

78



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

RESPUESTA INMUNE CONTRA ANTIGENOS DE RETINA DETERMINADA POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA EN RATONES QUE DESARROLLAN OFTAMOLPATIA ESPONTANEA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: MARIA GUADALUPE ZAVALA MORALES

79003



DIRECTOR DE TESIS: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

MEXICO D.F.

DICIEMBRE 2001.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA FACULTAD  
DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, EN EL  
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA L-313

## **Jurado**

<b>Presidente</b>	<b>Dr. Rubén Marroquín Segura</b>
<b>Vocal</b>	<b>Q.F.B. Ma. De las Mercedes Zamudio Durán</b>
<b>Secretario</b>	<b>M.C Maurilio Flores Pimentel</b>
<b>Suplente</b>	<b>Q.F.B Francisco Javier Parada García</b>
<b>Suplente</b>	<b>Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera</b>

## AGRADECIMIENTOS

### A DIOS

*Por iluminar mi vida, llenarla de amor, porque siempre que te he llamado me has escuchado y has estado a mi lado.*

### A MI QUERIDA ABUELITA LUZ MORALES

*Porque lo prometido es deuda y por que siempre nos inyectaste esa alegría y ganas de vivir*

### A MI QUERIDA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

*Por haberme abierto las puertas de esta gran Institución permitiéndome ser universitaria y en especial a la FES ZARAGOZA, mi querida Facultad a quien debo mi formación.*

### A MIS SINODALES

*Por todas las aportaciones que hicieron para la mejora de este trabajo y su comprensión.*

A MI DIRECTOR DE TESIS

DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

*Por sus conocimientos, su tiempo, alegría, calidad humana. Por creer en mí, pero sobre todo por la paciencia y confianza que siempre me brindo.*

*Mil Gracias*

A LA Q.F.B YOLANDA FLORES CABRERA

*Por la valiosas aportaciones que hizo a este trabajo, así como el apoyo y porras que siempre me dio, pero sobre todo gracias por su amistad.*

A LA Q.B.P DORA ALICIA

*Gracias por todo su cariño y consejos que siempre tuvo hacia mí.*

AL M.C MAURILIO FLORES PIMENTEL

*Por los conocimientos, apoyo y amistad que siempre me brindo.*

AL Q.F.B. JORGE GARCIA

*Gracias por todos sus conocimientos, por disipar siempre mis dudas cuando quiero estrangular a la computadora, pero sobre todo gracias por el apoyo, disponibilidad y sincera amistad.*

AL M.C ARTURO EDUARDO CANO FLORES

*Por su amistad, por creer tanto en la ciencia y transmitir esa filosofía a sus alumnos*

AL Q.F.B. MAURO ARRIETA

*Por su linda y valiosa amistad y sobre todo gracias por escuchar, guiar y ayudar siempre a sus alumnos*

A LA M.C PATRICIA MORAN WHITE

*Por el tiempo que me otorgo B.Q para que pudiera llegar a término este trabajo.*

A JUAN CARLOS JARILLO MARTINEZ

*Gracias por toda tu ayuda*

## DEDICATORIAS:

### A MIS PADRES:

*Por haberme guiado involucrandome en el arte del saber, darme valores necesarios para la vida, por amarme y chiquearme tanto*

*Roberto Zavaleta y Castro: Gracias por enseñarme a tener carácter frente a la vida.*

*Ofelia Morales: Gracias mamita por darme la fuerza y los consejos que he necesitado para salir adelante, Gracias por ser mi madre, amiga y confidente.*

*A los dos Gracias por mi vida*

### A MIS HERMANOS:

#### IMELDA

*Gracias por confiar y creer en mí, por ser mi guía, y preocuparte tanto por mí, por ser una gran hermana escuchandome siempre.*

#### A MI CUÑADO JORGE

*Gracias por la alegría que tienes y la ayuda que me das en las traducciones.*



ARMANDO Y MI CUÑADA ADRIANA

*Gracias por todo su cariño y apoyo incondicional*

A MIS SOBRINAS

A THALÍA Y VIVIANA

*Mis lindas princesas de quien espero ser un buen ejemplo universitario en sus vidas, el cual me esforzare por mejorar cada día.*

A LA SRA. ROSARIO TORRES

*Por que usted es parte de nuestra familia comparto este triunfo con usted Gracias.*

## 2. -ABREVIATURAS:

<b>Ag</b>	Antígeno
<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>Antígeno S</b>	Proteína Soluble de Retina
<b>BCDF</b>	Factor de Diferenciación de Células B
<b>CD</b>	Grupos de Diferenciación
<b>CD1</b>	Ratón Albino Eutímico
<b>DBA</b>	3,3'-Diaminobencidina
<b>ELISA</b>	Análisis para enzimas fijadas a inmuoadsorbentes, del inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>Fab</b>	Fragmento de unión al antígeno
<b>Fc</b>	Fracción Cristalizable
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IMC</b>	Inmunidad Mediada por Células
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IRBP</b>	Proteína Unida al Interfotoreceptor Retinoide
<b>KDa</b>	Kilodaltons
<b>L</b>	Litros
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>PAGE</b>	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida
<b>PBS</b>	Amortiguador de Salina Fosfato
<b>rpm</b>	Revoluciones por Minuto
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>μL</b>	Microlitro
<b>Th</b>	Células T Cooperadoras
<b>WB</b>	Western blot

### 3. -INDICE DE TABLAS:

<b>Tabla No. 1</b>	Desarrollo de la Inmunidad
<b>Tabla No. 2</b>	Características de la Inmunidad
<b>Tabla No. 3</b>	Clasificación clínica de la Uveítis
<b>Tabla No. 4</b>	Clasificación de la Uveítis Granulomatosa y no Granulomatosa
<b>Tabla No. 5</b>	Resultados
<b>Tabla No. 6</b>	Resultados de ELISAS

## **CONTENIDO:**

1.	INDICE GENERAL	
2.	ABREVIATURAS	
3.	INDICE DE TABLAS	
4.	INDICE DE FIGURAS	
5.	RESUMEN	1
6.	INTRODUCCIÓN	2
7.	MARCO TEÓRICO:	6
	7.1 ANATOMIA DEL OJO:	6
	7.1.1 QUE ES EL OJO	6
	7.1.2 ESCLERA	7
	7.1.3 CÓRNEA	7
	7.1.4 COROIDES	7
	7.1.5 CUERPO CILIAR	8
	7.1.6 IRIS	8
	7.1.7 RETINA	9
	7.2 MECANISMOS DE DEFENSA DEL OJO	12
	7.3 DESARROLLO DE LA RESPUESTA INMUNE	13
	7.4 AUTOINMUNIDAD:	26
	7.4.1 FACTORES QUE FAVORECEN LA AUTOINMUNIDAD	
	7.4.1.1. -EDAD	29
	7.4.1.2. -SEXO	29
	7.4.1.3. -GENÉTICOS	29
	7.4.1.4. -NUTRICIONALES	29
	7.5 UVEÍTIS	
	7.5.1 QUE ES	31
	7.5.2 CLASIFICACIÓN DE LA UVEÍTIS:	31

7.5.3 ANÁTOMICA	32
7.5.4 CLÍNICA	34
7.5.5 PATOLÓGICA	33,34
7.5.6 ETIOLÓGICA	32
7.6 PROTEÍNAS	35
7.7 RATÓN DESNUDO	35
8.0.FUNDAMENTO DE TÉCNICA DE ELECTROFORÉISIS	38
8.1 FUNDAMENTO DE TÉCNICA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	38
9.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
10.0 OBJETIVOS	43
11.0 HIPÓTESIS	44
12.0 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:	45
12.1 OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO DE RETINA	45
12.2 INMUNIZACIÓN DE ANIMALES CON ANTÍGENO DE RETINA	45
12.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	45,46
12.4 OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO	46
12.5 OBTENCIÓN DE SUEROS	47
12.6 TÉCNICA DE ELISA	47
12.7 TÉCNICA DE ELECTROFORÉISIS	49
12.8 TÉCNICA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	50
12.9 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	52
13 MATERIAL Y EQUIPO:	
13.1 MATERIAL DE VIDRIO	53
13.2 EQUIPO	53
13.3 MATERIAL DE USO COMÚN	54
13.4 OTROS MATERIALES	55
13.5 MATERIAL BIOLÓGICO	55
13.6. REACTIVOS	55
14. -DIAGRAMAS DE FLUJO	58

## **5. RESUMEN:**

En el presente trabajo se observó la respuesta inmune contra antígenos de retina utilizando como modelo experimental ratones hipotímicos cepa CD1 et/et mantenidas en el biotério de campus II de la FES Zaragoza, esta cepa desarrolla espontáneamente la enfermedad oftálmica presentando un cuadro clínico de uveítis. La uveítis consiste en la inflamación de parte o totalidad de la uvea y es considerada como una enfermedad autoinmune. Para observar la respuesta de los antígenos descritos como uveitogénicos se realizó la técnica de ELISA corroborando por inmunoelectrotransferencia la presencia de estas proteínas. También se utilizaron ratones albinos cepa CD1, CD1 et/+ (portador del gen de hipotimia).

A nivel macroscópico se observó el progreso de la enfermedad que va desde la inflamación, catarata hasta pérdida del ojo, esta oftalmopatía se presenta en el ratón sin necesidad de inducir la enfermedad.

Así mismo se realizaron cortes histológicos en parafina de una córnea normal y otra dañada, de una retina normal y otra dañada, observándose como resultado tanto en retina como en córnea un infiltrado inflamatorio severo de células mononucleares y polimorfonucleares.

Se realizó un corrimiento electroforético de la proteína S de retina (antígeno) en un gel de poliacrilamida observándose dos bandas muy definidas una de 45 KDa que corresponde a la proteína S de retina y la IRBP (interfotoreceptor retinoide) de 130 Kda descritas como uveitogénicas.

De acuerdo a los títulos positivos obtenidos se realizó la inmunoelectrotransferencia, obteniéndose tres bandas con los siguientes pesos moleculares, una de 55 KDa, otra de 45 KDa y la última de 36 KDa ,

La de 45 KDa corresponde a la proteína S de retina por lo que confirmamos la presencia de esta proteína involucrada en el desarrollo de la enfermedad de uveítis autoinmune experimental.

## 6.-INTRODUCCIÓN

Las causas de ceguera son muy diversas y su importancia varia según el medio que se considere. A nivel mundial las causas de ceguera más frecuentes son las infecciones, traumatismos y de tipo autoinmune, sin embargo; La uveítis ha sido considerada por largo tiempo como un prototipo de enfermedad autoinmune ocular, esto es, que se originan antígenos dirigidos contra el propio organismo, lo cual despierta actualmente gran interés en el campo de la inmunología. Distintos investigadores como: Alan Woods en 1953 consideraba que el 75% de las uveítis eran de etiología tuberculosa y que la inflamación se debía a la presencia de este microorganismo en la úvea<sup>1</sup>. Golmar y Witmer en 1954 realizaron la determinación cuantitativa de anticuerpos en el Ha (humor acuoso) determinando así el cociente de anticuerpos, en donde:

$$Q = \frac{\text{Gamma globulina de anticuerpos del suero}}{\text{Gamma globulina de anticuerpos del Ha}}$$

Los anticuerpos del humor acuoso provienen del suero, con una relación 1:1 anticuerpos del suero/anticuerpos Ha. Por lo tanto un valor superior a la unidad, favorece la producción de anticuerpos intraoculares<sup>2</sup> Amsler y Verrey (1955) introdujeron el método de análisis del Ha, al puncionar la cámara anterior de pacientes con uveítis, demostrando en sus estudios una relación entre el tipo celular, y la etiología de la inflamación<sup>3</sup> Ellos realizaron más de 3000 estudios de Ha concluyendo que los microorganismos vivos son raros en el ojo inflamado.

Witmer en 1955 confirmó la síntesis intraocular de anticuerpos, en un conejo sensibilizado con bacilo de Koch humano, además demostró la síntesis de anticuerpos por las células plasmáticas que infiltran la úvea, por medio de la técnica de albúmina cristalizada e inmunofluorescencia<sup>4</sup>

Witmer Oerkins y Wood en 1960, realizaron el diagnóstico de uveítis facoantigénica, mencionando que las proteínas cristalinas no son reconocidas por el sistema inmunocompetente durante el periodo embrionario, debido a su

aislamiento anatómico, por lo tanto al escapar estas proteínas de su cápsula inducen la formación de autoanticuerpos <sup>5</sup>

Iwamoto y Witmer en 1969 confirmaron que la úvea actúa como un nódulo linfático y produce anticuerpos<sup>6</sup> Al siguiente año Campinchi y col. demostraron que un antígeno soluble inoculado en el Ha pasa más rápidamente a la circulación general que el inyectado en el vítreo y que las células inmunocompetentes extraoculares son sensibilizadas y atraídas a la uvea por el antígeno residual ocular<sup>7</sup> Por lo que deducen que las células inmunocompetentes que se infiltran en la úvea tienen origen extraocular, sin embargo, la multiplicación y la diferenciación se realiza dentro del ojo.

Martenet en 1979, en el congreso internacional de Kyoto, Japón menciona que los virus pueden ser encontrados en el 15% de las uveítis (anteriores), siendo esto posible por detección de anticuerpos específicos o por identificación al microscopio electrónico de partículas vírales en biopsias de iris<sup>8</sup>.

Dernouchamps en 1978 menciona que la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra las diferentes estructuras oculares detectados en el Ha y en el suero, traduce una ruptura en la tolerancia inmunológica. Esto es como consecuencia de la modificación de los determinantes antigénicos de las membranas celulares de los tejidos oculares, debido a un proceso inflamatorio, con la consecuente fabricación de anticuerpos hacia las estructuras oculares modificadas. Esta situación se produciría si los virus ó medicamentos se incorporaran a las estructuras oculares, lo cual modificaría sus determinantes antigénicos produciendo autoinmunidad<sup>9</sup>

Devron en 1979, realizó un estudio de complejos inmunes circulantes, llegando a la conclusión de que la naturaleza de dichos complejos detectados puede ser debidos a una inmunoglobulina alterada, un antígeno extraocular extraño ó un antígeno de superficie de tejido ocular. Con respecto a esto la inmunoglobulina más frecuente unida al antígeno fue la IgG.<sup>10</sup>

Nussenblat, Cervario y Cery en 1981, realizaron un estudio de la actividad de las células T supresoras en 40 pacientes con uveítis, concluyendo que no todas las enfermedades de origen autoinmune son el resultado de disminución en la



actividad de los linfocitos T supresores, lo cual ha sido demostrado en algunos casos de autoinmunidad como el Lupus Eritematoso Sistemico<sup>11</sup>

Gramon en 1982 realizó el primer estudio en el humor acuoso (Ha), en un paciente con endoftalmitis. Vav Durgen, en 1902 noto la presencia de anticuerpos en (Ha), de conejo una semana después de haber inyectado suero heterólogo en la cámara anterior (C.A) esto fue corroborado posteriormente por Leber en 1906, Metermich y Solomon en 1977.<sup>12</sup>

Woods introduce el término uveítis “granulomatosa” y “no granulomatosa”, donde menciona las características clínicas específicas de cada una de ellas y su estudio histopatológico, correlacionándolas con las diversas etiologías infecciosas también demostró que los pacientes con uveítis inducida por las proteínas del cristalino, eran hipersensibles a la prueba cutánea de inoculación de dicha proteína.. Ohnos col. por medio de la técnica de placas hemolíticas e inoculando en el vítreo del conejo glóbulos rojos de carnero, determinó que a las dos horas después de la inoculación había anticuerpos en el bazo y que sólo hasta las 10 horas, había anticuerpos en la úvea.<sup>13</sup> Hogan, Woods y Godfrey en 1992, estudiaron con microscopia electrónica células de Ha en pacientes con uveítis, pero fueron incapaces de encontrar inclusiones bacterianas vírales en las células examinadas.<sup>14</sup> Amsler y Verrey, introdujeron el método de análisis de Ha, concluyendo que las células vivas son raras en el ojo inflamado.<sup>15</sup> Von Sallman y Locke confirmaron estos hallazgos en un estudio de 88 muestras que fueron cultivadas en las que se propuso la hipótesis que estos microorganismos son bloqueados por anticuerpos específicos por lo que impide su desarrollo <sup>16</sup>

En este trabajo se evaluó la respuesta inmune contra antígenos de retina utilizando como modelo experimental ratones hipotímicos cepa CD1 et/et mantenida en el bioterio de campus II, FES ZARAGOZA. Debido a que en esta cepa se genera espontáneamente una oftalmopatía sin necesidad de inducir la enfermedad lo cual es una ventaja con respecto a otras cepas. Para ello se llevarán a cabo la técnica de ELISA, electroforesis e inmunoelectrotransferencia

para evaluar la respuesta inmune. Con esto se pretende plantear alternativas de diagnóstico en el estudio de esta enfermedad autoinmune.

## 7. -MARCO TEÓRICO

### 7.1-ANATOMIA DEL OJO

**7.1.1 EL OJO (NA, oculus; gr Ophthalmos).** Es el órgano de la visión de unos 20 mm de diámetro formada por un conjunto de membranas denominadas córnea, esclera, coroides y retina. La córnea y la esclera constituyen las envolturas externas anterior y posterior del ojo respectivamente. La capa coroidal además de alimentar el ojo a través de sus vasos sanguíneos, tiene la misión de absorber las luces extrañas que entran al ojo así como de amortiguar el efecto de dispersión de la luz dentro del globo ocular. El iris o diafragma está situado en la parte anterior del coroides, y tiene como misión controlar la cantidad de luz que entra en el ojo. Para ello, la pupila o parte central del iris puede cambiar de tamaño en función de la luminosidad incidente desde 2 mm a 8 mm de diámetro.<sup>18</sup>

La lente del ojo está formada por capas concéntricas de células fibrosas y está sujeta al coroides a través de fibras. La lente está compuesta principalmente por agua (60%- 70 %), grasa 6% y proteínas. En la lente se absorbe cerca de un 8% del espectro de luz visible así como una gran proporción de luz infrarroja y ultravioleta.

La membrana más interna del ojo es la retina que cubre toda la pared interna del ojo. Cuando la luz llega al ojo la imagen que transporta se forma en la retina por la sensibilización de dos clases de receptores: los bastones y los conos.

El número de conos existentes en un ojo está entre 6-7 millones y su situación dentro del ojo se concentra alrededor de un punto llamado fovea. La misión de los conos dentro del ojo es doble por un lado son responsables de la detección del color y por otro ayudan a resolver los detalles finos de la imagen. Cuando una persona quiere resolver detalles finos en una imagen intenta que esta se forme en su retina alrededor de la fovea, consiguiendo por tanto, que los conos sean mayoritariamente los receptores de la luz. La visión a través de los conos se denomina Visión fotocopia o de luz brillante.

Para poder explicar en que consisten los problemas visuales más habituales, se hace imprescindible un conocimiento ligero de la anatomía y funcionamiento del ojo humano y del sistema visual general.

El aparato visual se compone de: Globo ocular, Vías ópticas y anexos.

El globo ocular se compone de tres capas y tres cámaras.

Las capas son: La Esclerocórnea, la Úvea y la Retina

Las cámaras: La anterior, la posterior y la vítrea.

La esclerocórnea es la capa más exterior, y se compone de Esclera y Córnea.

**7.1.2 Esclera.** Es una cubierta blanca, opaca y densa que cubre las regiones posterior y lateral del globo ocular se continúa hacia delante con la córnea transparente está laxamente unida a la coroides y la atraviesan el nervio óptico nervios ciliares y numerosos vasos sanguíneos. Como hemos dicho la esclera es la parte fibrosa que forma la “parte blanca del ojo”, y tiene una función de protección. En su zona exterior está recubierta por una mucosa transparente llamada conjuntiva, cuya irritación da lugar a las conocidas y frecuentes conjuntivitis.

