

65
9m



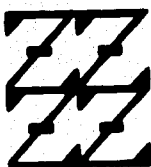
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

PARTICIPACION DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA
OFTALMOPATIA QUE SUFREN LOS RATONES
CEPA CD1 et/et

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
URBIETA MAGAÑA ELIZABETH

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO MURADO EN
DE NUESTRA COLECCION

MEXICO, D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES

**Dr. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA POR SU APOYO ORIENTACIÓN
DISPOSICIÓN Y ESFUERZO. PARA LA REALIZACIÓN DE ESTÉ TRABAJO Y
AL Dr. MARCO P. HERNÁNDEZ ÁBREGO POR SU ORIENTACIÓN Y AYUDA.**

**AL PROFESOR LUIS MORA GUEVARA POR LA ORIENTACIÓN Y CONSEJOS
BRINDADOS.**

GRACIAS A DIOS

**QUE MEDIO LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR EN LA UNAM UNA
CARRERA PROFESIONAL PARA ORGULLO DE MIS PADRES, BENEFICIO MÍO
Y DE LA SOCIEDAD A LA CUAL PERTENEZCO Y QUIERO SERVIR CON
HONESTIDAD Y CALIDAD.**

DEDICO ESTA TESIS

A MIS PADRES

**POR INFUNDIRME ÁNIMOS DE SEGUIR ADELANTE SIEMPRE SIN
IMPORTAR ADVERSIDADES.**

**MUY ESPECIALMENTE A MI HERMANO Dr. ALEJO URBIETA MAGAÑA
POR SU EJEMPLO APOYO Y CONFIANZA Y POR DESPERTAR EN MI LA
INQUIETUD DEL SABER.**

**PARA TODOS MIS SOBRINOS OJALÁ QUE SIGAN ADELANTE QUE SIEMPRE
SE FIJEN METAS TENGAN ANHELOS Y LUCHEN POR ALCANZARLOS.
CUANDO ESTO SUCEDE EL ALMA SE INUNDA DE EMOCIONES
INCOMPARABLES QUE PROPORCIONAN UNA DICHA CON ÁNIMOS DE
COMPARTIRLA CON TODOS LOS SERES QUE NOS RODEAN.**

PARA TODAS LAS PERSONAS QUE CONSULTEN ESTA TESIS

ÍNDICE

	Pág.
1.-INTRODUCCIÓN	1
2.-MARCO TEÓRICO	
2.1 EL RATÓN DESNUDO	2
2.2 INMUNIDAD	4
2.3 ÓRGANOS INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA INMUNE	6
2.4 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS IgG, IgM.	12
2.5 RESPUESTA PRIMARIA Y SECUNDARIA	15
2.6 MARCADORES DE SUPERFICIE	14
2.7 INMUNOANÁLISIS ENZIMÁTICO	16
2.7.1 MÉTODOS	18
2.7.2 ASPECTOS PRÁCTICOS	23
2.7.3 CONJUGADOS ENZIMAS Y SUSTRATOS	25
2.8 EL GLOBO OCULAR	
2.8.1 EL OJO	27
2.8.2 ENFERMEDADES MEDIADAS POR ANTICUERPOS EN EL OJO	28
2.8.3 INMUNOLOGÍA DE LAS UVEÍTIS Y TIPOS	29
2.8.4 EL CRISTALINO Y SUS PROTEÍNAS	32
2.8.5 PROTEÍNA SOLUBLE INVOLUCRADA EN UVEÍTIS AUTOINMUNE	33
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
4.- FUNDAMENTACIÓN DE LA ELECCIÓN DEL TEMA	36
5.- HIPÓTESIS	38
6.- OBJETIVOS	39
7.- TIPO DE ESTUDIO Y CRITERIOS UTILIZADOS PARA EL MISMO	40
8.- MATERIAL	41
9.- METODOLOGÍA	43
10.- RESULTADOS	49
11.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
12.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	73
13.- CONCLUSIONES	75
14.- BIBLIOGRAFÍA	76
15.- ANEXOS	77

1.- INTRODUCCIÓN

Los conocimientos actuales en inmunología son todavía escasos y persisten áreas oscuras en relación con las implicaciones patológicas derivadas de la respuesta inmune; una de estas áreas es indudablemente la oftalmología, específicamente en el terreno de las uveítis. Tema que ha sido ampliamente discutido por diversos autores sin llegar a conclusiones definitivas, este trabajo fue motivado por que se pueda lograr un mejor conocimiento de las uveítis conforme se acumulen más estudios y experiencias sobre ellas, que redundaran en un diagnóstico más certero y en un tratamiento más oportuno y efectivo. (1)

La uveítis es una severa inflamación de la uvea la cual esta caracterizada por una capa de músculo vascular compuesta por las siguientes estructuras iris, cuerpo ciliar y coroides. Este conjunto de tejidos constituye el sistema que proporciona el aporte nutritivo del ojo.(2)

La uveítis es también una entidad grave de la que todavía se desconoce su etiología, su frecuencia es cada vez mayor en la consulta, constituye una patología altamente incapacitante por las secuelas que produce a mediano y largo plazo.(3)

La mayoría de los estudios sobre este padecimiento han sido efectuados en ratas por medio de la inducción experimental autoinmune de uveítis con un antígeno soluble extraído de retina bovina llamado proteína S (Ag S) por su origen y sus características.

Un gran número de los estudios realizados utilizan la técnica de ELISA para medir el título de anticuerpos (Ac) contra estos antígenos.

En este trabajo se considero importante establecer la participación de la respuesta inmune en la oftalmopatía que sufren los ratones cepa CD1 et/et (hipotímicos) mantenida en el bioterio de campus II FES- ZARAGOZA. Por que se genera en ella espontáneamente se podría crear una plataforma de estudio sin necesidad de inducir la enfermedad en el ratón como se ha venido haciendo con otras cepas.

Se ha visto que en la uveítis de origen autoinmune experimental, la proteína S juega un papel importante. Por lo que en el presente trabajo se estandariza la técnica de ELISA para medir Ac antiproteína S de retina además de Ac antiproteínas de cristalino.

2.- MARCO TEÓRICO

2.1 EL RATÓN DESNUDO

Los ratones mantenidos en el bioterio de FES ZARAGOZA que presentan una oftalmopatía con signos correspondientes a una uveítis autoinmune han sido ya caracterizados como una cepa de ratones hipotímicos alopésico CD1 et/et. por medio de citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales marcados con ficoeritrina e isotiocianato de fluoresceína, para evaluar sus poblaciones celulares de linfocitos a través de sus marcadores de superficie CD3 CD4 y CD8 (4)

En investigación el ratón constituye un material biológico de gran valor por su bajo costo y fácil manipulación, el objeto de la producción de este como de otros animales en el bioterio es el de obtener respuestas estándares a la manipulación experimental y variabilidad mínima para que con los experimentos se produzcan resultados significativos por lo que su crianza debe ser en condiciones estándares y libres de enfermedades.(4)

Estas especies deben estar bien caracterizadas genética microbiológicamente e inmunológicamente.(5)

En años recientes se ha dado auge al estudio de ratones con mutaciones que producen inmunodeficiencias la utilización de estos en la investigación representa un gran avance en áreas como la inmunología, infectología parasitología patología experimental entre otras, específicamente en estudios sobre injertos cáncer y otras áreas médicas. (5-7) En 1966 el Dr. Flanagan reporto la existencia de un ratón mutante bajo los siguientes conceptos sin pelo, tamaño pequeño, baja fertilidad y atimia y un periodo de vida breve 100% de mortalidad a las 25 semanas y un 45% de mortalidad a las 2 primeras semanas. (8)

EL Dr. Flanagan demostró que el gen responsable de la mutación es un gen autosomal recesivo que el denominó nude(desnudo) y cuyo símbolo genético nu, En 1968 Panteloris, haciendo experimentos con este tipo cepa describió que los ratones homocigóticos dominantes (+/+) y heterocigóticos (nu/+) presentan timo normal. También describió la presencia de una marcada leucopenia en los ratones atímicos (815- 3380) L u/l mientras que hermanos fenotípicamente normales presentan (3000-12000) .Esta cepa fue ampliamente utilizada para observar respuestas ante injertos y respuesta inmune antitumoral, descubrieron en este tipo de ratones unas células No T que tenían actividad antitumoral y se les denominó linfocitos asesinos naturales (NK). (9-10).

En FES-ZARAGOZA se suman estudios para caracterizar una cepa que surge espontáneamente de ratones alopecicos derivados de la cepa CD1 progenitora que a resultado ser diferente a la cepa nu/nu. Que era atímica estudios realizados a está cepa demuestran que son ratones hipotímicos (10) estos además presentan poca sensibilidad a los cambios de temperatura(9-10)

Las características observadas en estos ratones son, desarrollo sexual a los 2 y medio meses de edad , latencia de 35 días, de 4 a 5 crías por hembra, con un 25% de mortalidad presentan poca facilidad para amamantar a sus crías, además de muchas enfermedades de las que son presas fáciles llama la atención que presentan una oftalmopatía referida como uveítis, que surge en ellos espontáneamente, y por sus características inmunológicas se presume de origen autoinmune, esto resultó interesante, pues para el estudio de este tipo de padecimientos se tiene que inducir la enfermedad experimentalmente.

2.2 INMUNIDAD

El individuo es capaz de defenderse de agentes nocivos gracias a la inmunidad con la cual un huésped ofrece resistencia a ciertos antígenos o inmunógenos; de una forma natural o adquirida y se lleva a cabo por mecanismos inespecíficos o específicos respectivamente.

En el esquema siguiente se clasifica a la inmunidad de acuerdo con su origen y forma de adquisición.

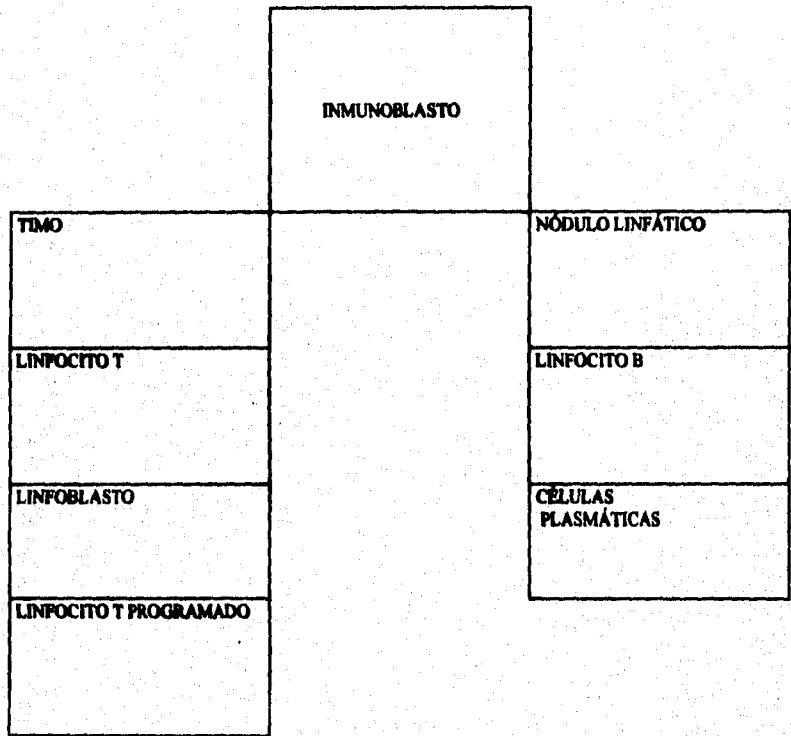
Esquema 1.

	INNATA	DE ESPECIE RACIAL DE EDAD DE INFLUENCIAS METABÓLICAS Y HORMONALES SECRECIONES TEMPERATURA.	
INMUNIDAD			
	ADQUIRIDA	PASIVA ACTIVA	ANTICUERPOS DE LA MADRE ENFERMEDAD VACUNACIÓN

Por muchos años se consideró que la inmunidad humoral y la celular eran totalmente diferentes sin embargo muchos estudios han puesto en evidencia que son manifestaciones de un mecanismo básico y específico de inmunidad.

Esquema 2

MECANISMO ESPECIFICO DE INMUNIDAD



Como se puede apreciar en el esquema 2 tanto el timo como el nódulo linfático son órganos de gran importancia en los procesos de inmunidad pues intervienen en la maduración y especialización de dos grandes bloques celulares, los linfocitos T (L-T) y los linfocitos B (L-B) éste último grupo de células interviene en un proceso de inmunidad llamado humoral por la creación de células plasmáticas. Por otra parte los linfocitos T intervienen en la inmunidad llamada celular de la que derivan L-T especializados y programados para realizar ciertas funciones.(11)

2.3 ÓRGANOS INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA INMUNE

EL TIMO

Dado el papel que juega el timo como órgano en la inmunidad cabe resaltar algunos aspectos sobre él, controla directamente la inmunidad celular he influye indirectamente en el adecuado funcionamiento del mecanismo humoral o de anticuerpos es un órgano de tipo linfoide pero a diferencia de otros órganos que también participan en la inmunidad como los ganglios linfáticos, los nódulos y el bazo. El timo está protegido, su localización he histología le confiere una especie de barrera que le impide el contacto directo con la sangre.(11)

La importancia de el timo ésta en el periodo perinatal y decrece con el correr de los años el Timo alcanza un peso de cuarenta gramos hasta los 7 años y hasta los 30 años alcanza un peso solo de 12 gramos el resto es poco funcional histológicamente ésta formado por una estructura de células epiteliales interconectadas entre sí, citoreticulum, que semeja una esponja en cuyos intersticios se colocan los linfocitos abundantes en la zona periférica o corteza y escasos en el interior o médula las células epiteliales forman una estructura completa alrededor de los vasos. No hay canales linfáticos aferentes. La cápsula conectiva que rodea al órgano, emite tabiques que forman lobulillos. En el centro de éstos se encuentran algunas formaciones de aspecto quístico, llamadas corpúsculos de hassal. En el timo se encuentra un tercer tipo de células las mioides que en la vida embrionaria se asemejan a músculo estriado.(11)

El timo es un órgano linfoepitalial que se compone de una masa de linfocitos unos 10^{-8} en un ratón joven y un número mucho menor de células epiteliales . El timo se desarrolla en el embrión de las bolsas branquiales de la faringe los brotes epiteliales proliferan , se desprenden y emigran (en los vertebrados superiores hacia la línea media de la parte superior del tórax donde son eventualmente pobladas por los linfocitos tímicos llamados timocitos. El timo es mayor al nacer que en el adulto. Empieza a atrofiarse después de la pubertad o en descargas hormonales rápidas , tensiones fuertes en respuesta a los altos niveles de corticosteroides.(12)

Los efectos de la timectomía neonatal están duplicados en los ratones desnudos genéticamente defectivos que carecen de un timo. El defecto primario en la función epidérmica es heredado como un rasgo recesivo asociado a la falta de pelo.(12)

Las células T funcionales maduras están ausentes casi totalmente, y así estos ratones no desarrollan respuestas inmunes mediadas por células T no rechazan injertos cutáneos de otras cepas la mayoría de los linfocitos en los ratones desnudos son células B, algunos de los niveles de inmunoglobulinas en el suero son normales (Ig M, Ig G-3) otros están considerablemente disminuidos (Ig G he Ig A) Los anticuerpos que se producen son en gran parte moléculas de Ig M.(12)

Bolsa de fabricio

Bolsa de Fabricio una de las principales claves para la distinción entre células B y T se deriva del descubrimiento de Glick de que los pollos privados al nacer de esta son incapaces de producir anticuerpos la bolsa se parece anatómicamente al timo y se desarrolla también por infiltración linfocítica de una invaginación epitelial del intestino (Pero de la cloaca en lugar del intestino anterior no obstante los folículos linfáticos de la bolsa a diferencia de los del timo están empaquetados en células B. Los experimentos de extirpación que la bolsa y el timo regulan funciones complementarias en contraste con los animales sin timo los pollos bursotomizados al nacer tienen respuestas inmunes normales mediadas por células rechazan injertos pero tienen un gran déficit de inmunoglobulinas (Ig s) y la capacidad formadora de anticuerpos es mayor cuanto más pronto se les priva de la bolsa al igual que el timo la bolsa se atrofia también como resultado de niveles ascendentes de hormonas esteroides. De hecho la bolsa puede ser eliminada sumergiendo simplemente los huevos embrionados durante unos minutos en una solución de testosterona (extirpación hormonal). Los mamíferos carecen de bolsa de fabricio y no se ha identificado ninguna estructura de mamífero con una función equivalente entre las posibles se incluye la propia médula ósea y varias estructuras linfoepiteliales asociadas al intestino. (11, 12)

Estructuras linfáticas secundarias bazo, ganglios linfáticos y racimos menos organizados y más pequeños de células linfoides de muchos tejidos y órganos constituyen las estructuras secundarias en las que los linfocitos implicados experimentaran la ulterior diferenciación en respuesta a la estimulación de los antígenos estas estructuras son filtros altamente efectivos para atrapar Ags en los que los linfocitos taponaran los intersticios con una red fibrosa tridimensional densa en ella muchas células reticulares del tipo macrófago pegajosas se adhieren a las fibras reticulares, los linfocitos inyectados se acumulan en el bazo y en los ganglios linfáticos como si expresaran el instinto que induce a los linfocitos circulantes a abandonar los vasos sanguíneos en estas estructuras, y pasar a residir por un tiempo en zonas apropiadas (B y T) antes de recircular. (11, 12)

Ganglios linfáticos

Estas pequeñas estructuras ovoides normalmente menores de 1cm de diámetro en el hombre están ampliamente difundidas. generalmente están situadas en uniones principales de la red de conductos linfáticos que pasan a la manera de un árbol desde ramas en tejidos más superficiales a un gran tronco colector central, el conducto torácico; este vaso vierte linfa y linfocitos en una gran vena que retorna la sangre al corazón los conductos linfáticos a través de los ganglios linfáticos sucesivos en los que tienen probabilidades de ser atrapados por macrófagos. (12)

El cerebro la médula ósea y el ojo carecen de drenaje linfático, y los anticuerpos transportados por la sangre lejos de estas estructuras serán probablemente atrapados en el bazo o los ganglios linfáticos distantes.(12)

Las células B y T están conectadas en diferentes zonas de los ganglios linfáticos. Las células B se acumulan en nódulos subcapsulares y las células T ocupan los espacios existentes entre los nódulos la presencia de estas últimas están muy reducidas en los ratones desnudos y en los timectomizados al nacer. En el centro de cada nódulo subcapsular hay un centro germinal compuesto de una masa de linfocitos B que se dividen rápidamente (tiempo de generación de unas 12 horas) son también abundantes los macrófagos con núcleos pignóticos.(12)

