56; CD4; CCR2; CD103; CD15; CCR7 en PBMCs de pacientes sanos.

Fig 3. Imágenes de citometría de flujo del análisis de expresión de CD133 en células Y-79.

Fig 4. Imágenes de citometría de flujo del análisis de expresión de CD44 en células ARPE.

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de los anticuerpos utilizados en la estandarización de los Ab para la inmunofenotipificación de células inmunes en pacientes con PP.

Tabla 2. Resumen de las líneas celulares utilizada para la estandarización de la técnica con los Ab.

Tabla 3. Resumen de las disoluciones finales a utilizar obtenidas del panel de identificación de acuerdo con los resultados de citometría de flujo.

III. ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
ARPE	Células de Epitelio Pigmentado de Retina
CD	Clúster de Diferenciación
CS	Corticosteroides
FcγRIII	Receptor Fc
FSC	Factor de células madre
HA	Hialuronano
IL-6	Interleucina 6
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad I
NK	Natural Killer
OPN	Osteopontina
PMBC	Células mononucleares de sangre periférica
PP	Pars Planitis

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes generales

1.1.1 Pars Planitis (PP)

La PP es una enfermedad ocular inflamatoria crónica caracterizada por infiltración linfocitaria en la pars plana y la cavidad vítrea, así como por la presencia de vasculitis retiniana periférica (Arellanes-García et al., 2008). Se caracteriza por la forma tejido fibrovascular y agregación de células inflamatorias o también denominados “bancos de nieve” en la pars plana y los “copos de nieve” que se refiere a la acumulación de células en la cavidad vítrea (Fig. 1). Por lo general, esta condición es bilateral, aunque puede manifestarse asimétricamente (Guest et al., 2001).

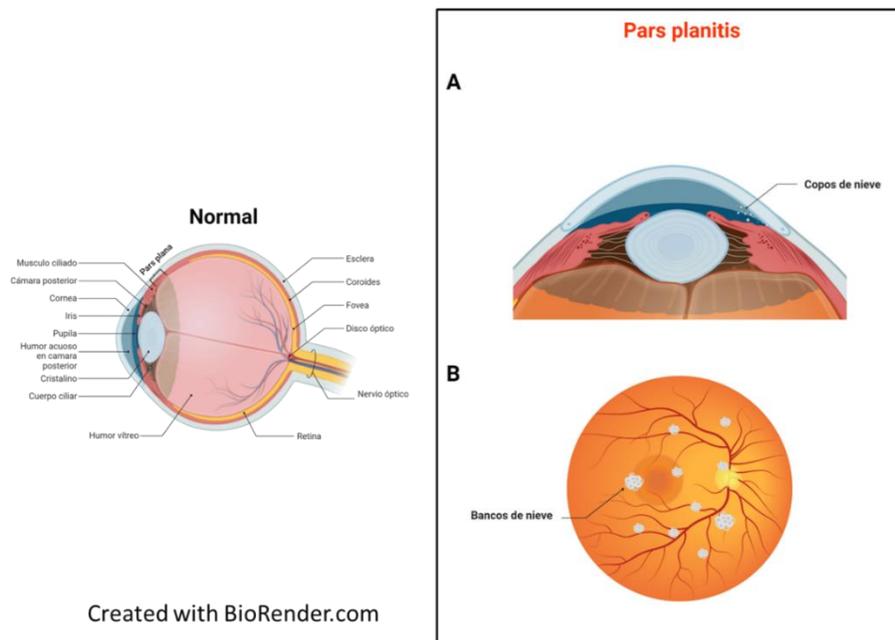


Fig 1. Esquema representativo de la anatomía del ojo en condiciones normales y en Pars Planitis. A) Representación del cumulo celular denominado bancos de nieve observado en los pacientes con PP. B) Copos de nieve observados en fondo de ojo en pacientes con PP.

1.1.2 Epidemiología

Presenta una incidencia de hasta el 15 %, principalmente en niños y adultos jóvenes de forma bilateral y asimétrica. La severidad de la respuesta inmune, el nivel y tipo de células inflamatorias y sus efectos, influyen en el daño estructural de la retina. En México, la incidencia de esta patología en un centro de referencia de tercer nivel durante un período de estudio de 9 años fue de 2.92 % entre todos los pacientes con uveítis (Forrester, 2007); (Concha del Río et al., 2020).

1.1.3 Manifestaciones clínicas

Los principales hallazgos clínicos que se encuentran son: células en cámara anterior, queratopatía en banda, membrana ciclítica, inflamación de cámara vítrea, bancos y copos de nieve (Berker et al., 2018). Los pacientes con Pars Planitis tienen los niveles de IL-6 más altos respecto a otras entidades de uveítis. Dicha interleucina es importante en la respuesta inmune del huésped al producir reactantes de fase aguda, inducir fiebre, activación de macrófagos, movilización de neutrófilos e iniciar la respuesta inmune adaptativa (Perez et al., 2004).

Las membranas ciclíticas son proliferaciones fibrovasculares formadas por la migración de macrófagos en el epitelio ciliar que posteriormente se diferencian en fibroblastos, se extienden desde la parte interna del cuerpo ciliar de la base vítrea y la retina periférica hacia la cápsula posterior del cristalino y la hialoides anterior. Poseen actividad contráctil, es decir que si se rompe puede producir desprendimiento del cuerpo ciliar, coroides y retina periférica (Concha del Río et al., 2020).

No obstante, se desconoce cuáles son las células del sistema inmune que se relacionan al desprendimiento de retina, vitritis severa crónica o hemorragia vítrea en pacientes con Pars Planitis.

1.1.4 Diagnóstico

El diagnóstico se basa en los hallazgos clínicos, no existe un estudio de laboratorio específico para esta patología, por lo que es un diagnóstico de exclusión y es indispensable descartar enfermedades sistémicas. En niños se tiene que hacer el diagnóstico diferencial con uveítis anterior, artritis idiopática juvenil, sarcoidosis. Síndrome de Bau, esclerosis múltiple, toxocariasis, toxocara y retinoblastoma. En adultos es importante descartar sarcoidosis, tuberculosis, esclerosis múltiple, síndrome de Behçet, síndrome uveítico de Fuchs y enfermedad de Lyme. En los adultos mayores el diagnóstico diferencial más importante es el linfoma primario intraocular (Ozdal et al., 2015).

1.1.5 Tratamiento

En 1984 se describió por primera vez el abordaje terapéutico que consiste en cuatro pasos:

- 1.- Inyecciones perioculares de corticosteroides (CS) y prednisona oral.
- 2.- Crioterapia o fotocoagulación con laser.
- 3.- Vitrectomía pars plana.
- 4.- Tratamiento inmunosupresor.