**7.1.3 La Córnea** es la cubierta transparente del polo anterior del ojo, su capa epitelial superficial se continúa directamente con la conjuntiva y el punto en que se unen esclera y córnea constituye la unión corneoescleral que posee un pequeño conducto, el seno venoso escleral (*sinus venosus sclerae*) que circunda esa porción del ojo, en otras palabras la Córnea es la parte transparente de la capa externa, es la “ventana óptica” del ojo, y su función es, lógicamente óptica. La Úvea es la capa media, y tiene tres partes:

**7.1.4 La Coroides**, que está en la parte posterior, y tiene una función tanto nutritiva como de pantalla pigmentaria (para evitar que entre luz en el ojo por donde “no debe”. En si la coroides es la capa vascular del globo ocular y está formada principalmente por vasos sanguíneos que se organizan en dos capas, una superficial que contiene especialmente venas que se vacían a las venas vorticosas mencionadas y una profunda formada por arterias. La coroides está flojamente unida a la esclera pero muy firmemente adherida a la retina, de

hecho, la capa pigmentaria de la retina a menudo permanece unida a la coroides cuando se remueve la retina.

**7.1.5 El Cuerpo Ciliar** es una estructura compleja que continúa directamente hacia adelante con la coroides y el iris, es la extensión anteromedial del cuerpo ciliar está formado por:

- 1) Una porción posterior, el anillo ciliar formado principalmente de vasos y nervios.
- 2) Una porción anterior, el músculo ciliar, formado por fibras lisas circulares y radiales, las ultimas se originan de la unión corneoescleral y se dirigen hacia atrás para insertarse sobre el anillo ciliar.
- 3) La tercera parte del cuerpo ciliar, los procesos ciliares, acumulaciones de tejido que se extiende desde la coroides por detrás al iris por delante.

Los procesos tienen apariencia nodular y forman el límite lateral de la cámara posterior del ojo entre el iris por delante y la cámara anterior del cristalino hacia atrás. También sirven como puntos de inserción importantes para el ligamento suspensorio del cristalino. El epitelio de los procesos ciliares secreta el humor acuoso hacia la cámara posterior y éste fluye después a través del seno venoso escleral hacia las venas ciliares anteriores, el Cuerpo Ciliar, en la zona media, formado por los procesos ciliares encargados de la secreción del líquido que rellena la cámara anterior y que se llama Humor Acuoso y el Músculo ciliar, encargado de variar la curvatura del cristalino para poder enfocar a distintas distancias. Y la tercera parte es el Iris que está en la zona anterior, es la parte coloreada del ojo y cuya función es regular la cantidad de luz que entra en el interior del ojo, para lo cual varía su tamaño según la intensidad de la luz.

**7.1.6 El Iris** es la porción coloreada del ojo que se aprecia a través de la córnea se proyecta en sentido central hacia adelante en el humor acuoso, se inserta en forma radial al cuerpo ciliar y a la córnea mediante ligamentos pectíneos cortos: el iris tiene forma de disco con una abertura central, la pupila. Está fuertemente pigmentado y posee dos grupos de fibras musculares: uno formado por fibras radiales que tiene a su cargo el agrandamiento de la pupila (*músculo*

*dilatador de la pupila, musculus dilator pupillae*), y otro compuesto de fibras circulares que se encargan de disminuir la abertura pupilar cuando se contrae (músculo esfínter pupilar, *musculus sphincter pupillae*).

Inmediatamente tras el iris, y unido a los músculos ciliares está el Cristalino, la lente del ojo por excelencia tiene forma de lente biconvexa y es capaz de variar su curvatura, y por tanto su potencia dióptrica por la acción de los músculos ciliares. Esto será lo que permita enfocar distintas distancias.

**7.1.7 La Retina** es la zona “sensible” del aparato visual. Es donde se deberían formar las imágenes que vemos para poder “verlas” con nitidez. Su parte anterior es ciega, y su sensibilidad es una pequeña hendidura llamada Fóvea, que es donde se encuentra una mayor concentración de las células responsables de la sensibilidad de la retina: conos y bastones. En la zona posterior hay una parte ciega, que es donde conecta el nervio óptico y se llama papila.

Como mencionamos al inicio, las cámaras que forman parte del globo ocular son tres: la anterior, la posterior y la vítrea.

La cámara anterior es la zona comprendida entre la córnea y el iris. Está rellena de Humor Acuoso, líquido transparente producido por los procesos ciliares y que esta desaguado por el ángulo que forman iris y córnea. Problemas en este desagüe producen lógicamente, aumento de la presión intraocular y dan lugar al temible glaucoma.

La cámara posterior, también rellena de humor acuoso, es la zona comprendida entre el iris y el cristalino, y es donde están los procesos ciliares.

La cámara Vítrea es la zona entre el cristalino y la retina, y está rellena de un gel transparente y vascular llamado Humor Vítreo.<sup>19,20</sup>

# ANATOMIA DEL OJO

## Anatomía

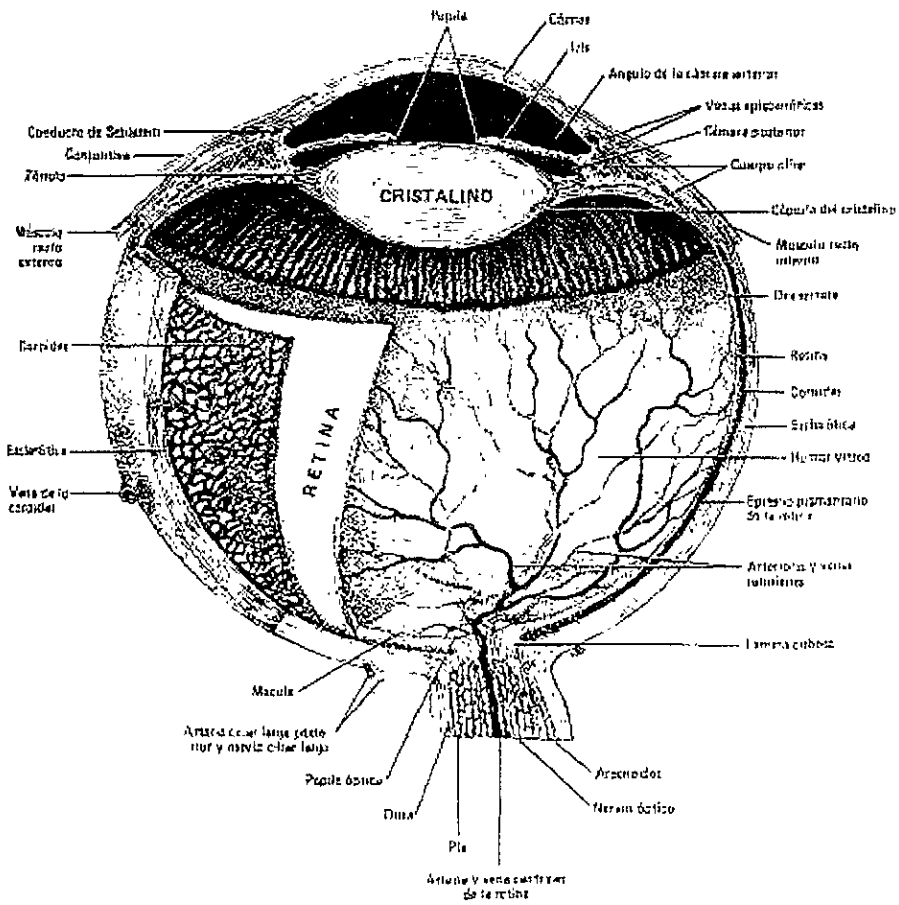


Fig. 1-3. Estructuras internas del ojo humano

Las vías ópticas constituyen la transmisión de los impulsos nerviosos desde la retina hasta la corteza cerebral a través del nervio óptico. Las células receptoras son los ya nombrados conos y bastones que transforman las imágenes recibidas en impulsos nerviosos que son trasladadas al cerebro a través del citado nervio.

Los anexos del aparato visual, son el sistema óculo motor, compuesto por seis músculos externos que provocan la movilidad del globo ocular. El sistema de protección, compuesto por órbita, párpados, conjuntiva, lagrimales y glándulas lagrimales.

El acto visual consta de 4 etapas:

1. Formación de la imagen en la retina a través del sistema óptico (córnea, humor acuoso, cristalino y humor vítreo)
2. Nacimiento del influjo nervioso a través del nervio óptico.
3. Transmisión del impulso nervioso a través del nervio óptico
4. Interpretación del impulso nervioso, en la corteza cerebral.

Pero la formación de la imagen en la retina no es un proceso simple ni mucho menos estático.

Un ojo normal, enfocado al infinito (a partir de unos 5 metros) esta en reposo. Aparte de la posible contracción del iris para regular la cantidad de luz (como en una cámara fotográfica con el diafragma), la otra parte dinámica del sistema óptico, es decir el cristalino, está en reposo. O sea, que el ojo humano para ver de lejos no necesita esfuerzo adicional.

Lógicamente, un ojo enfocado al infinito, si no varia algo de su sistema óptico, verá borroso a una distancia próxima, al igual que si enfocamos una cámara de fotos a una distancia y fotografiamos a otra más cercana, la foto saldrá borrosa. Y lo que varía es el grosor del cristalino. Cuando precisamos enfocar a una distancia próxima, los músculos ciliares entran en acción y provocan un aumento de grosor del citado cristalino, aumentando en consecuencia su potencia (al fin y al cabo es una lente biconvexa) y consiguiendo el enfoque correcto. Este mecanismo se llama acomodación, y su fallo es lo que produce la presbicia, a la que llamamos comúnmente "Vista Cansada".



El nervio óptico atraviesa la esclera ligeramente e inferiormente al polo posterior del globo ocular, lo que se debe a la oblicuidad de la órbita y a la dirección anteposterior del globo ocular. Las arterias ciliares cortas y los nervios atraviesan la esclera alrededor del nervio óptico exactamente por detrás del ecuador del globo ocular, cuatro o cinco grandes venas (venas vorticosas) sale del globo ocular después de atravesar la esclera las arterias ciliares anteriores atraviesan esta capa más adelante, cerca de la córnea.

## **7.2-MECANISMOS DE DEFENSA DEL OJO**

Las lágrimas y la conjuntiva juegan un papel importante en el mecanismo de defensa del ojo, así como la limpieza mecánica que se produce en la acción de parpadeo. Las lágrimas contienen anticuerpos, principalmente la inmunoglobulina A secretora y lisozimas. La conjuntiva posee numerosos linfocitos, células plasmáticas, neutrofilos y mastocitos, que pueden responder con rapidez a la infección mediante la inflamación y la producción de anticuerpos e interferón. El interior del ojo se haya protegido frente a la invasión externa sobre todo por la barrera física establecida por la esclerótica y la córnea <sup>22</sup>

### **7.3. -DESARROLLO DE LA RESPUESTA INMUNE**

El término de inmunidad comprende todos los mecanismos fisiológicos de los que está dotado el organismo para reconocer materiales como propios o extraños y neutralizarlos, eliminarlos o metabolizarlos eventualmente. La respuesta inmunitaria es una secuencia compleja de eventos que se inicia con la presencia de un estímulo (inmunógeno o antígeno) y por lo general termina con la eliminación del agente que lo provoca. La inmunidad reacciona frente a sustancias extrañas, incluidos los microorganismos y macromoléculas, como las proteínas y los polisacáridos; sin implicar la consecuencia fisiológica o patológica a tal reacción. El sistema inmune está compuesto por los órganos linfoides, la respuesta inmune primaria y secundaria, por linfocitos y células del sistema mononuclear fagocítico que se encuentra circulando por el organismo. En los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) se diferencian y maduran las diferentes poblaciones de linfocitos. Mientras que en los órganos secundarios constituidos por cúmulos de linfocitos maduros entre mezclados con células del sistema mononuclear fagocíticos (bazo, ganglio linfático y tejido linfoide distribuido a lo largo del tubo digestivo y aparato respiratorio) es donde entran en contacto los linfocitos con los antígenos extraños presentados por células accesorias y donde se inicia por lo tanto la respuesta inmune.

Hay dos niveles de defensa contra una invasión de agentes externos: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida (Tabla 1) La primera que es llamada en ocasiones inmunidad natural, esta presente desde el nacimiento y comprende diversos elementos no específicos como son la piel, enzimas, polimorfonucleares, proteínas de fase aguda, células NK (NK, del inglés natural Killer) etc. Estos mecanismos no se incrementan por la exposición previa y tampoco discriminan entre la mayoría de las sustancias ajenas. La segunda inmunidad se distingue por su memoria y por una alta especificidad para el inmunógeno ofensor, es decir; es capaz de eliminar específicamente el material ofensor y además la exposición subsecuente es más eficiente y efectiva. Las

características generales de la inmunidad innata y adquirida se muestran en la tabla 2.

Como se ha mencionado la inmunidad adquirida o específica se estimula normalmente cuando un individuo se expone a un antígeno extraño. La forma de inmunidad inducida por este proceso de inmunización se llama inmunidad activa, ya que el individuo inmunizado desempeña un papel activo en la respuesta del antígeno. La inmunidad activa puede ser dada a un individuo transfiriéndole células o suero a partir de otro individuo inmunizado de forma específica. El receptor de tal transferencia adoptiva se hace resistente o inmune, al antígeno particular sin exponerse o responder a ese antígeno. Por lo tanto, esta forma de inmunidad se llama inmunidad pasiva. La inmunización pasiva es un método útil de conferir resistencia con rapidez, sin tener que esperar a que se desarrolle una respuesta inmunitaria activa.<sup>23,24</sup>

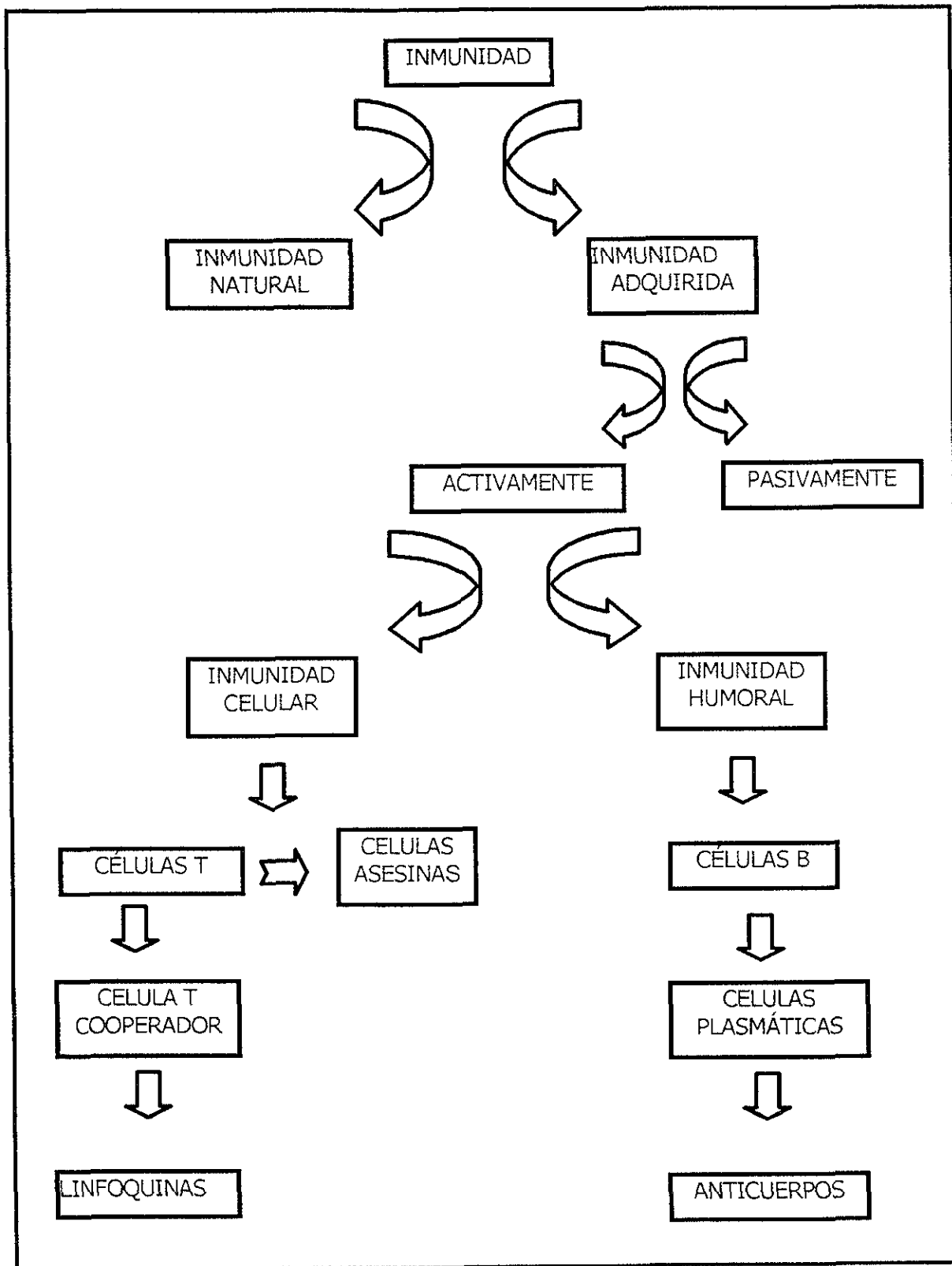


TABLA 1 DESARROLLO DE LA INMUNIDAD

TABLA.2

<b>CARACTERÍSTICAS DE LA INMUNIDAD</b>		
	<b>NATURAL</b>	<b>ADQUIRIDA</b>
Barreras fisico-químicas	Piel y mucosas	Sistemas inmunitarios cutáneos, anticuerpos en las secreciones mucosas
Moléculas circulantes	Complemento	Anticuerpo
Células	Fagocitos (macrófagos, neutrófilos) células agresoras naturales	Linfocitos
Órganos y tejidos de interacción	Zonas infectadas	Bazo, ganglios
Sistemas de circulación	Sangre	Linfa y sangre
Órganos y tejidos de producción	Hígado (complemento, fase aguda), Médula ósea, leucocitos.	Timo (T), Médula ósea (B)
Mediadores solubles activos en otras células	Citocinas derivadas de macrófagos, es decir, interferones $\alpha$ y $\beta$ , factor de necrosis tumoral.	Citocinas derivadas de linfocitos, esto es, interferón $\gamma$

Referencias: Abaas K Abul, Lichtman H. Andrew. Immunology Celular and Molecular Roitt <sup>24</sup>

La respuesta inmunitaria funciona principalmente por tres caminos distintos, la inmunidad humoral, inmunidad celular y mediante la secreción de unas proteínas llamadas linfoquinas. La inmunidad humoral, se basa en moléculas que se encuentran en solución en el cuerpo, estas moléculas son proteínas llamadas colectivamente inmunoglobulinas y abreviadas como Ig.

Constituyendo el 20% de las proteínas de la sangre. Una molécula individual de este tipo se llama anticuerpo, pero el término "anticuerpo" también se usa en el caso de muchas moléculas individuales diferentes dirigidas todas contra la misma molécula diana, los anticuerpos pueden transferirse a individuos no inmunizados (también llamado "nativo") por medio de componentes no celulares de la sangre, esto es, el plasma o el suero.