EL bazo

Es un gran órgano vascular encapsulado (pasa unos 200 grs. en el hombre adulto atrapa los Ag s transportados por la sangre su corteza tiene linfocitos densamente empaquetados y su médula laxa tiene amplios espacios vasculares con toda una gran variedad de linfocitos macrófagos y otras células. En el bazo la médula llamada pulpa roja encierra zonas corticales llamadas pulpa blanca esa última constituida por acumulos de células linfoides, y está situada alrededor de las arteriolas ramas de la esplénica, lugar importante para el fácil y rápido contacto con el Ag que llega al órgano. En la pulpa roja existe gran cantidad de elementos de la línea monocitaria, que cumple una importante función de filtro y destrucción de elementos celulares caducos o extraños (como parásitos o bacterias).(11-12)

El bazo es un órgano linfoide, conectado con la periferia del organismo a través del sistema circulatorio. Adquiere gran importancia cuando la barrera secundaria de los ganglios linfáticos son traspasados por la agresión antigénica; la esplenectomía bien tolerada en el adulto, es inconveniente en el niño en el cual se presenta mayor incidencia de septicemias cuando por trauma es necesario efectuarla es pues el bazo desde el punto de vista inmunológico un filtro a los antígenos que penetran al torrente circulatorio, al igual que los ganglios linfáticos produce anticuerpos.(11)

Las células que reconocen los antígenos e inician las respuestas inmunológicas son los linfocitos, estas células se encuentran en todo el organismo, junto con los eritrocitos y los fibroblastos y constituyen el tipo celular más numeroso., los linfocitos varían solo moderadamente en su aspecto pero su función es muy diversa. El marco general teórico para enfocar las respuestas de estas células han experimentado varias transiciones radicales desde que se reconoció, hace 85 años, que el individuo puede responder selectivamente frente a cada uno de un número inmenso de antígenos diferentes. Las teorías anteriores

centraban su atención en los anticuerpos por lo que las respuestas inmunes no fueron claramente diferenciadas hasta hace 20 años no obstante las primeras teorías pueden aplicarse también a la inmunidad celular sustituyendo los receptores de unión por Ag de linfocito apropiados por moléculas de anticuerpo.(12)

Entre las que destacan dos, según las teorías selectivas el inmunogéno estimula la síntesis de un anticuerpo por las células que forman ya al anticuerpo a un bajo nivel antes de la inmunización es decir, toda la información genética necesaria existe ya antes de que la célula se encuentre con el antígeno. Las teorías instructivas suponen por el contrario que la formación de un anticuerpo no puede tener hasta que la presencia del antígeno proporcione la información necesaria.(12)

La primera teoría detallada propuesta por Ehrlich en 1900, era selectiva suponía que las superficies celulares estaban cubiertas por toda una gran variedad de tipo anticuerpo, en cierta manera eran estimulados selectivamente su ulterior producción y secreción por las células. Esta teoría fue abandonada en 1920 a causa de la gran variedad de sustancias inmunogénicas, incluyendo los productos químicos y orgánicos recién sintetizados; era indudable que todos los anticuerpos frente a casi una diversidad ilimitada de antígenos pudieran preexistir.(12)

2.4 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

Los anticuerpos son inmunoglobulinas que pueden reaccionar específicamente con el antígeno que estimuló su producción. Las inmunoglobulinas comprenden alrededor del 20% de las proteínas totales del suero y una proporción variable de inmunoglobulinas tienen actividad de anticuerpo.

Todas las inmunoglobulinas tienen patrones estructurales similares, con una gran diversidad de propiedades antigénicas de secuencias de aminoácidos. Las moléculas de inmunoglobulinas están formadas por cadenas polipeptídicas ligeras (pequeñas) y pesadas (grandes). Cada cadena de inmunoglobulina consta de porción amino terminal variable (v) y una porción carboxilo terminal constante (c), cada una de las cuales, a su vez está genéticamente determinada. Las cadenas ligeras y pesadas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro

Las cadenas están plegadas en tres dimensiones con enlaces disulfuro para formar dominios. Hay dominios variables y constantes

CADENAS LIGERAS (L). Estas siempre son de dos tipos, Kappa (K) y lambda (λ) con pesos moleculares de 25000; ambos tipos ocurren en todas las clases de inmunoglobulinas pero cualquier molécula contiene sólo un tipo de cadena L.

CADENAS PESADAS (H). Existen cinco clases de inmunoglobulinas cada una tienen un conjunto antigénico de cadenas H (isótipos), con pesos moleculares de 50000 a 70000. Los cinco tipos de cadenas pesadas se denominan γ , μ , δ , ϵ en Ig G, M en Ig M, A en Ig A, D en Ig D y E en Ig E. La porción de cadena (H) que no está involucrada en el sitio de combinación del anticuerpo (fragmento Fc) porta los sitios para diferentes reacciones efectoras, por ejemplo, fijación a células fagocitarias, degranulación de las células cebadas y fijación cutánea.

Los fragmentos de inmunoglobulina provienen del tratamiento enzimático de la molécula de inmunoglobulina. El tratamiento de la molécula Ig G 75 con papaína resulta en la producción de 3 fragmentos; dos de estos son muy parecidos y tienen capacidad para ligarse a los antígenos, son de tipo univalente ya que solo tienen un punto de unión ligando. Estos fragmentos reciben el nombre de Fab (fragmento de unión con el antígeno), el tercero es el fragmento Fc el cual no porta actividad de anticuerpo sino una gama de reacciones efectoras y tiene la propiedad de ser cristalizabile.

SITIO COMBINANTE. La actividad inmune de una molécula de anticuerpo se centra sobre su capacidad de enlazar específicamente antígenos. El sitio de combinación está localizado sobre el extremo del grupo amino terminal de la molécula de anticuerpo y está compuesto de ciertos segmentos hipervariables plegados dentro de las regiones modificables de ambas cadenas L y H. La especificidad de los anticuerpos es una función de la secuencia de los aminoácidos y de su configuración tridimensional (13).

INMUNOGLOBULINA M (IgM).

La Ig M comprende alrededor del 10% de inmunoglobinas en el suero humano normalmente. El mayor tamaño de las moléculas de IgM es debido al eslabonamiento de 5 unidades (cada una similar a la unidad de IgG) mediante enlaces disulfuro cerca de la región bisagra; cada subunidad de IgM consiste en dos cadenas H (Fig. 1). Además hay una cadena J (peso molecular 15000) por cada diez cadenas L de moléculas Ig M. La cadena J es ácida y difiere en antigenicidad y composición de aminoácidos de las otras cadenas. Es probable que ayude a la polimerización y estabilización de las moléculas de IgM tiene diez segmentos Fab que se pueden combinar hasta en diez sitios antigénicos.

Las moléculas de Ig M son los anticuerpos que se sintetizan primero en la respuesta al estímulo antigénico, fijan bien el complemento en presencia de antígeno.

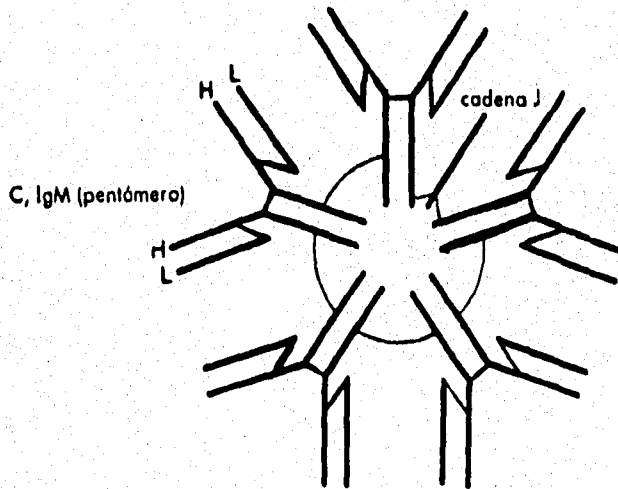


Fig. 1 Estructura pentamérica de la Ig M humana . (2)

INMUNOGLOBINA G (IgG).

La IgG comprende aproximadamente 75% de inmunoglobinas en los sueros humanos normales. Cada molécula de IgG consta de dos cadenas L y dos cadenas H ligadas por 20-25 enlaces disulfuro. Hay 4 subclases de Ig G basadas en las diferencias antigénicas en las cadenas H. Cada molécula de Ig G tiene solo un tipo de cadena L y un tipo de cadena H; las moléculas de Ig G probablemente tienen la forma de Y con una bisagra cercana a la mitad de la cadena pesada que une a los dos segmentos Fab al segmento Fc (Fig. 2).

Durante la respuesta secundaria, la Ig G es la principal inmunoglobulina sintetizada. Por su capacidad para cruzar la placenta ofrece una línea defensiva primordial contra las infecciones en las primeras semanas de la vida del recién nacido; la región Fc de las moléculas de Ig G se unen a los receptores específicos de las células fagocitarias tales como los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares, aumentando así la eficiencia de las células fagocíticas para que puedan ingerir y destruir a los microbios infectantes que han quedado cubiertos con los anticuerpos Ig G producidos como respuesta a la infección. Además de unirse a las células fagocíticas, la región Fc de Ig G puede unirse, activando, al primer componente del sistema del complemento que en estas circunstancias desata un ataque bioquímico que mata al microorganismo (14).

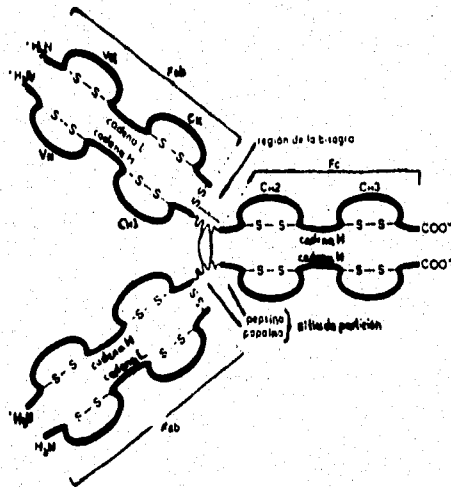


Fig. 2 Representación esquemática de una molécula de Ig G (2)

2.5 RESPUESTA INMUNE PRIMARIA Y SECUNDARIA.

La primera exposición de un inmunógeno desencadenará una respuesta de anticuerpos relativamente débil y de vida corta denominada respuesta primaria, la cual se divide en diversas fases. La fase de espera o latente es el tiempo que pasa entre el contacto con el inmunógeno y la detección de anticuerpos en la circulación, que en promedio, dura una semana en humanos. Durante este periodo tiene lugar la activación de los linfocitos T y B. La fase exponencial marca un rápido incremento en la cantidad de anticuerpos en circulación. Después de un intervalo el nivel de anticuerpos permanece relativamente constante debido a que está ocurriendo síntesis y degradación a frecuencias casi iguales (fase de declinación) al menguar la síntesis de nuevos anticuerpos.

Los siguientes encuentros con el mismo inmunógeno dan como resultado la respuesta secundaria en donde está acortado el periodo de latencia y los niveles de anticuerpo alcanzan rápidamente un nivel de equilibrio mucho más alto permaneciendo detectables en el suero durante periodos mucho más largos. Las células T y B de memoria son generadas durante la respuesta primaria y son responsables de una cinética más rápida, de mayor intensidad y duración en la respuesta secundaria, esto explica por que son tan eficaces las inyecciones de refuerzo de las vacunas. (15)

2.6 MARCADORES DE SUPERFICIE.

Los linfocitos y otros leucocitos expresan un gran número de diferentes moléculas en su superficie. Algunas de éstas moléculas aparecen en determinados estadios de la diferenciación o activación celulares durante breves periodos de tiempo, mientras que otras son características de distintas líneas celulares.

Las moléculas que pueden utilizarse para identificar a las poblaciones celulares reciben el nombre de marcadores, en muchas de ellas ésta identificación se puede realizar mediante anticuerpos monoclonales específicos.

En fechas recientes se ha desarrollado una nomenclatura para estas moléculas de la superficie celular el sistema CD, en el que los marcadores se numeran como CD1, CD2, etc. El término CD (designación de agrupamientos; cluster designation) provino del análisis computarizado de los anticuerpos monoclonales contra los antígenos leucocitarios humanos llevado a cabo por diferentes laboratorios de todo el mundo. Los marcadores se pueden poner de manifiesto por medio de anticuerpos fluoresceinados. En este caso, los marcadores de superficie actúan como antígenos (16-17).

2.7 INMUNO ANÁLISIS ENZIMÁTICO

ELISA

La técnica de ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático que debe su nombre a las iniciales de su denominación inglesa. (ENZYME LINKED IMMUNOABSORBENT ASSAY), Como todas las técnicas inmunoenzimáticas permite la identificación y/o cuantificación de inmunógenos, haptenos o anticuerpos, utilizando enzimas como sustancias marcadoras. Las primeras experiencias en ELISA fueron realizadas por Engval y Perimande Suecia y Van Weemen y Schurs de Holanda en 1971. El método ha facilitado desde entonces la revelación de numerosas sustancias presentes en líquidos orgánicos, tales como antígenos, anticuerpos, hormonas y fármacos, etc.

El área de sus aplicaciones está en sostenida expansión siendo utilizada en endocrinología para cuantificación de hormonas, y en hematología para la determinación y dosificación de antígenos, eritrocitos, en inmunología para la medición de inmunoglobulinas por mencionar solo una, y en el laboratorio clínico para el diagnóstico de diversas enfermedades víricas, bacterianas, micóticas y parasitarias.

El principio básico de esta prueba es que el antígeno o el anticuerpo se adhiera a un soporte en donde se lleve a cabo la reacción antígeno anticuerpo poniéndose ésta de manifiesto mediante una reacción enzimática.

Existen diferentes ensayos tipo ELISA que se utilizan para detectar antígeno o anticuerpo los más usados son el método indirecto el método de doble anticuerpo o de sandwich. El método indirecto se emplea para detectar o medir las cantidades de anticuerpos específicos contra un antígeno usando la fase sólida con el mismo. El método del Sandwich se emplea para detectar antígenos empleando anticuerpos específicos.(18)

ELISA permite determinar la concentración de antígeno o anticuerpo mediante la fijación de uno de ellos a una fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno anticuerpo mediante una inmunoglobulina frente a una inmunoglobulina heteróloga o ante el antígeno unido a una enzima, posteriormente se le adiciona el sustrato de la enzima y la adición del sustrato por la enzima es proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo fijada
(19)

En este ensayo, el antígeno o el anticuerpo se adosa usualmente a un soporte de fase sólida para facilitar la separación de los reactivos libres y combinados, se ha hallado que antígenos y anticuerpos se pueden unir covalentemente al material particulado, tal como celulosa y polyacrilamida y que también se puede obtener una adsorción pasiva satisfactoria a tubos perlas y discos o microplacas de nylon poliestireno y polivinilo o polipropileno.

Una parte esencial del inmunoensayo por la enzima es la conjugación de anticuerpo o antígeno fijado a una enzima es necesario que la enzima tenga actividad elevada, sea económica y se obtenga de forma pura y que posea una reacción con el sustrato fácilmente medible.

Existen varios tipos de ELISA: competitivo, inhibitorio, Sandwich e indirecto. Estos métodos son fáciles de realizar no requieren equipo costoso, sus reactivos son muy estables por largo periodo de tiempo y tienen una sensibilidad similar a RIA.

2.7.1 MÉTODOS

Método competitivo

Este método sirve para determinar anticuerpos o antígenos. Para la determinación de anticuerpos el anticuerpo se marca con la enzima. El anticuerpo marcado compete con el anticuerpo no marcado en la muestra en estudio por los sitios de unión de un antígeno inmovilizado en una fase sólida como poliestireno. La diferencia en la degradación del sustrato entre el conjugado solo (Ac marcado) y el conjugado más la muestra ensayada es proporcional a la cantidad de anticuerpo de esta última (fig. 3)

Método de inhibición

Este sistema se utiliza para la detección de un antígeno así como su cuantificación y puede ser utilizado para sustancias de bajo peso molecular en el cual la interacción antígeno anticuerpo, del antígeno de la fase sólida y el anticuerpo marcado con la enzima, es inhibida por el antígeno libre de la muestra. La diferencia de la degradación entre las pruebas con el conjugado de referencia solo y con el conjugado más la muestra ensayada es proporcional a la cantidad de antígeno de la misma (Fig. 4)

Método de sandwich.

Este sistema emplea dos anticuerpos, uno unido a la fase sólida y el otro que va marcado por la enzima. El anticuerpo en fase sólida reacciona con la enzima y después de un lavado se adiciona el anticuerpo marcado con la enzima. La actividad enzimática en fase sólida es proporcional a la concentración del antígeno. Se emplea para la cuantificación de marcadores tumorales como la alfafeto proteína y para otros antígenos tales como proteínas. (Fig. 5)

Método indirecto

El método indirecto es ampliamente utilizado para la determinación de anticuerpo ya que necesita sólo unos pocos conjugados (ej. Antglobulinas humanas marcadas con enzimas) para analizar anticuerpos de una variedad de enfermedades. Este procedimiento emplea antígeno inmovilizado el cual reacciona con el anticuerpo de la muestra, adicionando después el anticuerpo marcado con la enzima que es específico para la inmunoglobulina ha ser determinada (Fig. 6)

MÉTODO COMPETITIVO

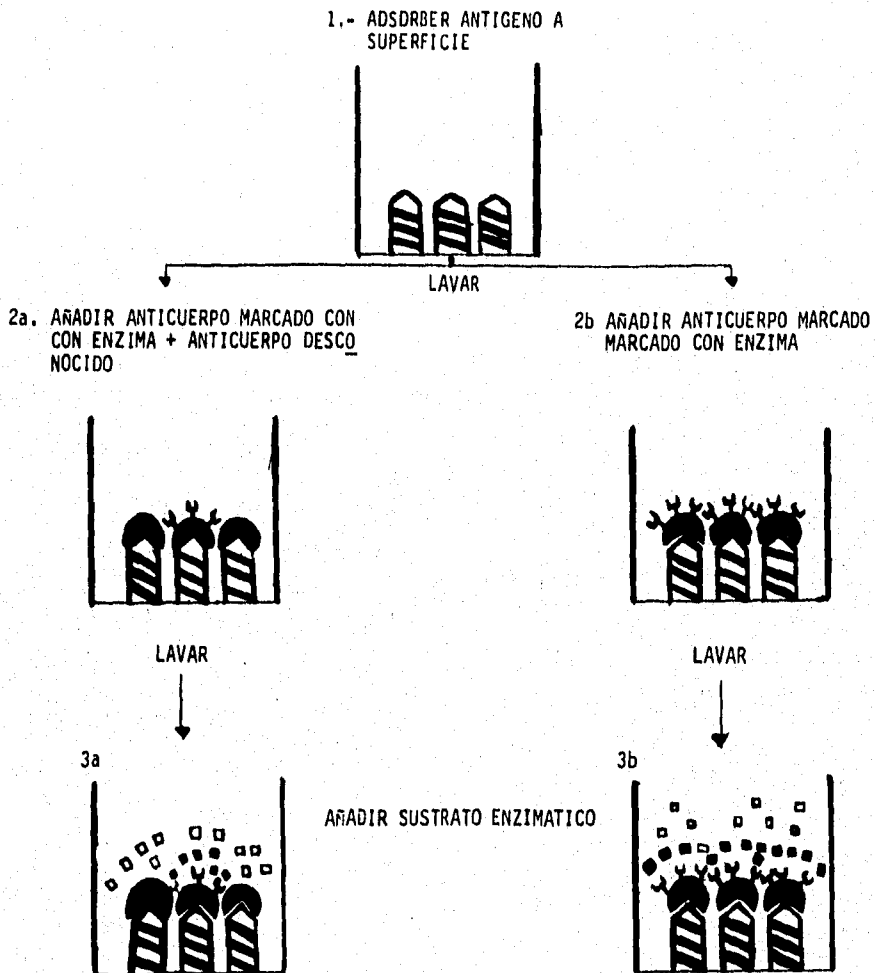
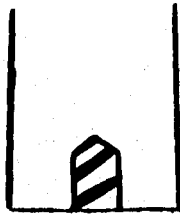
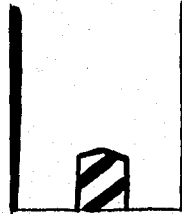


Fig. 3 ELISA en microplaca para la detección y determinación de anticuerpos. (19)
HIDROLISIS DEL SUSTRATO = ANTICUERPO MARCADO
LA DIFERENCIA ENTRE 3a Y 3b = ANTICUERPO DESCONOCIDO.