En la actualidad el primer paso con CS sigue siendo el pilar del tratamiento. Los CS tópicos se usan solo si hay inflamación del segmento anterior. Son ineficaces para el tratamiento de la uveítis intermedia, especialmente en casos fásicos. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes se requieren CS sistémicos o perioculares. Los pacientes con afectación bilateral, inflamación ocular grave o enfermedad unilateral que no responden al tratamiento con CS periorcular deben recibir tratamiento sistémico. La mayoría de los especialistas en uveítis prefieren una dosis de 1-1,5 mg/kg/día de prednisona que se reduce gradualmente según la respuesta clínica. La terapia con pulsos de metilprednisolona intravenosa (1 gr/día para adultos, 30 mg/kg para niños) puede administrarse cuando se necesita una acción más rápida y potente (Ozdal et al., 2015).

La terapia inmunosupresora ahorradora de esteroides debe considerarse como un segundo paso en pacientes que requieren tratamiento a largo plazo. El metotrexato (especialmente en pacientes pediátricos), el micofenolato mofetilo, la azatioprina y la ciclosporina pueden usarse solos o en combinación. La elección del agente inmunosupresor puede cambiar según la preferencia y la experiencia del oftalmólogo y también según los hallazgos clínicos y la edad del paciente. El metotrexato es el agente inmunosupresor de primera línea más utilizado en niños con uveítis crónica no infecciosa debido a su historial de seguridad a largo plazo y su buena tolerancia (Ozdal et al., 2015).

1.2. Antecedentes particulares

1.2.1 CD133

CD133 o prominina-1, una glicoproteína de superficie celular de cinco dominios transmembrana, inicialmente asociada con el colesterol y luego descrita como un biomarcador específico para seleccionar células progenitoras hematopoyéticas humanas. CD133 se reconoce como un biomarcador importante para identificar y aislar la subpoblación celular específica denominada "células madre cancerosas" en muchos tipos de neoplasias, incluido el cáncer de mama. Las células CD133+ tienen propiedades de troncalidad tales como resistencia a fármacos, autorrenovación, capacidad de diferenciación; alta proliferación y son capaces también de formar tumores en xenoinjertos. En el contexto del sistema inmune, el marcador CD133 ha sido identificado en ciertas células del sistema inmune, pero su función precisa aún no está completamente comprendida (Tume et al., 2016).

1.2.2 HLADR

HLA -DR es una molécula típicamente expresada por células presentadoras de antígenos y está asociada con la presentación de antígenos. Curiosamente, HLA -DR también se expresa en las células T y se ha asociado con la activación de las

células T. Sin embargo, no se comprende por completo por qué y cómo las células T activadas expresan HLA -DR (Tippalagama et al., 2021).

1.2.3 CD117 (c-kit)

CD117 (cKit) es el receptor del factor de células madre (FSC) y juega un papel importante en la hemopoyesis temprana. Mostramos que CD117 también se expresa después del cebado de células T CD8⁺ humanas maduras in vitro y es detectable después de la infección primaria in vivo . La expresión de CD117 está mediada por una vía intrínseca y es suprimida por IL-12. Es importante destacar que el grado de expresión de CD117 está inversamente relacionado con la fuerza del estímulo activador y el compromiso posterior con el SCF unido a la célula aumenta notablemente la susceptibilidad a la apoptosis. Por lo tanto, es probable que CD117 dé forma al patrón de CD8⁺ inmunodominancia de las células T durante una respuesta inmunitaria primaria al hacer que las células con poca avidéz por el antígeno sean más propensas a la apoptosis. Además, las células T CD117⁺ son muy sensibles a la apoptosis mediada por galectina-1, una molécula comúnmente expresada en el microambiente tumoral y, por lo tanto, la expresión de CD117 puede representar un mecanismo novedoso y potencialmente objetivo de evasión inmune tumoral (Frumento et al., 2019).

1.2.4 CD44

CD44 es una molécula de adhesión celular que juega un papel importante en la progresión tumoral y la metástasis. El papel de CD44 en la tumorigénesis se debe a su unión a los componentes de la matriz extracelular, incluidos el hialuronano (HA) y la osteopontina (OPN), y a las moléculas mensajeras, como los factores de crecimiento presentes en el microambiente tumoral. HA y OPN son muy abundantes en el nicho de células madre leucémicas y en tumores sólidos de varios tipos de cáncer, donde contribuyen al mantenimiento de la troncalidad de las células malignas. En consecuencia, CD44 ha sido reconocido como un marcador de células

madre cancerosas en varios tipos de cánceres, lo que ha sido un tema de muchas investigaciones recientes (Morath et al., 2016).

1.2.5 CD38

Es una glicoproteína de cadena única que tiene 300 aminoácidos, codificada en el cromosoma 4. Tiene un segmento transmembrana se localiza en la superficie celular y también se ha encontrado intracelular en el retículo endoplásmico, membrana nuclear y mitocondria, Regula la liberación de citocinas, adhesión y migración celular a los sitios de inflamación. Se encuentra expresado en células epiteliales prostáticas, astrocitos de los islotes pancreáticos, células de músculo liso, riñón, intestino, cerebro, así como en células B, células natural killer, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas (Piedra-Quintero et al., 2020).

1.2.6 CD19

CD19 es una proteína codificada por un gen localizado en el cromosoma 16p11.2. Tiene un peso de 95 kDa; se expresa en células de linaje B a excepción de las células plasmáticas. CD19 forma parte del correceptor de los linfocitos B (LB) junto con CD21 y CD81 (TAPA-1). Este complejo es de vital importancia en la activación de los LB pues son capaces de transducir señales secundarias para la activación de estos por medio de la unión de CD21 a C3d, que recubre algunos antígenos (Ag) luego de la activación del complemento. CD19 cumple junto con CD21 y CD81 un papel importante en la activación de LB pues ayuda a la transducción de señales secundarias que disminuyen el umbral de activación gracias a la capacidad de CD19 para unirse a varias proteínas que participan en varias vías de señalización favoreciendo la activación de factores de transcripción. Es un regulador positivo de la función de células B porque amplifica la activación PTK de la familia Src y mejora la actividad de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y promueve la proliferación celular (Li et al., 2017).

1.2.7 CD3

El antígeno CD3 comprende un complejo proteico que se codifica en el brazo corto del cromosoma 11 y es de gran importancia en la transducción de señales en los linfocitos T (LT). El CD3 está compuesto por tres cadenas 7 polipeptídicas designadas como γ , δ , ϵ y ζ no polimórficas, que se unen para formar los heterodímeros CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ y adicionalmente a estas cadenas se une el homodímero CD3 $\zeta\zeta$. Los heterodímeros poseen segmentos peptídicos de 5-10 aminoácidos (aa) ricos en cisteína que desempeñan un papel importante en la transducción de señales. Es un marcador empleado tradicionalmente para la detección de LTCD3⁺. El complejo CD3-receptor de células T (TCR) juega un papel central en la inmunorespuesta mediada por células T, ya que está involucrado en el reconocimiento de antígenos y la subsiguiente transducción de señales y activación de linfocitos T inmunocompetentes (Yang et al., 2005).