Los linfocitos B que se generan en médula ósea e hígado fetal y que son las células precursoras de las células productoras de anticuerpo y que en las aves se adiestran en la bursa de Fabricio, mientras que en los mamíferos en donde no existe tal estructura, salen de médula ósea con marcadores de linfocitos B. Cuando se sintetizan las cadenas funcionales H y L, se expresa la inmunoglobulina en la superficie celular estas células expresan inmunoglobulinas y se denominan células B vírgenes porque poseen inmunoglobulinas funcionales sobre la membrana pero aún no interactúan con el antígeno.

La clase principal de inmunoglobulina de los linfocitos B es la IgM presente en forma monomérica: también puede estar sobre la superficie las IgD, IgG, IgE e IgA.

La mayoría de los linfocitos B tienen un receptor para complejos antígeno-anticuerpo o inmunoglobulina agregada. Este receptor es específico para una porción Fc. Se ha demostrado en los linfocitos B un receptor para el componente CD3 para el complemento y el virus Epstein Barr, La célula B también manifiesta los antígenos clase II del MHC y el receptor para transferrina. En este estadio las células B migran desde la médula ósea hacia la sangre y tejido periférico.

La producción de anticuerpos requiere la activación de linfocitos B y su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos mientras que las células Th se activan, las células B específicas se unen al inmunógeno a través de sus receptores dándose enseguida la endocitosis del complejo antígeno-receptor, que parece proporcionar la señal de activación, sin embargo ésta es suficiente para la activación total de las células B requieren señales

adicionales de las célula Th. Estas señales son citocinas: la primera se denomina factor de crecimiento para la célula B, y la segunda denominada factor diferenciación de células de B (BCDF), induce a estas células B activadas a diferenciarse hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpo. Una fracción de las células B proliferan pero no diferencia hacia célula plasmática, quizá debido a que no reciben suficiente BCDF, tales células B forman un grupo de fondo común de células de memoria, que pueden responder a encuentros subsecuentes con el inmunógeno relevante.

Durante la proliferación de las células B actúan también otras interleucinas como son:

Interleucina 2 que pueden inducir el incremento en la producción de anticuerpos y proliferación en los linfocitos B normales.

Interleucina 4 sé sinergiza con IL-2 para estimular el crecimiento de células B en descanso, la IL-4 induce incrementos rápidos en la expresión membranal de antígeno MCH clase II y receptores para Fc de IgE.

La IL-4 induce producción de IgG2b e IgG3 por las células B estimuladas por LPS.

Interleucina 5 tienen una actividad promotora en el incremento de las células B (BCDF II).

Se ha visto que las IL-5 murina recombinante promueve el crecimiento de las células B activadas y se combinan con IL-2 para estimular la proliferación celular, promueve también la producción de anticuerpo por células B en particular IgA.

Interleucina 6 como factor estimulador de B es un agente de diferenciación o maduración que promueve la capacidad de células activadas de la línea B para secretar inmunoglobulinas<sup>23, 24</sup>.

En la inmunidad celular son células intactas las responsables de la reacción de reconocimiento, generalmente no participan moléculas solubles libres. En cambio moléculas fuertemente unidas a las superficies de las células inmunes reaccionantes actúan como inmunoglobulinas pero nunca rompen su asociación con la membrana plasmática

La inmunidad mediada por células, también llamada inmunidad celular, está mediada por células llamadas linfocitos T. Puede transferirse a individuos nativos con células procedentes de individuos inmunizados, pero no con plasma y suero

Los linfocitos T son responsables de la inmunidad celular presentan el 80% de los linfocitos de la sangre pero también se les encuentra en territorios particulares que han recibido el nombre de territorios particulares que han recibido el nombre de territorios inmuodependientes como la cortical profunda de los ganglios linfáticos.

El Timo. Es el más importante de los órganos linfoides centrales se encuentran en las especies animales más primitivas y es el primero en aparecer durante la vida embrionaria de los mamíferos esta aparición precoz testimonia la primacía en el desarrollo del sistema inmunitario. El timo es un órgano con dos lóbulos situados en la región anterior del mediastino, cada lóbulo se divide mediante septos fibrosos y cada uno de ellos consta de una corteza externa y una médula interna. La corteza contiene una colección densa de linfocitos T, y la médula, de una tinción más suave, esta poblada por linfocitos dispuestos de forma más dispersa a lo largo del timo se encuentran dispersas células epiteliales no linfoides que tienen abundante citoplasma, a sí como células dendríticas y macrófagos derivados de la médula ósea.

En la médula hay estructuras llamadas Corpúsculos de Hassall, que se componen de espirales de células degeneradas. El timo tiene un rico aporte vascular y vasos linfáticos eferentes que drenan a los ganglios linfáticos mediastínicos.

Los linfocitos del timo también llamados timocitos, son linfocitos T en diferentes estados de maduración, los precursores que están comprometidos en la estirpe de las células T entran en la corteza tímica a través de los vasos sanguíneos, no se sabe si entran en el timo precursores de células B y no sobreviven o si existen mecanismos que aseguran la entrada al timo sólo de células comprometidas en el desarrollo de linfocitos T, los timocitos más inmaduros no expresan receptores para los antígenos, o los marcadores de superficie



incluidos CD4 y CD8, que son características del fenotipo maduro: Estas células inmaduras migran desde la corteza hacia la médula y entran en contacto con las células epiteliales, los macrófagos y las células dendríticas.

Un contacto eficaz puede producirse en los complejos linfopiteliales en los que los linfocitos se encuentran en contacto estrecho con las membranas plasmáticas llamadas "células nodriza". En la ruta hacia la médula, los timocitos, comienzan a expresar receptores para los antígenos y marcadores de superficie presentes en los linfocitos T maduros periféricos de esta forma la médula contiene en su mayor parte células T maduras y sólo células T CD4 o CD8 maduras salen del timo y entran en la sangre, la linfa y los tejidos linfoides periféricos.

Del gran número de células T primitivas que entran en el timo, muchas células que podrían reconocer, los antígenos propios no sobreviven mientras que se estimula la maduración de las células cuyos receptores son específicos para antígenos extraños.

Estos procesos de selección que son vitales para la capacidad del sistema inmunitario de discriminar entre lo propio y lo ajeno.

El timo desempeña un papel de información local confiere a los linfocitos que pasan por él la "calidad" de linfocitos T. El timo tiene igualmente una función endocrina: fabrica una o quizá varias hormonas tímicas que ejercen actividad en las funciones inmunitarias.

La importancia del timo ha sido demostrada mediante la ablación de esta glándula en animales recién nacidos. Mientras que la timectomía en el ratón joven apenas tiene efecto, la timectomía neonatal en el ratoncillo provoca un déficit inmunitario celular, importante disminución del número de linfocitos T, retraso en el crecimiento, infecciones de repetición y la muerte del animal.

Se han descrito dos tipos generales de antígenos

Antígenos independientes de T y antígenos dependientes de T. Las células B que se encuentran a los antígenos independientes de T son capaces de proliferación y secreción de inmunoglobulinas en ausencia de células Th (células T cooperadoras) En contraste la respuesta a antígenos dependientes de T requiere

la interacción entre células B y T para la producción subsecuente de inmunoglobulinas.

La maduración de células T en el timo se acompaña de una serie compleja de cambios en su genotipo y fenotipo. El timocito de reconocimiento más temprano, la célula pro-T, se puede identificar mediante expresión de ciertos antígenos de la superficie celular (es decir, CD2 y CD7) y mediante la presencia de la proteína CD3 en el citoplasma. Las células pro-T se diferencian en células pre-T.

Los timocitos que expresan CD3/TCR-alfa/beta en su superficie y reaccionan con antígenos propios, por lo general se eliminan de la población por un proceso aún desconocido. Otros timocitos que poseen CD3/TCR-alfa/beta se "educan" para reconocer péptidos antígenos sólo cuando están asociados con proteínas propias MHC, mediante un proceso que aún no se ha delineado. La mayoría de los timocitos mueren en este proceso de selección dentro del timo, sólo una minoría se diferencia en forma exitosa en linfocitos maduros T y migran los órganos linfoides periféricos y a la sangre<sup>24,25</sup>.

Las células T tipo CD8 median la mayoría de la citotoxicidad específica contra el antígeno, capacidad para matar otras células que se toman como ajenas, como por ejemplo, las células infectadas por virus.

Las células T tipo CD8 reconocen los antígenos peptídicos unidos a las moléculas clase I del CMH sobre la superficie del blanco. Como consecuencia de la activación, las células T tipo CD8 también liberan linfocinas (interleucina 2 interferon gamma), que pueden incrementar las respuestas inmunitarias por otros linfocitos T, B. Aparte de su función citotóxica, las células T tipo CD8, pueden suprimir las respuestas inmunitarias, quizá por la liberación de factores solubles que interfieren con la función de otras células inmunitarias.

Existen diferentes métodos para determinar los tipos celulares de linfocitos T, con la idea de evaluar la respuesta celular. Una forma de hacerlo es mediante la detección de sus receptores por las técnicas como las rosetas E (marcador de todos los linfocitos T.) Se pueden usar también rosetas EA, usando hemolisinas IgM para determinar linfocitos T cooperadores.

La determinación de las subpoblaciones de linfocitos T se pueden realizar también determinando los receptores CD4 (marcadores de los linfocitos T cooperadores / inductores) y los receptores CD8 (marcadores de los linfocitos T citotóxicos), mediante microscopía de fluorescencia o bien usando la citometría de flujo.<sup>24,25</sup>

### **CÉLULAS T COOPERADORAS / INDUCTORAS.**

Los linfocitos T tipo CD4 forman el subgrupo denominado células colaboradoras tipo T, o colaboradoras / inductoras (Th) debido a su capacidad para incrementar respuestas de células B y amplificar las respuestas que las células T tipo CD8 llevan a cabo; bajo ciertas circunstancias también pueden medir las citotoxicidad y su presión inmunitaria. Los linfocitos T tipo CD4 por lo general reconocen antígenos peptídicos que están unidos a las glicoproteínas clase II del CMH presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno.

Después de la exposición al complejo péptido-MCH, las células T tipo CD4 se activan y proliferan, produciendo una serie de linfocinas, con distintos efectos como es la interleucina 2 (IL-2) que sirven como factor de crecimiento para la proliferación policlonal independiente de antígeno de otras células T.

La interleucina 4 (IL-4) incrementa el crecimiento de las células B y otras células T, aumenta la función de los linfocitos Tc e induce la expresión de receptores Fc. , Para la IgE sobre las células B y los monocitos.

Las células T tipo CD4 proveen factores reguladores que incrementan funciones mediadas por todo el sistema inmunitario. Intervienen también cooperando con los linfocitos B a los cuales induce producir respuestas secundarias

La secreción de las linfoquinas libera muchas proteínas que ayudan a desencadenar la respuesta inmunitaria. Estimulan la inmunidad humoral y la inmunidad celular así como la producción de fagocitos células que llevan a cabo las reacciones de eliminación y que ingieren y digieren tanto patógenos como los restos de las células muertas<sup>24,25</sup>.

## **ESTRUCTURAS Y CARACTERÍSTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS.**

Los anticuerpos son inmunoglobulinas que pueden reaccionar específicamente con el antígeno que estimuló su producción.

Las inmunoglobulinas desempeñan dos papeles y existen en dos formas estructuralmente diferentes: una como receptores de membrana en los linfocitos B en reposo y la otra como los principales productos de secreción de las células plasmáticas totalmente diferenciadas. Los anticuerpos pueden unirse a antígenos y luego mediar otras actividades o funciones en la interacción con otras células y moléculas del sistema inmune.

Las moléculas de anticuerpos se dividen en varias clases diferentes pero relacionadas. La inmunoglobulina IgG se considera la estructura prototípica, se trata de una proteína con forma de Y con sitios de unión se denomina bivalente.

Los brazos clivados de la Y representan fragmentos con capacidad para unirse con antígenos y se denominan fragmentos Fab- la cola de la Y se denomina Fc porque es el fragmento fácilmente cristizable: la parte Fc dirige importantes funciones del anticuerpo que no incluyen la unión con el antígeno estas funciones efectoras comprenden la activación del complemento y la interacción con receptores Fc específicos: diferentes clases de moléculas de anticuerpos pueden tener sitios de unión idénticos con los antígenos pero diferentes partes Fc, por lo que cumplen funciones distintas.

Las inmunoglobulinas comprenden alrededor del 20% de las proteínas totales del suero y una proporción variable de inmunoglobulinas tiene actividad de anticuerpos.

Todas las inmunoglobulinas tienen patrones estructurales similares, con una gran diversidad de propiedades antigénicas de secuencia de aminoácidos, las moléculas de inmunoglobulinas están formadas por cadenas polipeptídicas ligeras (pequeñas) y pesadas (grandes) cada inmunoglobulina consta de una porción terminal amino variable (v) y una porción terminal carboxilo constante (c), cada una de las cuales, a su vez está genéticamente determinada las cadenas ligeras y pesadas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro. <sup>26</sup>

En los mamíferos existen cinco clases o isotipos mayores de inmunoglobulinas: las clases de anticuerpo difieren en cuanto a la estructura y la función. La clasificación se basa en diferencias en las cadenas pesadas: los isotipos se denominan IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. Con sus respectivas cadenas pesadas designadas con las letras griegas  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , y  $\alpha$ . Hay dos tipos de cadenas livianas  $\kappa$ ,  $\lambda$ . Las cadenas pesadas determinan la actividad biológica única de los diferentes isotipos cada molécula de anticuerpo tiene sólo un tipo de cadena pesada puede tener dos cadenas livianas  $\kappa$  o dos cadenas livianas  $\lambda$  pero nunca una de cada una esto asegura que ambos sitios de unión con los antígenos sean idénticos.

### **INMUNOGLOBULINA G (IgG)**

La IgG comprende aproximadamente 75% de inmunoglobulinas 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 cuatro subclases de IgG basadas en las diferencias antigénicas en las cadenas H. Cada molécula de IgG tiene un sólo tipo de cadena L y un tipo de cadena H, las moléculas de IgG 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.

Durante la respuesta secundaria, la IgG, es la principal inmunoglobulina sintetizada por su capacidad por 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 IgG se unen a los receptores específicos de las moléculas fagocitarias tales como los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares, aumentando así la eficiencia de las células fagocíticas para que puedan ingerir y destruir los microbios infectantes que han quedado cubiertos con los anticuerpos IgG producidos como respuesta a la infección. Además de unirse a las células fagocíticas, la región Fc de IgG puede unirse activando al primer componente del sistema de complemento que en estas circunstancias desata un ataque bioquímico que mata al microorganismo.

## **INMUNOGLOBULINA M (IgM)**

La IgM comprende alrededor del 10% de inmunoglobulinas en el suero humano normal. 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 de la bisagra; cada subunidad de IgM consiste en dos cadenas L y dos cadenas H. Además hay una cadena J (peso molecular 15000) por cada 10 cadenas L de moléculas IgM.

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, puesto que cada molécula de IgM tiene 10 segmentos Fab que se pueden combinar hasta en 10 sitios antigénicos.

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

## **INMUNOGLOBULINA IgD**

La IgD es otra inmunoglobulina de membrana que se halla de forma predominante en las células B en reposo. La IgD humana también es una molécula de cuatro cadenas como IgG, pero con una región bisagra muy grande: su muy baja concentración en la sangre puede explicarse por su sensibilidad a la proteólisis en la región bisagra y la rareza de las células plasmáticas secretoras de IgD: su función mayor puede ser estar en la membrana como receptor de antígenos: durante la ontogenia de las células B la IgD se expresa después de la IgM. La aparición de la IgD vuelve funcionalmente madura a las células B, las cuales ya no pueden ser fácilmente convertidas en tolerantes por el contacto con un antígeno.

## **INMUNOGLOBULINA IgA**

La IgA está presente en las secreciones seromucosas como la leche, las lagrimas, la saliva, la respiración y las secreciones de los pulmones y el intestino también se hallan pequeñas cantidades en la sangre. En las secreciones las moléculas de IgA consisten en dos copias de moléculas similares a la IgG, unidas de forma covalente por medio de uniones disulfuro con una cadena J interpuesta. También se asocian con otra proteína denominada componente secretor, que es sintetizado por las células epiteliales. El componente secretor es una parte de una proteína de membrana integral conocida como receptor poli Ig que desempeñan un papel clave en el transporte de la IgA a través de las células epiteliales hacia la luz.

## **INMUNOGLOBULINA IgE**

La IgE es la clase de anticuerpo que aparece en el suero con la menor concentración: Es responsable de las manifestaciones clínicas de alergias como la fiebre del heno, el asma y la urticaria: su región Fc se une de forma específica con receptores de muy alta afinidad presentes en la superficie de los mastocitos y los basófilos. La IgE unida a células sirve como receptor de antígenos, también es importante en la respuesta a las infecciones por parásitos (principalmente los helmintos) ya que a menudo esta muy aumentada en el suero de los pacientes con estas enfermedades. La IgE participa en la destrucción mediada por células dependiente de anticuerpos de los parásitos por parte de los macrófagos y los eosinófilos, células que poseen receptores de Fc con baja afinidad específicos para la IgE.<sup>23, 24,25</sup>

**7.4.-AUTOINMUNIDAD** Produce una reacción inmunológica anormal contra los antígenos propios (autoantígenos) el sistema inmune de un individuo que funcione correctamente debe reaccionar contra los antígenos extraños y no debe reaccionar contra los componentes propios las reacciones autoinmunes son las que se dirigen contra los propios tejidos, células o moléculas del cuerpo, ocurren cuando los sucesos reguladores involucrados en la tolerancia inmunológica están alterados o funcionando mal. Los antígenos propios o autoantígenos, los blancos de las reacciones autoinmunes, pueden ser componentes intracelulares, receptores componentes de la membrana celular, componentes extracelulares, proteínas plasmáticas u hormonas según el autoantígeno, la enfermedad puede ser específica de órgano, o no específica de órgano. Tanto los anticuerpos como las respuestas de la célula T a los autoantígenos pueden causar enfermedades.

El daño tisular por la respuesta inmune puede ser causado por el hecho de que el huésped y el parásito comparten determinantes antigénicos. Sin embargo, no se sabe como estos determinantes provocan respuestas inmunes, ya que deberían ser reconocidos por el cuerpo como "propios" y establecer tolerancia a estos antígenos. El papel preciso de las reacciones autoinmunes en estas enfermedades todavía no está claro.

Dado que no puede establecerse la tolerancia inmunológica a autocomponentes ocultos del sistema inmune, se producen respuestas inmunes contra autoantígenos cuando estos antígenos secuestrados son liberados o expresados de forma anormal el daño a los tejidos y a las células, puede dar como resultado la liberación de moléculas intracelulares antigénicas. Las reacciones inmunes resultantes pueden causar traumatismos celulares continuos, la mayor liberación de antígenos secuestrados y la perpetuación del proceso inflamatorio. Los autocomponentes presentes en el órgano como en el sistema nervioso central (que carece de linfáticos convencionales y por lo tanto del contacto frecuente con los linfocitos) pueden provocar fuertes respuestas inmunes en un contexto poco habitual. También se cree que la expresión anormal de los productos de genes de clase II del MHC en células que no son



células B presentadoras de antígenos y los macrófagos puede permitir que ocurran reacciones inmunes locales efectivas contra los autoantígenos en estas células.