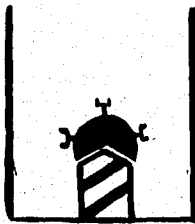
MÉTODO DE INHIBICIÓN



1.- PLACA CUBIERTA CON ANTIGENO

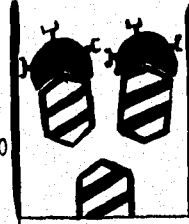


LAVAR LA PLACA



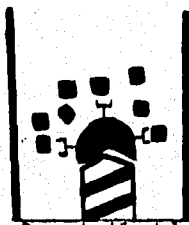
No hay antígeno en la muestra

2.- MUESTRA DE PRUEBA QUE SE CREE QUE CONTIENE ANTIGENO NO MEZCLADO CON ANTICUERPO DE REFERENCIA MARCADO



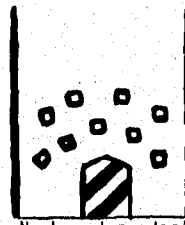
Antígeno presente en la muestra reacciona con anticuerpo en solución.

LAVAR LA PLACA



Degradación del sustrato la muestra no contiene antígeno.

3.- AÑADIR SUSTRATO ENZIMÁTICO



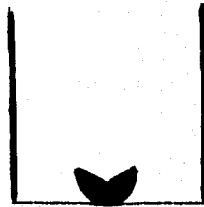
No hay degradación del sustrato la muestra contiene antígeno

Fig. 4 ELISA en microplaca para análisis de antígeno (19)

MÉTODO DE SANDWICH

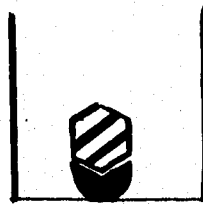
1.- ANTICUERPO ADSORBIDO A PLACA

LAVAR



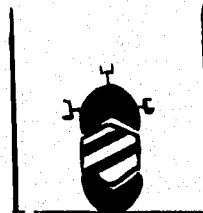
2.- AÑADIR ANTIGENO EN ESTUDIO

LAVAR



3.- AÑADIR ANTICUERPO ESPECIFICO
MARCADO CON ENZIMA

LAVAR



4.- AÑADIR SUSTRATO ENZIMATICO

CANTIDAD HIDROLIZADA = CANTIDAD DE
ANTIGENO PRESENTE

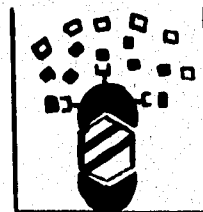
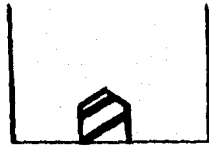


Fig. 5 SANDWICH de doble anticuerpo en microplaca para la detección y determinación de antígeno (19)

MÉTODO INDIRECTO

1.- ANTIGENO ADSORBIDO A LA PLACA

LAVAR



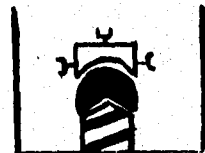
2.- AÑADIR SUERO ANTICUERPO ESPECIFICO SE UNE AL ANTIGENO.

LAVAR



3.- AÑADIR ANTIGLOBULINA MARCADA CON ENZIMA QUE SE UNE AL ANTICUERPO

LAVAR



4.- AÑADIR SUSTRATO

CANTIDAD HIDROLIZADA=
CANTIDAD DE ANTICUERPO
PRESENTE.

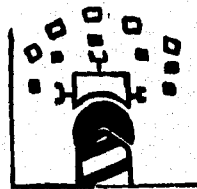


Fig. 6 Método indirecto en microplaca para la detección y determinación de anticuerpo. (19)

2.7.2 ASPECTOS PRÁCTICOS

CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS.

Los anticuerpos presentes en los líquidos corporales pueden ser cuantificados por medio de ELISA utilizando procedimientos que recubran la fase sólida con antígenos más o menos purificados. Los tubos y las placas así sensibilizados deben ser primero incubados con la solución que contenga los anticuerpos, luego lavados e incubados con anti inmunoglobulina marcada y finalmente sometidos a la acción reveladora de un sustrato de la enzima. La cuantificación de los anticuerpos se hace en base a la cantidad de conjugado enzima anti inmunoglobulina fijada sobre el sistema. (19)

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

Se realiza generalmente utilizando un método de doble anticuerpo o método Sandwich, este consiste en la adherencia al soporte sólido del suero o inmunoglobulina que posean anticuerpos específicos contra el antígeno que se intenta detectar, seguidamente se coloca la muestra biológica sospechosa de contener ese antígeno y posteriormente un segundo anticuerpo contra el mismo ligado a una enzima

La fijación de actividad enzimática a la placa evidencia la presencia de antígeno en la muestra.

Al poseer muestras controles positivas y negativas es posible en la mayoría de los casos evaluar visualmente la positividad de la reacción. La lectura fotolorimétrica permite la cuantificación aproximada del antígeno.

CUANTIFICACION DE ANTÍGENOS

Los métodos más difundidos hasta ahora se basan en el principio de especificidad que los antígenos marcados compiten con los no marcados en el proceso de unión con los anticuerpos. (19)

EL SOPORTE

El soporte sólido en general la mayoría de los soportes sólidos utilizados en radio inmunoensayo pueden ser útiles para ELISA. Entre ellos se encuentran: sacarosa, celulosa, acrilamida, etc. En la forma de pastillas, microesferas. También pueden usarse tubos o microplacas descartables de polivinilo, poliestireno o polipropileno que resultan en general más prácticas dada su alta capacidad para absorber proteínas además de su bajo costo y fácil manipulación. En general el poliestireno es un buen soporte para la adsorción de antígenos, mientras que el polivinilo es preferido para la absorción de anticuerpos. La unión que se establece entre la proteína y la fase sólida es, estrictamente de tipo físico. Para la mayoría de las proteínas se puede obtener una adecuada sensibilización del soporte sólido a concentraciones de 1 a 10 ug/ml.(19)

LAVADOS

En la mayoría de los casos el lavado puede ser realizado simplemente volteando las placas sacudiéndolas y llenando los pozos con algún agente humectante (Tween 20 es el más utilizado), por tres o cuatro veces consecutivas. Esta etapa es de suma importancia pues si no se realiza con el debido cuidado puede haber contaminación.(19)

VENTAJAS

Una de las grandes ventajas de ELISA es la posibilidad de evaluar visualmente los resultados. Para la detección de antígenos, para la titulación de anticuerpos utilizando diluciones seriadas es posible señalar la última dilución del anticuerpo en la cual hubo una reacción positiva, ella corresponde al título del mismo, la sensibilidad del método es grande pero requiere de un aparato altamente sensible y exacto (fotocolorímetro o espectrofotómetro).(18)

2.7.3. CONJUGADOS Y ENZIMAS

Las características ideales de la enzima para ser conjugada a antígenos o anticuerpos se puede observar en la siguiente cuadro.

CARACTERÍSTICAS

ENZIMAS MAS UTILIZADAS

1.- Debe ser activa a un pH que la reacción Ag- Ac. sea óptima.	1.- PEROXIDASA
2.- Fácil de detectar.	2.- FOSFATASA ALCALINA
3.- Fácilmente obtenible, purificable, soluble, estable y barata.	3.- GLUCOSA OXIDASA
4.- No debe ser inhibida por sustancias presentes en líquidos biológicos.	4.- LISOZIMA
5.- Debe poseer grupos reactivos para conjugarse a Ag o Ac sin dañar la actividad de estos ni de ella misma	5.- GLUCOSA 6-P DESHIDROGENASA
6.- No debe estar presente en cantidades significativas en los líquidos a estudiar.	6.- MALATO DESHIDROGENASA
	7.- ACETIL COLINESTERASA
	8.- GLUCOAMILASA
	9.- BETA GALACTOSIDASA

PREPARACIÓN DEL CONJUGADO

El conjugar una enzima involucra el uso de agentes ligantes que reaccionen a través de sus grupos activos con grupos funcionales presentes en las enzimas y las proteínas, que no modifiquen la actividad biológica de estas. Existen básicamente dos tipos de reacciones para conjugar la enzima a la proteína y son reacciones de uno a dos pasos en el caso de la reacción de un solo paso obtendremos un conjugado heterogéneo es decir acoplados enzima-enzima y proteína. En el caso de la reacción de dos pasos se hace reaccionar la proteína con el agente de unión y después la enzima de esta manera se limita la reacción y el conjugado es menos heterogéneo. Los agentes de unión más comúnmente usados son el glutaraldehído y el peryodato de sodio. Antes de utilizar el conjugado en la prueba de ELISA se debe establecer la dilución óptima para reacción, la cual se obtiene por titulación del conjugado, la mejor forma de almacenar el conjugado es mantenerlo concentrado. (18)

SUSTRATOS

La mayoría de los sustratos empleados en ELISA son sustancias incoloras que adquieren intenso color después de la degradación enzimática, se pueden emplear también sustancias fluorogénicas con lo cual se aumenta la sensibilidad del ensayo, pero ello requiere el empleo de instrumentos más sofisticados de detección. es recomendable que la reacción preceda por un periodo de incubación de 20 a 30 min. La reacción enzimática debe ser detenida antes de la lectura visual definitiva o de la lectura fotolorimétrica ello se logra con ácidos o base fuertes que inhiben la actividad enzimática (18)

EL GLOBO OCULAR

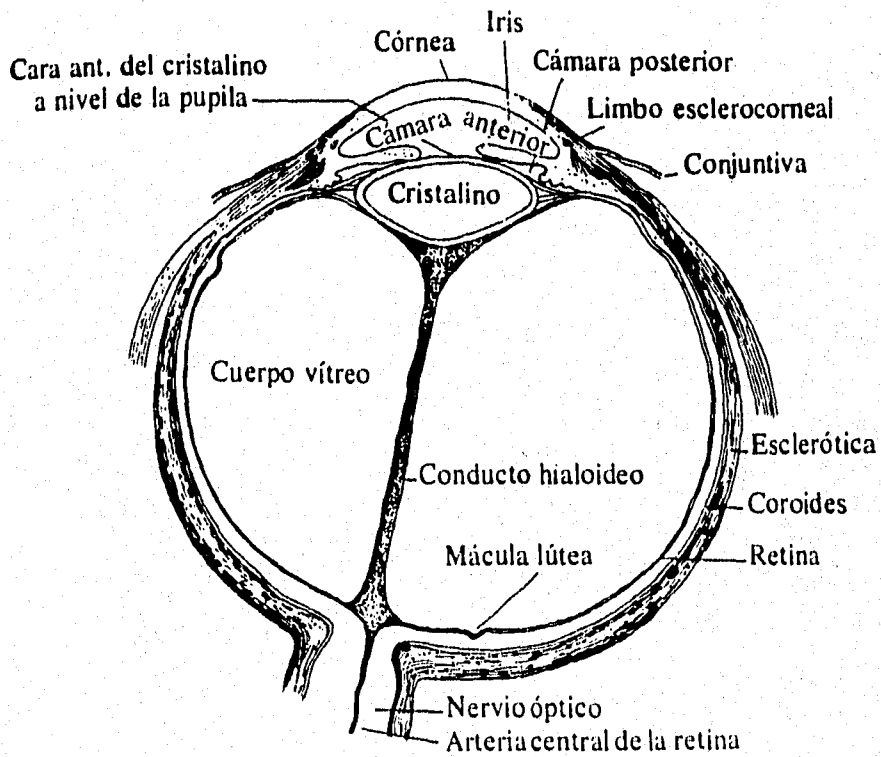


Fig. 7 Referencia (21)

2.8.1 EL OJO

Los cambios anatomopatológicos que se producen en las estructuras orbitarias del ojo son importantes por la particularidad anatómica y funcional, existen algunas enfermedades comunes que requieren una consideración especial, entre las que destacan los procesos inflamatorios como uveítis, neoplasias degenerativas, cicatrización corneal, glaucoma, retinopatías degenerativas entre otros.

El ojo puede ser invadido principalmente desde el exterior, o mediante la diseminación de una infección a partir de los tejidos orbitarios adyacentes del ojo o de forma hematógena la respuesta tisular ante varios agentes patógenos es similar a la que se observa en otros tejidos del organismo.(20)

En el ojo las infecciones son de especial importancia en primer lugar por que una lesión infecciosa de tamaño pequeño como por ejemplo en la córnea puede dañar la visión de forma irreversible, y a demás por que el cristalino y el humor vítreo son estructuras avasculares ricas en proteínas ideales para la proliferación de bacterias patógenas. Una ulceración de la córnea consecutiva a una infección bacteriana piógena puede medir tan solo unos escasos milímetros de diámetro y a pesar de ello puede progresar hasta producir una perforación una hipotonía ocular o una endoftalmitis, en todas estas condiciones puede ser necesaria una extirpación del ojo.(20)

El ojo es considerado como un blanco de la enfermedad inmunológica. La inmunología del ojo esta delineada con mucha menor claridad que la de otros órganos, la semejanza de la circulación de la úvea a la del riñón y el plexo coroideo del encéfalo a dado origen a la especulación justificada en relación con la selección de estos tejidos como blancos de las enfermedades por complejos inmunitarios.

Las enfermedades inmunitarias del ojo pueden dividirse burdamente en dos grandes categorías, mediadas por anticuerpo y mediadas por células. Como sucede en otros órganos existe amplia oportunidad para la interacción de estos dos sistemas en el ojo.(20)

2.8.2 ENFERMEDADES MEDIADAS POR ANTICUERPOS EN EL OJO

Antes de que pueda concluirse que un padecimiento ocular depende de anticuerpos (Ac) los criterios a seguir son los siguientes:

- 1) Debe haber evidencia de anticuerpos específicos en el suero.
- 2) El antígeno debe ser identificado y si es posible caracterizado.
- 3) Este antígeno debe producir una respuesta inmunitaria.
- 4) Si produce lesiones similares en animales sensibilizados, entonces la enfermedad puede describirse como posiblemente dependiente de anticuerpos.(2)

Solo si uno de los siguientes criterios es reunido la enfermedad puede considerarse como mediada por anticuerpos.(2)

- 1) Si el Ac a un antígeno se halla presente en cantidades mayores en los líquidos oculares que en el suero.
- 2) Si hay acumulación anormal de inmunoglobulinas en el sitio de la enfermedad.
- 3) Si hay acumulación excesiva de células plasmáticas en el sitio del padecimiento.
- 4) Si el complemento es fijado por las inmunoglobulinas en el sitio de la enfermedad.
- 5) Si hay acumulación de eosinófilos en el sitio del trastorno.
- 6) O si los padecimientos oculares están asociados con alguna otra enfermedad inflamatoria en cualquier parte del cuerpo para la cual se haya demostrado evidencia de Ac.

ENFERMEDADES MEDIADAS POR CÉLULAS EN EL OJO.

Este grupo de enfermedades párese estar asociado con la inmunidad mediada por células o con la hipersensibilidad retardada. Diversas estructuras del ojo son invadidas por células mononucleares, principalmente linfocitos y macrófagos como respuesta a uno a más estímulos antigénicos crónicos. En el caso de las infecciones crónicas como tuberculosis, toxoplasmosis y herpes simple, el estímulo antigénico ha sido claramente identificado como un agente infeccioso en el tejido ocular, tales infecciones se hallan a menudo asociados con una reactividad retardada a las pruebas cutáneas después de la inyección intradérmica de un extracto del organismo. Mas intrigante y poco entendido resulta el grupo de las enfermedades granulomatosas para la cual no se ha encontrado causa infecciosa alguna, se piensa que tales enfermedades representan trastornos mediados por células, posiblemente reacciones autoinmunitarias pero su origen continua incierto.(2)

Las enfermedades inmunitarias del ojo pueden dividirse en dos grandes grupos, mediadas por anticuerpos y mediadas por células, entre las enfermedades mediadas por anticuerpos se encuentran conjuntivitis, queratoconjuntivitis y uveítis, para la última Widmer demostró en 1962 que la cápsula se vuelve permeable a anticuerpos circulantes para las proteínas del cristalino como resultado de un traumatismo o infección.(2)

2.8.3 INMUNOLOGÍA DE LAS UVEÍTIS

Las uveítis agudas y crónicas, constituyen un problema complejo. El curso actual tomado por la investigación experimental y clínica de las uveítis es el inmunológico y representa un avance en su estudio. En las tablas de Amurabis que datan del siglo XXII antes de Cristo (a.C.); se hace mención a esta enfermedad ocular en el escrito cuneiforme del siglo VI a.C. se pone énfasis a la asociación de la afección dental con la ocular, mencionándose que al extraer el diente enfermo la infección ocular sanaba. Hipócrates y Ambrosio también hacen referencia a este hecho.(22-25)

Gramon en 1902 realizó el primer estudio en el humor acuoso (H. A.), en un paciente con endoftalmítis. Van Durgen, en 1902 noto la presencia de anticuerpos en H. A., de conejo una semana después de haber inyectado suero heterólogo en la cámara anterior (C. A.). Esto fue corroborado posteriormente por Leber en 1906, Meternich y Solomon en 1977. (25-27.)