1.2.8 CD14

Es un co-receptor para los receptores tipo toll para activar las respuestas de inmunidad innata a los patógenos y la lesión tisular en macrófagos y monocitos, es indispensable para trastornos inflamatorios. Se codifica en el cromosoma 5q23-q31. Se ha detectado en enterocitos, hepatocitos y células beta de los islotes pancreáticos. Puede servir como un marcador de pronóstico para la artritis reumatoide y su respuesta al metotrexate. Se ha encontrado niveles elevados en esclerosis sistémica, enfermedad de Kawasaki, pancreatitis aguda, osteoartritis, vasculitis y colangitis biliar primaria. Es un mediador temprano crítico de la respuesta inmune innata a la sepsis, lesión de órganos y enfermedades inflamatorias crónicas como aterosclerosis y cáncer (Wu et al., 2019).

1.2.9 CD8

CD8 es una proteína codificada en el brazo largo del cromosoma 2. Al igual que CD4, CD8 es una molécula que desempeña un papel como correceptor de los LT al

interactuar con MHC I de forma similar a como lo hace la molécula CD4 en los LTh. Se caracteriza por ser una glicoproteína con un peso cercano a 68kDa, con dos isoformas, CD8 $\alpha\beta$ conformada por dos cadenas diferentes denominadas CD8 α y CD8 β unidas por dos enlaces disulfuro y la isoforma CD8 $\alpha\alpha$, un homodímero de cadenas CD8 α . Se ha descrito que las isoformas de CD8 se expresan de forma diferente; por ejemplo, CD8 $\alpha\alpha$ se expresa a nivel intestinal en los linfocitos intraepiteliales, LT $\gamma\delta$, algunas células dendríticas y subpoblaciones de células NK, mientras que la isoforma CD8 $\alpha\beta$ se expresa en timocitos TCR $\alpha\beta$ y en LT $\alpha\beta$ maduros. Actualmente se sabe que la afinidad de unión al MHC entre las isoformas de CD8 es similar; sin embargo, se ha propuesto que CD8 $\alpha\alpha$ desempeña alguna función como regulador negativo de la activación de algunas poblaciones linfocitarias al impedir la formación de raft lipídicos donde se localizan el TCR/CD3 y CD8 (Flynn & Gorry, 2019).

1.2.10 CD16

CD16 es una molécula codificada en el brazo corto del cromosoma 1, tiene un peso molecular entre 50 y 80 kDa. También es llamado el receptor de baja afinidad de la porción Fc de la IgG (Fc γ RIII), existen dos isoformas, Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb. En las células NK CD16 cumple un papel en la activación siendo muy importante en el proceso de citotoxicidad mediada por anticuerpos. El patrón de las dos isoformas es diferente, mientras que Fc γ RIIIa se expresa en mastocitos, macrófagos y células NK, Fc γ RIIIb se expresa exclusivamente en neutrófilos (Bryceson et al., 2006).

1.2.11 CCR6

Es un receptor acoplado a proteína G (GPCR), se produce una red de señalización cuando se une al ligando CCL20. Es una pieza importante en procesos biológicos como la homeostasis, proliferación, quimiotaxis celular y se ha visto implicada en enfermedades como el cáncer, la psoriasis, la esclerosis múltiple, la infección por VIH o la artritis reumatoide. Se expresa en células B, células dendríticas inmaduras

células linfoides innatas, células de Langerhans, neutrófilos, células T reguladoras y células Th17. Las células TH17 expresan los receptores y citocinas inflamatorias son las encargadas de esparcir la respuesta inflamatoria (Gómez-Melero & Caballero-Villarraso, 2023).

1.2.12 CD69

Es una proteína de leucina C transmembrana tipo II que se expresa en los linfocitos y ciertos subtipos de células T reg y de memoria; es un marcador de activación temprana inducido por la activación de células T. Se asocia con la regulación de salida de células T del timo y de los órganos linfoides periféricos. Es expresado por el gen CD69 en el cromosoma 12. Se ha encontrado sobre expresado en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes (Gorabi et al., 2020).

1.2.13 CD56

La molécula CD56 una proteína con un peso entre 120 y 180kDa, se encuentra codificada en el brazo corto del cromosoma 11. Es una isoforma de NCAM y parece cumplir un papel como molécula de adhesión a otras células; sin embargo, aún se desconoce completamente su función. En sangre periférica es una molécula restringida a una subpoblación de células NK. También se observa en algunos linfocitos, en tejido neuronal, en algunas leucemias, mielomas y neuroblastomas. La expresión de CD56 varía en las células NK, por lo que actualmente se han descrito 5 poblaciones de células NK de acuerdo con la expresión en conjunto de CD56 y CD16: CD56^{bright} CD16⁻, CD56^{bright} CD16^{dim}, CD56^{dim} CD16⁻, CD56^{dim} CD16^{bright}, CD56⁻ CD16^{bright} (Van Acker et al., 2017).

1.2.14 CD4

Esta molécula es una glicoproteína de 55 kDa codificada en el brazo largo del cromosoma 12. Se expresa en la superficie de varias células hematopoyéticas y desempeña un papel fundamental en la activación de los linfocitos T ayudadores

(LTh) por medio de la unión con el MHC II. Cumple una función como transductor de señal por medio de la activación de una proteína tirosina quinasa de la familia Src. Adicionalmente también se expresa en monocitos y macrófagos (Luckheeram et al., 2012).

1.2.15 CCR2

Es un receptor de quimiocina involucrado en la movilización de monocitos, son 7 dominios transmembrana unidos por bucles intracelulares y extracelulares que contribuye a la señalización intracelular, es importante en la extravasación, adhesión y trasmigración de monocitos en el tejido inflamado y es esencial para la migración de monocitos Ly6C^{hi}. Durante la inflamación se expresa en células natural killer, células T y basófilo (Chu et al., 2014).

1.2.16 CD103

Integrina αE , la cual se une a la integrina $\beta 7$ para formar la molécula $\alpha E\beta 7$ 17–19, que se expresa en las células T epiteliales, células T CD4 y CD8, así como en leucocitos en el intestino pulmones y la piel. Dicha molécula se une a la cadherina-E expresada en células epiteliales intestinales, queratinocitos y células de Langerhans. Se involucrado en la patogénesis de enfermedades como asma, hipersensibilidad alérgica de contacto (Fukui et al., 2020).

1.2.17 CD15

El antígeno Lewis x (Le x), o CD15, es un glicano de la superficie celular que consta de un trisacárido con la estructura Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc. Inicialmente identificado por anticuerpos monoclonales a principios de la década de 1980, se apreció rápidamente como un marcador útil para la diferenciación mieloide humana. En conclusión, el glicano Lewis x (Le x /CD15) es un marcador distintivo para las células mieloides humanas y media la adhesión de neutrófilos a las células dendríticas (Gadhoum & Sackstein, 2008).

1.2.18 CCR7

Es un receptor transmembrana de 7 dominios acoplado a proteína G que se albergan en los ganglios linfáticos de drenaje y pueden activar las células T, mediando la migración de células presentadoras dendríticas clásicas y el tráfico de células detriticas plasmocitoides Se codifica en el gen Ccrt7 localizado en el cromosoma 17q12-q212 y tiene 378 aminoácidos. Tiene dos ligandos, el CCL19 y el CCL21 que son fundamentales en el tráfico de células inmunes hacia los ganglios linfáticos e incluso en la metástasis o invasión de algunas células tumorales maligna (Hong et al., 2022).

2. HIPÓTESIS

La estandarización de la titulación de anticuerpos para la identificación de células inmunes en el humor vítreo de pacientes con Pars Planitis permitirá una detección más precisa de estas células, lo que facilitará la caracterización y seguimiento de la enfermedad, así como el desarrollo a futuro de estrategias terapéuticas dirigidas y efectivas a nivel intraocular o periocular y no solamente tratamiento sistémico.

3. JUSTIFICACIÓN

La estandarización de la titulación de anticuerpos para la identificación de células inmunes en el humor vítreo de pacientes con Pars Planitis nos permitirá la identificación de células inmunes en el humor vítreo; y una estandarización correcta del panel de anticuerpos para la identificación ayudará a obtener resultados más confiables y mejorar la precisión diagnóstica; con ello facilitará valorar el seguimiento y evolución de las células inmunes en el humor vítreo de los pacientes, lo que permitirá evaluar la respuesta al tratamiento, identificar recaídas y ajustar las estrategias terapéuticas de manera más precisa.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estandarizar la inmunofenotipificación de las células infiltradas en humor vítreo por medio de citometría de flujo de pacientes con Pars Planitis en la Asociación para Evitar la Ceguera en México I.A.P.

4.2 Objetivos particulares

4.2.1 Establecer los anticuerpos fluorescentes que se utilizarán en el protocolo.

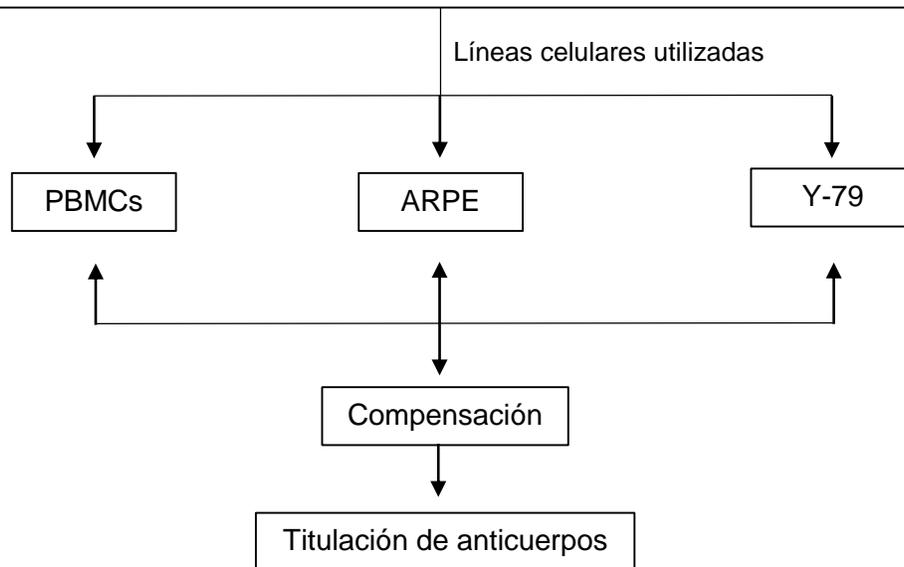
4.2.2 Establecer el protocolo de compensación adecuado.

4.2.3 Establecer una titulación de anticuerpos apropiada en cada una de las líneas celulares a utilizar (PBMCs, ARPE o Y-79).

4.2.4 Analizar los resultados de las citometrías de flujo y determinar concentración adecuada de cada anticuerpo.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Estandarizar la inmunofenotipificación de las células infiltradas en humor vítreo por medio de citometría de flujo de pacientes con Pars Planitis en la Asociación para Evitar la Ceguera en México I.A.P.



	Anticuerpo
BUV395	CD133
ZOMBIE	Marcador de viabilidad (biolegend)
BUV496	HLADR
BUV563	CD117 (c-kit)
BUV661	CD44
BUV805	CD38
BV421	CD19
BV570	CD3
BV605	CD14
BV650	CD8
BV711	CD16
BV785	CCR6
PE	CD69
PECF594	CD56
PECY5.5	CD4
PECY7	CCR2
APC	CD103
AF700	CD15
APCCY7	CCR7

Citometría de flujo

Obtención de volúmenes finales adecuados

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Líneas celulares

La línea celular Y-79 (ATCC HTB-18) LOT: 63743666 se mantuvo y se propagó en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) de ATCC 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% V/V de antibiótico en botellas de cultivo de 75cm². Las condiciones de incubación fueron de 37 °C a 5% de CO₂. Posteriormente llegada la confluencia al 70% fueron utilizadas para la titulación de anticuerpos.

La línea celular ARPE (células del epitelio pigmentado de la retina) se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alto en glucosa y con L-glutamina (ATCC-30-2002) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% V/V de antibiótico en botellas de cultivo de 75cm². Las condiciones de incubación fueron 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente llegada la confluencia al 70% fueron utilizadas para la titulación de anticuerpos.

Las células PMBCs; fueron obtenidas de pacientes sanos y aisladas por medio del protocolo de gradiente de densidad o también conocido como Ficoll-Paque. Según la densidad diferente de cada población de células sanguíneas, se pueden separar mediante una centrifugación de un solo paso con el medio de gradiente de densidad correspondiente. Estas fueron cultivadas en medio R10 (RPMI suplementado con suero fetal bovino 10%; 1% V/V glutamina y 1% V/V de antibiótico) en botellas de cultivo de 75cm². Las condiciones de incubación fueron 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente llegada la confluencia al 70% fueron utilizadas para la titulación de anticuerpos.

6.2 Compensaciones

La compensación es un procedimiento adicional y esencial cuando se utilizan tinciones policromáticas, ya que es más probable que exista superposición entre los

espectros de emisión de los fluorocromos utilizados. El proceso de compensación permite corregir esta superposición. Aunque se prefiere el uso de marcadores de alta densidad para la compensación, también se reconoce que lo realmente importante es proporcionar al software una señal positiva y una señal negativa, o dos poblaciones con intensidades de fluorescencia lo suficientemente diferentes y con la misma autofluorescencia, con el objetivo de evitar la superposición en los espectros de emisión de los fluorocromos presentes en la tinción y evitar obtener resultados incorrectos. Las compensaciones en el presente trabajo se realizaron con perlas de compensación CompBead (Marca BD, Cat: 51-90-900129); se les colocó el volumen indicado para cada Ab (Tabla 1) y se dejaron incubar toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron con Stain Buffer (BD) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos; y finalmente resuspendidas en formalina 1%.

Tabla 1. Listado de los anticuerpos utilizados en la estandarización de los Ab para la inmunofenotipificación de células inmunes en pacientes con PP.

Anticuerpo
CD133
HLADR
CD117 (c-kit)
CD44
CD38
CD19
CD3
CD14
CD8
CD16
CCR6
CCR7
CD69
CD56
CD4
CCR2
CD103
CD15

6.3 Titulación de anticuerpos

La titulación de anticuerpos (Ab) es un procedimiento diseñado para evaluar la concentración adecuada de Abs a utilizar en técnicas de inmunofenotipificación. Se ha mencionado que la concentración óptima de Ab es aquella que permite una mejor distinción entre una célula positiva y una célula negativa, lo cual es esencial para determinar la relación entre la señal (intensidad de fluorescencia de la tinción) y el ruido (uniones no específicas). Para lograr esto, es necesario obtener la intensidad media lineal del canal de fluorescencia tanto para las células positivas como para las negativas o el ruido.

7. RESULTADOS

7.1 Procesamiento celular

La titulación de anticuerpos se llevó a cabo en la Unidad de Investigación de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, I.A.P, se necesitaron células que expresaran los anticuerpos a titular; se ocuparon tres diferentes líneas celulares (Tabla 2).

La primera línea celular fue las células PMBCs (peripheral blood mononuclear cell/ monocitos celulares de sangre periférica) extraídas de pacientes sanos; en ellas se realizó la titulación para los anticuerpos CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD38, CD103, CD56, CD69, CCR2, CCR6, HLADR, CD15, CCR7, CD16.

La segunda línea celular empleada fue las ARPE (células del epitelio pigmentado de la retina) y con ellas se realizaron las titulaciones de los anticuerpos CD44.

Y finalmente en la línea celular Y-79, es una línea celular de retinoblastoma, y con ella se realizaron las titulaciones de CD133 y CD117 c-kit.

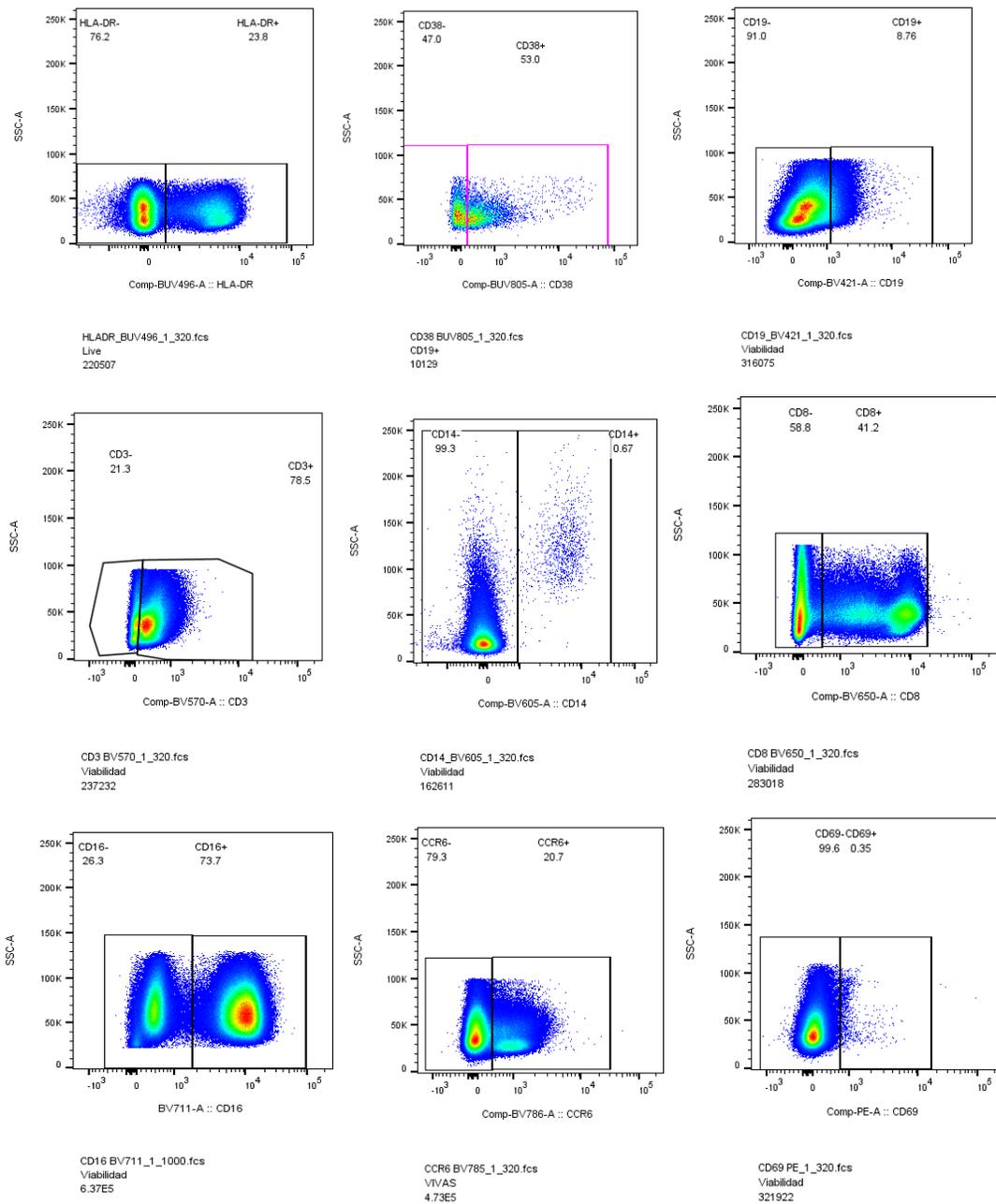
Posteriormente las muestras celulares fueron procesadas en el citómetro de flujo del Centro de Investigación en. Enfermedades Infecciosas (CIENI).

Tabla 2. Resumen de las líneas celulares utilizada para la estandarización de la técnica con los Ab.

PBMCs	ARPE	Y-79
HLADR	CD44	CD133
CD38	-	CD177 c-kit
CD19	-	-
CD3	-	-
CD14	-	-
CD8	-	-
CD16	-	-
CCR6	-	-
CCR7	-	-
CD69	-	-
CD56	-	-
CD4	-	-
CCR2	-	-
CD103	-	-
CD15	-	-

7.2 Titulaciones de anticuerpos

7.2.1 Anticuerpos titulados en PBMCs



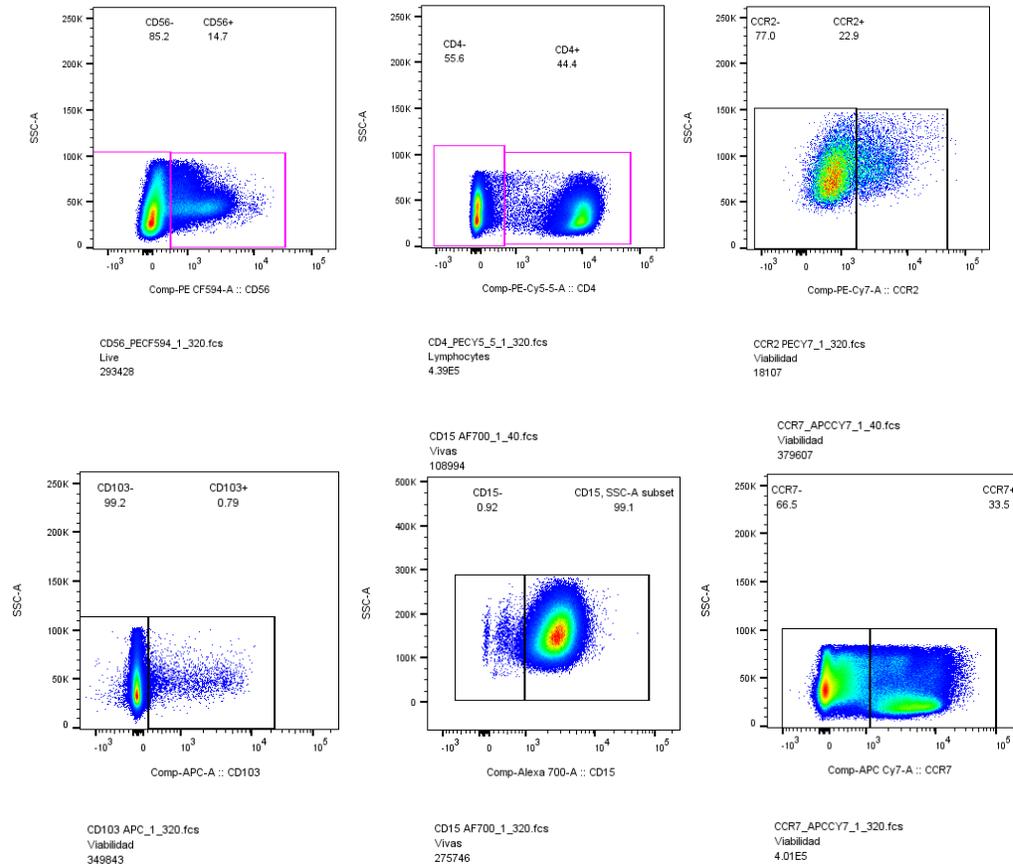


Fig 2. Imágenes de citometría de flujo del análisis de expresión de HLADR; CD38, CD19; CD3; CD14; CD8; CD16; CCR6; CD69; CD56; CD4; CCR2; CD103; CD15; CCR7 en PBMCs de pacientes sanos. Se representa las gráficas los niveles de expresión de los anticuerpos (eje horizontal) y la complejidad celular (eje vertical).

7.2.2 Anticuerpo titulado en línea celular Y-79

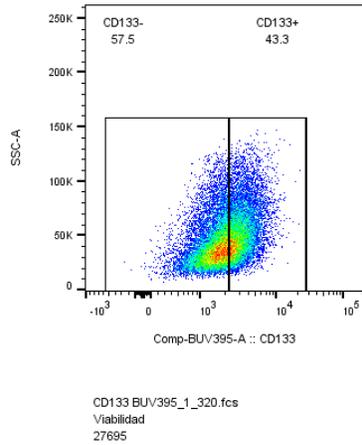


Fig 3. Imágenes de citometría de flujo del análisis de expresión de CD133 en células Y-79. A la izquierda se representa la gráfica de todas las células tumorales ordenadas según los niveles de expresión del Ab CD133 (eje horizontal) y la complejidad celular (eje vertical).

7.2.3 Anticuerpo titulado en línea celular ARPE

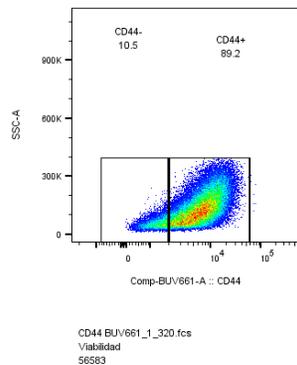


Fig 4. Imágenes de citometría de flujo del análisis de expresión de CD44 en células ARPE. A la izquierda se representa la gráfica de todas las células de retina ordenadas según los niveles de expresión del Ab CD44 (eje horizontal) y la complejidad celular (eje vertical).

La tabla de volúmenes finales obtenidas después de titular los anticuerpos se presentan a continuación (Tabla 3). Los valores representan las diluciones a utilizar y las respuestas obtenidas en el ensayo, que reflejan la capacidad del anticuerpo para reconocer y unirse específicamente a su antígeno objetivo. Estos resultados son cruciales para determinar la eficacia y la afinidad del anticuerpo, así como para evaluar su potencial aplicación en diagnóstico, terapia o investigación. La tabla proporciona una visión detallada de los títulos alcanzados y permite realizar comparaciones entre diferentes muestras o condiciones experimentales.

Tabla 3. Resumen de las disoluciones finales a utilizar obtenidas del panel de identificación de acuerdo a los resultados de citometría de flujo.

Fluorocromo	Anticuerpo	Células	Dilución a utilizar
BUV395	CD133	Y-79	1:50
BUV496	HLADR	PMBCs	1:160
BUV563	CD117 (c-kit)	Y-79	Falta titular
BUV661	CD44	ARPE	1:200
BUV805	CD38	PMBCs	1:50
BV421	CD19	PMBCs	1:20
BV570	CD3	PMBCs	1:20
BV605	CD14	PMBCs	1:160
BV650	CD8	PMBCs	1:320
BV711	CD16	PMBCs	1:500
BV785	CCR6	PMBCs	1:80
PE	CD69	PMBCs	1:5
PECF594	CD56	PMBCs	1:160
PECY5.5	CD4	PMBCs	1:1000
PECY7	CCR2	PMBCs	1:160
APC	CD103	PMBCs	1:100
AF700	CD15	PMBCs	1:60
APCCY7	CCR7	PMBCs	1:160

8. DISCUSIÓN

La estandarización de las técnicas moleculares es de suma importancia en la investigación científica y en el ámbito clínico por diversas razones. A continuación, se discuten algunos aspectos relevantes sobre la importancia de la estandarización de estas técnicas:

1. Reproducibilidad de los resultados: La estandarización garantiza que los protocolos y procedimientos utilizados en las técnicas moleculares sean consistentes y uniformes. Esto permite la reproducción de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios y por diferentes investigadores. La falta de estandarización puede conducir a variaciones significativas en los resultados, lo que dificulta la comparación y validación de los hallazgos.

2. Comparabilidad de los datos: Al estandarizar las técnicas moleculares, se asegura que los datos generados sean comparables entre diferentes estudios y experimentos. Esto es esencial para poder integrar y sintetizar la información obtenida en diferentes contextos y establecer conclusiones sólidas. La falta de estandarización puede dar lugar a diferencias en los métodos utilizados, lo que dificulta la comparación y la interpretación de los datos.

3. Avance en la investigación colaborativa: La estandarización de las técnicas moleculares fomenta la colaboración y el intercambio de conocimientos entre diferentes laboratorios e investigadores. Cuando todos los involucrados siguen los mismos protocolos y estándares, se facilita la comparación de resultados y se promueve una mayor confianza y fiabilidad en los hallazgos. Esto permite la generación de datos robustos y reproducibles, así como el establecimiento de consensos científicos más sólidos.

4. Mejora en el diagnóstico y tratamiento clínico: En el ámbito clínico, la estandarización de las técnicas moleculares es fundamental para garantizar la

precisión y fiabilidad de los resultados obtenidos. Esto es especialmente relevante en el diagnóstico de enfermedades genéticas, infecciosas y oncológicas, donde la identificación precisa de mutaciones genéticas, la detección de patógenos específicos o la evaluación de biomarcadores son cruciales para el manejo clínico adecuado de los pacientes. La estandarización asegura que los resultados sean comparables entre diferentes laboratorios y facilita la toma de decisiones clínicas basadas en evidencia sólida.

5. Calidad y seguridad de los productos biológicos: En la producción de productos biológicos, como terapias génicas, vacunas y productos sanguíneos, la estandarización de las técnicas moleculares es esencial para garantizar la calidad y seguridad de los productos. La estandarización asegura que los procesos de fabricación y control sean uniformes y reproducibles, lo que minimiza el riesgo de variaciones indeseables y garantiza la eficacia y seguridad de los productos utilizados en la atención médica.

En el presente trabajo se realizó una estandarización de un panel de anticuerpos y es de suma importancia en la citometría de flujo la técnica a utilizar para la identificación celular en muestras de vítreo de pacientes con Pars Planitis debido a que garantiza una correcta y precisa detección de antígenos específicos en las células. La titulación permite determinar la concentración óptima de anticuerpos necesaria para obtener una señal de fluorescencia adecuada y distinguir de manera confiable las células positivas de las negativas. Al estandarizar la titulación de anticuerpos, se minimiza la variabilidad entre experimentos y se asegura la reproducibilidad de los resultados. Esto es esencial para obtener datos confiables, comparables y precisos en estudios de inmunofenotipificación, investigación básica, diagnóstico clínico y desarrollo de terapias dirigidas.

La titulación de anticuerpos en la citometría de flujo es un paso crítico para obtener información valiosa sobre la expresión de marcadores celulares y con ello inmunofenotipificación de estirpes celulares que hasta hoy en día no se han

identificado. Estas células son de importancia en procesos inflamatorios como la Pars Planitis y el identificarlas es de suma importancia ya que su infiltración en el humor vítreo del paciente tiene consecuencias que afectan la anatomía ocular y el funcionamiento visual.

Algunas de las principales complicaciones oculares incluyen:

- **Opacidad y disminución de la visión:** La presencia de células inflamatorias en el vítreo puede provocar opacidad en este fluido gelatinoso que llena la cavidad ocular. Esta opacidad puede afectar la transparencia del vítreo y causar una disminución en la agudeza visual. Cuanto mayor sea la infiltración celular, mayor será el grado de opacidad y la afectación visual. La presencia de células en el vítreo ocasiona liberación de citocinas que conllevan a la inflamación de diferentes tejidos intraoculares.
- **Formación de sinéquias y tracciones:** En casos más severos de Pars Planitis, las células infiltradas en el vítreo pueden llevar a la formación de sinéquias, que son adherencias entre diferentes estructuras o tejidos del ojo. Estas adherencias pueden provocar tracciones en la retina, el cuerpo ciliar u otras estructuras, lo que puede ocasionar problemas como desprendimiento de retina, glaucoma o alteraciones en la producción y drenaje del líquido intraocular.
- **Edema macular y compromiso de la mácula:** La presencia de células inflamatorias en el vítreo puede provocar un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos de la retina, lo que puede resultar en la acumulación de líquido y edema en la región central de la retina conocida como mácula. El edema macular puede llevar a una disminución significativa de la agudeza visual y afectar la visión central, lo que dificulta tareas como leer, reconocer rostros o ver detalles finos e incluso ceguera.

- Cicatrización y fibrosis: La respuesta inflamatoria crónica en la PP puede desencadenar procesos de cicatrización y fibrosis en el vítreo y tejidos adyacentes. Esto puede conducir a cambios estructurales y funcionales en el ojo, como la formación de membranas contráctiles que ejercen tracciones en la retina y otros tejidos oculares, alterando aún más la función visual y aumentando el riesgo de complicaciones graves como el desarrollo de desprendimiento de retina.
- Administración de inmunosupresores: los inmunosupresores desempeñan un papel importante en el manejo de la PP, pero su uso conlleva riesgos asociados, como el aumento de la susceptibilidad a infecciones y la posibilidad de efectos secundarios sistémicos. Además, el costo de estos medicamentos puede ser una barrera para el acceso a un tratamiento adecuado.

9. CONCLUSIÓN

En conclusión, la estandarización de la titulación de anticuerpos mediante citometría de flujo para la identificación de células inmunes en el humor vítreo de pacientes con Pars Planitis ha demostrado ser un paso crucial en el avance de la caracterización y comprensión de esta enfermedad inflamatoria ocular. A través de este trabajo, hemos logrado establecer un protocolo confiable y reproducible que nos permitirá una detección precisa y cuantificación de las células inmunes presentes en el humor vítreo, y en consecuencia una alta precisión diagnóstica. Esto ha permitido una identificación más precisa de las células inmunes involucradas en la PP, lo que contribuye a una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y facilita la toma de decisiones clínicas más informadas.

Este estudio podría también impulsar la investigación científica en el campo de la Pars Planitis. Al contar con un protocolo estandarizado, los resultados obtenidos pueden ser comparables y reproducibles, lo que fomenta la colaboración científica y el intercambio de conocimientos. Además, la estandarización sienta las bases para investigaciones futuras y el desarrollo de nuevas terapias dirigidas específicamente a las células inmunes implicadas en la patogénesis de la PP.

En resumen, la estandarización de la titulación de anticuerpos mediante citometría de flujo ha sido un logro significativo en el estudio de la Pars Planitis en la Asociación para Evitar la Ceguera en México I.A.P. Se mejorará la precisión diagnóstica, el seguimiento de la enfermedad y se impulsará la investigación científica en este campo abriendo una nueva línea de investigación a futuro. Este avance contribuye a una atención médica más precisa y personalizada, abriendo nuevas puertas para el desarrollo de terapias y enfoques terapéuticos más efectivos en el manejo de la PP.

10. REFERENCIAS

- Arellanes-García, L., Navarro-López, P., Concha-Del Río, L. E., & Unzueta-Medina, J. A. (2008). Idiopathic Intermediate Uveitis in Childhood. *International Ophthalmology Clinics*, 48(3), 61–74. <https://doi.org/10.1097/IIO.0b013e31817d84af>
- Berker, N., Sen, E., Elgin, U., Atilgan, C. U., Dursun, E., & Yilmazbas, P. (2018). Analysis of clinical features and visual outcomes of pars planitis. *International Ophthalmology*, 38(2), 727–736. <https://doi.org/10.1007/s10792-017-0526-2>
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G., & Long, E. O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 107(1), 159–166. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1351>
- Chu, H. X., Arumugam, T. V., Gelderblom, M., Magnus, T., Drummond, G. R., & Sobey, C. G. (2014). Role of CCR2 in Inflammatory Conditions of the Central Nervous System. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(9), 1425–1429. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.120>
- Concha del Río, L. E., Duarte González, G. A., Mayorquín Ruiz, M., & Arellanes-García, L. (2020). Characterization of cyclitic membranes by ultrabiomicroscopy in patients with pars planitis. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 10(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12348-020-0194-7>
- Flynn, J., & Gorry, P. (2019). *Flow Cytometry Analysis to Identify Human CD8+ T Cells* (pp. 1–13). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9728-2_1
- Forrester, J. V. (2007). Intermediate and Posterior Uveitis. In *Immune Response and the Eye* (pp. 228–243). KARGER. <https://doi.org/10.1159/000099274>
- Frumento, G., Zuo, J., Verma, K., Croft, W., Ramagiri, P., Chen, F. E., & Moss, P. (2019). CD117 (c-Kit) Is Expressed During CD8+ T Cell Priming and Stratifies Sensitivity to Apoptosis According to Strength of TCR Engagement. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00468>
- Fukui, T., Fukaya, T., Uto, T., Takagi, H., Nasu, J., Miyanaga, N., Nishikawa, Y., Koseki, H., Chojookhuu, N., Hishikawa, Y., Yamashita, Y., & Sato, K. (2020). Pivotal role of CD103 in the development of psoriasiform dermatitis. *Scientific Reports*, 10(1), 8371. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65355-9>
- Gadhoum, S. Z., & Sackstein, R. (2008). CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. *Nature Chemical Biology*, 4(12), 751–757. <https://doi.org/10.1038/nchembio.116>
- Gómez-Melero, S., & Caballero-Villarraso, J. (2023). CCR6 as a Potential Target for Therapeutic Antibodies for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Antibodies*, 12(2), 30. <https://doi.org/10.3390/antib12020030>

- Gorabi, A. M., Hajighasemi, S., Kiaie, N., Gheibi Hayat, S. M., Jamialahmadi, T., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2020). The pivotal role of CD69 in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, *111*, 102453. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102453>
- Guest, S., Funkhouser, E., & Lightman, S. (2001). Pars planitis: a comparison of childhood onset and adult onset disease. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, *29*(2), 81–84. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9071.2001.d01-7.x>
- Hong, W., Yang, B., He, Q., Wang, J., & Weng, Q. (2022). New Insights of CCR7 Signaling in Dendritic Cell Migration and Inflammatory Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.841687>
- Li, X., Ding, Y., Zi, M., Sun, L., Zhang, W., Chen, S., & Xu, Y. (2017). CD19, from bench to bedside. *Immunology Letters*, *183*, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.01.010>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4 + T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Morath, I., Hartmann, T. N., & Orian-Rousseau, V. (2016). CD44: More than a mere stem cell marker. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *81*, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>
- Ozdal, P., Berker, N., & Tugal-Tutkun, I. (2015). Pars planitis: Epidemiology, clinical characteristics, management and visual prognosis. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, *10*(4), 469. <https://doi.org/10.4103/2008-322X.176897>
- Perez, V., Papaliadis, G., Chu, D., Anzaar, F., Christen, W., & Foster, C. (2004). Elevated Levels of Interleukin 6 in the Vitreous Fluid of Patients with Pars Planitis and Posterior Uveitis: The Massachusetts Eye & Ear Experience and Review of Previous Studies. *Ocular Immunology and Inflammation*, *12*(3), 205–214. <https://doi.org/10.1080/092739490500282>
- Piedra-Quintero, Z. L., Wilson, Z., Nava, P., & Guerau-de-Arellano, M. (2020). CD38: An Immunomodulatory Molecule in Inflammation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.597959>
- Tippalagama, R., Singhania, A., Dubelko, P., Lindestam Arlehamn, C. S., Crinklaw, A., Pomaznoy, M., Seumois, G., deSilva, A. D., Premawansa, S., Vidanagama, D., Gunasena, B., Goonawardhana, N. D. S., Ariyaratne, D., Scriba, T. J., Gilman, R. H., Saito, M., Taplitz, R., Vijayanand, P., Sette, A., ... Burel, J. G. (2021). HLA-DR Marks Recently Divided Antigen-Specific Effector CD4 T Cells in Active Tuberculosis Patients. *The Journal of Immunology*, *207*(2), 523–533. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100011>
- Tume, L., Paco, K., Ubidia-Incio, R., & Moya, J. (2016). CD133 in breast cancer cells and in breast cancer stem cells as another target for immunotherapy. *Gaceta*

Mexicana de Oncología, 15(1), 22–30.
<https://doi.org/10.1016/j.gamo.2016.01.003>

Van Acker, H. H., Capsomidis, A., Smits, E. L., & Van Tendeloo, V. F. (2017). CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00892>

Wu, Z., Zhang, Z., Lei, Z., & Lei, P. (2019). CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 48, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.06.003>

Yang, H., Parkhouse, R. M. E., & Wileman, T. (2005). Monoclonal antibodies that identify the CD3 molecules expressed specifically at the surface of porcine gammadelta-T cells. *Immunology*, 115(2), 189–196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02137.x>