Las enfermedades autoinmunes también pueden resultar de alteraciones de los autocomponentes por agentes ambientales.<sup>27</sup>

La falta de respuesta del sistema inmunitario a la estimulación antigénica se llama tolerancia inmunológica, la necesidad de mantener tolerancia frente a los antígenos propios conocida como autotolerancia y esta se debe a la ausencia de linfocitos que reconozcan lo propio, la pérdida de la autotolerancia da lugar a reacciones inmunitarias contra antígenos propios o autólogos provocando enfermedades autoinmunitarias. La autoinmunidad es una causa importante de enfermedad en el hombre estimándose que afecta al menos del 1 al 2% de la población de E.E.U.U, esta autoinmunidad resulta del fracaso o ruptura de los mecanismos normalmente responsables del mantenimiento de la autotolerancia, por lo tanto la pérdida de autotolerancia puede ser el resultado de una selección o regulación anormal de los linfocitos autorreactivos y de alteraciones en la forma en que se presentan los antígenos propios del sistema inmunitario.

## **7.4.1.-FACTORES QUE FAVORECEN LA AUTOINMUNIDAD**

**7.4.1.1.-EDAD.** En el hombre las enfermedades autoinmunes muchas veces se presentan en sujetos relativamente jóvenes, pero la frecuencia de los anticuerpos en el suero de personas aparentemente sanas aumenta mucho con la edad. Las enfermedades infecciosas son más graves en los extremos de la vida y al parecer en el animal joven este efecto se relaciona con la inmadurez de los mecanismos inmunológicos que afecta a la capacidad sistema linfoide para enfrentarse y reaccionar a antígenos extraños.

**7.4.1.2.-SEXO.** No hay diferencias importantes en la susceptibilidad a infecciones entre los sexos, sin embargo el sexo femenino es más expuesto a las enfermedades autoinmunes que el masculino.

**7.4.1.3.- GENÉTICOS.** Muchas veces en los parientes inmediatos (padres, hijos, hermanos) de enfermos con afecciones autoinmunes, se encuentran otros sujetos también afectados por la misma enfermedad, a veces latentes, o con mayor frecuencia en sujetos aparentemente sanos pero portadores de los mismos anticuerpos. Aún se conoce poco de las modalidades del control genético poligénico de las enfermedades autoinmunes. Estudios preliminares indican la existencia de dos categorías de genes, unos que controlan la "condición autoinmune" y otros la especificidad de los anticuerpos.

**7.4.1.4.-NUTRICIONALES.** Las proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, son esenciales para el crecimiento y mantenimiento humanos.

Los cambios cuantitativos y cualitativos en estos nutrientes pueden afectar de manera significativa las funciones del sistema inmunitario. Las células de este sistema, cuando se activan, son muy dinámicas en su metabolismo y sintetizan y secretan moléculas que participan en la interacción célula-célula. Así una deficiencia o un exceso de nutrientes específicos puede influir en la síntesis de estas moléculas y alterar la regulación de la inmunidad.

La desnutrición es una causa frecuente de deficiencia inmunitaria, con efectos en particular en la inmunidad mediada por células (IMC), fagocitosis y sistema del complemento puede tener efectos reversibles o irreversibles a largo plazo, según su gravedad y duración.<sup>25,26</sup>

En la desnutrición grave proteico calórica, la respuesta humoral y la producción de anticuerpos pueden regresar a niveles normales después que el sujeto se ha mantenido con una dieta adecuada para la deficiencia de IMC puede persistir<sup>23</sup>.

Las enfermedades inmunitarias del ojo se pueden dividir en dos categorías principales:

Enfermedades mediadas por anticuerpos

Enfermedades mediadas por células.

Lo mismo que en el caso de otros órganos, existe gran oportunidad de interacción de estos dos sistemas en el ojo.

#### Enfermedades Mediadas por Anticuerpos:

Antes de que se pueda concluir que una enfermedad del ojo es dependiente del anticuerpo, deberán satisfacer los siguientes criterios:

- 1) Debe haber evidencia de anticuerpos específico o células plasmáticas en el suero del paciente.
- 2) Se deberá identificar el antígeno y si es posible caracterizarlo.
- 3) Se deberá demostrar que el mismo antígeno produce una respuesta inmunitaria en el ojo de un animal experimental, y los cambios patológicos producidos en el animal de experimentación deberán ser similares a aquellos que se observan en la enfermedad humana.
- 4) Deberá ser posible producir lesiones similares en animales sensibilizados pasivamente con suero de un animal afectado, al retarlo con el antígeno específico.

A menos que se satisfagan todos los criterios mencionados antes, la enfermedad se deberá mencionar como probablemente dependiente de anticuerpo.

En tales circunstancias, la enfermedad se puede tomar como mediada por anticuerpos sólo si se cumple uno de los siguientes criterios:

En la desnutrición grave proteico calórica, la respuesta humoral y la producción de anticuerpos pueden regresar a niveles normales después que el sujeto se ha mantenido con una dieta adecuada para la deficiencia de IMC puede persistir<sup>23</sup>.

Las enfermedades inmunitarias del ojo se pueden dividir en dos categorías principales:

Enfermedades mediadas por anticuerpos

Enfermedades mediadas por células.

Lo mismo que en el caso de otros órganos, existe gran oportunidad de interacción de estos dos sistemas en el ojo.

#### Enfermedades Mediadas por Anticuerpos:

Antes de que se pueda concluir que una enfermedad del ojo es dependiente del anticuerpo, deberán satisfacer los siguientes criterios:

- 1) Debe haber evidencia de anticuerpos específico o células plasmáticas en el suero del paciente.
- 2) Se deberá identificar el antígeno y si es posible caracterizarlo.
- 3) Se deberá demostrar que el mismo antígeno produce una respuesta inmunitaria en el ojo de un animal experimental, y los cambios patológicos producidos en el animal de experimentación deberán ser similares a aquellos que se observan en la enfermedad humana.
- 4) Deberá ser posible producir lesiones similares en animales sensibilizados pasivamente con suero de un animal afectado, al retarlo con el antígeno específico.

A menos que se satisfagan todos los criterios mencionados antes, la enfermedad se deberá mencionar como probablemente dependiente de anticuerpo.

En tales circunstancias, la enfermedad se puede tomar como mediada por anticuerpos sólo si se cumple uno de los siguientes criterios:

- 1) Sí el anticuerpo contra un antígeno este presente en cantidades mayores en los líquidos oculares que en el suero después de que se han hecho los ajustes para las cantidades totales de inmunoglobulina en cada líquido.
- 2) Si se presentan acumulaciones anormales de células plásticas en la lesión ocular.
- 3) Si se presentan acumulaciones anormales de inmunoglobulinas en el sitio de la enfermedad
- 4) Si el complemento es fijado por inmunoglobulinas en el sitio de la enfermedad.
- 5) Si existe acumulación de eosinófilos en el sitio de la enfermedad.
- 6) Si la enfermedad ocular se asocia con una enfermedad inflamatoria en alguna otra parte del cuerpo para la cual se haya demostrado dependencia de anticuerpo o esto último se sugiera fuertemente.

Es importante conocer la clasificación de la enfermedad uveítis autoinmune experimental para poder situarnos específicamente en el problema planteado.

## **7.5.-UVEITIS**

**7.5.1.--**La uveítis (Uvea+itis) es la Inflamación de parte o totalidad de la úvea, túnica media (vascular) del ojo, que normalmente afecta a las otras túnicas (esclerótica, córnea y retina.) Esta enfermedad se ha visto que puede estar asociada a traumatismos, enfermedades inflamatorias no infecciosas o invasión por gérmenes infecciosos<sup>18,28</sup>. De ahí que se hayan propuesto muchas clasificaciones para la uveítis, ninguna de las cuales es perfecta, pero las más útiles son las siguientes:

### **7.5.2.-CLASIFICACION DE LA UVEITIS**

- Anatómica
- Clínica
- Patológica
- Etiológica

Desde el punto de vista anatómico la uveítis puede ser anterior, intermedia, posterior o difusa.

La uveítis anterior. Es la Inflamación que afecta predominantemente al iris e iridociclitis, e igualmente afectando cuerpo ciliar o ambos, comprende iritis y ciclitis

La uveítis intermedia (pars planitis, ciclitis crónica ) se caracteriza por una afectación predominante de la parte posterior del cuerpo ciliar (pars plana) y de la periferia extrema de la retina .

En la uveítis posterior. La inflamación se localiza por detrás del extremo posterior de la base vítrea. Según la localización primaria, la uveítis posterior se divide en coroiditis, retinitis, corioretinitis y retinocoroiditis .

La uveítis difusa o panuveítis. La panuveítis o uveítis difusa se caracteriza por la afectación de todo el tracto uveal. La uveítis anterior es el tipo más frecuente, seguido de la intermedia, la posterior y la difusa En cuanto a la clasificación clínica la enfermedad es considerada como crónica y aguda descritas en la tabla: No. 3

En la clasificación etiológica, la uveítis puede ser exógena o endógena .

La uveítis Exógena. Es causada por una lesión externa a la uvea o por la invasión de microorganismos o de otros agentes del exterior.

La uveítis Endógena. Es causada por microorganismos u otros agentes provenientes del propio paciente.

La clasificación patológica se describe la uveítis como granulomatosa o no granulomatosa, las principales diferencias clínicas se observan en la tabla. No. 4

TABLA No.3

LOCALIZACIÓN	CRÓNICA	AGUDA
Uveítis Anterior Dolor, Fotofobia Visión Curso	Mínimo o ausente Reducción gradual Prolongado, remisiones y exacerbaciones	Intenso Disminución brusca Autolimitado(1-6 semanas) con frecuencia recurrentes
Depósitos queráticos	Densos coalescentes a menudo "grasa de carnero" márgenes dentados, macrófagos, pigmento fagotizado	En punta de alfiler
Humor acuoso	Escasas células, con frecuencia grande, rubor acuoso variable	Muchas células, rubor acuoso intenso a veces coagulación de proteínas.
Precipitados y nódulos del iris	Frecuente	Ninguno
Uveítis Posterior		
Edema retiniano y subretiniano	Generalmente ligero o moderado exudados alrededor localizados	Intenso y generalizado, con velamiento de los márgenes neuroretinianos y el lecho vascular.
Exudados coroides	Exudados masivos densos con bordes velados por el edema retiniano y subretiniano, circundante.	Ningún exudado masivo denso, ocasionalmente áreas localizadas de infiltración más profunda.
Afectación retiniana secundaria	Casi invariable, con destrucción retiniana.	Ninguna o limitada al epitelio pigmentado y a los conos y bastones
Lesión orgánica residual	Cicatrices gliales gruesas con pigmentación masiva que rodea la lesión	Ninguna o cambios granulares finos en el epitelio pigmentado con lesión del neuroepitelio y gliosis superficial.
Cambios del segmento anterior	A veces depósitos queráticos de grasa de carnero.	Generalmente ninguno

Referencia: Hampton F. Ray. Síndromes oculares y Enfermedades sistémicas. Salvat., España 1990.

Tabla No.4

**DIFERENCIAS ENTRE UVEÍTIS GRANULOMATOSA Y NO GRANULOMATOSA**

	<b>NO GRANULOMATOSA</b>	<b>GRANULOMATOSA</b>
Instauración	Aguda	Insidiosa
Curso	Corto	Prolongado
Dolor	Acentuado	Leve
Visión Borrosa	Moderada	Acentuada
Inyección Circumcorneal	Acentuada	Leve
Precipitados Queráticos	Pequeños blanquecinos	Grandes grisáceos (“grasa de Carnero”).
Pupila	Pequeña e Irregular	Pequeña e Irregular (variable)
Sinequias posteriores	Algunas veces	Algunas veces
Cámara anterior	Predominio de enrojecimiento	Predominio de células
Nódulos del iris	Faltan	Algunas veces
Opacidad del Vítreo	Falta	Algunas veces
Localización	Vía anterior	Vía posterior (variable)
Evolución	Aguda	Crónica
Pronóstico	Bueno	Regular o malo
Recidivas	Frecuentes	Algunas veces
Fondo de ojo	Afectación difusa	Lesión nodular

REFERENCIA: Newell W. Frank. Oftalmología Fundamentos y Conceptos. 7a Mosby. España 1992.



## **7.6.-CARACTERÍSTICAS DE LA PROTEÍNA S**

Es un complejo hidrofílico formado por la adición de proteínas a C5b, C6 y C7 evita que el complejo en desarrollo del complemento se incruste en la bicapa lipídica del antígeno blanco. La proteína S es el antígeno soluble involucrado en la patogénesis de la uveítis autoinmune experimental y fue aislada de extractos retinales de bovino por precipitación de sulfato de amonio, el antígeno purificado tiene un peso molecular de 45 Kda.<sup>37</sup>

## **7.7.-EL RATON DESNUDO**

En 1962 aparece la primera publicación del ratón desnudo por J.H. Isaacson, B.M. Cattanch y N. A. Grist, . En 1966 el Dr. Flanagan realizó diversas cruces reportando las siguientes características para el ratón desnudo: ausencia de pelo, baja fertilidad, inmunodeficiencia, tamaño reducido, atimia, además de un periodo de vida corto con presentación de un 100% de mortalidad a la edad de 25 semanas y mortalidad infantil hasta del 45% en las dos primeras semanas de vida, así demostró por los datos de segregación, que el fenómeno se debe a un solo gen autosomal recesivo que denominó nude (desnudo) y cuyo símbolo genético es nu, también reportó que los ratones normales son heterocigotos para el gen responsable de la ausencia de pelo.<sup>38,39</sup>

En 1968 E. Pantelouris describió que los ratones homocigóticos recesivos para el gen nu (nu/nu) carecen de timo, mientras que los hermanos de camada homocigóticos dominantes (+/+) y heterocigóticos (nu/+) presentan timo normal. Así mismo describió la presencia de una marcada leucopenia en los ratones atímicos (815-3380 leucocitos/ $\mu$ l), mientras que sus hermanos fenotípicamente normales presentan hasta cuatro veces niveles más altos y otros con niveles intermedios, estos últimos fueron considerados como heterocigóticos (nu/+). A partir de estas investigaciones el ratón desnudo se ha utilizado como modelo biológico en distintas líneas de investigación, el ratón atímico ha sido cruzado con otros ratones portadores de defectos inmunológicos, aumentando el número de variantes de ratones con mutaciones<sup>38,39</sup>

En el ratón desnudo la actividad de las células B parece no estar alterada . Sprent y Miller estudiaron la recirculación y el tiempo de vida media de los linfocitos torácicos y encontraron que la función de los linfocitos B fue de un 97% . La disgenesia del timo produce una falta de maduración de las células T, que lleva a un estado de inmunosupresión en estos animales. Con respecto a la síntesis de anticuerpos, se ha reportado en esta cepa que el contenido total de inmunoglobulinas presentes en su suero es comparable con el de los ratones normales, no obstante algunas clases de inmunoglobulina se encuentran desbalanceadas.

En el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM surgió espontáneamente una cepa de ratones sin pelo derivados de la cepa CD1 et/et , el símbolo "et" es adoptado para referirse a su forma mutante. Los animales son obtenidos al aparear machos y hembras et/+, o bien machos y hembras et/et, estos ratones, se diferencian de sus hermanos de camada los et/+ (portadores del gen de hipotimia) por carecer de pelo, característica que parece estar ligada a un gen autosomal recesivo. De acuerdo a un estudio realizado por Rosas et al ( ) se demostró que estos animales son hipotímicos, ya que los machos presentan un timo rudimentario y el peso del mismo órgano es bajo en los portadores et/+ machos. Las hembras et/et presentan una estructura semejante a los nódulos linfáticos situada donde se encuentra el timo normalmente, el peso de esta estructura es bajo al igual que en la hembras et/+. La supervivencia de los ratones et/et es similar en sus hermanos, aproximadamente De 80% a las 4 semanas y de 60% a la semana 52. Los ratones nu/nu presentan una mortalidad mayor de 55% a las 2 semanas de vida y de 100% a las 25 semanas. ( ) en un estudio para caracterizar estos animales se llegó a la conclusión de que estos ratones a pesar de ser hipotímicos no son incompetentes inmunológicamente, ya que presentan títulos de anticuerpos similares al de los ratones normales frente a un antígeno timo dependiente como la BSA

## **8.-FUNDAMENTO DE ELECTROFORESIS<sup>43</sup>**

Esta técnica utiliza el movimiento de partículas con carga eléctrica en suspensión en un líquido, bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado para separarlas según su grado de migración. El método original en el que el movimiento del solvente no está restringido se denomina electroforesis de fronteras móviles porque todas las partículas de una misma especie se mueven a la misma velocidad manteniendo márgenes netos

Los métodos más utilizados emplean un medio de soporte como papel, acetato de celulosa, gel de agarosa, gel de almidón o gel de poliacrilamida. Que evita el movimiento de convección del solvente y recibe el nombre de electroforesis de zona.

Cada método suele designarse según el soporte utilizado por ejemplo electroforesis de acetato de celulosa.

En Capa Delgada: es aquella en la cual las partículas emigran a través de una delgada capa de material inactivo eléctrico.

De Disco: este método utiliza un gel de poliacrilamida con capas discontinuas de ahí su nombre, la muestra comienza a pasar por una capa de poros grandes donde fluye con rapidez hacia la capa de menor porosidad, donde se concentra para ir separándose luego por componentes según atraviesa lentamente el gel de separación.

De fronteras móviles: en este método se vigilan por un sistema óptico el número de fronteras netas en movimiento en una suspensión y la rapidez de propagación.

En Gel: Aquella en la cual se emplea como medio de difusión un gel.

De gradientes en un campo de pulsos: Esta técnica permite el estudio de regiones cromosómicas de varios cientos a miles de kilobases de longitud, en comparación con los 100-150 Kb que permiten los antiguos métodos.

En Papel: aquí los iones emigran siguiendo una tira de papel filtro poroso saturado de un electrolito. Cuando se aplica un gradiente de potencial a lo largo de la tira.

De Proteína: Es un método de separación y cuantificación de las proteínas del suero, de la orina o del líquido cefalorraquídeo por electroforesis de acetato a pH 8.6, las proteínas se separan en siete bandas por orden según su movilidad electroforética:

- Prealbumina                       $\alpha_1$      $\beta_1$
- Albumina                             $\alpha_2$      $\beta_2$
- Gamma

De Zona: es aquella en la cual el solvente se inmoviliza valiéndose de un medio de sostén, de la índole de papel o gránulos de almidón, ello permite la separación completa de los componentes de distinta movilidad electroforética, lo cual no suele ser posible en la electroforesis de fronteras móviles a causa de la mezcla por convección.

### **8.1.-FUNDAMENTO DE TÉCNICA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA<sup>44</sup>**

La Inmunolectrotransferencia combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia o ausencia de detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS) , con la reacción antígeno-anticuerpo en fase sólida, esta técnica fue descrita por Towbin y col. En 1979 es una de las técnicas más útiles para el análisis antigénico. En el primer caso, bajo las condiciones empleadas las proteínas se separan de acuerdo a sus pesos moleculares, lo que permite su identificación.

Posteriormente las proteínas así separadas son electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (NC) o de nylon, en donde se unen a los grupos reactivos de estas quedando inmovilizadas y expuestas en la superficie para reaccionar con los anticuerpos correspondientes. El patrón que se obtiene sobre el papel es una copia del patrón de separación obtenido en el gel. Es necesario en esta fase del procedimiento bloquear los sitios reactivos del papel que quedan libres con alguna proteína que no interfiera, Ej., gelatina , ovoalbumina o leche, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos; en la siguiente etapa, la membrana de nitrocelulosa se hace reaccionar con los

anticuerpos problema, los cuales podrán unirse a sus antígenos correspondientes inmovilizados en el papel.<sup>45</sup>

La reacción antígeno-anticuerpo que se efectúa corresponde a la primera etapa de la reacción, para ponerla de manifiesto es agregar un segundo anticuerpo unido a una enzima como peroxidasa o bien proteína igualmente marcada. En el ensayo enzimático se agrega el sustrato y un cromógeno que participe *in situ* para hacer visible la reacción. Dependiendo del tipo inmunológico que se emplee para hacer visible la reacción se puede identificar la clase de respuesta inmunológica del huésped (IgM, IgG, IgA, IgE) ( ).