Amsler y Verrey, introdujeron el método de análisis de (HA), concluyendo que las células vivas son raras en el ojo inflamado.(18,21), Von Sallman y Locke confirmaron estos hallazgos en un estudio de 88 muestras que fueron cultivadas en la que se propuso la hipótesis que estos microorganismos son bloqueados por anticuerpos específicos por lo que impide su desarrollo.(25,26)

Diferentes autores han logrado demostrar la producción intraocular de anticuerpos ya que la úvea trabaja como nódulo linfático, deduciéndose que, las células inmunocompetentes que infiltran la úvea tienen origen extraocular pero se multiplican y diferencian dentro del ojo.(25,27)

Desde 1916, Bruker publicó un artículo sobre la citología encontrada en pacientes afectados con uveítis.(25)

Nusseblatt, Cevario y Grey realizaron un estudio de las células T supresoras en 40 pacientes con uveítis concluyendo que no todas las enfermedades de origen autoinmune son el resultado de la disminución en la actividad de los linfocitos T supresores. (25,28)

Se ha corroborado en investigaciones anteriores que las uveítis afectan por igual a ambos sexos, (25,27-29) también concuerdan con que la incidencia de esta enfermedad se da entre la segunda y quinta década de la vida. Las uveítis más frecuentes fueron las uveítis endógenas y de estas la anterior aguda.

Muchos autores concuerdan con que no encuentran células en el humor acuoso.(20). La búsqueda de inmunoglobulinas en el (H.A) dio resultados negativos de las que se desencadenaron algunas teorías como la que apoya el consumo local endocular y su unión al antígeno así como la fijación a otras estructuras oculares, como pueden ser el iris, el endotelio corneal y la cápsula anterior del cristalino en forma de complejos (Ag-Ac), también influye que el paciente se encuentre inmunodeprimido.(25)

Los conocimientos actuales en inmunología son todavía escasos y persisten áreas oscuras en relación con las implicaciones patológicas derivadas de la respuesta inmune, algunos autores clasifican a la uveítis como anterior, posterior y difusa esta clasificación es utilizada por kimura, en su clínica de uveítis.(28,30)

UVEÍTIS ANTERIOR

El cuadro mínimo se refiere a enrojecimiento ocular, fotofobia y lagrimeo. Cuando hay una reactivación del proceso habrá una reacción ciliar, signo tyndall positivo, en cámara anterior y en vítreo, además de las alteraciones ya mencionadas. El proceso inflamatorio puede localizarse únicamente en cuerpo ciliar y pars plana., la sintomatología es también escasa, en la retina periférica y en la base de el vítreo es donde ocurren las reacciones principales, se observan exudados en banco de nieve, depósitos blanquecinos, dilatación venosa y tortuosa, envainamiento vascular, en estados avanzados se encuentran cambios retinianos maculares importantes y finalmente hipotonía y ptosis bulbi.(28)

Etiología. Difícilmente puede llegarse a establecer el origen de las uveítis, en la mayoría de los pacientes se ha mencionado como causas de esta uveítis la espondilitis anquilosante y la artritis reumatoide juvenil menos frecuentemente por sífilis, sarcoidosis y queratouveítis por herpes zoster, o simple tuberculosis. (19,28,31)

Diagnóstico exploración completa tonometría del fondo del ojo con depresión escleral.

Tratamiento. Ambulatorio es el uso de midriáticos solo en el momento de la enfermedad de el proceso inflamatorio su objetivo es movilizar la pupila, la atropina no es recomendada por la midriasis constante que produce, cuando no es severo se puede administrar colirio, se pueden utilizar esteroides tópicos perioculares y sistémicos.(28)

UVEÍTIS POSTERIORES

En la uveítis posterior participa tanto la retina como la coroides, la toxoplasmosis es en general la causa más frecuente, es un proceso congénito en el que se observan cicatrices retinocoroideas, la retinitis necrosante puede ser una reacción mediada por células, toxinas, enzima líticas, del parásito, inclusión citomegálica y la histoplasmosis.(28)

Diagnóstico. Lesiones localizadas en el ojo polo posterior, bien definidas con forma irregular.(19)

Tratamiento. Perimetamina 1 mg. por kilogramo de peso durante 30 días junto con sulfametoxipiridazina, clindamicina manifestaciones clínicas oculares y neurológicas además titulaciones elevadas de la prueba de inmunofluorecencia.(28)

UVEÍTIS DIFUSA

Es de muy rara etiología y se asocia en un 5% a los pacientes con Vogt-Koyanagi Harada, otras causas son sarcoidosis y síndrome de Behcet.(28)

En general la uveítis es un proceso inmunológico que tiene su expresión en el ojo, hasta el momento se desconocen con exactitud los mecanismos a través de los cuales se manifiesta solamente en la uvea o bien abarca su totalidad.(28)

Su etiología es desconocida en la mayor parte de ellas se ha relacionado con procesos sistémicos en los que existe una alteración inmunológica de fondo y que se hace evidente por las enfermedades antes mencionadas en cada uno de los tipos de uveítis.(28)

2.8.4 El cristalino la retina y sus proteínas antigénicas

El cristalino es una estructura en forma de lente biconvexa, es transparente y está situado por detrás del iris y por delante del vítreo y sostenido en su sitio por un ligamento entre suspensorio llamado zónula, el epitelio cubre la cara anterior del cristalino y por debajo de la cápsula.

Las fibras del cristalino forman el cuerpo del cristalino las que están situadas en la parte central forman núcleos de adentro hacia afuera, estos núcleos están formados por fibras y constituyen las cortezas.

Zónula es el ligamento que mantiene al cristalino y su liga y esta formado por fibras que se incrementan en el ecuador del cristalino, se dirigen y fijan en los procesos ciliares. En 1995 aislaron lentes cristalinos de bovinos y humanos además los caracterizan, purifican los encuentran alterados con la producción de un metabolito endógeno en diabetes lo que es causa frecuente de cataratas en diabéticos. (39)

La retina es la capa más interna del ojo es una membrana transparente se divide en 10 capas, las cuales son: epitelio pigmentado, capa de conos y bastones son los elementos fotorreceptores, los conos son los más altamente sensitivos y los más abundantes en la región central, donde los bastones son los más escasos, la capa limitante externa es propiamente una membrana con múltiples orificios por donde pasan las terminaciones que unen a los cuerpos celulares, capa nuclear interna y capa plexiforme interna además de ser neuronas de primer orden efectúan sinapsis. La capa de células ganglionares son células multipolares similares al sistema nervioso central, la capa de fibras nerviosas se forman en el nervio óptico, la capa limitante externa se piensa procede de las células de Muller, se encuentra limitando con el vítreo.

Se han desarrollado muchos modelos de uveítis autoinmune experimental bajo diversas condiciones siendo el antígeno S o proteína S soluble el componente mayor de las células fotorreceptoras, la secuencia del antígeno S ha sido determinada en varias especies de mamíferos y se ha establecido la localización de dos sitios uveipatogénicos, principales llamados péptido G y péptido M. La patogénesis de UAE inducida por el antígeno S nativo o por los péptidos sintéticos se ha demostrado que es mediada predominantemente por células T. El otro antígeno con actividad uveitopatogénica es la proteína que está unida al interfotoreceptor retinoide (IRBP), que es una glicoproteína tanto de retina como de la glándula pineal, la UAE inducida por el Antígeno S y por IRBP son similares, en su curso clínico y en los cambios histopatológicos ambos antígenos pueden producir pinealitis autoinmune experimental (EAP) Dada la importancia de la proteína S en este estudio. hablaremos de ella en el apartado siguiente

2.8.5 LA PROTEÍNA ANTAGÉNICA SOLUBLE DE RETINA

La proteína S es el antígeno soluble involucrado en la patogénesis de uveítis autoinmune experimental (EAU) fue aislado de extractos retinales de bovino por precipitación con sulfato de amonio: seguido de una tamizado molecular y cromatografía de intercambio iónico.

El Ag purificado tiene un peso molecular de aproximadamente 102 mil por ultracentrifugación analítica, 56,000 por un gel cromatográfico, 50,500 por electroforesis SAS.

Este antígeno fue identificado como una proteína con una cantidad pequeña de lípidos el espectro de absorción. La molécula carece de cisteína y triptofano pero contiene una porción relativamente alta de aminoácidos no polares que corresponden a una proteína lipofílica. Esto fue localizado por inmunofluorescencia en el área circundante de la célula fotorreceptora sana en un patrón indicando asociación con la membrana plasmática se descarto la posibilidad de que el antígeno encontrado fuera rodopsina el cual se ha visto involucrado como un probable antígeno en la patogénesis. El antígeno soluble encontrado tiene propiedades similares en células retinales fotorreceptoras unidas a proteínas tentativamente implicadas con el transporte de vitamina A desde la circulación a la retina.

La uveítis alérgica experimentalmente producida por la sensibilización de la retina es una enfermedad autoinmune caracterizada por inflamación del tracto uveal y la retina, por infiltración de fluidos acuosos y por la pérdida de estructura y función de la célula fotorreceptora la evidencia disponible indica que la capa de células visuales y el epitelio pigmentado retinal son la fuente de los antígenos sensibilizadores y que los múltiples autoantígenos pueden estar involucrados en la producción de diversas formas de la enfermedad.

Se localizaron 3 auto antígenos por inmunofluorescencia en un estudio de EAU en diferentes áreas de la retina.

- 1.- Un antígeno soluble referido como Ag S
- 2.- Un antígeno particulado localizado en la célula fotoreceptora fuera del segmento del bastón
- 3.- Un antígeno particulado situado en la intersección de la coroides y el epitelio pigmentado de la retina

Se descubrió que de estos tres el antígeno S es el patogénicamente más activo el antígeno ha sido aislado de diversas retinas como de cerdo de guinea, de bovino, y se ha encontrado que evoca EAU en dosis diferentes de microgramos, la mayoría de los estudios se limitan por la pequeña cantidad de tejido retinal.(32)

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ceguera es un problema importante de salud pública en México, con base en estudios realizados por la secretaria de salud (1-4). Las causas son multifactoriales entre las que destacan enfermedades oculares y traumáticas.

La evolución de muchas enfermedades oculares puede analizarse *in vivo* mediante técnicas clínicas como la microscopía la angiografía y el análisis electrofisiológico.(5) Sin embargo en la actualidad estas técnicas están limitadas a lugares sumamente especializados y para tener acceso a estos los enfermos deben estar bien canalizados y en la mayoría de los casos esto no es posible, por diagnóstico no oportuno o por falta de recursos económicos. Muchos de los pacientes deben conformarse con ayuda médica pero no especializada.. Esto ha dado pie a la investigación clínica experimental, sobre todo en el campo inmunológico ya que un gran número de éstas son mediadas por células y/o anticuerpos.(5-6)

En ratones de la cepa CD1 *et/et* hipotímicos (7-10) se ha observado una frecuencia alta en el desarrollo espontáneo de una oftalmopatía con signos que corresponden a una uveítis autoinmune anterior (11) y proponemos que deben estar involucrados anticuerpos y /o células de la respuesta inmune. Debido a la hipotimia que sufre el ratón creemos que existe un desequilibrio en la respuesta inmune encaminado hacia un aumento en los procesos autoinmunes.

La mayoría de los estudios experimentales sobre uveítis se han realizado en ratas usando un antígeno soluble extraído de retina bovina. (Ag S). En todos éstos, se ha concluido que el Ag. S de retina bovina se utiliza como agente inductor de la respuesta autoinmune experimental. (9,12-15).

La extracción del antígeno así como su caracterización está bien definido sobre todo para la proteína S de retina, sin embargo para las proteínas presentes en el cristalino no ha sido estudiado estas son alfa, beta H y beta-L, de estas no hay estudios donde se compare su poder antigénico con respecto a la proteína S de retina. (13-14,16)

En este sentido existe la posibilidad de desarrollar un modelo que ayude a comprender los mecanismos de patogénia en ésta oftalmopatía.

4.- FUNDAMENTO DE LA ELECCIÓN DEL TEMA

La ceguera es un problema importante de salud pública, actualmente hay en el mundo 28 millones de personas ciegas (1). De acuerdo con la Organización mundial de la salud (OMS), se consideran las siguientes definiciones: ceguera y debilidad visual al tener problemas para ver, de dos a tres metros y de tres a seis metros respectivamente.(4)

Estudios realizados en México de carácter epidemiológico., por la secretaria de salud nos indican una prevalencia de 67405 ciegos en la República mexicana, en el año de 1980, así como de 134,810 débiles visuales en el mismo territorio.(1,4)

Los padecimientos más frecuentes que ocasionan ceguera y debilidad visual son diferentes para los países desarrollados y subdesarrollados., para los primeros las causas más frecuentes son: retinopatías, glaucoma, catarata y uveítis; en el segundo las causas más frecuentes son tracoma, xerofalmia, oncocercosis y catarata, los países en vías de desarrollo tienen tasas mayores entre un diez y cuarenta por ciento más; que los países desarrollados.(1)

El conocimiento y la magnitud del problema de ceguera ha motivado a la búsqueda de soluciones y alternativas para mejorar la calidad de vida de estos enfermos.(1)

Este tema surge por que siempre está presente el riesgo de sufrir en el ojo un traumatismo o infección, capaz de desencadenar un proceso autoinmune incluso tan severo que termine con la visión parcial o totalmente.

Los estudios sobre uveítis se han limitado a modelos a los cuales experimentalmente se les ha tenido que inducir la enfermedad. Sin embargo en la FES-ZARAGOZA, se ha observado que los ratones hipotímicos cepa CD1 et/et desarrollan una oftalmopatía que según el cuadro clínico mínimo se refiere a uveítis autoinmune anterior, en la que interviene un proceso severo de inflamación, lagrimeo y catarata entre otros síntomas. En la lamina 1 podemos observar la diferente gama de lesiones que presenta el ratón.

Por lo que el realizar estudios en este ratón en el que se genera la enfermedad sin necesidad de inducirlo, es importante, pues se contaría con un modelo para estudiar mecanismos de patogénia. En términos generales esto nos llevaría a crear una plataforma de estudio sobre la inmunopatología del ojo.

Lamina 1
ILUSTRACIÓN DE LA LESIÓN MACROSCÓPICA CEPA CDI et/et.

Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.

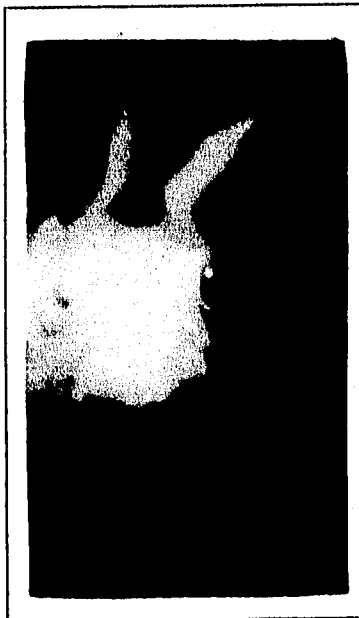


Fig. 1 Lesión (0) Ojo izquierdo sano

Fig. 2 Lesión (2) Ojo izquierdo con catarata

Fig. 3 Lesión (1) Ojo Izquierdo inflamación severa

Lesión (3) Ojo derecho perdido.

HIPÓTESIS

Debido a la hipotímia y a la alta frecuencia de ptisis Bulbi (perdida del ojo) observada en los ratones cepa CDI et/et mantenida en la FES-ZARAGOZA (Bioterio Campus II), se propone que esta oftalmopatía puede ser debida a una respuesta autoinmune.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer la participación de la respuesta inmune en la oftalmopatía observada en la cepa de ratones CDI et/et.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Evaluar el título de anticuerpos anti proteínas de cristalino y anticuerpos anti proteína S de retina, estandarizando la técnica de ELISA para este fin

b) Establecer por observación macroscópica el grado de severidad en la oftalmopatía.

7.- TIPO DE ESTUDIO

- A) OBSERVACIONAL.
- B) COMPARATIVO.
- C) TRANSVERSAL.
- D) PROSPECTIVO.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Ratonos cepa CD1 et/et que cursan o no con pediculamiento ocular, ratones cepa CD1 y cepa CD1 et/+. (hipotímicos, normales y portadores del gen hipotímia)

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Ratonos que cursen con infecciones bacterianas, parasitarias y/o procesos tumorales.

VARIABLES DE ESTUDIO

- Dependientes: Concentración de anticuerpos circulantes contra proteínas antigénicas de cristalino y/o de retina.
- Independientes: Cepas de estudio, edades y sexo de cada una de las cepas.

UNIVERSO DE TRABAJO

- Ratonos cepa CD1 et/et machos y hembras 28 y 28 respectivamente, de diferentes edades.
- Ratonos cepa CD1 et/+ machos y hembras 20 y 20 respectivamente de diferentes edades.
- Ratonos cepa CD1 machos y hembras 20 y 20 respectivamente de diferentes edades.

8.- MATERIAL

1)BIOLÓGICO.

- ojos de bovino frescos, de donde se obtienen las proteínas antigénicas de cristalino y retina.
- ratones hembras CD1 (ratones normales).
- ratones machos CD1 (ratones normales).
- ratones hembras CD1 *et/+* (portadores del gen hipotímico).
- ratones machos CD1 *et/+* (portadores del gen hipotímico).
- ratones hembras CD1 *et/et* (hipotímicos).
- ratones machos CD1 *et/et* (hipotímicos).

2)REACTIVOS

.....ESPECIFICACIÓN

- | | |
|---|-----------------|
| ● Solución salina control al 0.85% | (S.S.I) |
| ● Metanol absoluto grado reactivo. | (MERCK). |
| ● Aceite de inmersión. | (MERCK). |
| ● Ácido sulfúrico grado reactivo. | (MERCK) |
| ● Ácido acético | (MERCK) |
| ● Conjugado de ratón anti IgG peroxidasa de rábano comercial. | (SIGMA). |
| ● Agua bidestilada en vidrio grado reactivo. | (SIGMA). |
| ● Albúmina de huevo grado reactivo | (J.T. BAKER). |
| ● Carbonato de sodio grado reactivo | (J.T. BAKER). |
| ● Bicarbonato de sodio grado reactivo | (J.T. BAKER). |
| ● Ácido cítrico grado reactivo | (J. T. BAKER) . |
| ● Fosfato de sodio grado reactivo | (SIGMA). |
| ● Tween 20 grado reactivo | (MERCK). |
| ● Timersol grado reactivo | (MERCK). |
| ● Cloroformo grado reactivo | (MERCK). |
| ● Rojo de ponceau 5% | (MERCK) |

3) MATERIAL Y EQUIPO

ESPECIFICACIÓN

- | | |
|---------------------------|----------------|
| ● Balanza granataria. | (OHAUS) |
| ● Balanza analítica. | (Mettler H-80) |
| ● Agitador vortex . | (GENIE) |
| ● Microscopio óptico | (ZEISS) |
| ● Equipo para destilación | (PYREX) |

- Espectrofotómetro.
- Micropipetas de 20 -100 microlitros
- Micropipetas de 200-1000 microlitros.
- Microcentrífuga
- Centrífuga.
- Equipo de electroforesis para geles de acrilamida.
- Lector de ELISA en placa.
- Densitómetro CD 50
- Cámara

(ESPECTRONIC 20)
 (BRAN)
 (BRAN)
 (BECTON DIKINSON)
 (DAMON /ICE B-20A DIVISON)
 (B R L)
 (DYNATECH)
 (HEIDELBERG CROMATOGRAM)
 (CÁMARA HELMAN INSTRUMENT)

4) MATERIAL DE VIDRIO

- Vasos de precipitados de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Tubos de ensaye
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Celdas para espectrofotómetro
- Probetas de 25, 50 y 1000 ml.
- Matraces aforados de 25, 50, 100, 500, 1000 y 2000 ml.

(PYREX).
 (PYREX).
 (PYREX).
 (Bauch Lomb).
 (PYREX).
 (PYREX).

5) MATERIAL DIVERSO

- Espátula de acero inoxidable.
- Piseta de 250, 500 y 1000.
- Soporte Universal.
- Trípode Metálico.
- Tela de Asbesto.
- Mechero Bunsen.
- Mechero Fisher.
- Papel parafilm.
- Tijeras.
- Jeringas.
- Algodón.
- Gradillas.
- Placas para microtitulación de ELISA
- Perillas de plástico.
- Bulbos para pipeta Pasteur.
- Bisturi.
- Membrana de diálisis
- Mango para Bisturi.
- Tiras de acetato de celulosa

(COSTAR, NUNC).

(Molecular Spectra/Pours).

(Beckman Microzone Plus)

METODOLOGÍA

1)EXTRACCIÓN DE ANTÍGENOS (PROTEÍNAS DE CRISTALINO Y DE RETINA).

2)CUANTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS (POR EL MÉTODO DE LOWRY).

3)INMUNIZACIÓN DE LOS RATONES CON LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS PARA TENER TESTIGOS POSITIVOS.

4)OBTENCIÓN DEL SUERO Y CABEZAS DE LOS ANIMALES INMUNIZADOS. OBTENCIÓN DE SUEROS Y CABEZAS DE ANIMALES TESTIGO NEGATIVO CEPA CDI, CDI *et/et*, Y DE CEPA DE ESTUDIO CDI *et/et*. LOS CUALES SON: RATONES NORMALES, PORTADORES DEL GEN DE HIPOTIMIA E HIPITÍMICOS RESPECTIVAMENTE.

5)DETERMINACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS IgG EN EL SUERO DE LOS RATONES POR LA TÉCNICA DE ELISA.

6)OBSERVACIÓN DE LOS OJOS, ESTABLECIMIENTO DEL GRADO DE LESIÓN MACROSCÓPICA.

7)ELECTROFORESIS.

8)ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

9.- METODOLOGÍA.

1) Extracción de antígenos.

Los antígenos proteína S de retina y proteínas de cristalino se obtuvieron de la siguiente manera:

a. Seis ojos frescos de bovino se obtuvieron del rastro sacándolos en las mejores condiciones de asepsia posible, la porción anterior del globo ocular fue removido por una incisión circumcorneal, el cristalino y humor vítreo se extrajo suavemente de la copa del ojo. La retina se separo del epitelio pigmentado y coroides con ayuda de unas pinzas y se cortó con tijeras pequeñas la conexión de ésta al nervio óptico. Las retinas así como los cristalinos se limpiaron para evitar contaminación y cada una de estas estructuras se depositaron en vasos de precipitados perfectamente limpios, fríos, con un poco de solución salina fisiológica y etiquetados, se guardaron en congelación a -4°C.

b. De las retinas y los cristalinos colectados en el paso anterior se procedió a hacer el extracto antigénico, como sigue: se preparó una suspensión al 20% p/V en amortiguador A (Buffers de fosfatos, 0.5 M fosfato de potasio pH 7.2 ,0.1M de cloruro de sodio) de cada una respectivamente. Se homogeneizaron en un Grinder Tissue Homogenizers (Thomas laboratory Specialties) Se mantuvieron en congelación a -4°C.

c. Se centrifugó 1 hora a 10000 r.p.m. en una centrifuga (Damon /ICE Divison) Los sobrenadantes claros contienen los antígenos y se cosecharon por aspiración.

d. Se hizo un fraccionamiento con sulfato de amonio, el sulfato de amonio saturado se adiciono con agitación suave a un volumen igual de extracto retinal y de cristalino respectivamente, los sobrenadante obtenidos, se mantuvieron fríos.

e. Los sobrenadantes se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 20 min.

f. Los sobrenadantes se dializaron durante cuatro días, en membranas Spectra pour, para diálisis. en tres litros de PBS cambiados cada 24 horas, respectivamente.

g. Después, de esto cada una de las soluciones de las membranas se centrifugaron. a 10,000 rpm. durante una hora los sobrenadantes se guardaron, en un frascos estériles bien etiquetados; se les adicionó timerosal al 0.01%. (32)

2) Cuantificación de antígenos (Ag)

Se cuantificó, tanto las proteínas de retina como las proteínas presentes en el cristalino por el método de Lowry. (38).

a. Se realizó una curva patrón colocando una serie de 10 tubos que contenían solución de ovoalbúmina en concentraciones de 50, 100, 150, ..., 500 microgramos por mililitro en solución salina isotónica. (SSI).

b. En otro tubo se colocó un ml de muestra problema "A", a todos los tubos se les agregó 3 ml de el reactivo de Lowry "a" del cual se preparan 50 ml a estos se les adiciona 1 ml "b" se dejó reposar durante 10 min. a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente, después de esto adicionó 0.1 ml del reactivo de Folin Ciocalteu y se incubó durante 30 min, y Leer a 600 nm. en un espectrofotómetro.

c. Se interpoló el resultado en la curva patrón. (26)

Reactivos de Lowry

"a" contiene carbonato de sodio al 2% , y tartrato de sodio y potasio al 0.02% en hidróxido de sodio al 0.1N.

"b" Es una solución de sulfato de cobre al 0.5% en agua.

3) Inmunización de los animales con las proteínas antigénicas, para tener testigos positivos.

A partir de la concentración obtenida de la cuantificación se inmunizó 4 hembras de las cepas (CD1 y CD et/et) respectivamente de la emulsión de antígenos

a. Se inyectó en cada uno de los cojinetes plantares 0.1 c.c de una emulsión que contenía 30 microgramos por ml. de los antígenos correspondientes, con un volumen igual de adyuvante de Freud, aumentado con *Mycobacterium tuberculosis* H-37 (12)

b. Se etiquetaron perfectamente bien las jaulas con la fecha de inmunización, 14 días después de la inmunización se sacrificaron los animales. (12)

4) Obtención del suero y cabezas de los animales, testigo positivo y negativo.

En el sacrificio de los animales, para todos se procedió de igual manera tanto para los testigos negativos, como para los ratones de estudio y los inmunizados.

a. Se anestesió a cada uno de los ratones con éter y se cortó la arteria axilar con bisturí, se colectó la sangre en tubos de ensayo debidamente etiquetados, se anotó en la libreta de registro las observaciones correspondientes de acuerdo a el lote además de las características que presentaban los ojos.

b. Se cortaron las cabezas y colocaron en formalina al 10% en PBS y se mantuvieron en refrigeración

c. La sangre extraída se colocó en incubación durante 30 min. a 37 °C.

d. Después de esto toda la noche a 4 °C , los sueros se obtuvieron mediante centrifugación a 5000 r p m /20 min.

5) Determinación de los títulos de anticuerpos Ig G en el suero de los ratones por la técnica de ELISA.

a. Se colocaron en una gradilla 7 tubos los cuales fueron etiquetados de la A a la G, en el tubo A se colocan 3 ml. de la dilución del (Ag) y de la B a la G se hicieron diluciones al doble con volúmenes de 1.5 ml de amortiguador de carbonatos. Se mezcló bien cada uno de los tubos en el vortex. Al final todos los tubos quedaron con un volumen de 1.5 ml. excepto el G que quedó con 3 ml.

b. Se colocaron en los pozos de la fila A de la placa de microtitulación 100 microlitros del tubo A, se hizo lo mismo con el resto de los tubos la fila H se llenó con 100 microlitros de diluyente (testigo negativo).

c. Se dejó en cámara húmeda a 4°C durante 24 hrs.

d. Se tiró el sobrenadante y se bloqueó con una mezcla de albúmina de huevo al 1% en PBS a 37°C durante 1 hr.

e. Se tiró el sobrenadante y se lavó 5 veces con PBS-tween, dejando actuar durante 1 min. la solución de lavado antes de tirar el sobrenadante.

f. Se realizaron diluciones de los sueros de ratón. y se colocaron 100 microlitros de la dilución correspondiente en cada pozo dejando el pozo 96 como testigo negativo del anticuerpo se incubó a 37°C durante 1 hr.

g. Se tiró el sobrenadante y se lavó 5 veces con PBS-Tween; se dejó actuar un minuto la solución de lavado antes de tirar el sobrenadante.

h. Se preparó la dilución del conjugado de ratón anti IgG.

i. Se adicionaron 100 microlitros del conjugado a cada pozo de la placa. Se incubó a 37 °C durante 15 min.

j. Se detiene la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N colocando en cada pozo 50 microlitros.

k. Leer densidad óptica de 490 nm.

6) Observación de los ojos y establecimiento del grado de lesión macroscópica

a.- Se observó cada uno de los ojos de los ratones en estudio y se anotó en la libreta de registro si hay inflamación, opacidad o destrucción.

b.- El grado de lesión macroscópica es la observación del ojo y se le designaron los números dependiendo del grado 0 ojo sano, 1 ojo inflamado, 2 ojo con catarata y 3 ojo destruido (32)

7) Electroforesis

Para la electroforesis los sueros se colectaron de la misma forma que para ELISA pero aquí el corrimiento electroforético se realizó con los sueros frescos sin congelar los sueros se corrieron con regulador de barbital pH 8.6 y una fuerza iónica de 0.5 en tiras de acetato de celulosa, el corrimiento se realizó durante 20 min. a 200 vts y se tiñeron las tiras TCA 7.5% y rojo de Ponceau 5%, una vez que a las tiras se les quitó el exceso de colorante con acético agua al 5%, se sacaron y se integraron en un densitómetro a una long. de onda de 550 nm. (39) Nota con esta técnica se esperaba observar si había activación policlonal en nuestro modelo.

8) Análisis estadístico

En este se estableció la correlación entre las variables estudiadas mediante un programa de análisis estadístico ANOVA. Después se llevó a cabo una prueba de rangos múltiples entre las variables, en el paquete estadístico SPSS PC . PLUS. (40)

10.- RESULTADOS

TABLA NUMERO 1

**TITULO DE Ac IgG vs PROTEINA S ANTIGENICA DE REINA
MEDIANTE LA TECNICA DE ELISA**

NUMERO	SX	CEPA	EDES	ABS	LESION
1	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.307	0,0
2	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.351	3,0
3	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.369	0,0
4	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.360	0,3
5	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.371	3,2
6	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.312	0,0
7	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.266	3,0
8	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.332	0,3
9	MACHO	CD1 et/et	28	0.405	3,0
10	MACHO	CD1 et/et	28	0.405	0,2
11	MACHO	CD1 et/et	28	0.394	2,0
12	MACHO	CD1 et/et	28	0.365	0,2
13	MACHO	CD1 et/et	45	0.333	0,3
14	MACHO	CD1 et/et	45	0.401	3,0
15	MACHO	CD1 et/et	45	0.394	3,3
16	MACHO	CD1 et/et	45	0.426	3,0
17	MACHO	CD1 et/et	45	0.378	3,0
18	MACHO	CD1 et/et	44	0.361	0,2
19	MACHO	CD1 et/et	44	0.320	0,0
20	MACHO	CD1 et/et	44	0.369	0,0
21	MACHO	CD1 et/et	44	0.392	0,3
22	MACHO	CD1 et/et	44	0.394	1,0
23	MACHO	CD1 et/et	44	0.384	3,0
24	HEMBRA	CD1 et/et	49	0.314	3,3
25	HEMBRA	CD1 et/et	49	0.384	3,3
26	HEMBRA	CD1 et/et	49	0.426	2,1
27	MACHO	CD1 et/et	105	0.421	3,1
28	MACHO	CD1 et/et	51	0.390	1,2
29	MACHO	CD1 et/et	51	0.420	0,2
30	MACHO	CD1 et/et	51	0.375	2,(1)
31	MACHO	CD1 et/et	51	0.339	3,3
32	MACHO	CD1 et/et	32	0.426	3,2
33	MACHO	CD1 et/et	32	0.418	2,2
34	MACHO	CD1 et/et	32	0.438	3,3
35	MACHO	CD1 et/et	29	0.423	0,3
36	MACHO	CD1 et/et	29	0.325	2,2
37	MACHO	CD1 et/et	29	0.280	3,3
38	MACHO	CD1 et/et	29	0.339	1,2

SX= SEXO, EDES= EDAD EN SEMANAS, ABS =Ac vs PROTEINA ANTIGENICA S DE RETINA
DILUCION 1: 500

LESION= LESION MACROSCOPICA : 0 Ojo sano, 1 Ojo inflamado, 2 Ojo con catarata, 3 Ojo destruido,
()= lesión severa

TABLA NUMERO 2

**TITULO DE Ac IgG vs PROTEINAS DE CRISTALINO
DETERMINADOS ELISA**

NUMERO	SEXO	CEPA	EDES	ABS	LESION
1	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.293	0,0
2	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.214	3,0
3	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.265	0,0
4	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.266	0,3
5	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.282	3,2
6	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.252	0,0
7	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.268	3,0
8	HEMBRA	CD1 et/et	34	0.282	0,3
9	MACHO	CD1 et/et	28	0.344	3,0
10	MACHO	CD1 et/et	28	0.365	0,2
11	MACHO	CD1 et/et	28	0.390	2,0
12	MACHO	CD1 et/et	28	0.440	0,2
13	MACHO	CD1 et/et	45	0.336	0,3
14	MACHO	CD1 et/et	45	0.348	3,0
15	MACHO	CD1 et/et	45	0.307	3,3
16	MACHO	CD1 et/et	45	0.385	3,0
17	MACHO	CD1 et/et	45	0.236	3,0
18	MACHO	CD1 et/et	44	0.291	0,2
19	MACHO	CD1 et/et	44	0.317	0,0
20	MACHO	CD1 et/et	44	0.340	0,0
21	MACHO	CD1 et/et	44	0.359	0,3
22	MACHO	CD1 et/et	44	0.355	1,0
23	MACHO	CD1 et/et	44	0.289	3,0
24	HEMBRA	CD1 et/et	49	0.351	3,3
25	HEMBRA	CD1 et/et	49	0.368	3,3
26	HEMBRA	CD1 et/et	49	0.379	2,1
27	MACHO	CD1 et/et	105	0.355	3,1
28	MACHO	CD1 et/et	51	0.366	1,2
29	MACHO	CD1 et/et	51	0.399	0,2
30	MACHO	CD1 et/et	51	0.359	2,(1)
31	MACHO	CD1 et/et	51	0.423	3,3
32	MACHO	CD1 et/et	32	0.354	3,2
33	MACHO	CD1 et/et	32	0.347	2,2
34	MACHO	CD1 et/et	32	0.324	3,3
35	MACHO	CD1 et/et	29	0.359	0,3
36	MACHO	CD1 et/et	29	0.288	2,2
37	MACHO	CD1 et/et	29	0.350	3,3
38	MACHO	CD1 et/et	29	0.423	1,3

SY= SEXO.

EDES= EDAD EN SEMANAS

ABS= NIVEL DE ANTICUERPOS MEDIDOS POR LA TECNICA DE ELISA DILUCION 1:500

LESION= OBSERVACION MACROSCOPICA DEL GRADO DE LESION 0 OJO SANO, 1 OJO CON INFLAMACION, 2 OJO CON CATARATA, 3 OJO DESTRUIDO, 0 SEVERO.

TABLA No 3

TITULO DE Ac IgG VS PROTEINAS DE RETINA POR LA TECNICA DE ELISA

NUMERO	SEXO	CEPA	EDES	ABS	LESION
1	HEMBRA	CD1 et/+	42	0.244	0,0
2	HEMBRA	CD1 et/+	42	0.212	0,0
3	HEMBRA	CD1 et/+	42	0.231	0,0
4	HEMBRA	CD1 et/+	42	0.245	0,0
5	MACHO	CD1 et/+	22	0.321	0,0
6	MACHO	CD1 et/+	22	0.359	0,0
7	MACHO	CD1 et/+	22	0.245	0,0
8	MACHO	CD1 et/+	32	0.245	0,0
9	MACHOI	CD1 et/+	49	0.264	0,0
10	MACHO	CD1 et/+	49	0.99	0,0
11	MACHO	CD1 et/+	39	0.051	0,0
12	MACHO	CD1 et/+	35	0.035	0,0
13	MACHO	CD1 et/+	35	0.180	0,0
14	MACHO	CD1 et/+	53	0.000	0,0
15	HEMBRA	CD1 et/+	53	0.038	0,0
16	HEMBRA	CD1 et/+	53	0.079	0,0
17	HEMBRA	CD1 et/+	53	0.373	0,0
18	HEMBRA	CD1 et/+	50	0.290	0,0
19	HEMBRA	CD1 et/+	50	0.283	0,0
20	HEMBRA	CD1 et/+	50	0.259	0,0
21	HEMBRA	CD1 et/+	50	0.255	0,0
22	HEMBRA	CD1 et/+	50	0.276	0,0

SX= SEXO DEL RATON, EDES= EDAD EN SEMANAS, ABS= TITULO DE ANTICUERPOS IgG VS PROTEINAS DE RETINA DILUCION 1:500, LESION= LESION MACROSCOPICA : 0 OJO SANO, 1 OJO INFLAMADO, 2 OJO CON CATARATA, 3 OJO DESTRUIDO Y () LESION SEVERA.