## **9.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

La pérdida de la visión ha sido considerada con justa razón como una de las mayores desgracias que le puede suceder a un individuo; de aquí que haya sido una fuente de preocupación para la sociedad y especialmente para personas del área de la salud (médicos oftalmólogos, inmunólogos, Q.F.B.s, etc.) Se considera ciego a un individuo que carece completamente de la vista y a un débil visual como aquel en el que se encuentran limitadas sus posibilidades de desarrollo en diversas áreas. La Organización Mundial de la Salud estima que hay en el mundo 28 millones de ciegos. En México la Secretaría de Salud ha realizado estudios epidemiológicos que indica que hay 76.405 ciegos y 134.810 débiles visuales <sup>46,47</sup>. Esta condición puede derivar de defectos genéticos o congénitos de conformación del ojo o de accidentes o enfermedades que han alterado el mecanismo de la visión. Estos padecimientos son distintos en países desarrollados, presentando retinopatias diabéticas, glaucoma, uveítis y cataratas; en países subdesarrollados las causas más frecuentes son tracoma, xeroftalmia, diabetes, cataratas, lepra y oncocercosis.

El curso tomado por la investigación experimental y clínica de esta misteriosa enfermedad ocular, actualmente ha sido el de la inmunología, que es hoy por hoy un medio para avanzar en el estudio de la uveítis.

Una de las causas más frecuentes de esta enfermedad es la reacción autoinmune descrita desde 1903 por Uhlenhuth, cuando descubrió que se podían formar anticuerpos contra la proteína del ojo, la capacidad de estas proteínas para inducir autoinmunidad se le ha atribuido al secuestro anatómico del ojo. El ojo a pesar de estar muy irrigado, sobre todo en los plexos coroideos tiene sitios donde hay una barrera hemática por lo que se considera a este órgano como un "sitio privilegiado" y debido a esto es posible la presencia de clonas prohibidas las cuales si se activan pueden desencadenar un proceso autoinmune contra antígenos oculares. Se especula que factores ambientales, nutricionales, sexo, etc. influyen en el desarrollo de estas enfermedades autoinmunes. Se tiene otra posibilidad para el desarrollo del proceso autoinmune y es que el antígeno secuestrado se expusiera por algún proceso

## 10.-OBJETIVOS

### **Objetivo General:**

Evaluar la respuesta inmune contra antígenos de retina, determinada por ELISA y corroborada por inmunoelectrotransferencia en ratones que desarrollan oftalmopatía espontánea.

### **Objetivos Particulares.**

- Obtención de antígenos descritos como uveitogénicos
- Realizar el estudio histopatológico en los ojos, buscar *“in situ”* el tipo de células que lo infiltran y la participación de complejos inmunes.
- Buscar la respuesta asociada a daño, realizando inmunoelectrotransferencias con sueros de ratones testigo positivos para la prueba así como de ratones con o sin lesiones.
- Evaluar el grado de severidad en la oftalmopatía causada, registrando en cada ratón la presencia de inflamación, cataratas y pérdida de ojos.

## **11.-HIPÓTESIS**

Se propone que en la oftalmopatía observada en los ratones hipotímicos CD1 et/et, esta involucrada la respuesta inmune.



## **12.-DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.**

### **12.1.- Obtención de antígenos de retina.**

La obtención de la proteína S de retina se realizó de acuerdo a la metodología descrita de Wacker y cols<sup>48</sup>, en la cual se recolectaron 10 ojos frescos de bovino en las mejores condiciones de asepsia posible transportados en solución salina estéril. La porción anterior del globo ocular se remueve por una incisión circumcorneal, se extrajo la córnea, el cristalino eliminando el humor vítreo de la copa del ojo, se enjuago la copa suavemente con amortiguador de salina fosfato pH 7.2 (PBS) varias veces. A las retinas extraídas se les realizó una sonicación de 10 ciclos de medio minuto cada ciclo en baño de hielo, se centrifugaron a 10 000 rpm por 30 minutos obteniendo un total de 18.5 mL Los sobrenadantes se precipitan con una solución sulfato de amonio volumen/volumen (50% de saturación) se centrifugan a 6000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se coloca en una membrana de acetato de celulosa dializandose con solución salina se repite el procedimiento dos veces más y al final el precipitado se resuspende en PBS hasta la eliminación del sulfato de amonio se cuantificaron proteínas mediante el método de Lowry<sup>49</sup>

### **12.2.-Inmunización de Animales con Antígenos de Retina**

Se inmunizaron ratones hembras CD1 y CD1 et/et con proteínas de retina, para nuestros animales testigo positivos del ensayo de ELISA siguiendo el método de Solik y cols<sup>50</sup>.

Se inmunizaron 5 hembras de la cepa CD1 con 30 microgramos de antígeno S en 50 microlitros de volumen y se mezclan con un volumen igual de adyuvante completo de Freund, se inyecta en ambos cojinetes plantares y 14 días después se sangraron los animales.

### **12.3.-CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Determinación de proteínas por el método de Lowry

Preparación de curva estandar

1. Se preparó una solución estándar de ovoalbúmina en solución salina con una concentración final de 525 µg/mL.

2. Se coloca una serie de 10 tubos con 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9 y 1.0mL y se completa el volumen a 1mL (un tubo lleva sólo 1 mL de solución salina y se le dio el mismo tratamiento que al resto de los tubos, esté al blanco de reactivos).
3. Se adiciona cada tubo 3 mL del reactivo C . se deja reposar 10 minutos.
4. Se agrega 0.1 mL de reactivo de Folin sin diluir. Se deja reposar por 30 minutos.
5. Se calibra el espectrofotómetro
6. La absorbancia se leyó a 600 nm empezando por la de menor concentración hasta llegar a la de mayor concentración
7. Se elaboró curva de calibración

#### Determinación de la concentración de proteínas en el antígeno

1. Se elaboraron diluciones en solución salina del antígeno a evaluar con distintas diluciones como:
2. Se completó el volumen a 1 mL
3. Se agrego a cada tubo 3 mL del reactivo C. Se dejo reposar durante 10 minutos.
4. Se adicionó 0.1 mL del reactivo de Folin sin diluir. Se dejó reposar durante 30 minutos
5. La absorbancia se leyó a 600 nm empezando por la de mayor concentración hasta llegar a la de menor concentración
6. Se interpolaron las absorbancias en la curva estándar.
7. Se calculó la concentración de proteína del antígeno

#### **12.4.-Obtención de Material Biológico.**

Se utilizó como material biológico, ratones hipotímicos cepa et/et , et/+, y ratones CD1 sanos, dando un total de 111 ratones en estudio.

En los ratones et/et se observaron lesiones en sus ojos como inflamación, cataratas , perdidos y normales usando estas características como nomenclatura para su estudio.

Las proteínas así obtenidas se corrieron por electroforesis de geles de poliacrilamida obteniendo diferentes bandas.

### **12.5.-Obtención de sueros (sangrado de animales)**

Se anesteciaron previamente en una cámara con éter. Realizando un corte en plexo axilar, recogiendo la mayor cantidad de sangre, se perforo la oreja de cada ratón colocando y etiquetandolos para su identificación posterior anudado con hilo cañamo

Se decapito al ratón identificándola con el número asignado en cada etiqueta (siguiendo un orden progresivo) para fines de conservación se utilizó formalina al 10%. Una vez coagulada la sangre se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos se extrajo el sobrenadante obteniendo así los sueros Los sueros obtenidos se mezclan y se les adiciona timerosal al 0,01%, de esta mezcla se tomaran alícuotas y se guardaran a -20°C hasta su uso.

### **12.6.-Técnica de ELISA.**

Para la técnica de ELISA se usaron placas de poliestireno de alta unión (COSTAR) irradiandolas con luz UV durante 30 minutos para aumentar su adhesividad según el método descrito por Boudet<sup>51</sup>. Usando los sueros positivos se estandarizó los ELISAs para el sistema de proteínas S, siguiendo un esquema de tablero de ajedrez, Rabin et al<sup>52</sup>. Se busco la concentración adecuada del antígeno y dilución del suero, así también se titulo el conjugado de cabra-Peroxidasa de rábano picante anti IgG de ratón Sigma chemical Company. A las muestras positivas en el ELISA se les realizó una inmunoelectrotransferencia mediante el método de Dunbar<sup>43</sup>, para determinar a que proteína del extracto crudo de retina hiba dirigida la respuesta.

#### **ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE ELISA**

1. Para el ensayo de ELISA se utilizaron placas de microtitulación con 96 pozos irradiadas con luz U.V.
2. Se cubrieron con 100 µL del antígeno de diluciones seriales al doble (de A a G, H es testigo negativo para el antígeno) en amortiguador de carbonatos-bicarbonatos 0.05 M pH 9.6). se incubó la placa cubierta a 37 °C durante 1 hora, se elimino el sobrenadante.

3. Se bloqueo la placa con 300  $\mu$ L de gelatina y ovoalbumina en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se incubó la placa cubierta a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween.
4. Se prepararon diluciones seriales dobles antígeno de retina S dilución ( 1:) y se adicionaron 100  $\mu$ L por pozo, la placa se incubo a 37 °C por una hora. Las placas se lavaron 3 veces tres veces con PBS-Tween.
5. Los anticuerpos se detectaron con un conjugado de peroxidasa de rábano-anti -IgG de ratón hecho en cabra, se adicionaron 100  $\mu$ L a cada pozo, la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora, concluido el tiempo se lavaron las placas tres veces con PBS-Tween.
6. Se revelaron las placas como sigue: se adicionó del sustrato de o-fenilendiamina disuelto en amortiguador de sustrato. Después se incubó 37 °C por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se realizó la lectura de las placas, con un lector de ELISA la absorbancia a 490 nm

Determinación del titulo de anticuerpos de tipo IgG contra antígenos de retina por el método de ELISA.

1. Se irradiaron placas de microtitulación con 96 pozos con luz ultravioleta durante 30 minutos
2. Se adicionó a cada pozo 100  $\mu$ L de antígeno diluido en buffer de carbonato-bicarbonato (50 mM, pH 9.6). Se incubo a 37 °C durante 1 hora trancurrido el tiempo se elimina el sobrenadante
3. Se bloquea la placa con 300  $\mu$ L de solución de ovoalbumina y gelatina a 1 2% en PBS , se incubo 1 hora a 37 °C , se lavo con PBS-Tween 3 veces.
4. A cada pozo se le agregaron 100  $\mu$ L de suero de ratón et/et 1:100 en PBS. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora, se lavo con PBS-Tween 3 veces.
5. Se agrego el conjugado IgG de ratón hecho en cabra peroxidado con una dilución 1:500 se incubaron a 37 °C durante 1 hora, se lavo con PBS-Tween 3 veces.

6. Se colocaron en cada pozo 100  $\mu$ L del sustrato o-fenilendiamina diluido en buffer de sustrato, se incubó durante 15 minutos a 37 °C.
7. Se tomo la lectura de las absorbancias de las placas en un lector de ELISA a 490 nm. La concentración de anticuerpos se detectó por interpolación de los datos para las muestras de ratón en la curva de calibración.

## **12.7.-Electroforesis en Geles de Poliacrilamida**

### **Formación del Gel.**

- 1) Con dos cristales de 12x 11 y 12 x 10 cm y empacadores de teflon de 0.5 mm se montara el soporte, donde se armara el gel de poliacrilamida. Sellar los lados y la parte inferior con agarosa 2% cuidando de que no quede algún espacio sin cubrir.
- 2) En vaso de precipitado de 80 ml mezclar 10 ml de solución A 7.5 ml de solución B, 0.3 ml de SDS 10% sol D y 12.05 ml de agua, cuidar que no se formen burbujas.
- 3) Mezclar perfectamente sin la formación de burbujas ya que afecta la polimerización del gel.
- 4) Adicionar 10 $\mu$ l de TEMED y 150  $\mu$ l de persulfato de amonio sol E cuidar en todo momento que no se formen burbujas.
- 5) Vaciar la mezcla en el armazón a un nivel aproximado de 4 cm del borde.
- 6) Agregar cuidadosamente agua por los extremos aproximadamente 0.5 ml el agua formara una capa cuya interfase se observará cuando el gel este polimerizado.
- 7) Una vez polimerizado inclinar el armazón para desalojar el agua.
- 8) Lavar la superficie del gel con agua.
- 9) Adicionar 1 ml.de solución F
- 10) Dejar reposar el gel unos minutos

## **Preparación del gel separador**

- 11) Vaciar el líquido de la superficie del gel
- 12) En un vaso de precipitados agregar 1.66 de solución A 2.5 ml de la solución C 0.1 ml de SS 10% (sol D), 6.1 ml de agua mezclando evitando que se formen burbujas.
- 13) Agregar 5  $\mu$ l
- 14) Adicionar 1 o 2 ml de esta mezcla al armazón para lavar la superficie del gel para drenar el líquido.
- 15) Llenar el armazón
- 16) Insertar el peine cuidando de no generar burbujas bajo los dientes de éste
- 17) Dejar reposar el gel media hora.
- 18) Combinar partes iguales de la muestra de proteína y regulador de tratamiento 2x (sol G).
- 19) Colocar el tubo en un baño de agua hirviendo por 90 segundos.
- 20) Transferir los tubos de las muestras a hielo hasta su uso.

## **12.8.-ELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN-BLOT)**

1. Se cortó una hoja de papel de nitrocelulosa y cuatro hojas de papel filtro absorbente al tamaño del gel
2. Se empapo la membrana de nitrocelulosa colocándola en suficiente agua destilada durante varios minutos empapandola totalmente
3. también se empapo con buffer de transferencia durante 5 minutos
4. El papel absorbente se humedecio remojando en el buffer de transferencia durante 5 minutos
5. El gel , la membrana de nitroocelulosa, el papel filtro y las almohadillas de soporte se sumergieron en el buffer de transferencia para asegurarse de que estuvieran totalmente humedecidas. Se cuidó de que no se formaran burbujas y las producidas se eliminaron.
6. Se ensambló el sándwich completo en el recipiente de transferencia , cuidando que todos los componentes estuvieran húmedos y herméticamente ensamblados

7. Se colocó el sándwich completo en el recipiente de transferencia con la membrana del lado del electrodo positivo
8. Se transfirió a 15 volts durante toda la noche y se aumentó a 140 volts durante una hora más .
9. Después de la transferencia, se desconectó la fuente de poder. El sándwich se desensambló y la membrana de nitrocelulosa se marcó con un recorte en la esquina inferior izquierda.
10. El gel de poli(acrilamida) se tiñó con azul de Coomassie para verificar la transferencia.

#### Tinción de la membrana de nitrocelulosa

1. Para teñir se preparó un stock concentrado de rojo de ponceau (al 2%), la solución se diluyó 1:10 con agua y se preparó la solución de trabajo.
2. La hoja de nitrocelulosa se lavó enseguida en la solución de rojo de Ponceau se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente
3. Se transfirió la hoja de la hoja a PBS y se lavó por 1 a 2 minutos con varios cambios de PBS
4. Se marcó la posición la posición de la transferencia y los marcadores de peso molecular

#### Bloqueo de sitios inespecíficos

1. Se lavó la membrana varias veces con PBS
2. Se adicionó la solución de bloqueo (Gelatina al 2% y ovoalbumina al 3%)
3. Se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 2 horas

#### Adición del anticuerpo

1. se removió el blot de la solución de bloqueo y se lavó dos veces durante 5 minutos cada vez a temperatura ambiente y agitación con PBS-tween
2. Las muestras de suero se diluyeron 1:10 en PBS
3. Se incubaron las muestras de suero durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación
4. Se realizaron cuatro cambios con PBS-tween durante 5 minutos cada uno con agitación constante a temperatura ambiente

### Adición del conjugado

1. Se hizo una dilución 1:1500 del conjugado de anti IgG de ratón.peroxidasa de rabano en PBS
2. Se incubaron por espacio de 1 hora con agitación constante y a temperatura ambiente.
3. Se realizaron cuatro cambios con PBS-tween durante 5 minutos cada uno con agitación constante a temperatura ambiente

### Detección:

1. Justo antes de desarrollar el inmunoblot, se disolvieron 6 mg de 3,3'-diaminobencidina (DBA) en 10 mL de PBS
2. Se le adicionaron 10 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.
3. El blot se revelo a temperatura ambiente con agitación hasta la visualización de las bandas
4. La reacción se detuvo, removiendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por lavado con PBS

## 12.9 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Antes del sacrificio de los ratones se observaron las lesiones visibles con ayuda de una lupa y se clasificaron como cataratas, procesos, procesos inflamatorios y pérdida de ojo. Se hicieron marcas con perforaciones en la oreja de tal manera que se pudiera identificar al ratón. Los ratones se anestesiaron en cámara de eter etílico y se sangraron totalmente se sacrificaron en la cámara de eter y se les corto la cabeza ya marcada colocándolos en formalina se sacaron los ojos se colocaron en gasa se les colocó una etiqueta, para su futura identificación, de talñ manera que los ojos correspondieran al número del ratón asignado. Los ojos fueron incluidos parafina, cortados a 10  $\mu$ m y se tiñeron con hrmatoxilina-eosina.. se buscó infiltrado de células de la respuesta inmune en estructuras como retina, córnea, uvea. Se usó un microscopio Nikon FX-35DX. En la interpretación se siguió el criterio de Nussemblat et al<sup>53</sup>



## **13.-MATERIAL Y EQUIPO:**

### **13.1.-Material de vidrio de uso común.**

- ♣ Pipetas graduadas 1ml
- ♣ Pipetas graduadas 0.1ml
- ♣ Pipetas Pasteur
- ♣ Vasos de precipitado 100 ml
- ♣ Vasos de precipitado 200 ml
- ♣ Matraces Erlenmeyer 125 ml
- ♣ Tubos de Ensayo
- ♣ Vidrios de reloj
- ♣ Embudos
- ♣ Frascos de vidrio transparentes

### **13.2.-Equipo:**

- ◆ Fuente de poder
- ◆ Potenciometro
- ◆ Espectrofotometro
- ◆ Cámara de electroforesis (owl Scientific)
- ◆ Cámara para electrotransferencias (Bio Rad)
- ◆ Balanza analítica Mettler H80
- ◆ Balanza granataria de un plato Ohaus
- ◆ Micropipetas 5-40  $\mu$ l , 40-200  $\mu$ l Eppendorf
- ◆ Micropipetas 0.1, 100,  $\mu$ l 2-20  $\mu$ l, 10-100 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, Labpette
- ◆ Micropipetas 200-1000  $\mu$ l , Transferpette
- ◆ Pipetas multicanales Costar Octapette
- ◆ Centrifuga Sol-bat modelo J-12
- ◆ Cuarto frío Temperatura de 4°C
- ◆ Lector de placas de ELISA Dynatech

- ◆ Secador de geles de poliacrilamida Slab gel Dryer SGD 4050
- ◆ Congelador horizontal Revco a -20 °C
- ◆ Ultracentrífuga con refrigeración Damon IEC B-20<sup>a</sup>
- ◆ Fuente de luz ultravioleta
- ◆ Plataforma de agitación Bellco Glass
- ◆ Incubadora a 37 °C Riossa
- ◆ Horno de microondas Sharp
- ◆ Microcentrífuga Eppendorf 5414C
- ◆ Fuente de poder BRL
- ◆ Vortex Genie
- ◆ Columna para cromatografía

### **13.3.-Material de Uso Común**

- ♥ Pipetas graduadas 0.1 mL, 1 mL, 10 mL
- ♥ Pipetas Pasteur
- ♥ Vasos de precipitado 50, 100 y 250 mL Matracas Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL
- ♥ Tubos de Ensayo
- ♥ Probetas 10, 50, 100 500 y 1000 mL
- ♥ Frascos ámbar y transparentes
- ♥ Embudos

### **13.4.-OTROS MATERIALES**

- ∅ Gradillas
- ∅ Guantes desechables
- ∅ Papel filtro de poro abierto y poro cerrado
- ∅ Algodón
- ∅ Gasa
- ∅ Hisopos

- ∅ Tijeras
- ∅ Jeringas
- ∅ Papel Filtro Whatman # 40
- ∅ Papel Parafilm
- ∅ Puntas para Micropipeta, 10, 200 y 100  $\mu$ l
- ∅ Tubos eppendorf 500 y 1500  $\mu$ l
- ∅ Mortero c/ pistilo
- ∅ Bisturí
- ∅ Placas de Poliestireno o polivinilo tipo Cooke.

### **13.5.-Material Biológico**

- ♣ Cepa CD1
- ♣ Cepa CD1+
- ♣ Cepa et/et Machos y hembras

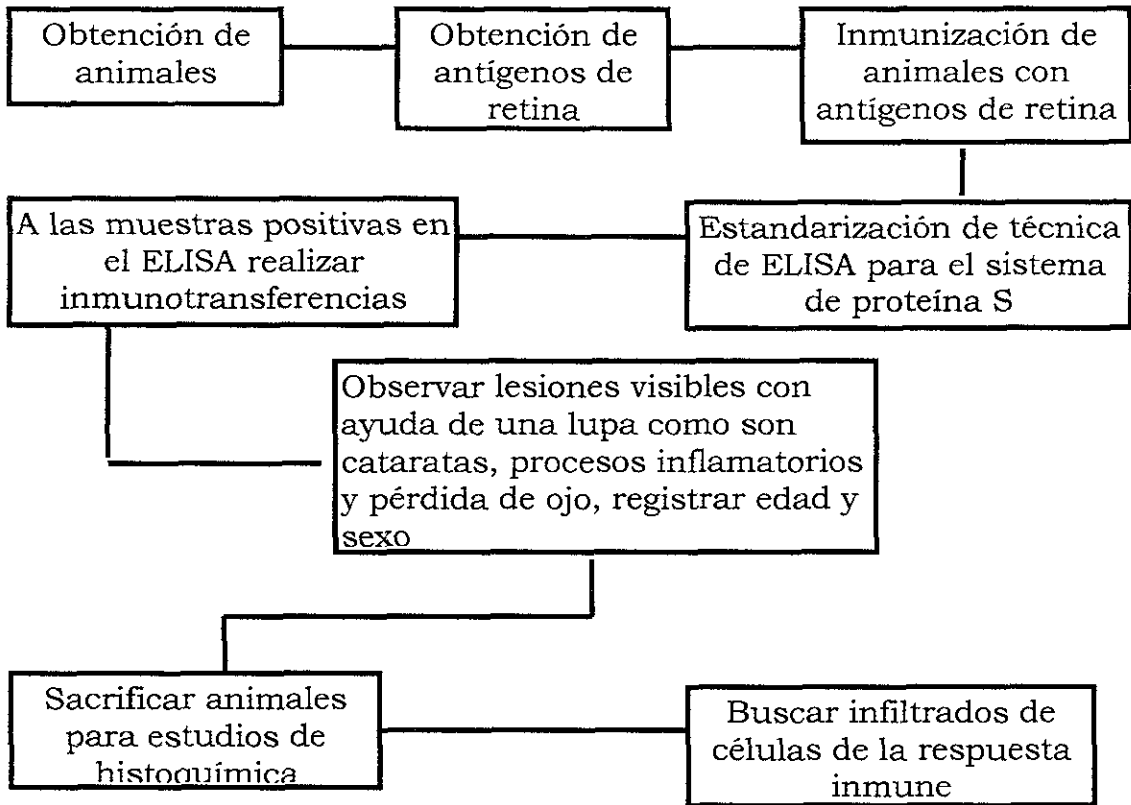
### **13.6.-Reactivos**

- ♣ Cabra anti-Ratón Conjugado a Peroxidasa ,Sigma
- ♣ Acrilamida Sigma
- ♣ N,N -Bis acrilamida Sigma
- ♣ Tris (hidroximetil)amino-metano (TRIS) ,Sigma
- ♣ Dodecilsulfato de sodio (SDS) ,Sigma
- ♣ Persulfato de amonio (APS) ,Sigma
- ♣ -N-N-N-tetrametilendiamino (TEMED) Sigma
- ♣ Glicina ,Sigma
- ♣ Glicerol,Sigma
- ♣ Azul de bromofenol ,Sigma
- ♣ Azul de Coomassie R-250 ,Sigma
- ♣ Carbón activado,Sigma
- ♣ Peroxido de hidrógeno,Sigma

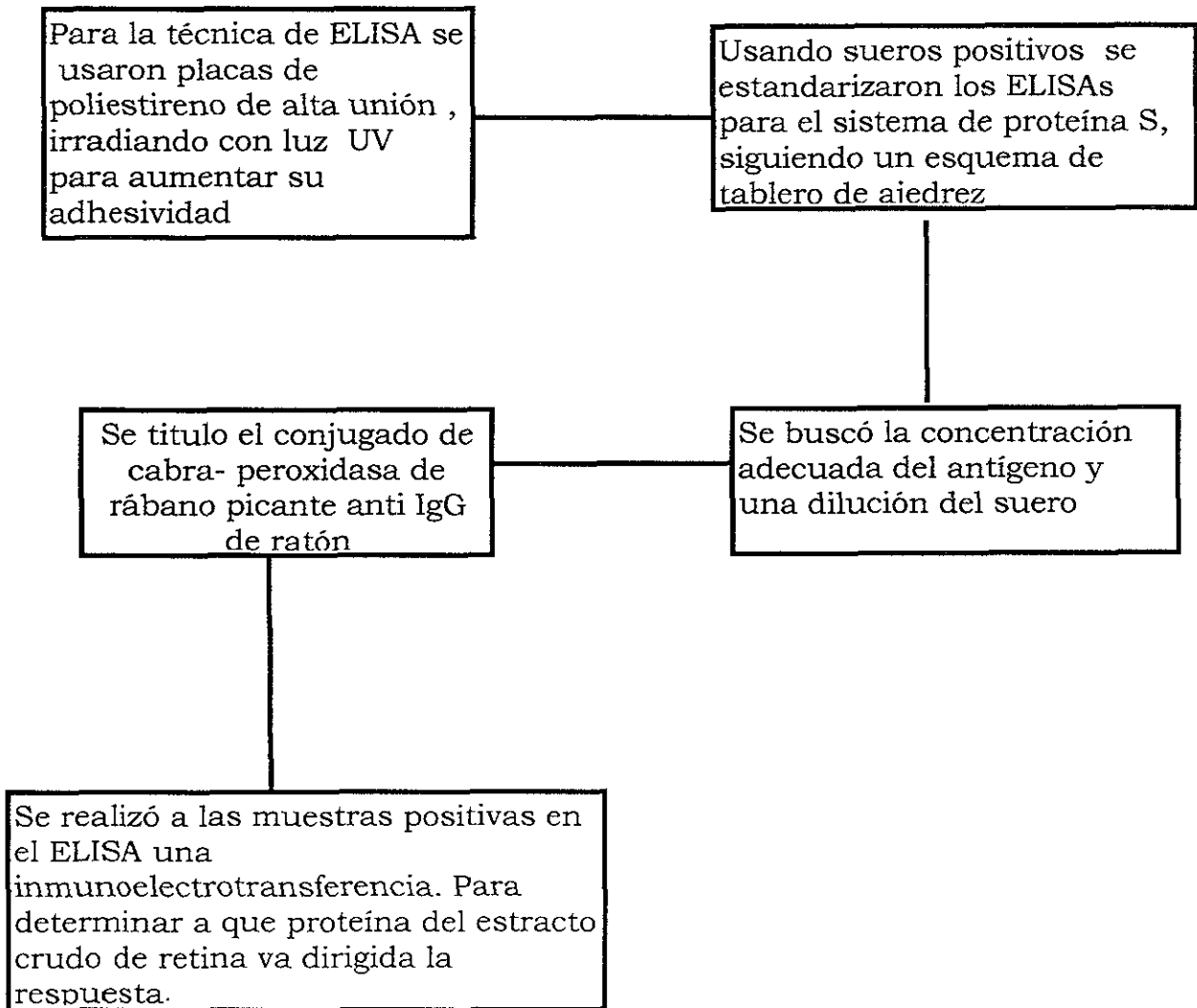
- ♣ Metanol absoluto T.J. Baker
- ♣ Acido acético glacial, T.J. Baker
- ♣ 2-β-mercaptoetanol ,Sigma
- ♣ 4-α- cloro naftol ,Sigma
- ♣ Peróxido de hidrógeno al 30% T.J. Baker
- ♣ 3,3- diaminobencidina,Sigma
- ♣ Acetona, T.J. Baker
- ♣ Etanol , T.J. Baker
- ♣ Marcadores de peso molecular preteñido de 16.5 a 175 Kda ,biolabs
- ♣ Papel de nitrocelulosa de 0.2 μm de poro (BIO-RAD)
- ♣ Fosfato de potasio monobásico. T. J. Baker
- ♣ Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado, T.J. Baker
- ♣ Cloruro de potasio,Técnica Química
- ♣ Cloruro de sodio, Técnica Química
- ♣ Bicarbonato de sodio,Sigma
- ♣ Albúmina Sérica Bovina Fracción V, Merck
- ♣ Acido Cítrico monohidratado, Técnica Química
- ♣ Tween 20 , Sigma
- ♣ Adyuvante completo de freund, Sigma
- ♣ Adyuvante incompleto de freund, Sigma
- ♣ Rojo de Ponceau al 2% en ác. Tricloroacético, Gelman Sciences
- ♣ Fenol, Técnica Química
- ♣ Carbonato de sodio, T.J. Baker
- ♣ Sulfato de cobre pentahidratado
- ♣ Tartrato de sodio y potasio
- ♣ Reactivo de folin
- ♣ Amido negro
- ♣ Aceite de Inmersión, Sigma
- ♣ Acido Clorhídrico, T.J. Baker

- ♣ Acido Sulfúrico, T.J. Baker
- ♣ Formaldehído, Merck
- ♣ Tiras de acetato de celulosa.
- ♣ Amortiguador de recubrimiento
- ♣ Amortiguador de sustrato
- ♣ PBS y PBS-Tween
- ♣ O-fenilendiamina, Sigma
- ♣ Sulfato de amonio, T.J. Baker

## 14.-DIAGRAMA DE FLUJO



## TECNICA DE ELISA E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA



## **15.-Modelo Estadístico.**

La prueba H o prueba de Kruskal-Walis es una prueba de suma de rangos que sirve para probar la hipótesis nula de que k muestras aleatorias independientes provienen de poblaciones idénticas contra la hipótesis alternativa de que no todas las medias de estas poblaciones son iguales; esta prueba no implica la suposición de que las poblaciones de las que se efectúa el muestreo tienen por lo menos aproximadamente distribuciones normales<sup>54</sup>



## 16.-Resultados.

Tabla No. 5

### 16.1.-Observación de Lesiones en Distintas Cepas

<b>Número</b>	<b>Sexo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Ojo</b>	<b>Ojo</b>
1	Hembra	CD1	Normal	Normal
2	Hembra	CD1	Normal	Normal
3	Hembra	CD1	Normal	Normal
4	Hembra	CD1	Normal	Normal
5	Hembra	et/et	Normal	Normal
6	Hembra	et/et	Normal	Normal
7	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado
8	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado
9	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado
10	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado
11	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado
12	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado
13	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado
14	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado
15	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado
16	Macho	CD1	Muerto	
17	Macho	CD1 et/+	Muerto	
18	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
19	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
20	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
21	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
22	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
23	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
24	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
25	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
26	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
27	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
28	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
29	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
30	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
31	Macho	CD1 et/+	Sanos	Sanos
32	Macho	CD1	Sanos	Sanos
33	Macho	CD1	Sanos	Sanos
34	Macho	CD1	Sanos	Sanos
35	Macho	CD1	Sanos	Sanos
36	Macho	CD1	Sanos	Sanos
37	Macho	CD1	Sanos	Sanos
38	Macho	CD1	Sanos	Sanos
39	Macho	CD1	Sanos	Sanos

40	Macho	CD1	Sanos	Sanos
41	Macho	CD1	Sanos	Sanos
42	Macho	CD1	Sanos	Sanos
43	Macho	CD1	Sanos	Sanos
44	Macho	CD1	Sanos	Sanos
45	Macho	CD1	Sanos	Sanos
46	Macho	CD1	Sanos	Sanos
47	Macho	CD1	Sanos	Sanos
48	Macho	CD1	Sanos	Sanos
49	Macho	CD1	Sanos	Sanos
50	Macho	CD1	Sanos	Sanos
51	Macho	CD1	Sanos	Sanos
52	Macho	et/et	Sanos	Sanos
53	Macho	et/et	Sanos	Sanos
54	Macho	et/et	Inflamado	Sanos
55	Macho	et/et	Sanos	Sanos
56	Macho	et/et	Sanos	Sanos
57	Macho	et/et	Sanos	Sanos
58	Macho	et/et	Inflamado	Catarata
59	Macho	et/et	Inflamado	Catarata
60	Macho	et/et	Inflamado	Sanos
61	Macho	et/et	Sanos	Sanos
62	Macho	et/et	Sanos	Inflamado
63	Macho	et/et	Inflamado	Perdido
64	Macho	et/et	Inflamado	Catarata
65	Macho	et/et	Sanos	Sanos
66	Macho	et/et	Perdido	Catarata
67	Macho	et/et	Muerto	
68	Macho	et/et	Inflamado	Sanos
69	Macho	et/et	Sanos	Sanos
70	Macho	et/et	Sanos	Sanos
71	Macho	et/et	Sanos	Inflamado
72	Hembra	et/et	Sanos	Sanos
73	Hembra	et/et	Inflamado	Catarata
74	Hembra	et/et	Sanos	Sanos
75	Hembra	et/et	Sanos	Inflamado
76	Hembra	et/et	Sanos	Perdido
77	Hembra	et/et	Sanos	Sanos
78	Hembra	et/et	Sanos	Catarata
79	Hembra	et/et	Catarata	Sanos
80	Hembra	et/et	Catarata	Sanos
81	Hembra	et/et	Catarata	Sanos
82	Hembra	et/et	Perdido	Sanos
83	Hembra	et/et	Sanos	Inflamado
85	Hembra	et/et	Sanos	Sanos

86	Hembra	et/et	Sanos	Sanos
87	Hembra	et/et	Sanos	Sanos
88	Hembra	et/et	Sanos	Sanos

**Tabla No. 6**  
**16.2.-Resultados de ELISAS**

Número	Sexo	Cepa	Ojo	Ojo	Absorbancias
1	Hembra	CD1	Normal	Normal	0.172
2	Hembra	CD1	Normal	Normal	0.194
3	Hembra	CD1	Normal	Normal	0.134
4	Hembra	CD1	Normal	Normal	0.153
5	Hembra	et/et	Normal	Normal	0.307
6	Hembra	et/et	Normal	Normal	0.369
7	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado	0.266
8	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado	0.312
9	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado	0.255
10	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado	0.302
11	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado	0.280
12	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado	0.259
13	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado	0.267
14	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado	0.230
15	Hembra	et/et	Inflamado	Inflamado	0.217
16	Macho	CD1et/+			-
17	Macho	CD1et/+			-
18	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.053
19	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.035
20	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.080
21	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.038
22	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.079
23	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.043
24	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.059
25	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.130
26	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.043
27	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.180
28	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.090
29	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.125
30	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.143
31	Macho	CD1et/+	Sanos	Sanos	0.102
32	Macho	CD1	Sanos	Sanos	0.173
38	Macho	CD1	Sanos	Sanos	0.035
40	Macho	CD1	Sanos	Sanos	0.134
46	Macho	CD1	Sanos	Sanos	0.043
47	Macho	CD1	Sanos	Sanos	0.030

48	Macho	CD1	Sanos	Sanos	0.035
49	Macho	CD1	Sanos	Sanos	0.025
50	Macho	CD1	Sanos	Sanos	0.019
51	Macho	CD1	Sanos	Sanos	0.137
58	Macho	et/et	Inflamado	Catarata	0.326
59	Macho	et/et	Inflamado	Catarata	0.390
60	Macho	et/et	Inflamado	Sanos	0.298
62	Macho	et/et	Sanos	Inflamado	0.287
63	Macho	et/et	Inflamado	Perdido	0.392
64	Macho	et/et	Inflamado	Catarata	0.221
66	Macho	et/et	Perdido	Catarata	0.198
67	Macho	et/et	-	-	
68	Macho	et/et	Inflamado	Sanos	0.217
71	Macho	et/et	Sanos	Inflamado	0.202
73	Hembra	et/et	Inflamado	Catarata	0.225
75	Hembra	et/et	Sanos	Inflamado	0.179
76	Hembra	et/et	Sanos	Perdido	0.189
78	Hembra	et/et	Sanos	Catarata	0.366
82	Hembra	et/et	Perdido	Sanos	0.220
83	Hembra	et/et	Sanos	Inflamado	0.388

### 15.3.-Fotos de Lesiones



**Fig. D.Ojo Inflamado**



**Fig. F.Ojo Perdido**

## **Fotos de Lesiones**

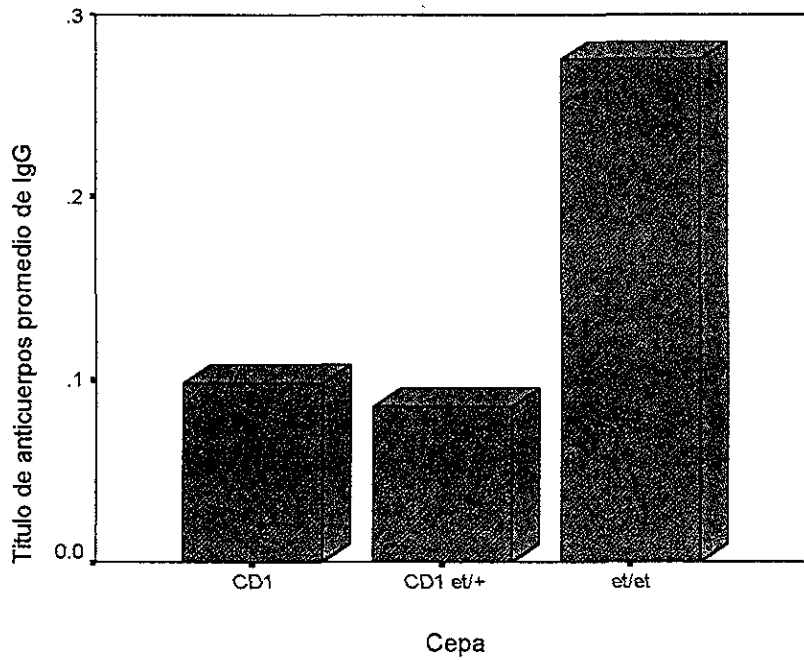


**Fig. E.Ojo con Catarata**

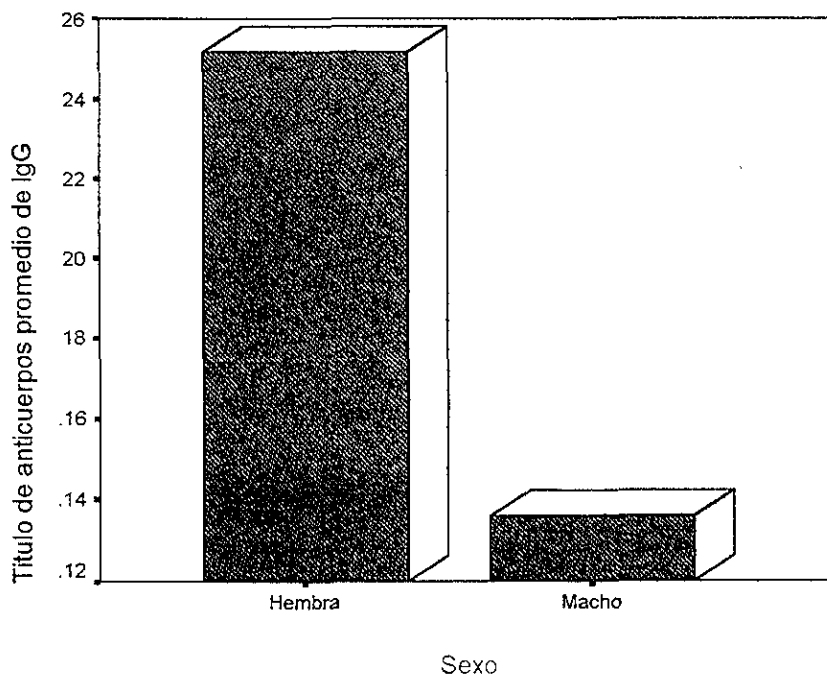


**Fig.C.Ojo Sano**

## GRAFICAS

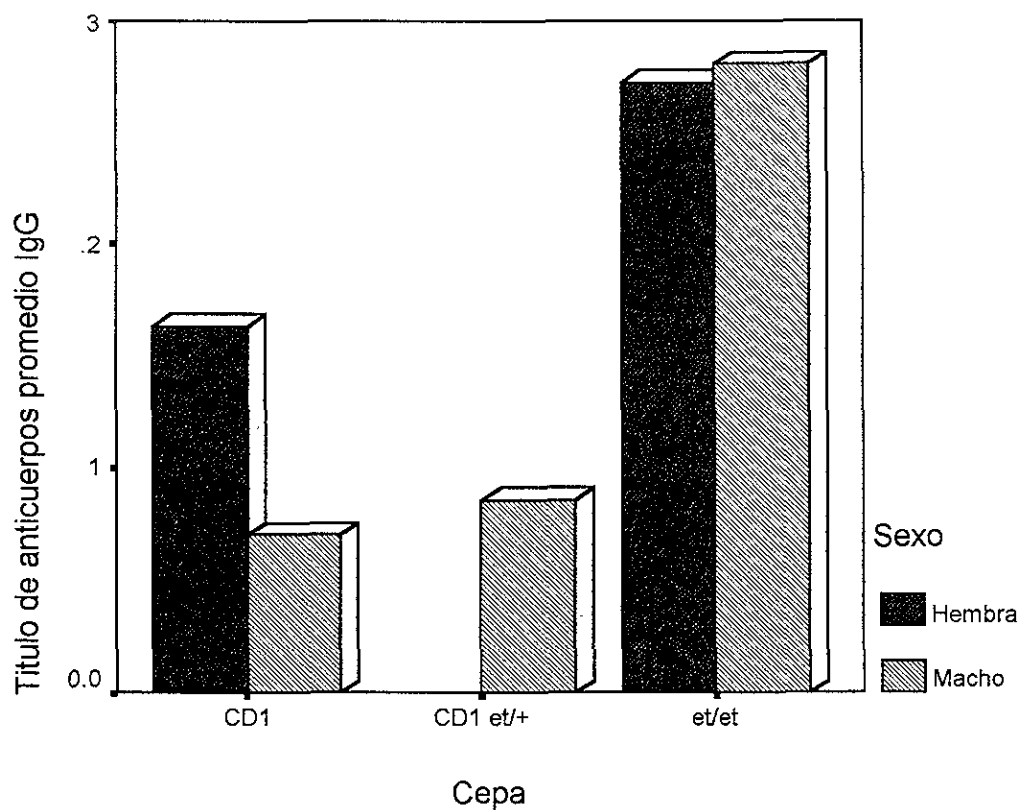


Gráfica No.1. Título de anticuerpos IgG en función de la cepa.



Gráfica No.2. Título de anticuerpos IgG en función del sexo.

Gráfica No.2. Título de anticuerpos IgG en función del sexo.



Gráfica No.5. Título de anticuerpos IgG en función de la cepa, agrupando por sexo.



## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cepa	Casos	Rango promedio
CD1	13	14.31
CD1/et+	14	13.93
et/et	25	39.88

Tabla A Rangos promedio del título de anticuerpos IgG contra proteína S de retina en función de la cepa.

El título de anticuerpos es diferente al menos en la cepa et/et.

$\chi^2$	G. L.	p
37.53	2	0.000

Tabla B Correlación del título de anticuerpos IgG contra proteína S de retina de en función de la cepa.

Lesión	Casos	Rango promedio
Sano	29	16.45
Inflamado	14	38.43
Catarata	5	43.80
Pérdido	4	36.00

Tabla C Rangos promedio del título de anticuerpos IgG contra la proteína S de retina en función de la lesión.

$\chi^2$	G. L.	p
29.5193	3	0.000

Tabla D Correlación del título de anticuerpos IgG contra proteína S de retina de en función de la lesión.

Sexo	Casos	Rango promedio
Hembra	20	36.30
Macho	32	20.38

Tabla E Rangos promedio del título de anticuerpos IgG contra la proteína S de retina en función del sexo.

$\chi^2$	G. L.	p
13.5906	1	0.0002

Tabla E Correlación del título de anticuerpos IgG contra proteína S de retina de en función del sexo.

Cepa	Casos	Rango promedio
CD1	13	15.00
CD1/et+	14	15.00
et/et	26	39.46

Tabla F Rangos promedio de lesión en función de la cepa.

$\chi^2$	G. L.	p
33.2308	2	0.000

Tabla G Correlación de las lesiones en función de la cepa.

Sexo	Casos	Rango promedio
Hembra	20	33.05
Macho	32	23.03

Tabla H Rangos promedio de lesión en función del sexo.

$\chi^2$	G. L.	p
33.2308	2	0.000

Tabla I Correlación de las lesiones en función del sexo.

### 16.3.-Cortes Histológicos



Fig G.Retina Normal



Fig.H.Retina Dañada  
Cortes Histológicos

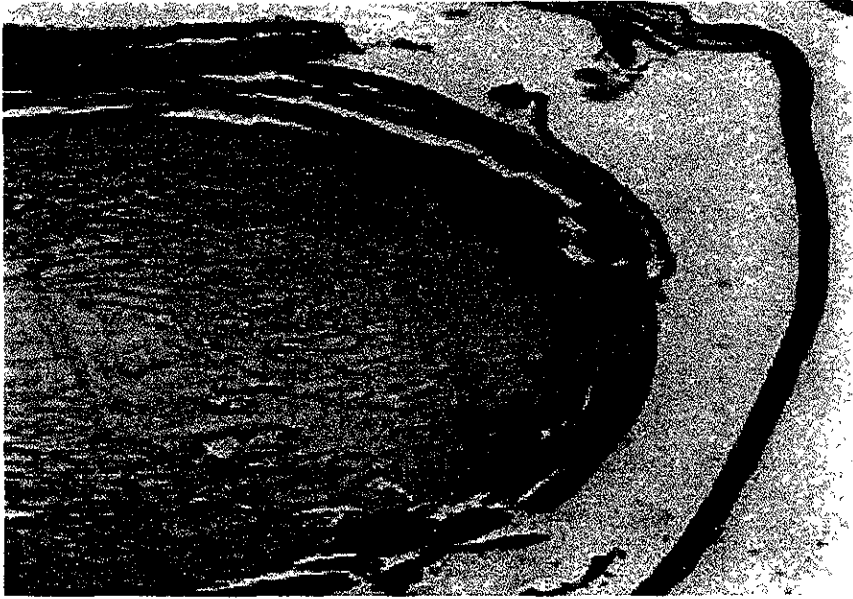


Fig.I.Córnea Normal de Un Ojo Sano 20x

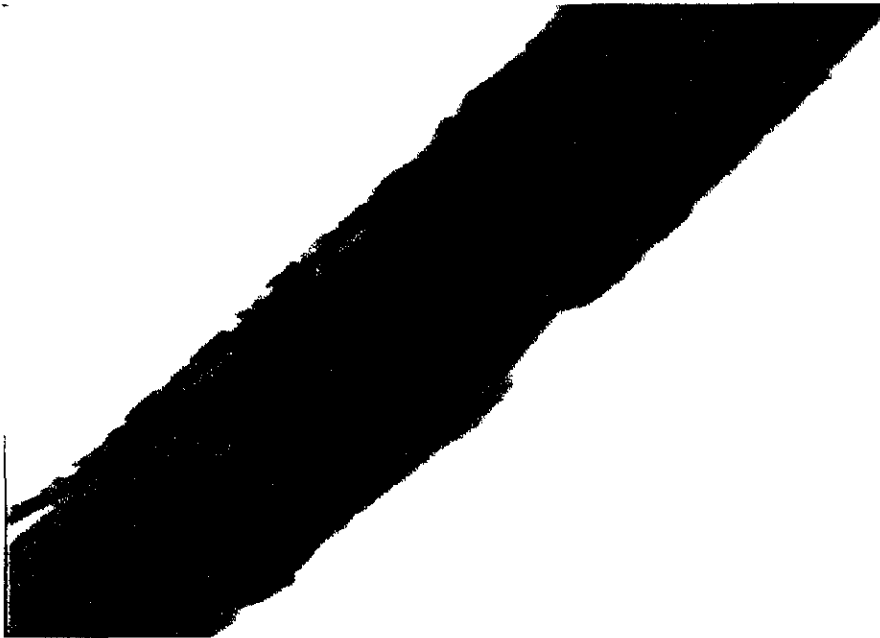


Fig. I,1.Córnea Normal de Un Ojo Sano 200x

Cortes Histológicos

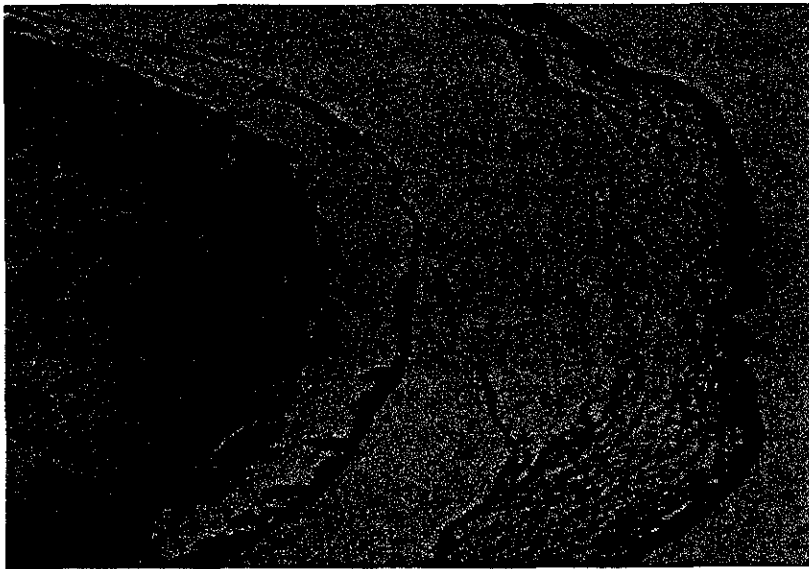


Fig. J. Córnea de Ojo Inflamado

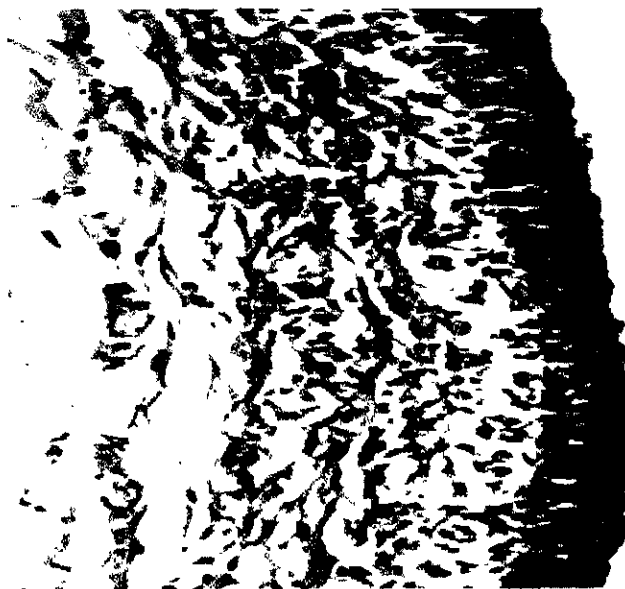


Fig. J.1. Córnea de Ojo Inflamado 100x



Fig.J. Córnea de Ojo Inflamado 200x

En cuanto a los resultados del estudio histopatológico en la fig.G se muestra un corte histológico del ojo sano y una ampliación de la córnea en donde se muestra el epitelio compacto, se pueden observar algunos núcleos de queratinocitos y de fibroblastos. En la fig.J observamos una córnea muy laxa, producto de edema y en la ampliación se puede observar un gran infiltrado de células mononucleares y polimorfonucleares, esta misma imagen se presenta tanto en ojos inflamadas como con catarata. En la fig,G muestra como se observa una retina de ojo sano, en la cual pueden verse perfectamente limitadas sus capas, mientras que en los ojos inflamados la división entre las capas se pierde debido al infiltrado celular, esta imagen corresponde a una uveorretinitis.

**16.4.-ELECTROFORESIS DE PROTEINAS DE RETINA**

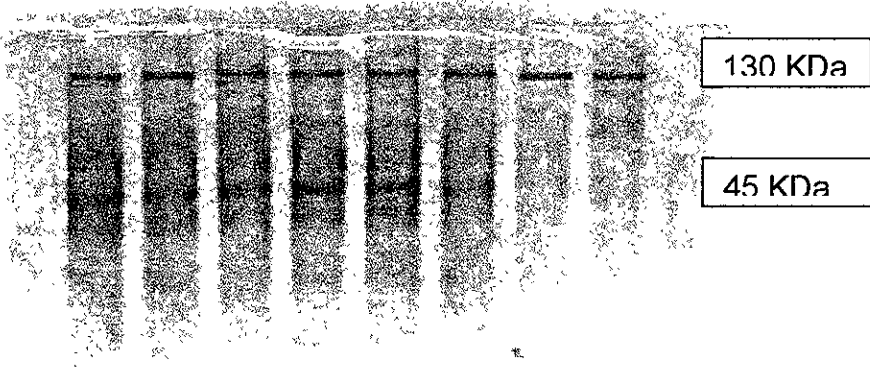


Fig K. Corrimiento Electroforético

## 16.5.-Técnica de Western Blot

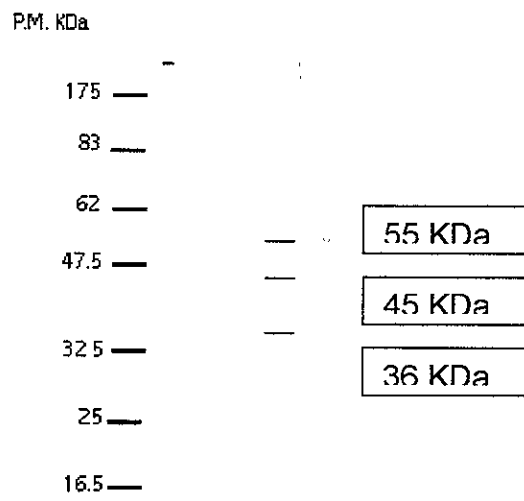


Fig. L INMNOELECTROTRANSFERENCIA



## 17.-Discusión de Resultados

Con base a los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA, se observa que el título de anticuerpos IgG dirigidos contra la proteína S de retina en función de la cepa hay mayor respuesta en la cepa et/et siguiéndole la cepa CD1/et+ (portador del gen de hipotímia), esta pudiera deberse a la presencia de genes codominantes presentes en cada cepa.

Con respecto a la grafica No. 4 el título de anticuerpos IgG dirigidos contra la proteína S de retina en función del sexo, observamos mayor respuesta en las hembras que en los machos, en humanos el sexo femenino es quien presenta mayor predisposición a padecer enfermedades autoinmunes según literatura reportada aunque pudiera pensarse que hubiera una disminución en cuanto a la respuesta por la actividad hormonal sin embargo no es así, este padecimiento uveítico esta relacionado con una deficiencia inmunitaria y no con una alteración de tipo hormonal. En cuanto al comportamiento de las hembras son menos agresivas que los machos entre su mismo sexo, por lo que en hembras facilita la manipulación y mantenimiento de la cepa.

En cuanto al cuadro clínico observado debido a las distintas lesiones (inflamado, catarata y perdida del ojo) el título de anticuerpos IgG dirigidos contra la proteína S de retina se vio aumentada la respuesta en el ojo inflamado siguiendo la lesión de catarata y menor respuesta en ojo perdido, esto nos lleva a pensar que tenemos la presencia de una uveítis de tipo autoinmune, la cual corroborarla con el estudio histopatológico realizado en retina durante el proceso inflamatorio hecho en los ratones hipotímicos cepa et/et, observando en dichos cortes un abundante edema e infiltrado celular de células polimorfonucleares tanto en córnea como en retina.

También observamos que en la cepa et/et , en algunos animales no se observó lesión alguna en ninguno de los ojos catalogándolos como "sanos" pero si se obtuvieron títulos de anticuerpo IgG dirigidos contra la proteína S de retina altos, esto pudiera deberse a diversos factores que favorecieran la observación de lesiones como son de tipo genético , nutricional, la edad. Este último

parámetro observado pudiera estar relacionado con que el tiempo de desarrollo no fue suficiente para que se manifestaran las lesiones, es evidente que en ratones con mayor edad siempre es observada algún tipo de lesión .

Se realizó un corrimiento electroforético de la proteína S de retina (antígeno) en un gel de poliacrilamida. Se observaron dos bandas muy definidas una de 45 KDa que corresponde a la proteína S de retina y la IRBP (interfotoreceptor retinoide) de 130 KDa

Al realizar la técnica de inmunoelectrotransferencia se observaron tres bandas una de 55 KDa, otra de 45 KDa y la ultima de 36 KDa , la de 45 KDa corresponde a la proteína S de retina por lo que confirmamos la presencia de esta proteína involucrada en el desarrollo de la enfermedad de uveítis autoinmune experimental..

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
LABORATORIO DE ENFERMEDADES Oculares

## 18.-CONCLUSIONES

Existe diferencia significativa entre el título de anticuerpos IgG dirigidos contra la proteína S de retina en función de las cepas et/et presentando esta mayor respuesta debido al reconocimiento de anticuerpos IgG dirigidos contra la proteína S de retina , comparada con las cepas CD1 et/+ (portador del gen de hipotímia) y CD1 por la técnica de ELISA.

No hay una íntima relación entre las lesiones observadas y el título de anticuerpos.

Existe una diferencia significativa entre el título de anticuerpos IgG dirigidos contra la proteína S de retina con respecto al sexo, siendo las hembras quienes presenta mayor respuesta.

Las lesiones observadas en los ratones hipotímicos como inflamación y catarata al hacerles el estudio histopatológico presentaron infiltrados celulares de células polimorfonucleares y mononucleares tanto en córnea como retina lo cual corresponde a una uveorretinitis.

La técnica de inmunoelectrotransferencia resulta ser una técnica específica y confirmatoria de la presencia de la proteína S de retina la cual interviene en el desarrollo de la uveítis autoinmune experimental.

## **19.-GLOSARIO**

**ANTICUERPO.** (Ac) Molécula sintetizado por los linfocitos B y por los plasmocitos; específica de un antígeno estimulado e implicado.

**ANTÍGENO.** Producto que provoca en un individuo, una respuesta inmune y reacciona con el producto de esta respuesta.

**COMPLEJO INMUNE.** Asociación de gran número de moléculas de antígeno y de anticuerpos específicos

**CICLITIS.** Inflamación del cuerpo ciliar.

**CORIORRETINITIS.** Inflamación de la coroides y la retina, retinocoroiditis.

**HAPTENO.** Localización del antígeno separado del resto de la molécula (equivalente a un determinante aislado).

**CLON.** Una o un gran grupo de células, organismos o plantas genéticamente idénticas derivadas por reproducción vegetativa a partir de un único progenitor; también una población de DNA derivada de una única molécula híbrida de DNA (vector recombinante, q.v) por replicación en una eucariótica o célula huésped bacterial.

**ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.** Estudio de las proteínas del suero sometidas a la influencia de un campo eléctrico.

**INMUNOGENICIDAD.** Propiedad de provocar una respuesta inmune.

**INMUNOGENO.** Producto que provoca una inmunorespuesta.

**INMUNOGLOBULINA.** Molécula dotada de actividad de anticuerpos.

**IRITIS.** Inflamación del iris caracterizada generalmente por dolor, congestión de la región ciliar, fotofobia, contracción de la pupila y alteraciones en el color del iris.

**IRIDOCICLITIS.** Inflamación del iris y del cuerpo ciliar; uveítis anterior.

**LINFOCITOS (T Y B).** leucocito responsable de la inmunidad específica.

**LINFOQUINAS.** Producto sintetizado por los linfocitos T estimulados e implicados en algunas reacciones inmunitarias

**OFTALMOPATIA.** Cualquier enfermedad del ojo

**PROTEÍNA.** producto biológico constituido por aminoácido

**RETINITIS.** inflamación de la retina, el término se empleaba en la literatura oftalmológica antigua para indicar alteraciones de la visión , edema y exudación en la retina y en ocasiones hemorrágica retiniana.

**SUERO.** Parte líquida de la sangre desprovista de células tras la coagulación.

**TRACOMA.** Enfermedad infecciosa crónica de conjuntiva y córnea que produce fotofobia, dolor y lagrimeo causada por un microorganismo que antes se consideraba un virus, pero que ahora se clasifica como cepa de la bacteria *Chlamydia trachomatis*.

Desde el punto de vista clínico puede dividirse en cuatro etapas (Mac Callan):

- 1) Infección leve caracterizada por folículos minúsculos sobre la conjuntiva palpebral e infiltración subepitelial.
- 2) Aumento de tamaño de los folículos y cambios inflamatorios que forman duras papilas rojas por lo general con invasión vascular de la córnea que indica la iniciación de paño córneoal.
- 3) Retracción cicatrización y contracción grave que da por resultado el peligro de ceguera.
- 4) Detención total con retracción cicatrizal permanente, y párpados granulosos.

**ONCOCERCOSIS.** Trastorno consistente en infección por gusanos del género *Onchocerca*. La infección humana es causada por *O.volvulus*. en la infección importante, aparecen nódulos subcutáneos firmes.

**PLEXO COROIDEO.** Repliegues de vasos sanguíneos de la piemadre, cubiertos por una delgada capa de células ependimarias que forman proyecciones en mechones hacia los ventrículos tercero, cuarto y laterales del cerebro secretan el líquido cefalorraquídeo, V. plexo coroideo del ventrículo y plexo coroideo del tercer ventrículo.

**XEROFTALMIA.** Sequedad de conjuntiva y córnea a causa de deficiencia de vitamina A, el trastorno se inicia con ceguera nocturna y xerosis conjuntival y progresa hasta xerosis corneal y en etapas finales queratomalacia.

## 20.-APENDICE

### Preparación de Reactivos

Reactivo para la determinación de proteínas por el método de Lowry.

(Lowry y col., 1951)

**Solución A:** Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1N

**Solución B:** Sulfato de cobre pentahidratado al 1% y tartrato de sodio y potasio al 2%

Se prepara el sulfato de cobre y el tartrato de sodio y potasio por separado y cuando se va a usar se mezclan por partes iguales; obteniéndose así la solución B.

**Solución C:** Se prepara con 50 ml de la solución A y 1 ml de la solución B

**Solución D:** Diluir 2 ml del reactivo de fenol en 2 ml de agua destilada

**Solución E:** Albúmina sérica bovina a una concentración de 1 mg/ml

### Reactivos para la Realización de Geles de Poliacrilamida

**Solución A:** Monómero de acrilamida

Acrilamida	29 g
Bis-acrilamida	1.0 g

Llevar a 100 ml con agua desionizada, aforar hasta que la solución este a temperatura ambiente. Filtrar la solución después de aforar usando membrana de 0.52  $\mu\text{m}$ . Guardar a 4°C, no más de un mes.

**Solución B:** Regulador del gel separador 10X. Tris-HCl 1.5M, pH 8.8

Tris base	18.15 g
Agua destilada	90 mL

Se ajusta el pH con HCl 6N. Se afora a 100 ml. Se filtra con papel Whatman #1 y se guarda a 4°C.

**Solución C:** Regulador del gel concentrador 5X. Tris-HCl 0.5M, pH 6.8

Tris base	3.0 g
Agua destilada	40 ml

Se ajusta el pH con HCl 6N. Se afora a 50 ml. Se filtra con papel Whatman #1 y se guarda a 4°C

**Solución D:** SDS al 10% (dodecil-sulfato de sodio)

SDS	10 g
Agua desionizada	

Disolver hasta completar el volumen de 100 mL

Filtrar con papel filtro después de aforar. Guardar a temperatura ambiente.

**Solución E:** Persulfato de amonio (PSA)

Persulfato de amonio	20 mg
Agua desionizada	200 µl

**Solución F:** TEMED

TEMED	65 µl
-------	-------

**Solución G:** Regulador de muestra 2X

Solución C	1 ml
Solución D	0.4 ml
Glicerol 50%	0.4 ml
2-β-mercaptoetanol	0.02 ml
Azul de bromofenol 0.2%	0.1 ml
Agua	0.08 ml

Mezclar los componentes, colocar en volúmenes de 1 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml y almacenarlos a -20°C.

**Solución H:** Regulador de desarrollo (Tris-HCl 0.025M, pH 8.3, glicina 0.192M, SDS 0.1%)

Tris	12 g
Glicina	57.6 g
SDS 10%	40 mL
Agua desionizada	4 L

**Solución I:** Colorante Azul de Coomassie R-250 al 1% (stock)

Azul de Coomassie	2.0 g
Agua destilada	200 mL

**Colorante** (Azul de Coomassie R-250 0.125%, MeOH 50%, ácido acético 10%)

Azul de Coomassie	62.5 mL de la solución stock
MeOH	250 mL
Acido acético	50 mL
Agua destilada	500 mL

**Solución decolorante I:** (MeOH 50%, ácido acético 10%)

MeOH	500 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	1000 mL

**Solución decolorante II** (MeOH 5%, ácido acético 7%)

MeOH	700 ml
Acido acético	500 mL
Agua destilada	10 L



## **INMUNOELECTROTRANSFERENCIA**

Buffer de transferencia

Concentración para 1000 mL

Tris	50 mM	5.8 g
Glicina	380 mM	29.0 g
SDS	0.1 % (p/v)	1.0 g

Metanol

Se lleva hasta 1000 mL con agua bidestilada

### **Solución colorante , solución concentrada al 25 de Rojo de Ponceau**

Rojo de Ponceau	2.0 g
Acido tricloroacético	30.0 mL
Acido sulfosalicilico	30.0 g

Completar el volumen hasta completar 100 mL con agua bidestilada

### **Buffer de detección. 3,3'-diaminobencidina (DBA)**

3,3'-diaminobencidina	6.0 mg
PBS	10.0 mL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	10.0 µL

Se prepare hasta el momento de su uso

### **Solución Salina 0.14 M**

NaCl	8.5 mL
------	--------

Diluir a 1 L con agua destilada.

## **REACTIVOS PARA ELISA**

Amortiguador de recubrimiento (carbonato-bicarbonato pH 9.6)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59 g

Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 2.93 g

Llevarlo a 1 L de agua bidestilada. Puede almacenarse a 4°C por no más de dos semanas .

## **PBS Amortiguador de fosfatos pH 7.4**

NaCl 8.0 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . 12H<sub>2</sub>O 2.9 g

KCl 0.2 g

Disolver hasta completar a 1 litro con agua bidestilada,. Puede almacenarse a 4°C por no más de dos semanas .

## **PBS-tween. Amortiguador de fosfatos pH 7.4**

NaCl 8.0 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . 12H<sub>2</sub>O 2.9 g

KCl 0.2 g

Tween 20 0.5 mL

Disolver hasta completar a 1 litro con agua bidestilada,. Puede almacenarse a 4°C por no más de dos semanas .

## **Buffer de sustrato para peroxidasa de rabáno pH 5.0**

Acido cítrico 0.1 M 24.3

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M 25.7

El amortiguador se prepara justo antes de su uso

### **Sustrato para peroxidasa de rabano**

Buffer de sustrato	100 mL
O -fenilendiamina	40.0 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	40.0 μL

Esta solución es fotosensible por lo que se prepara justo antes de su uso

## 1.-REFERENCIAS:

- Puig C.M. Diagnóstico Etiológico de las Uveítis Endogenas. *Anales Soc Mex* 1960; 3:127
- Dernouchamps J P. L' Inmunite Cellulaire et humorale dans l'uveite. *J Fr Ophthalmol* 1979; 2: 297-309.
- Amsler M. Verrey F. Fuber A. L' Humeur Aqueuse et ses Functions Rapport a la Societe Fran caise Ophthalmologique. Mossan Paris 1955.
- Witmer R. Antibody Formation in the Rabbits Eye Studied With Fluorescein Labeled antibody. *Arch Ophthalmol* 1955; 53: 811-815.
- Witmer R. Iwamoto T. Electron Microscope Observation of Herpes Like particles in the iris. *Arch Ophthalmol* 1968;74:331.
- Campinch ch. L'uveite. *Soc Fr Ophthalmol*. 1970
- Martenet A C . Le traitement des Inflammations de l'uveitis. *Jr Fr Ophthalmol* 1979; 2: 369-377.
- Dernouchamps J P. Michiels J. Circulatin Antigen-Antibody Complexes in aqueous Humor their Detection and Their Significance in Various Ocular disorder. 2d International Symposium on The Immunology and Immunopathology of the Eye. San Francisco. 1978.
- 0.-Devron H. Stein P. Masir J. "y col". Immune Complexe in Uveitis. *An J Ophthalmol* 1979; 87: 678-681.
- 1.-Nussenblat R. Cevarios H. Gery I Altered Suppresor Cell Activities in Uveitis *Lancet* 1980; 4: 722-724.
- 2.-De Grandmont G.M. Nature Microbiane Ophthalmics Profundes. *Arch Ophthalmol* 1983; 12:623.
- 3.-Ohnos Kimure S. O'Connor R. Devron Ch. HLA Antigens and Uveitis. *Br J Ophthalmol* 1977; 61: 62-64.
- 4.-Hogan H J. Wood is Godfrey W A Aqueous Humor Citology in Uveitis. *Arch Ophthalmol* 1973; 84 217

- 5.-Amsler M. Verrey F. Fuber A. L' humeur Aqueuse et ses Functions Rapport a la Societe Fran Caise Ophthalmologique. Mossan Paris 1955.
- 5.-Von Sallman. Ingrid Falk. Alexandre J. Thomas Barthlott. christiaanN. Inmature T cell in Peripheal Lymphoid organs of Recombinase-Activating gene 1/-2-Deficient mice. J. Immunology. 1996. 1362-1368.
- 7.-Yamakawa N, Tanaka T, Hijikata S, Konoeda Y. Usui M. Ann Investigation of Factor in the pathogenesis of experimental autoimmune Uveorretinitis (EUA) in congenic mice. Nippon Gankai Zasshi 1994; 98: 760-764.
- 3.-Dorland. Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina. 27a ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. 1992.
- D.-Kimber G Stackpole. Miller A. Marjorie J. Manual de Anátomia y Fisiología. 3a de. La Prensa Medica Mexicana 1992
- 1.-Riordan Eva P, Vaughan D. G. eye en Tierney L.M. et al current medical diagnostic treatment Appleton and lange Norwalk, Connecticut USA. 1993
- 2.-Sherris C. John. Microbiologia Medica. Introducción a las Enfermedades Infecciosas. Doyma España 1993
- 3.-Stites D. Inmunologia Básica y Clínica. 7a manual Moderno. 1993
- 4.-Abul K Abbas Andrew H Lichtman Jordans Pober. Interamericana. España. 1995.
- 5.-Bach J francois. Inmunología. Limusa. México. 1984.
- 6.-Inmunología. Roitt Ivan, Brostoff Jonathan. 3a de. Masson-Salvat. Medicina. Barcelona 1993.
- 7.-Bennigton Diccionario Enciclopedico del Laboratorio Clínico. Interamericana. Argentina 1991.
- 8.-Medina L. Frecuencia de Ceguera y debilidad visual. Rev. Med Oftalmol 1987; 61:287-289.
- 9.-Lowry O H. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.
- 0.-Sholik A. Stephanie, Palestine G.Alan, Blaese Michael. R., Nussenblatt B. Robert. Treatment Of Experimental Autoimmune uveitis In The Rat with

- Systemic Succinylecetone. *Clinical Immunology And Immunopathology* (1988); 49:63- 71.
- 31.-Boudet F. UV-Treated Polystyrene Microtiter For Use in ELISA to Measure Antibodies Against Synthetic Peptides. *J Immunology Methods*. 1991; 142:73-82.
- 32.-Southern. E. M. Detection Of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.*(1975) Vol 98: 503-517.
- 33.-Wilson V.G. A Rapid Method For Removal Of Excess linkers. *Biotechniques* (1988); Vol. 6: 733-738.
- 34.-Hapton F R., *Sindromes Oculares Y Enfermedades Sistemicas*. Salvat. España. 1990.
- 35.Enguall E .and Perlmann P. Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) *Immunochemistry*. (1971) Vol. 8: 874-979.
- 36.-Newell W.F. *Oftalmología Fundamentos y Conceptos*. 7ª, Mosby. España 1992.
- 37.-Katates., De Smet U. D, et al., Analysis of the pivotal Residues Of The Immunodominant And Highly Uveitogenic Dant Of Intherphotoreceptor Retinoid-Binding Protein. *J. Immunology*. 1991., 146:2995.
- 38.-Flanagan S P. Nude, A. New Hairless Gene With Pleist Effect In The Mouse. *Genet. Res*. 1996;. 8-295.
- 39.-Pantelouris E.M. Thymus Rudiment Of The Athymic Nude Mouse. *Nature*.1975, 256:491-493.
- 40.-Averbach R. *Animal Models Of Immunological Process* Academic Press lond. 1982:: 138-141.
- 41.-Castro B A. Evaluación De Las Poblaciones Celulares De Linfocitos T MedianteC.F. Respuesta Primaria y secundaria a BSA Medida por ELISA Para Caracterizar El Modelo Murini et/et. Tesis Profesional. Fes Zaragoza. UNAM 1995.
- 42.- Rosas P. Castellanos P. And Roberto Domínguez. The Existence Of Espontaneous Hairless (nudes) Hipotymic mutant Mice From The CD1 Strain,

Reared Under Conventional Animal House Conditions. *Med. Sci. Res.* 1987  
15:533-554.

43.-Dumbar B S. Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological  
Techniques. New York. Plenum Press. 1987:67-76.

44.-Harlow E. Lane E. Antibodies a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor  
Laboratory 1988. USA. 471-501, 637-657.

45.-Burnette W N. "Western Blotting": Electrophoretic Transfer Of Protein From  
Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gels To Unmodified Nitrocellulose And  
Radiographic Detection With Antibody And Radioiodinated Protein A. *Anal  
Biochem.* 1981; 112: 195-203

46.-Informe Técnico de la OMS. Internacional Classification Of Impairments  
Disabilities And Handicaps. World Health Organization. Geneva .1980.

47.-Medina L. Frecuencia de Ceguera y Debilidad Visual. *Rev Med Oftalmol.*  
1987; 61:287-289.

48.-Wacker B W. Donosol A. Et al. Identification Of a Uveitopathogenic And  
Lymphocyte Proliferation Site In Bovine S-Antigen. *Cell Immunol.* 1988; 49:63-  
69.

49.-De Kozak. Colab. Inhibition Of experimental Autoimmune Uveoretinitis in  
Rats by S-antigen-specific monoclonal antibodies. *Eur J. Immunol.* Nov. .(1985)  
15(11) 1107-11.

50.-Skolik S a. Palestine A G. Et al. Treatment Of Experimental Autoimmune  
Uveitis In The Rat With Systemic Succinylacetona. *Clin. Immunol.  
Immunopathol.* 1988; 49:63-71

51.-Boudet F. Uv\_Treated Polystyrene microtiter For Use In ELISA To Measure  
Antibodies Against Synthetic peptides. *J. Immunol. Methods* 1991;142:73-82

52.-Rabin B.S. Enzyme3 Linked Immunoassay. En:Manual Of clinical  
laboratory Immunology. Rose N R et al; Fourth Edition American Societe For  
Microbiology. Whashington D.C., 1993.

53.-Nussenblat R B. Rodrigues M M. Wacker W B., Cervario S J. Cyclosporin A  
inhibition Of Experimental Autoimmune Uveitis In Lewis Rats. *J. Clin. Invest.*  
1981; 67:1228-1231.

- 54.-Freund J E. Simon G A. Estadística Elemental 8a. ed. Prentice may. México. 1994: 494-495.
- 55.-Rozens Zajnla y Colab. Induction Of Experimental Autoimmune Uveoretinitis By T-Cell lines. Immunology. April. (1986) 57(4):559-65.
- 56.-Berra. A y Colab. Autoimmune Uveítis. I. Immunochemical Properties Of the Soluble Fraction of bovine retinal. Allergol Immunopathol. (1985) Sert-Oct. 13(5):383-91.
- 57.-Caspi Rachel, Kuwabara. Toichiro,. Nussenblat Robert B. Caracterización of a Supresor Cell Line Which Downgrades Experimental Autoimmune Uveoretinitis in the Rat. Journal Of Immunology. 1988 140(8)April 15 2579-2584.
- 58.-Seder A. Kelsall L. Brian Jankovic Dragana. Differential for IL-12 in the maintenance of immune Responses in infectious Versus Autoimmune Disease. The American Association Of Immunologist (1966).
- 59.-Calder L. V. LightmanL. S. Experimental Autoimmune Uveoretinitis (EUA) *versus* Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE): a Comparison Of T Cell-Mediated Mechanism. Clin. Exp. Immunol. (1992) (6)165-169.
- 60.-Southern. E. M. Detection Of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated By Gel Electrophoresis. J. Mol. Biol. (1975) Vol 98: 503-517.
- 61.-Wilson V.G. A Rapid Method For Removal of Excess Linkers. Biotechniques (1988). Vol. 6: 733-738.