TABLA NUMERO 4

**TITULO DE Ac IgG vs PROTEINAS DE CRISTALINO
POR LA TECNICA DE ELISA**

NUMERO	SEXO	CEPA	EDES	ABS	LESION
1	HEMBRA	CD1 et/+	42	0.263	0,0
2	HEMBRA	CD1 et/+	42	0.253	0,0
3	HEMBRA	CD1 et/+	42	0.337	0,0
4	HEMBRA	CD1 et/+	42	0.371	0,0
5	MACHO	CD1 et/+	22	0.384	0,0
6	MACHO	CD1 et/+	22	0.337	0,0
7	MACHO	CD1 et/+	22	0.301	0,0
8	MACHO	CD1 et/+	52	0.305	0,0
9	MACHO	CD1 et/+	49	0.358	0,0
10	MACHO	CD1 et/+	49	0.358	0,0
11	MACHO	CD1 et/+	49	0.301	0,0
12	MACHO	CD1 et/+	35	0.429	0,0
13	MACHO	CD1 et/+	35	0.376	0,0
14	MACHO	CD1 et/+	33	0.350	0,0
15	HEMBRA	CD1 et/+	33	0.369	0,0
16	HEMBRA	CD1 et/+	33	0.390	0,0
17	HEMBRA	CD1 et/+	33	0.290	0,0
18	HEMBRA	CD1 et/+	50	0.261	0,0
19	HEMBRA	CD1 et/+	50	0.299	0,0
20	HEMBRA	CD1 et/+	50	0.297	0,0
21	HEMBRA	CD1 et/+	50	0.264	0,0
22	HEMBRA	CD1 et/+	50	0.297	0,0

LESION=LESION MACROSCOPICA : 0 OJO SANO, 1 OJO INFLAMADO, 2 OJO CON CATARATA, 3 OJO DESTRUIDO Y 0 LESION SEVERA.
SX= SEXO DEL RATON, EDES= EDAD EN SEMANAS, ABS= TITULO DE ANTICUERPOS IgG VS PROTEINAS DE CRISTALINO DILUCION 1:500.

TABLA NUMERO 5

TITULO DE A₂ vs PROTEINA S DE RETINA MEDIANTE ELISA

NUMERO	SEXO	CEPA	EDES	ABS	LESION
1	HEMBRA	CD1	12	0.170	0,0
2	HEMBRA	CD1	12	0.220	0,0
3	HEMBRA	CD1	12	0.134	0,0
4	HEMBRA	CD1	12	0.164	0,0
5	HEMBRA	CD1	12	0.247	0,0
6	HEMBRA	CD1	12	0.149	0,0
7	HEMBRA	CD1	12	0.194	0,0
8	HEMBRA	CD1	12	0.153	0,0
9	HEMBRA	CD1	12	0.135	0,0
10	HEMBRA	CD1	12	0.108	0,0
11	HEMBRA	CD1	12	0.148	0,0
12	HEMBRA	CD1	12	0.157	0,0
13	HEMBRA	CD1	12	0.069	0,0
14	HEMBRA	CD1	12	0.138	0,0
15	HEMBRA	CD1	12	0.076	0,0
16	MACHO	CD1	12	0.176	0,0
17	MACHO	CD1	12	0.035	0,0
18	MACHO	CD1	12	0.130	0,0
19	MACHO	CD1	12	0.139	0,0
20	MACHO	CD1	12	0.044	0,0
21	MACHO	CD1	12	0.032	0,0
22	MACHO	CD1	12	0.061	0,0
23	MACHO	CD1	12	0.089	0,0
24	MACHO	CD1	12	0.031	0,0
25	MACHO	CD1	12	0.025	0,0
26	MACHO	CD1	12	0.015	0,0
27	MACHO	CD1	12	0.138	0,0
28	MACHO	CD1	12	0.089	0,0
29	MACHO	CD1	12	0.002	0,0
30	MACHO	CD1	12	0.074	0,0

LESION=LESION MACROSCOPICA : 0 OJO SANO, 1 OJO INFLAMADO, 2 OJO CON CATARATA, 3 OJO DESTRUIDO Y () LESION SEVERA.

SEX= SEXO DEL RATON, EDES= EDAD EN SEMANAS, ABS= TITULO DE ANTICUERPOS IgG VS PROTEINAS DE CRISTALINO DILUCION 1:500.

TABLA NUMERO 6

**DETERMINACION DEL TITULO DE Ac vs PROTEINAS DE CRISTALINO
MEDIANTE LA TECNICA DE ELISA**

NUMERO	SEXO	CEPA	EDES	ABS	LESION
1	HEMBRA	CD1	12	0.399	0,0
2	HEMBRA	CD1	12	0.405	0,0
3	HEMBRA	CD1	12	0.389	0,0
4	HEMBRA	CD1	12	0.421	0,0
5	HEMBRA	CD1	12	0.359	0,0
6	HEMBRA	CD1	12	0.319	0,0
7	HEMBRA	CD1	12	0.450	0,0
8	HEMBRA	CD1	12	0.392	0,0
9	HEMBRA	CD1	12	0.394	0,0
10	HEMBRA	CD1	12	0.384	0,0
11	HEMBRA	CD1	12	0.320	0,0
12	HEMBRA	CD1	12	0.329	0,0
13	HEMBRA	CD1	12	0.249	0,0
14	HEMBRA	CD1	12	0.309	0,0
15	HEMBRA	CD1	12	0.312	0,0
16	MACHO	CD1	12	0.358	0,0
17	MACHO	CD1	12	0.331	0,0
18	MACHO	CD1	12	0.379	0,0
19	MACHO	CD1	12	0.375	0,0
20	MACHO	CD1	12	0.348	0,0
21	MACHO	CD1	12	0.361	0,0
22	MACHO	CD1	12	0.398	0,0
23	MACHO	CD1	12	0.413	0,0
24	MACHO	CD1	12	0.310	0,0
25	MACHO	CD1	12	0.436	0,0
26	MACHO	CD1	12	0.379	0,0
27	MACHO	CD1	12	0.347	0,0
28	MACHO	CD1	12	0.349	0,0
29	MACHO	CD1	12	0.480	0,0
30	MACHO	CD1	12	0.323	0,0

LESION-LESION MACROSCOPICA : 0 OJO SANO, 1 OJO INFLAMADO, 2 OJO CON CATARATA, 3 OJO DESTRUIDO Y () LESION SEVERA.

SX- SEXO DEL RATON, EDES- EDAD EN SEMANAS, ABS- TITULO DE ANTICUERPOS IgG VS PROTEINAS DE CRISTALINO DILUCION 1:500.

TABLA NUMERO 7

Esta tabla muestra el título de Ac IgG en suero de animales inmunizados medido con la técnica de ELISA

TESTIGOS POSITIVOS (ANIMALES INMUNIZADOS)

No	SEXO	CEPA	INMU	EDES	ABS1	ABS2	LESION
1	HEMBRA	CD1	PRO S	12	0.432	0.396	0,0
2	HEMBRA	CD1	PRO S	12	0.437	0.393	0,0
3	HEMBRA	CD1	PROS C	12	0.462	0.418	0,0
4	HEMBRA	CD1	PROS C	12	0.460	0.435	0,0
5	HEMBRA	CD1 et/et	PRO S	14	0.427	0.418	0,0
6	HEMBRA	CD1 et/et	PRO S	14	0.410	0.428	0,0
7	HEMBRA	CD1 et/et	PROS C	14	0.460	0.420	0,0
8	HEMBRA	CD1 et/et	PROS C	14	0.439	0.416	0,0

INMU= INMUNIZACION

PRO S = PORTEINA S DE RETINA

PROS C= PROTEINAS DE CRISTALINO

EDES= EDAD EN SEMANAS

ABS1= ABSORBANCIA TITULO DE ANTICUERPOS IgG VS PROTEINA S DE RETINA BOVINA

DILUCION 1:500

ABS2=ABSORBANCIA TITULO DE ANTICUERPOS IgG VS PROTEINAS DE CRISTALINO BOVINO

DILUCION 1:500

LESION : SIN LESION

11.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 8

Respuesta 1 (anticuerpos vs antígenos de retina) relación cepa.

CEPA	1	2	3	Control +
Desv. \bar{X}	0.1114	0.2083	0.3715	0.4486
Desv. STD S	0.0636	0.0109	0.0436	0.0192

Tabla 9

Respuesta 1 relación sexo cepa

CEPA	1	1	2	2	3	3	Control +
SEXO	M	H	M	H	M	H	H
Desv. \bar{X}	0.0720	0.1508	0.1799	0.2320	0.3824	0.3446	0.4486
Desv. S	0.0531	0.0473	0.01265	0.0908	0.0392	0.0192	0.0192

Tabla 10

Respuesta 1 relación lesión cepa

CEPA	1	2	3	3	3	3	Control +
LESIÓN	S	S	S	I	C	D	S
Desv. \bar{X}	0.1114	0.2083	0.3380	0.3940	0.3888	0.3718	0.4486
Desv. S	0.0636	0.1096	0.0285	-	0.0329	0.0482	0.0192

Tabla 11

Respuesta 1 relación cepa sexo lesión

Cepa	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	C+
Sexo	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	H
lesión	S	S	S	S	S	I	I	C	C	D	D	D	S
\bar{X}	0.072	0.150	0.179	0.232	0.344	0.334	0.394	0.394	0.384	0.426	0.385	0.337	0.448
S	0.053	0.047	0.126	0.090	0.034	0.033	-	-	0.320	-	0.442	0.433	0.019

Tabla 12

Respuesta 1 relación cepa edad lesión.

CEPA	1	C+	2	3	3	2	3	3	3
EDAD	10	10	21	21	21	31	31	31	31
LESIÓN	S	S	S	C	D	S	S	C	D
\bar{X}	0.1144	0.4484	0.3083	0.3723	0.3632	0.1075	0.3348	0.4180	0.3623
S	0.0192	0.0192	-	0.0357	0.0645	0.0725	0.0301	-	0.0645

CEPA	2	3	3	3	3	2	3	3
EDAD	41	41	41	41	41	50	50	50
LESIÓN	S	S	I	C	D	S	C	D
\bar{X}	0.2257	0.3444	0.3940	0.3935	0.3783	0.1470	0.3980	0.3800
S	0.0743	0.0346	-	0.0460	0.0344	0.01572	0.1572	0.0580

Tabla 13
 Respuesta 2 (Anti antígenos de cristalino) relación cepa.

CEPA	1	2	3	CONTROL+
DESX	0.3676	0.3268	0.3328	0.4150
DESV STD S	0.0489	0.0488	0.0472	0.0146

Tabla 14
 Respuesta 2 relación sexo cepa

CEPA	1	1	2	2	3	3	C+
SEXO	M	H	M	H	M	H	H
DESX	0.3723	0.3621	0.3499	0.3076	0.3475	0.3126	0.4154
DESV STD	-	-	0.0411	0.0478	0.0375	0.0374	0.0146

Tabla 15
 Respuesta 2 relación cepa lesión.

CEPA	1	1	2	2	3	3	C+
LESIÓN	S	S	S	I	C	D	S
DESX	0.3673	0.368	0.2802	0.3550	0.3624	0.3338	0.4154
DESV S	0.0489	0.0488	0.0458	0-	0.0463	0.0497	0.0146

Tabla 16
 Respuesta 2 Relación sexo cepa lesión.

Cepa	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	C+
Sexo	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	H
lesión	S	S	S	S	S	I	I	C	C	D	D	D	S
X	0.372	0.361	0.349	0.307	0.328	0.256	0.355	-	0.360	0.379	0.346	0.302	0.415
S	0.041	0.053	0.041	0.047	0.016	0.032	-	-	0.0487	-	0.047	0.044	0.014

Tabla 17
 Respuesta 2 Relación cepa lesión edad

CEPA	1	C+	2	3	3	2	3	3	3
EDAD	10	10	21	21	21	31	31	31	31
LESIÓN	S	S	S	C	D	S	S	C	D
X	0.3673	0.4154	0.3407	0.3708	0.3690	0.4020	0.2560	0.3470	0.2960
S	0.0489	0.0146	0.0140	0.0634	0.0365	0.0375	0.0328	-	0.0353

CEPA	2	3	3	3	3	2	3	3
EDAD	41	41	41	41	41	50	50	50
LESIÓN	S	S	I	C	D	S	C	D
X	0.3049	0.3285	0.3550	0.3350	0.3310	0.3408	0.3747	0.3890
S	0.0418	0.0163	-	0.0622	0.0463	0.0423	0.0214	0.0481

Tabla 18 Electroforesis gama relación sexo cepa

CEPA	1	2	3	1	1	2	2	3	3
SEXO				M	H	M	H	M	H
X	34.98	43.29	36.29	28.84	41.12	43.54	43.04	34.61	37.96
S	10.054	8.74	4.23	6.07	9.08	4.23	12.40	4.6	3.39

Tabla 19 Electroforesis Albúmina relación sexo cepa.

CEPA	1	2	3	1	1	2	2	3	3
SEXO				M	H	M	H	M	H
X	46.35	38	43.30	48.66	44.04	39.16	36.84	40.63	45.96
S	6.97	6.78	5.32	4.36	8.77	2.75	9.64	3.55	5.71

Nota.

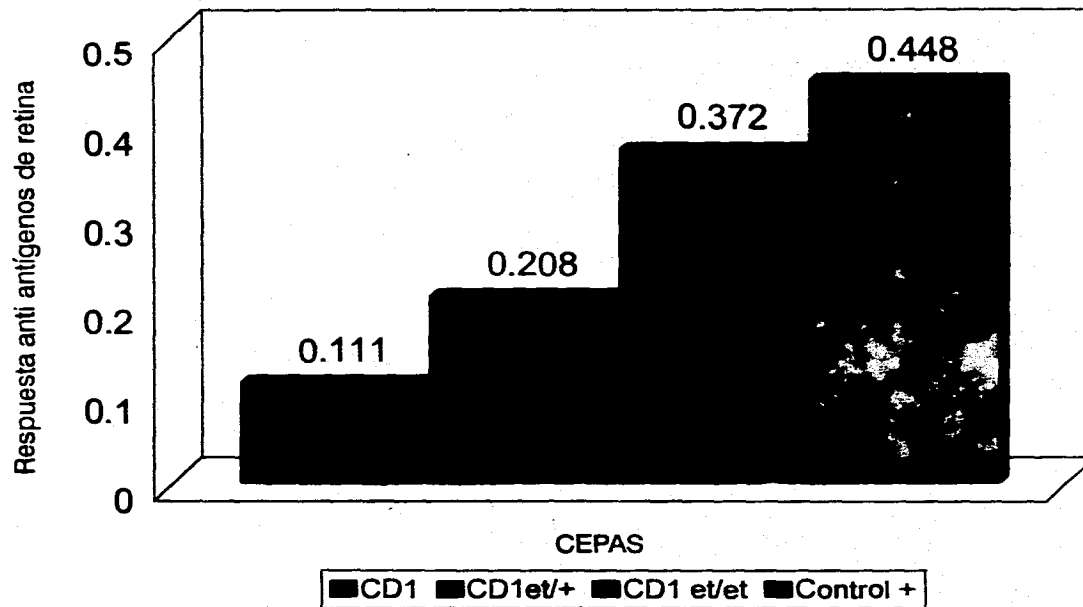
CEPA 1= CD1 (PROGENITORA) CEPA 2= CD1 et/ + (PORTADORES DEL GEN DE HIPOTIMIA)
 CEPA 3= CD1et/et (HIPOTÍMICA)

SEXO = H PARA HEMBRA Y M PARA MACHO

LESION= S OJO SANO, Y OJO INFLAMADO, C OJO CON CATARATA Y D OJO DESTRUIDO.

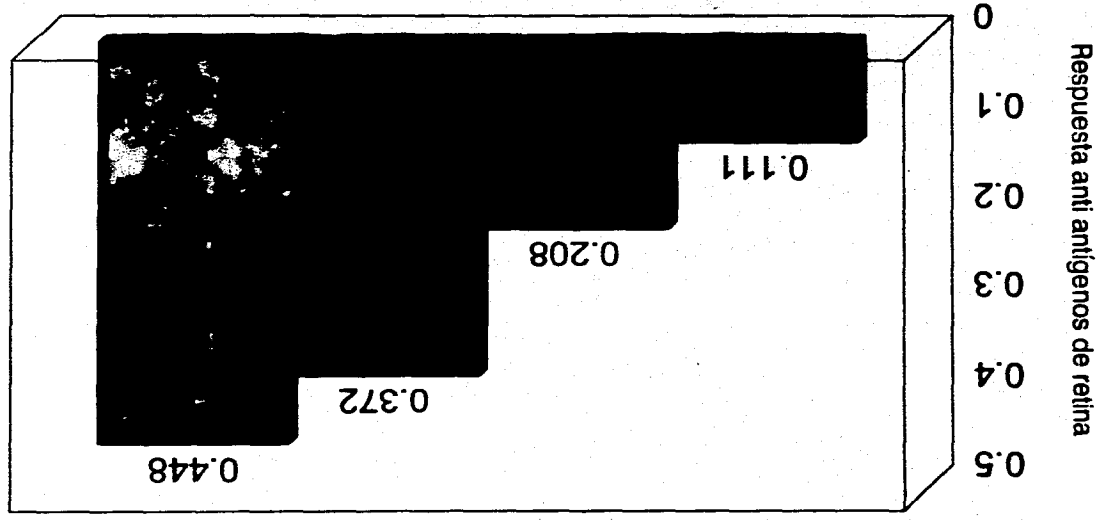
EDAD= EN SEMANAS

RESPUESTA ANTI ANTIGENOS DE RETINA DETERMINADOS POR ELISA.⁵⁹



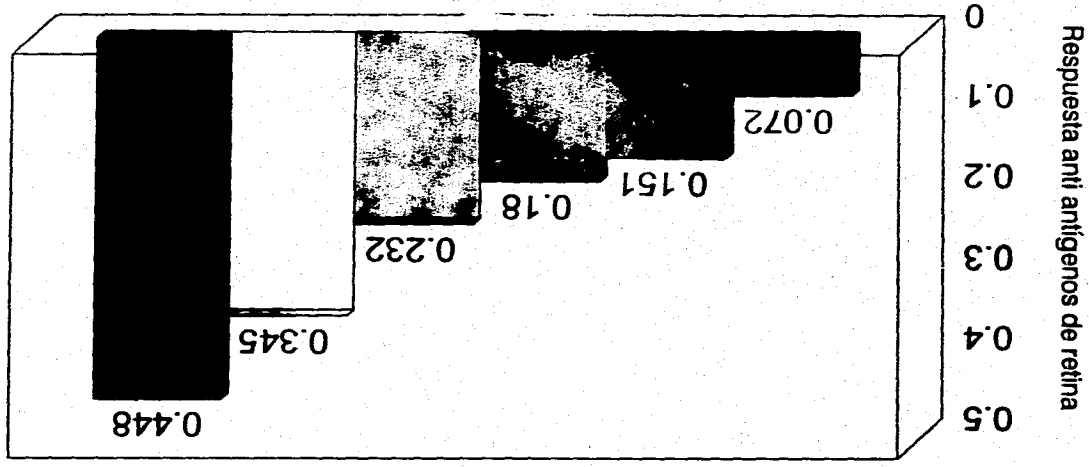
Gráfica 1. Dilución 1:500. $P < 0.05$

RESPUESTA ANTI ANTIGENOS DE RETINA DETERMINADOS POR ELISA.



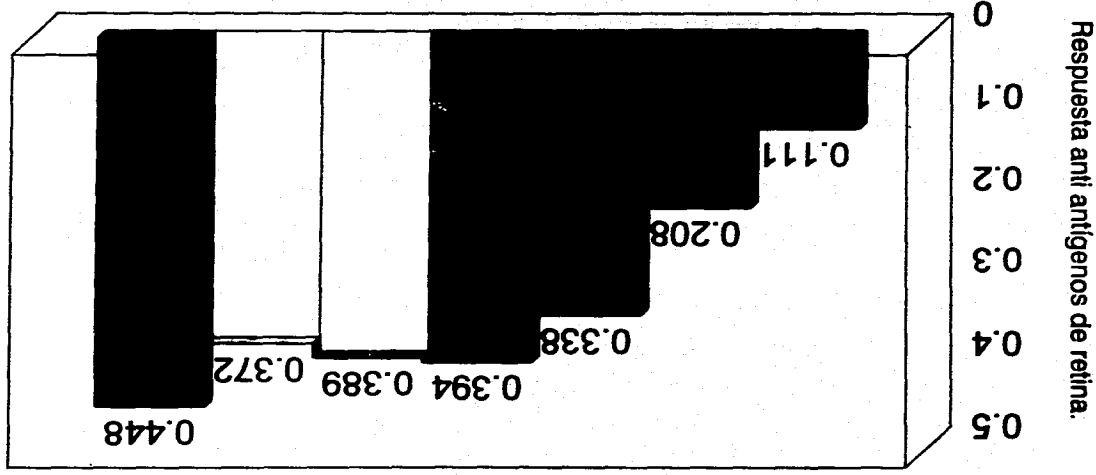
Gráfica 1. Dilución 1:500. $P < 0.05$

RESPUESTA ANTI ANTIGENOS DE RETINA DETERMINADOS
POR ELISA.



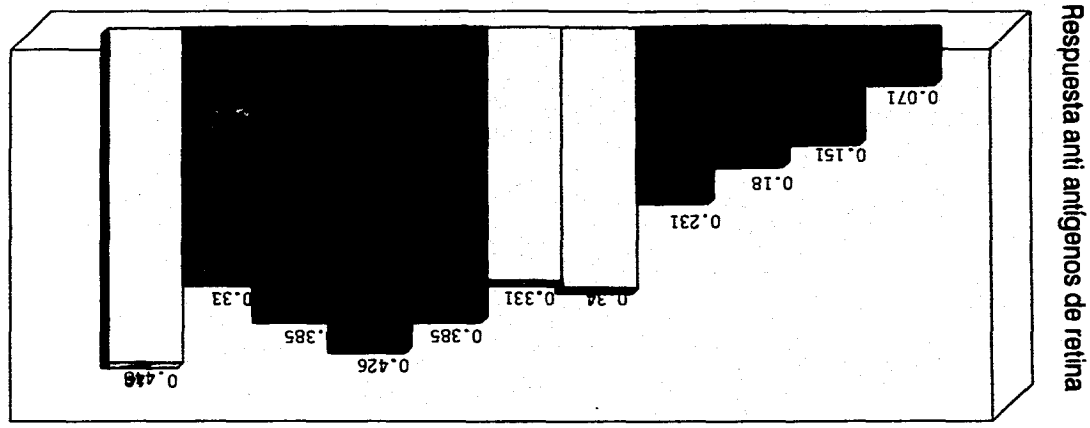
Gráfica 2. Dilución 1:500. $P < 0.05$

**RESPUESTA ANTI ANTIGENOS DE RETINA DETERMINADOS
POR ELISA.**



Gráfica 3. Dilución 1:500. $P < 0.05$

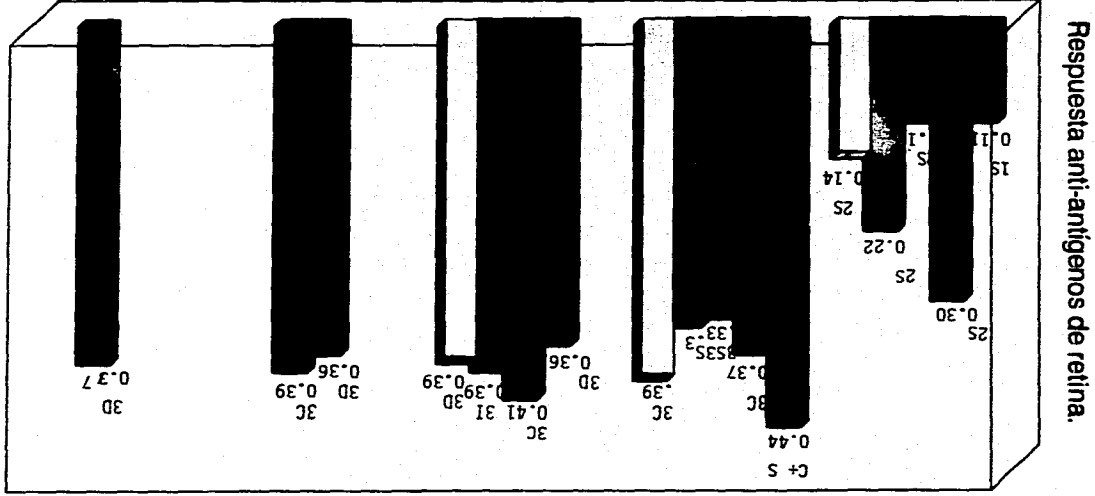
RESPUESTA ANTI ANTIGENOS DE RETINA DETERMINADOS POR ELISA.



■ MCD1 S ■ MCD1ev+S ■ MCD1ev+c ■ MCD1evID
 □ MCD1evS □ H Control +

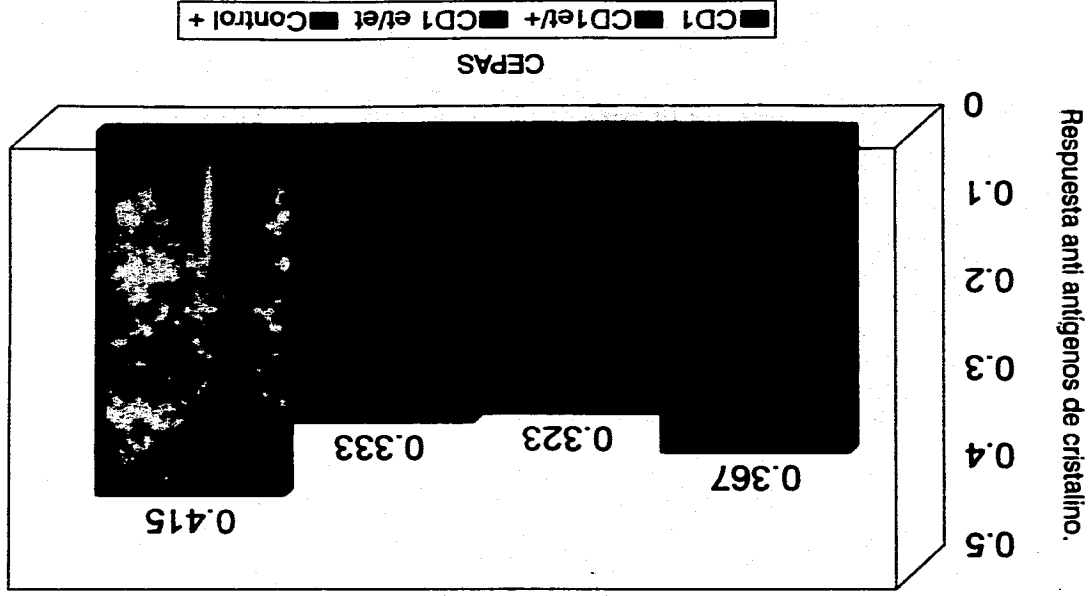
Gráfica 4. S=sano, C= catarata y D= destrucción total. P < 0.05

RESPUESTA ANTI ANTIGENOS DE RETINA DETERMINADOS POR ELISA.



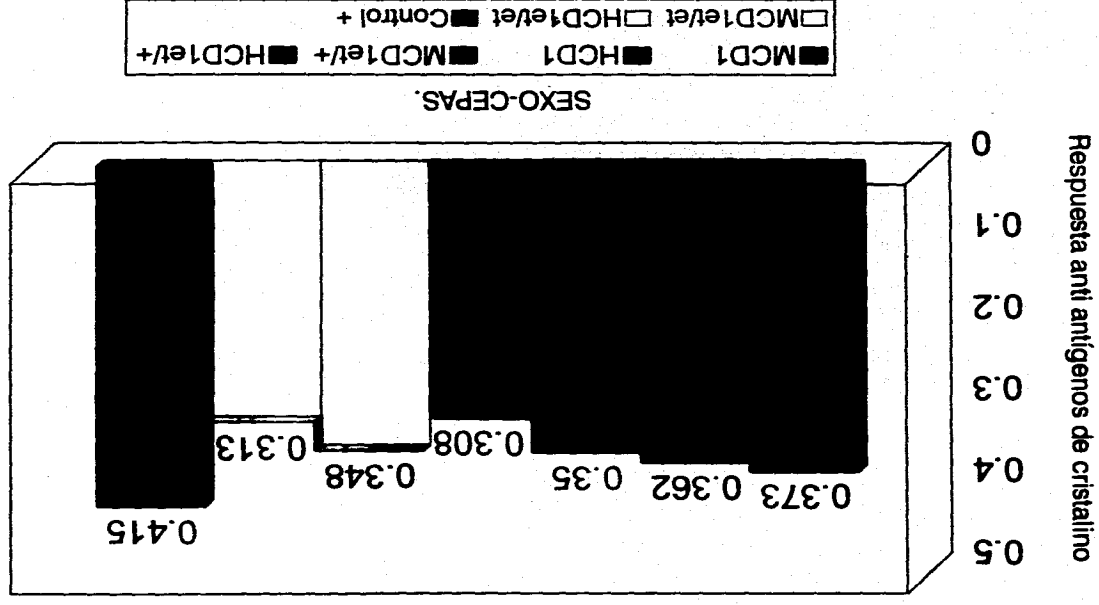
Gráfica 5. S=sano, C=catarata y D=destrucción total. P < 0.05
 C E P A S . 1= C D I 2= C D I et/+ 3= C D I et/et.

RESPUESTA ANTI ANTIGENOS DE CRISTALINO DETERMINADOS POR ELISA.



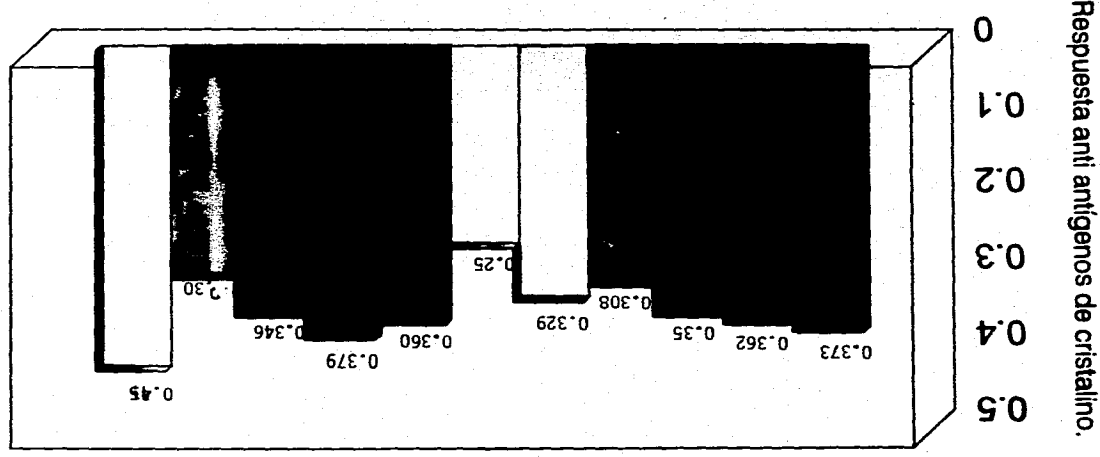
Gráfica 6. Dilución 1:500. $P < 0.05$

RESPUESTA ANTI ANTIGENOS DE CRISTALINO DETERMINADOS POR ELISA.



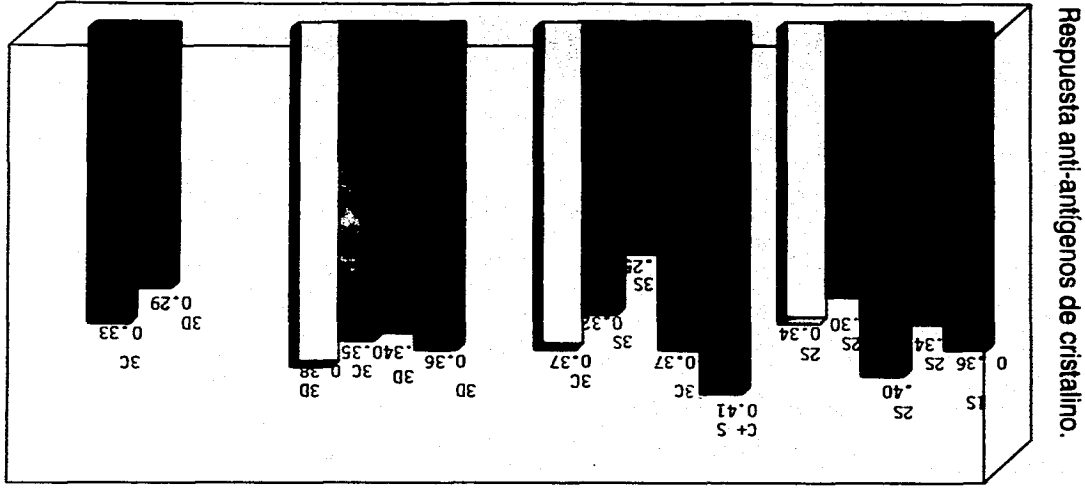
Gráfica 7. Dilución 1:500. P < 0.05

RESPUESTA ANTI ANTIGENOS DE CRISTALINO DETERMINADOS POR ELISA.



Gráfica 9. S=sano, C= catarata y D= destrucción total. P < 0.05

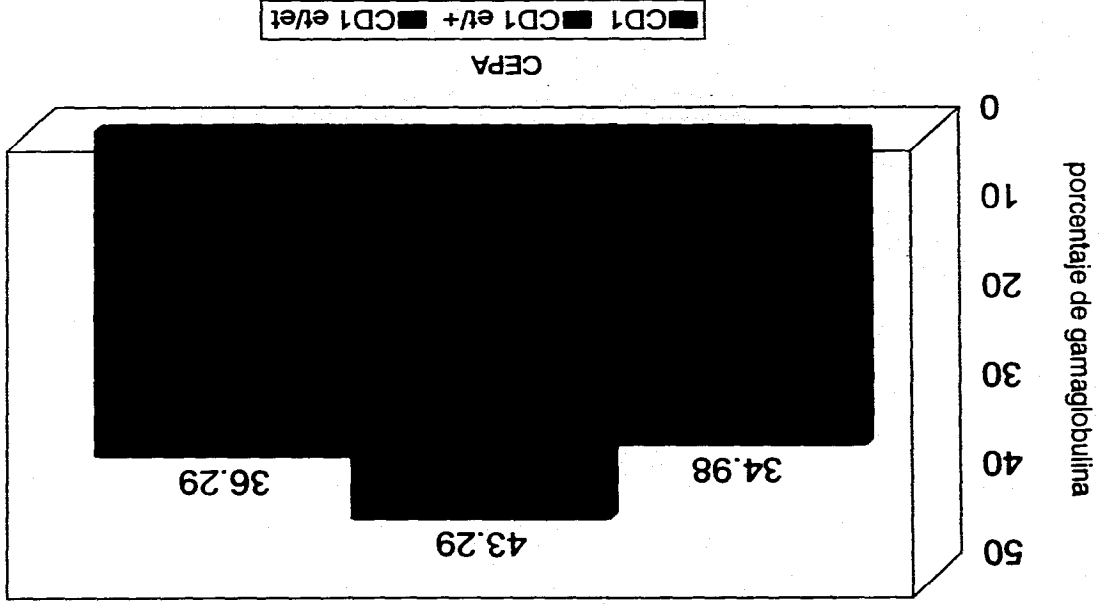
RESPUESTA ANTI ANTIGENOS DE CRISTALINO DETERMINADOS POR ELISA.



Gráfica 10. S=sano, C=catarata y D=destrucción total. P<0,05

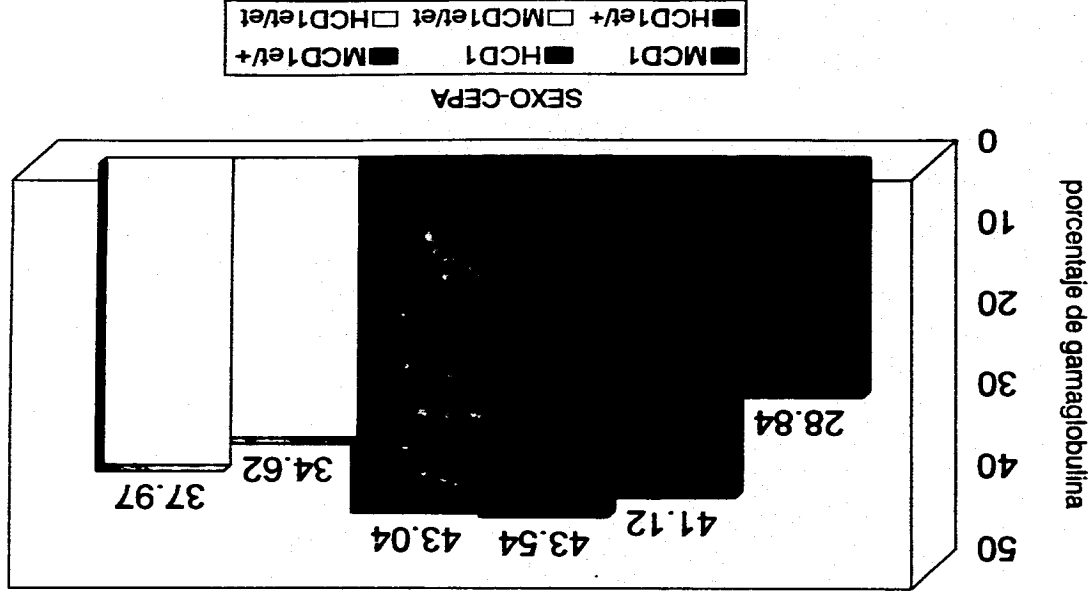
C E P A S 1= CD1 2= CD1 et/+ 3= CD1 et/et.

PORCENTAJE DE GAMAGLOBULINA.
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.



Gráfica 11. P<0.05

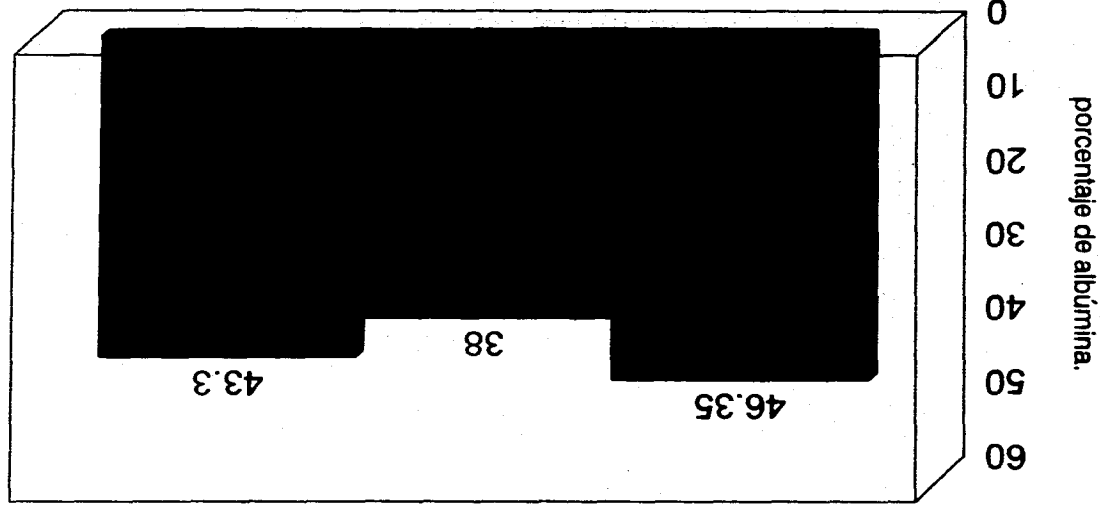
**PORCENTAJE DE GAMAGLOBULINA
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.**



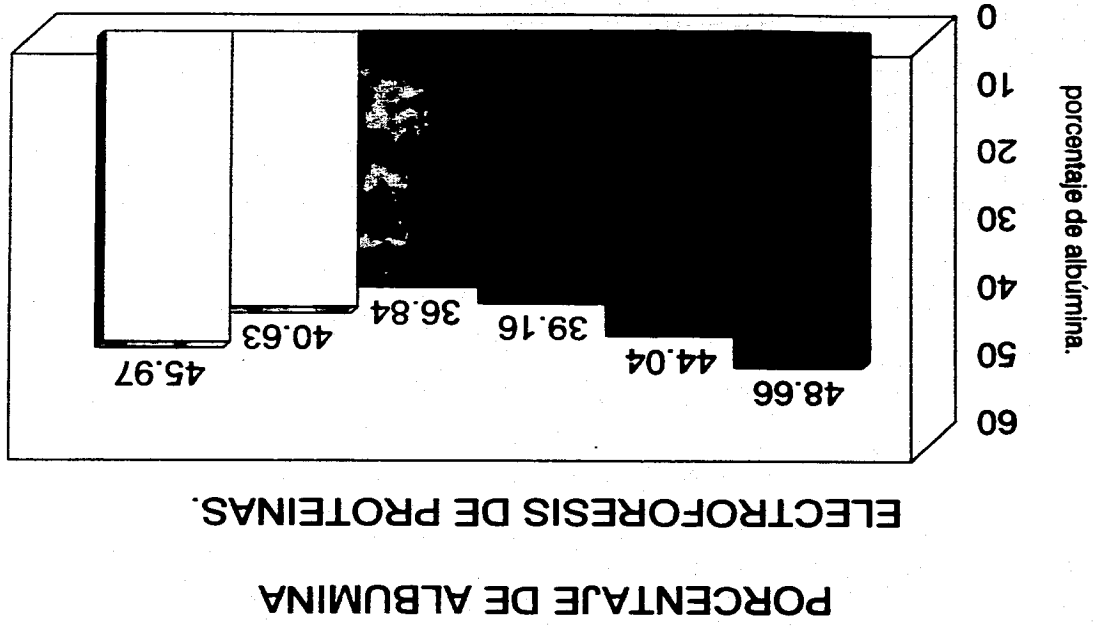
Gráfica 12. $P < 0.05$

PORCENTAJE DE ALBUMINA.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.



Gráfica 13. P<0.05



Gráfica 14. P<0.05

12.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA muestran una diferencia significativa entre las cepas de ratones estudiadas CDI (eutímico), CDI *et/+* (portador del gen de hipotimia) y CDI *et/et* (hiopotímico).

La gráfica 1 muestra que los ratones hipotímicos tienen una mayor respuesta anti antígenos de retina en comparación con las otras cepas y además ésta es similar a la de los controles positivos; esto era de esperarse puesto que la cepa muestra una oftalmopatía uveítis, que se explica porque hay un reconocimiento de anticuerpos IgG contra antígeno soluble proveniente de retina. el cual está involucrado en la patogénesis de este padecimiento de origen multifactorial. Apesar de que el ojo está anatómicamente aislado, contiene diversos antígenos que en estado normal no están en contacto con la circulación, esto puede ser explicado según la teoría de selección clonal de Burnet, aquellas clonas autorreactivas que en etapa inmadura no se ponen en contacto con su antígeno homólogo o con su antígeno de reacción cruzada (mimetismo molecular), responderán; generando efectores de la respuesta inmune que se traducirán en procesos autoinmunes. La uveítis es un proceso severo de inflamación y el desarrollo de la respuesta inflamatoria dentro del ojo tras como consecuencia la ruptura de la barrera hematorretinal con lo cual se permite la entrada de la respuesta inflamatoria incluyendo posibles clonas auto reactivas o salida de material de esta estructura que origina la activación de clonas homologas y generación de autorrespuestas.

De la gráfica 6 a la 10 observamos que en la respuesta contra antígenos proteínas provenientes del cristalino no hay diferencia de ésta entre las cepas únicamente el control + es en el que se ve un ligero aumento, lo que nos indica que no es relevante la respuesta contra proteínas de cristalino en el padecimiento oftálmico que sufren los ratones hipotímicos. Sin embargo hay reportes de que la respuesta anti proteínas de cristalino juega un papel importante en la generación de cataratas pues en diabetes se ven alteradas cuando se crea un metabolito endógeno llamado metil glicoxal y se observa que es una causa frecuente de cataratas. . (41)

La gráfica 2 muestra que no hay diferencia significativa estadísticamente entre sexos para este padecimiento. A pesar de lo que se pudiera esperar pues otros estudios demuestran que las hembras tienen mayor respuesta inmunológica, sin embargo para este padecimiento no fue relevante el sexo, incluso hay un estudio de la Dr. Rosas en donde el timo de las hembras en comparación con el de los machos es mayor y podríamos esperar una respuesta inmunológica diferente quizá efectivamente más aumentada, esto obviamente dependería de su actividad tímica sin tener una afectación por la actividad hormonal, sexualmente hablando esto no ocurre en uveítis tal vez porque es un padecimiento en el que únicamente se encuentra una deficiencia inmunitaria y no una alteración de origen hormonal ..

La gráfica 3 muestra la interacción cepa- lesión, se observa que la cepa CD1 *et/et* con lesiones como inflamación y catarata muestran un incremento en la respuesta de anticuerpos IgG contra proteína S en comparación con las demás esto es de esperarse dado lo que se comento con respecto a la respuesta inflamatoria dentro del ojo, en la gráfica 4 además se toma en cuenta el sexo y no hubo diferencias marcadas. con respecto a éste como ya se había descrito.

La gráfica 5 muestra la respuesta anti antígenos de retina, con respecto a la interacción edad cepa lesión. muestra que la cepa CD1 sana tiene una media de respuesta de 0.1114, el control + sano, tiene una media de respuesta igual a 0.4484 con 10 semanas de edad, los portadores sanos de 31 semanas tienen una respuesta de 0.1075 sin embargo los ratones hipotímicos con catarata de 21 semanas de edad tienen una respuesta de 0.3723, a las 31 semanas de 0.4180 y a las 41 semanas el más elevado es el ojo inflamado con 0.3940 siguiéndole el de catarata con 0.3935 el mayor nivel alcanzado exceptuando el de catarata a las 31 semanas, es el de catarata con animales mayores de 50 semanas. lo que nos afirma que la respuesta inmunológica se ve aumentada conforme aumenta la edad. De acuerdo a las investigaciones que relacionan la edad y la respuesta inmune se ha observado, que tiene una relación directa con la capacidad de regulación de la respuesta inmune y por lo tanto con la participación del timo en la misma, como ya se sabe el timo es un órgano maestro de la respuesta inmune que tiene una involución progresiva de acuerdo a la edad del hospedero esto es, va perdiendo su eficiencia con el tiempo y esto favorece muchas veces la aparición espontánea de padecimientos de origen autoinmune. (e incluso la aparición de cáncer) Como ya se observo en la gráfica 5 esto apoya lo que ocurre en el estudio.

Se descarta que la respuesta anti retina sea como consecuencia de una activación policlonal como se puede observar en las gráficas 11 a 14. Electroforesis de inmunoglobulinas gama y albúmina, no se ven diferencias entre las cepas de ratones estudiados que nos indique trastornos que podamos denominar gamopatía policlonal, término que implica que intervienen múltiples líneas celulares en el incremento de inmunoglobulinas.

13.- CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en el análisis estadístico se concluye lo siguiente

1- Existe diferencia significativa entre las cepas CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et. en la respuesta contra proteínas de retina medida por ELISA, por parte de ésta última hay un mayor y más claro reconocimiento hacia los antígenos de retina que hacia los de cristalino.

2.-No hay diferencia significativa entre las cepas CD1, CD1et/+ y CD1 et/et con respecto a los anticuerpos anticristalino.

3.-Con respecto a los sexos no hay diferencia significativa dando niveles similares de respuesta tanto hembras como machos.

4.-Cuando se toma en cuenta el grado de lesión macroscópica del ojo tomando los siguientes criterios, 0 ojo sano, 1 ojo inflamado, 2 ojo con catarata y 3 ptisis bulbi (destrucción) se observa una mayor respuesta inmunológica humoral, en las lesiones 1 y 2 de la cepa CD1 et/et.

5.-La lesión aumenta con la edad.

6.-Con respecto a la electroforesis de proteínas se concluye que no hay activación policlonal. esto implica que no intervienen múltiples líneas celulares en el incremento de inmunoglobulinas.

7.-El modelo cuenta con un proceso de uveítis autoinmune, en el que se presenta todo el espectro de lesiones involucradas, por lo que sería un buen modelo para crear una plataforma de estudio sobre uveítis autoinmune.

14.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.-L. Medina *Frecuencia de Ceguera y Debilidad Visual. Rev. Mex. Oftalmol.* 1987;61:287-289.
2. -Hugh Feunderberg, D. P. Stites, Joseph L. Caudwell. *Inmunologia Clinica* 3ed.Ed. Manual Moderno México 1982 pág. 680-688
- 3.-Thyleforad B. *La ceguera evitable Salud Mundial* 1983 2:23-24.
- 4.Boehmer HV *The developmental biology of the lymphocytes Annu Rev Immunol* 1988; 6:309-321
- 5.Poole T *The WJAW Landbook on: the care and managment of laboratory animals.* Six edition. Great Britain: Longman Societifc Technical, 1989: 1-15.
- 6.-Rygaard J, Povisen O. *Heterotransplation of human malignant tumor to the mouse mutant nude. Acta Pathol Microbiol Scand* 1969; 77:758.
7. Hag BJ. *Animal immunological processes* London Academic Pres Inc. 1982: 138-141
- 8.- Flanagan SP. *Nude a New Hairless gene With pleist effects in the mouse. Genet Res.* 1966; 8: 295.
- 9.- Pantelouris EM. *Absence of tymus in a mous mutant Nature* 1968; 217:370- 371.
- 10.-Pantelouris EM. *Nude mice with normal thymus Nature* 1975; 254: 140-141.
- 11.- Williams R M. *Inmunologia De. Manual Moderno* 1974.
- 12.-Davis B D. *Tratado de microbiologia* 3de. De. Salvat Mexico 1990.
- 13.- Jawetz E, Melnick J. *Microbiologia médica.* 13 de. México De. El Manual Moderno 1990
- 14.-Brinkmann V, Heusser C. *T Cell- Dependent differentiation of human B cells into IgM, IgG, IgA or IgE plasma cells : high rate of antibody production by IgE plasma cells, but limited clonal expansion of IgE precursors. Cell Immunol* 1993; 152:323_331
- 15.- Rott MI, Brostoff J, Male D. *Inmunologia* 2ed.Ed.Salvat Barcelona 1991: 2.4-2.6.

- 16.- Koning F *Lymphocyte antigen receptors* Immunol today 1991 12: 100-101.
- 17.- Mac Donald HR, Less KR, Sordat B. Age Associated increase in expression of the T cell surface markers Thy-1, Lyt-1 and Lyt-2 in congenitally athymic (nu/nu) mice: analysis by flow microfluorometry. *J. Immunol* 1981;126:865-869.
- 18.- Voller A, Bidwell-D E, Bartlett A *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* Dynatech Laboratories INC 1979.
- 19.- Rose R N, Friedman H. *El Laboratorio en inmunología clínica 2a edición* Buenos Aires: Médica Panamericana, 1984:414-415, 419-425.
- 20.- Muir's J R Anderson. *Compendio de Anatomía patológica y patología general*. De. Expans S. A. Barcelona 1977;835-845.
- 21.- Villanueva D. *Introducción a la oftalmología* De. Litografía senefelder. Barcelona 1978.
- 22.- Jr Peptide protein Rees 1979, 13:409
- 23.- Robert B. Nussenblatt, Rachel R. Caspi, Rashid Mandi, Chi-Chao Chan, Francois Roberge, Ofer Lider, and Howard L. Weiner. "Inhibition of S-Antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by induction of tolerance with S-Antigen". *The Journal Immunology* 1990,144:1689-1695
- 24.- Vijay K Singh, Kunihiko Yamaki, Larry A. Donoso, and Toshimichi Shinohara. *Yeast Histone H-3 Induced Experimental Autoimmune Uveitis*. *The Journal Immunology* 1989, 142:1512-1517.
- 25.- Arturo Rodríguez Enríquez, Martha Céspedes. *Inmunología de las uveítis*. *Rev. Mex. Oftalmol*, 1988;62:167-170
- 26.- Anser M. Verrey, S. Huber "Aqueuse et ses Fonctions". *Raport a la société Française Ophtalmologique* Paris Masson 1995 p.15
- 27.- Dernouchamps J. L. *Immunité Cellulaire en immunité uveïtis*, *J. Fr. Ophtalmol* 1979,2: 29 7-309.
- 28.- Rojas Dosal José Adrián. "Procesos inflamatorios de la uvea en el niño." *Rev. Mex. Oftalmol*, 1987;61:11-16.
- 29.- Rosas P., Cruz R., Chavez R., Domínguez R., *Sex differences in the circadian rhythm of brain acetylcholinesterase activity between hairless hypothyroid and normal mice* *Med. Sci. Res* 1990.18:139-140

- 30.- Kimura S, "Uveitis in Children" Proceedings of the centennial symposium Manhattan Eye Ear Treat Hospitas St. Luis Mosby 1969:148-164.
- 31.- Mazow, L. M. *Diagnosis and management of uveitis complication in children.* J. Pediatric ophthalmol 1973 10:167-62
- 32.- Waldon B, Waker Larry A, Donoso, Carolyn M, Kalsow, John A, Yankeelov, J. R. and Daniel T. Organisciak. *Experimental allergic uveitis. Isolation of a soluble Uveitopathogenic Antigen From Bovine Retinal.* The Journal of Immunology 1977, 119:1949-1952.
- 33.- P. Rosas, M. Arguelles and R. Dominguez *Effects noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless female mice* Med. Sci. Res. 1988;17:285-286.
- 34.- Stephanie A. Skolik, Alan G. Palestine, R. Michael Blaese, Nussenblatt, and Richard A. Hese; *Treatment of Experimental Autoimmune Uveitis in the Rat. With systemic succinylacetone* Clinical Immunology and Immunopath 1988;49:63-69
- 35.- Vijai K. Singh, Robert B. Nussenblatt, Lary A. Donoso, Kunihiko Yamaki, Chi-Chao Chan, and Toshimichi Shinohara. *Identification of uveitopathogenic and lymphocyte proliferation in site In bovine S Antigen.* Celular Immunology, 1988;115:413-419.
- 36.- Saoudi, B. Bellon, Y De Kozak, J. Kuhn, C. Vial B. Thillaye, PH. Druet. *Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis and experimental autoimmune pinealitis in (flawis Por Brown - Norway) F1 rats by HgCL2 injections.* Immunology 1991, 74:348-354.
- 37.- M L. Calder, S. Lightman. *Experimental autoimmune uveoretinitis (E. A. U.) Versus Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) a comparoson of T cell-mediated mechanisms.* Clinical Experimental Immunol.;1992;165-169.
- 38.- Lowry O. H., Rosebrough, N. J. Farr a. L. Redall "Lowry Folin protein determination" Jr. Biol. Chem., 1951;:193-295.
- 39.- Rosas P. *Estudio de las aracterísticas reproductoras de ratones desnudos hipotímicos y la vinculación del timo con la regulación neuroendocrina de la reproducción* Tesis doctorado facultad de ciencia s de la UNAM 1990 México D. F.
- 40.- Von Bohemer. *H Developmental Biology of T cells in the receptor transgenic mice* Ann Rev. of Immunol 1990 Vol. 8
- 41.- Rieley M. Louise, *The reacción of the methyl glyoxal whit human and bovine lens protein* : Biochimica et biophysica Acta 1270 1995 36-43

15.- ANEXOS

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA TÉCNICA DE ELISA

AMORTIGUADOR DE RECUBRIMIENTO.

Carbonato-bicarbonato pH 9.63

1.59g de Na_2CO_3

2.93g de NaHCO_3

Disolver ambos reactivos en agua bidestilada y aforarlos a un litro.

Se puede almacenar a 4 C por no más de dos semanas.

PBS- TWEEN.

8g de NaCl

0.2g de KH_2PO_4

2.9g de Na_2HPO_4

0.2 KCl

0.5ml de Tween 20

Disolver los reactivos con agua bidestilada ajustando el pH a 7.4 y guardar a 4 C

Sustrato de peroxidasa.

Ácido cítrico 0.1M (24.3 ml.)

Na_2HPO_4 0.2M (25.7 ml)

El sustrato se prepara antes de usarse por que es sensible a la luz.

Ortefenilendiamina 40 mg disolverla en 100 ml de amortiguador del sustrato y adicionarle 40 microlitros de peróxido de hidrógeno al 30 %

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA