MODELO EXPERIMENTAL

DE CONJUNTIVITIS VERNAL

TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCION DEL GRADO

DE DOCTOR POR:

IGNACIO CARRERAS EGAÑA

DIRECTOR:

PROFESOR DOCTOR D. BUENAVENTURA CARRERAS EGAÑA

D. BUENAVENTURA CARRERAS EGAÑA, PROFESOR TITULAR DE OFTALMOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal designado por la Facultad de Medicina, D. IGNACIO CARRERAS EGAÑA titulada MODELO EXPERIMENTAL DE CONJUNTIVITIS VERNAL ha sido realizada bajo mi dirección durante los cursos de 1982 a 1987, siendo expresion de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones que lo hacen acreedor del titulo de de Doctor simpre que así lo considere el citado tribunal.

Granada a 16 de Septiembre de 1987

FDO. BUENAVENTURA CARRERAS EGAÑA

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Buenaventura Carreras Matas, por su apoyo, estímulo y ayuda en los momentos difiles y por el sabio magisterio con que nos ha instruido en nuestra formación, trascendiendo en su enseñanza más allá de las disciplinas propias de la Oftalmología.

Al Profesor Buenaventura Carreras Egaña, Director de esta tesis, por sus conocimientos y calidad científica, por sus enseñanzas y su infatigable, paciente y hábil directriz que han hecho materiales los propósitos de esta Tesis Doctoral.

Al Doctor Alfonso Carreras Egaña, que guió mis primeros pasos en el, entonces para mí, desconocido mundo del laboratorio.

Al Profesor Enrique García Olivares, por su apoyo, ayuda, y enseñanzas que permitieron adquirir los conocimientos de técnicas que han resultado imprescindibles.

Al Doctor Marcos García Pacheco, por su colaboración continua y desinteresada.

A la Srta. Felisa Martín de la Plata, por su eficáz ayuda técnica.

Queremos agradecer también la colaboración desinteresada que han prestado las señoritas Gloria Gort Zufri, Rosa Fernández Lozano, Rosario Cuesta Pulido, Sacramento Salguero Mezcua, Mercedes García Román, Purificación Alfaro González, Mª Dolores Rodríguez Martínez, y Francisca Saez Lopez, Técnicos de Laboratorio del Departamento de Anatomía Patológica, por su constante e insustituible apoyo técnico en el procesamiento histológico y por la paciencia y profesionalidad de la que han hecho gala.

Asimismo, al personal de la Cátedra de Fisiología queremos agradecerles la ayuda personal y material que de modo reiterado nos han ofrecido.

Finalmente, a todos aquellos/as que de alguna manera han colaborado directa o indirectamente o se han visto sacrificados por los imperativos que ha supuesto la realización de esta tesis.

A todos, mi mas profundo, sincero y eterno agradecimiento.

INDICE

	Pag
INTRODUCCION	
Hipersensibilidad	1
Alergia y Atopia	3
Historia	5
Incidencia, Herencia y Comienzo	8
Causas	10
Inmunoglobulinas Ig E e Ig G2a	12
Mastocitos y Basófilos	22
Conjuntivitis Alérgicas	30
Conjuntivitis Vernal	39
Historia	39
Epidemiología	40
Clínica	42
Anatomía Patológica	50
Tratamiento	57
Etiopatogenia	60
OBJETIVOS DEL TRABAJO	68

MATERIAL Y METODOS 69

Animales 69

Antígenos 69

Adyuvante 72

Marcaje de BSA con I^{125} 73

Inmunización 74

Sangrado 75

Provocación de la Respuesta Alérgica en la conjuntiva 75

Detección de Ig E e Ig G_{2a} 77

Valoración Cuantitativa Objetiva de la respuesta a nivel conjuntival 78

Métodos Histológicos 79

RESULTADOS 86

Histología 110

DISCUSION 140

CONCLUSIONES 179

BIBLIOGRAFIA 183

INTRODUCCION

HIPERSENSIBILIDAD

Se aplica el termino hipersensibilidad cuando ocurre una respuesta inmune adaptativa exagerada o de forma inapropiada que causa un daño tisular. La hipersensibilidad es una caracteristica individual y se manifiesta en el segundo contacto con un antigeno determinado (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985). Las reacciones de hipersensibilidad se dividian clinicamente en inmediatas y retardadas atendiendo al tiempo necesario para la aparición de la reacción desde el contacto con el antigeno. Gell y Coombs clasificaron las reacciones de hipersensibilidad en cuatro categorias. Los tipos I, II y III dependen de la interacción del antigeno con los anticuerpos humorales y tienden a presentarse clinicamente como reacciones de tipo "inmediato", las reacciones del tipo IV estan mediadas por células y son de aparición tardía. Estas reacciones no ocurren necesariamente de modo aislado y pueden darse conjuntamente (THEODORE, BLOOMFIELD & MONDINO, 1983).

En el tipo I o hipersensibilidad inmediata se produce una respuesta mediada por Ig E dirigida contra antigenos inócuos, como el polen, resultando en la liberación de mediadores farmacológicos, como la histamina, por los mastocitos.

El tipo II o hipersensibilidad citotóxica dependiente de los anticuerpos, ocurre como resultado de la acción de anticuerpos dirigidos contra antígenos estructurales de la superficie celular, o antígenos que se han adherido a dicha superficie, produciendose el daño de la célula por fagocitosis, lisis mediada por el complemento, o por células K.

El tipo III o hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos tiene lugar cuando antígenos solubles se combinan con anticuerpos en grandes cantidades formando inmunocomplejos que se depositan en los vasos, con cierta predisposición por las membranas basales, e inducen una respuesta inflamatoria con fijación del complemento y liberación de sustancias quimiotácticas y vasoactivas produciendose un daño tisular

El tipo IV o hipersensibilidad de tipo retardado o mediado por células, es el resultado de la interacción entre linfocitos T, previamente sensibilizados, y antigenos especificos, estando mediadas estas respuestas por la liberación de linfokinas y por citotoxicidad (THEODORE, BLOOMFIELD & MONDINO, 1983; ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985).

ALERGIA Y ATOPIA

Se denomina alergia a cualquier estado que conduce a una respuesta inmune patológica caracterizada por la degranulacion de los mastocitos y los basófilos. Incluye la atopia, la anafilaxis y ciertos fenomenos de degranulación no asociados con las respuestas mediadas por Ig E (KLEIN, 1982).

Se usa el termino anafilaxis para expresar una sensibilización capaz de ser inducida en cualquier individuo de una determinada especie

mediante una estimulación antigénica, *sensibilización*, y que se expresa por cambios característicos tras una nueva estimulación con el mismo antígeno. Estos cambios incluyen la contracción del músculo liso y la vasodilatación capilar y estan causados por la liberación de sustancias farmacologicamente activas por los mastocitos y los basófilos tras la combinación del antígeno con los anticuerpos fijados a estas células (KLEIN, 1982).

El término atopia se aplica al estado que afecta solamente a individuos genéticamente predispuestos y que se caracteriza por la contracción de la musculatura lisa y vasodilatación capilar causada por la liberación de sustancias farmacologicamente activas por los mastocitos y los basófilos tras la combinación del antígeno con los anticuerpos Ig E fijados a dichas células (KLEIN, 1982).

Historia (MYGIND, 1986)

En 1819, el médico londinense John Bostock describió ante la Real Sociedad Médica de Londres sus propias "afecciones periódicas de oidos, nariz y garganta" a las que denominó catarro estival, y que pronto fué popularmente conocida como fiebre del heno ya que prevaleció la idea de que era provocada por el efluvio del nuevo heno.

Medio siglo después, Charles Blackey estableció el papel del polen en la causalidad de la fiebre del heno. El mismo sufria de tal padecimiento y se usó a sí como sujeto de experimentación y con muestras de polen se provocó rinitis, dermatitis, conjuntivitis y asma. Además, usando portas impregnados con pegamento y mirando con el microscopio el número de particulas recogidas estableció una correlación directa entre la cantidad de polen recogido y la intensidad de sus síntomas.

En 1901, Charles Richet intentó hacer inmune a un perro frente al veneno de medusa, en la segunda dosis, diez veces inferior a la letal, el perro falleció en venticinco minutos. A este sorprendente resultado lo denominó anafilaxis, al considerar que habia desaparecido la protección natural o profilaxis. Años mas tarde se sugirió que la fiebre del heno, por Wolf-Eissner en 1906, y el asma, por Meltzer en 1910, eran situaciones de anafilaxia humana.

Un año despues del experimento de Richet, Maurice Arthus demostró como las reacciones anafilacticas podian ser producidas por sustancias no tóxicas *per se* al inyectar suero de caballo a un conejo sin causar ningún daño en la primera inyección, sin embargo en la segunda dosis el tejido del lugar de la inyección se inflamaba y a veces se necrotizaba. Esta reacción anafiláctica local fué conocida como fenómeno de Arthus.

Clemens von Pirquet en 1906 propuso el término alergia para expresar el concepto

reactividad alterada uniendo los términos griegos αλλως, otro, diferente y εργων, trabajo, acción.

R.A Cooke y A.F.Coca acuñaron el término atopia para aquellas formas clínicas de alergia como la fiebre del heno y el asma, en las que "los individuos como grupo poseen la capacidad peculiar de hacerse sensibles a ciertas proteínas a las cuales son frecuentemente expuestos por sus hábitos de vida y su medio ambiente".

En 1921, Praustnitz inyectó en su brazo el suero de Kustner, alérgico al pescado. Al dia siguiente inyectó en el mismo lugar extracto de pescado resultando una reacción positiva. Pensaron que el suero de Kustner poseía un factor mediador de tal reacción, denominada de Praustnitz-Kustner, al que Coca y Cooke denominaron reagina.

Parecía que las reaginas estaban relacionadas con los anticuerpos, sin embargo ciertas peculiaridades los separaban de estos últimos. Primero, no podían ser demostradas en suero por reacciones de precipitación; segundo, eran termolabiles; y tercero, tenían la capacidad de

fijarse durante largo tiempo en la piel y liberar reacciones con eritema y edema.

En 1967, Teruko y Kimishigue Ishizaka demostraron que las reaginas pertenecían a un grupo previamente desconocido de inmunoglobulinas al que denominaron gammaglobulina E. Al mismo tiempo, Johanson y Bennich descubren un nuevo anticuerpo al que denominan Ig ND en el mieloma de un paciente, y determinan que las reaginas pertenecen al grupo de la Ig ND. Fue en 1968 cuando se estableció el nombre definitivo de Inmunoglobulina E (KYGIND, 1986).

Incidencia, Herencia, y Comienzo de la Atopia

Se estima que aproximadamente el 10 % de la población exhibe manifestaciones alérgicas de tipo familiar con una mayor incidencia en jóvenes varones.

Cerca de la mitad de los pacientes muestran los primeros signos de alergia en la primera

década de la vida. Aquellos que son homocigotos para el gen de la alergia tienden a desarrollar la enfermedad antes que aquellos que son heterocigotos, que la desarrollan mas tardiamente. Cuando ambos padres son alérgicos hay un 50 % de probabilidades de que los hijos lo sean, y casi un 30 % cuando solo uno de los padres es alérgico (SMOLIN & O CONNORS, 1981; ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985).

Cuanto mayor es la prevalencia de una enfermedad alergica en una familia o manifiesta mayor severidad, tanto mas temprano es el comienzo de la enfermedad en su progenie. Un comienzo temprano se asocia con una enfermedad severa y duradera (SMOLIN, 1981).

Hay tres mecanismos geneticos principales que regulan la respuesta alérgica:

1) Nivel total de Ig E. Un nivel bajo de Ig E se asocia con un gen dominante (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985).

2) Respuesta Ir ligada al HLA. Parece existir una relación entre el HLA-A2 y ciertos alergenos

ambientales, que es mas significativa cuando los niveles de Ig E son bajos.

3) Hipersensibilidad general. Existe una asociacion significativa entre los antigenos de histocompatibilidad HLA-B8 y HLA-Dw3, y la positividad a las pruebas cutáneas para alergenos comunes en individuos atópicos (RORTT, BROSTOFF & MALE, 1985).

Causas de la atopia

Las causas de la atopia permanecen aún sin especificar habiendose sugerido varias teorías.

1) Déficit de células T. Existe una evidencia substancial de que los linfocitos T desempeñan un papel importante en las repuestas inmunologicas mediadas por Ig E, y esto ha sugerido que un defecto en estas células, concretamente los linfocitos T supresores, podría estar involucrado en la etiología de la atopia. En los pacientes con eccema atópico severo se ha observado una reduccion de las células formadoras de rosetas E y

de los linfocitos T supresores. No obstante, en pacientes con asma o rinitis alérgica este defecto no es tan evidente. Estudios recientes muestran que existe una relación entre la lactancia artificial en la infancia y una reducción en el número de linfocitos que ocasiona niveles aumentados de Ig E (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985).

2) Retroalimentación anormal de los mediadores. Hallazgos *in vitro* sugieren que la histamina es capaz en los atópicos de estimular a los monocitos para producir prostalglandinas que pueden suprimir la respuesta de las células T y contribuir a la reacción inflamatoria (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985).

3) Factores ambientales. La patogénesis del fenotipo atópico podría refejar un fenómeno denominado *punto de ruptura alérgico*, el cual sería la manifestación de la sensibilización coincidente a antigenos ambientales, al tiempo que un mecanismo amortiguador no especifico supresor de la síntesis de Ig E, esta transitóriamente alterado, dando lugar a una producción excesiva de

Ig E (KATZ, 1978). Este mecanismo dependería de una serie de circunstancias como la exposición al alergeno, predisposición genética del paciente, tendencia a la producción de Ig E, o una posible infección viral de vías respiratorias altas (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985).

Inmunoglobulina E

La inmunoglobulina E, Ig E, es una inmunoglobulina monomérica con cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas de la clase épsilon. El peso molecular es ligeramente mayor que el de la Ig G, 188.000 daltons, tiene un 12 % de carbohidratos en su molécula y cinco dominios en su cadena pesada. La vida media en suero es de dos días y medio (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985).

Las principales características de la Ig E incluyen la termolabilidad y la capacidad de fijarse a la superficie de mastocitos y basófilos. La capacidad dermosensibilizante de la Ig E reside

en el fragmento Fc de la molécula y puede ser inactivada mediante el calentamiento de la inmunoglobulina a 56° durante media hora, quedando intacta la capacidad de unión al antígeno propia del fragmento Fab (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985).

La Ig E ha sido a menudo denominada homocitotrópica debido a su afinidad por las células de la misma especie solamente. Sin embargo, se ha comprobado que la Ig E humana, por ejemplo, también puede unirse a las células del mono. Los términos reagínico, citofílico, dermosensibilizante y homocitotrópico son intercambiables (MYGYND, 1986).

La principal función fisiológica de las respuestas mediadas por Ig E es la defensa frente a parásitos mediante la reacción frente a aquellos antígenos exógenos que penetran a través de las superficies epiteliales y mucoepiteliales. La respuesta puede ser dividida en cinco fases: en la fase 1 un plasmocito que exhibe Ig E en su superficie es expuesta a un antígeno, y en la fase 2 es activado para producir anticuerpos de la

clase Ig E; en la fase 3 los anticuerpos se fijan en los tejidos a los mastocitos y los basófilos, activando a estas células en la fase 4 y causando la liberación de los mediadores químicos almacenados en sus gránulos; y finalmente en la fase 5 los mediadores inducen una respuesta tisular compleja destinada a expulsar el parásito del organismo (KLEIN, 1982).

Las células plasmáticas secretoras de Ig E y las precursoras de estas se encuentran mayoritariamente en las superficies secretoras de todo el organismo (KLEIN, 1982). Se piensa que tanto la sensibilización como la mayoría de las fases de la respuesta Ig E, se efectúan en los órganos de inmunidad locales, aunque en las secreciones sólo se encuentre una escasa cantidad de anticuerpos Ig E. El desconocimiento de los eventos celulares que siguen a la activación de las celulas B por los alergenos incluye aspectos tan fundamentales como el lugar de encuentro y presentación antigeno-linfocito B, migración de

células precursoras, interacciones celulares para la regulación de la respuesta Ig E, y lugar real de la secreción IgE (KLEIN, 1982).

Se sabe que la activación de los precursores B Ig E es T-dependiente, presumiblemente de una forma similar a otros precursores B. Se cree que las células T controlan la diferenciación de los precursores B Ig E en células plasmáticas, la generación de células Ig E de memoria y el grado de expansion clonal. Se han identificado factores estimulantes ("helper") especificamente en la respuestas mediadas por Ig E. Se cree que las célula T supresoras desempeñan un papel importante en este tipo de respuesta y evitan que la reacción desencadenada sea perjudicial para los tejidos involucrados del organismo, pues se ha comprobado que la respuesta Ig E inducida en animales de experimentación es más susceptible a los mecanismos reguladores que la Ig G (ISHIZAKA, 1978).

Los, estudios sobre las inmunoglobulinas de superficie de las células B muestran que existe un

tipo de células T vírgenes que son portadoras de Ig M. Los linfocitos que llevan en su membrana determinantes Ig A o Ig G derivan de estas células vírgenes. Los linfocitos portadores de Ig A o Ig G han sido inducidos a diferenciarse en este sentido. Esto sugiere la posibilidad de que los precursores de las células formadoras de Ig E adquieran, los determinantes de las cadenas épsilon en cierto estadío de su evolución. Al encontrarse células portadoras de Ig E que tambien llevan Ig M en su superficie, se piensa que las células Ig E derivan tambien de celulas vírgenes portadoras de Ig M (ISHIZAKA, 1978).

Los linfocitos T no son necesarios para el paso de célula B vírgen portadora de Ig M a células portadora de Ig E, pero sí para la trasformación de esta última en plasmocito productor de Ig E. Existe una doble población de células B de memoria para Ig E que incluye tanto células portadoras de IgE como células portadoras de doble inmunoglobulina Ig E e Ig M (ISHIZAKA, 1978). Es necesaria tambien una colaboración de

las células T estimulantes con las células B de memoria para la respuesta Ig E secundaria. Estas células T han de ser especificas de portador, y llevan en su membrana el antígeno (ISHIZAKA, 1978).

Se ha observado por otra parte que la toma de contacto repetida con un alergeno determinado en animales inmunizados supone un descenso de Ig E y un aumento de Ig G. Para la explicación de este fenómeno se ha postulado la intervención de dos tipos distinto de células T. Por un lado, la célula T especifica del portador que controla la porción de células B de memoria comisionadas para diferentes isotipos, que influencia la distribución de anticuerpos entre las diferentes clases. Por otro lado, las células T supresoras específicas de antígeno, que son inducidas por el tratamiento. La disociación de la respuesta Ig G e Ig E puede deberse a diferente sensibilidad de las células B-Ig E y de las células B-Ig G frente a un mismo tipo de célula T supresora. Sin embargo los investigadores se inclinan por postular dos tipos

diferentes de células T supresoras específicas para cada tipo de inmunoglobulina (ISHIZAKA, 1978).

Debido a la particular estructura de la región Fc, las moléculas de IgE se unen a receptores específicos de los mastocitos tisulares y a los leucocitos basófilos circulantes. La fijación de Ig E a mastocitos y basófilos es altamente preferente, pero no exclusiva, ya que se ha encontrado Ig E en algunos eosinófilos animales (MAYRHOFER, 1976), y humanos (HUBSCHER, 1977).

La unión de las moléculas de Ig E con los receptores celulares es reversible y no implica una unión covalente. La constante de equilibrio de la reacción de unión se ha estimado que es del orden de 10^{9} M^{-1}, tanto en basófilos como en mastocitos (ISHIZAKA, 1978).

Existen dos tipos de poblaciones, tanto en humanos como en animales de experimentación, con respecto a la cantidad de Ig - E que poseen en el suero. Unos muestran niveles altos de Ig E en suero, y otros nivles bajos. Los experimentos de

Katz (1978) tienden a demostrar que el fenotipo de baja respuesta de Ig E no refleja la incapacidad genética de producción de Ig E, sino por el contrario la capacidad genética para suprimir activamente la producción de Ig E de una manera efectiva. Por tanto, la expresión del fenotipo alérgico resulta de la disminución de la capacidad de tales individuos para mantener de una manera efectiva la producción de anticuerpos Ig E a niveles mínimos (KATZ, 1978).

Este mismo autor ha descubierto en ratones una molécula termostable de peso molecular 150.000 daltons capaz de suprimir la producción de Ig E. A la actividad que ejerce tal molécula se la conoce como Factor Supresor de la Alergia (SFA). Tal material parece no ser específico de antígeno (KATZ, 1978).

Por tanto, la síntesis de anticuerpos Ig E está controlada no sólo por un mecanismo regulador consistente en las célula T estimulantes y las células T supresoras específicas de antígeno, como ocurre con las otras clases de inmunoglobulinas,

sino que también está sujeta a control por un mecanismo supresor no específico que parece actuar selectivamente en la respuesta por anticuerpos Ig E. Este supresor no específico parece depender de los linfocitos T. Estos sistemas reguladores pueden ser alterados con ciertas manipulaciones, como bajas dosis de rayos X, ciclofosfamida y otros, lo que se refleja en una gran producción de Ig E sin afectar al resto de las inmunoglobulinas. Los niveles de Ig E pueden ser devueltos a niveles normales con la adición de SFA (KATZ, 1978).

El estudio de la Ig E en la rata se ha desarrollado principalmente en la raza LOU/C sobre inmunocitomas malignos ileocecales que en su mayoría son productores de Ig E monoclonal. Las propiedades físico-químicas de la Ig E de rata consisten en un peso molecular 198.000 ± 10.000 dalton con un coeficiente de sedimentación 7.6 S. La Ig E, a diferencia de otras inmunoglobulinas, precipita en sulfato amónico saturado al 33% y es termolabil alterándose la cadena Epsilon tras calentar a 56° durante 4 horas. La propiedades

biológicas incluyen una vida media en suero de 12.0 ± 2.1 h. En la piel la vida media se ha estimado en 7.40 ± 0.89 días. La Ig E de rata no cruza la barrera placentaria y si puede ser encontrada en el calostro y la leche, y al menos en algunos casos puede ser absorbida por el tracto intestinal de ratas lactantes (BAZIN, 1982). La Ig E posee una gran actividad citofílica y se fija a la membrana de los mastocitos y de los basófilos, aunque también lo hace a otras células que poseen receptores para la Ig E, Fc', como células T y B, monocitos, eosinófilos, y plaquetas (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985). La unión de la Ig E a los receptores del mastocito es estrecha pero reversible, y probablemente el tipo de unión es de interacciones múltiples no covalentes. La capacidad para la unión reside al parecer en los dos últimos dominios en el fragmento Fc, que a su vez debe estar íntegro, ya que subfragmentos Fc no tienen tal capacidad de unión. Esta unión muestra una alta especificidad de especie (METZGER, 1981)

La Ig G2a tiene en la rata importantes propiedades homocitotrópicas. Su peso molecular es de 156.000 dalton, la vida media en suero es 5 dias, y en la piel 2.40±0.25 dias. La Ig G2a de la rata cruza la barrera placentaria, está presente en el calostro y puede ser absorbida por el tracto intestinal de ratas lactantes. Además, la Ig G2a es la segunda clase de anticuerpo anafiláctico en la rata y posee actividad citofílica pudiendo fijarse, aunque debilmente, a la membrana del mastocito (BAZIN, 1982).

. . tocitos y Basófilos

Paul Ehrlich fué el primero en describir el mastocito por su contenido en gránulos que se teñian metacromáticamente con el azul de toluidina. El mastocito tiene un tamaño de 10-20 µm, y su forma varía dependiendo del medio. El núcleo es oval y situado centralmente, y con microscopia optica aparece enmascarado por los

gránulos secretorios, que en número aproximado de 200 muestran un tamaño uniforme, con un diámetro de 1 µm. Los gránulos estan delimitados por una membrana granular, mas apreciable en la rata que en el hombre. En la rata la ultraestructura de los gránulos es homogénea, mientras que en el hombre es característicamente laminar con espirales y volutas. Esta estructura se pierde durante la degranulación (MYGIND, 1986).

El basófilo es de menor tamaño que el mastocito y difiere estructuralmente de este último por mostrar un núcleo bilobar, menor número de gránulos, y de desigual tamaño (MYGIND, 1986).

Se pensaba que los mastocitos formaban una población homogénea de células con una morfología similar a la del que recientemente ha sido reconocido como *mastocito asociados al tejido conectivo, CTMC*. La técnica de tinción usada para demostrar los CTMC requiere fijación en formol y tinción con azul de toluidina. Se ha observado que con estos métodos no aparecen los *mastocitos*

asociados a mucosas, MMC, los cuales requieren fijacion y tinciones especiales (ROITT, 1985).

Los CTMC se encuentra alrededor de los vasos en la mayoría de los tejidos, y aunque existe similitud en la morfología grosera, pueden diferir en cuanto al número y tamaño de los gránulos y sus propiedades farmacológicas. Los MMC tienen una distribución diferente hallándose la máxima concentración en la mucosa del intestino medio y los pulmones (ROITT, 1985).

Existen importantes diferencias funcionales entre los MMC y los CTMC de la rata:

La proliferación de los MMC es dependiente de los linfocitos T, mientras que la de los CTMC es independiente de dichas células o de sus factores.

El cromoglicato disódico y la teofilina inhiben ambos, en la rata, la liberación de histamina de los CTMC, pero no de los MMC.

El contenido en histamina es mayor en los CTMC que en los MMC.

En los MMC existe Ig E citoplasmática. Este hallazgo es negativo en los CTMC (ROITT, 1985).

Los leucocitos basófilos se forman en la médula ósea. Tienen mucha similitud estructural y funcional con los mastocitos y actuan como "mastocitos circulantes", median en las reacciones alérgicas sistémicas y generalmente estan confinados a la médula ósea y sangre. En algunos tipos de inflamación, los basófilos migran a los tejidos y participan en las reacciones alérgicas locales (MYGIND 1986).

En 1953, Riley y West demostraron la presencia de histamina en los mastocitos, haciendo obvio el papel desempeñado por los mastocitos y los basófilos en la alergia. La degranulación de estas células amplifica la interacción alergeno-Ig E, media la alergia tipo I, y son por ello llamadas células mediadoras. El término degranulación es sinónimo de liberación de histamina o, mas correctamente de liberación de mediadores bioquímicos, tambien llamados autacoides (MYGIND, 1986).

En contraste con otros tipos de células, los mastocitos y los basófilos tienen receptores de

gran afinidad para la Ig E; hay aproximadamente 10^5 en cada célula. Esta constante de fijación tan elevada y el largo tiempo de permanencia, cerca de seis semanas, permiten a estas células concentrar Ig E en su superficie (MYGIND, 1986).

Los receptores de los mastocitos estan localizados y embebidos en la membrana plasmatica escasamente expuestos al exterior y orientados de tal modo que la Ig E puede fijarse a ellos. Existen evidencias de que el receptor es una glicoproteina con un 10-15% de carbohidratos. Una sola molécula del receptor fija una sola molécula de Ig E. Además de univalentes los receptores son móviles en la membrana celular, tanto si estan unidos a la Ig E como si no (METZGER, 1981).

La heparina es la responsable de la tinción de los mastocitos, pero su importancia como mediador en la alergia es pequeña. La heparina es una molécula cargada negativamente que fija al catión histamina. En el hombre existen otros mediadores quimicos. Unos preformados y almacenados en gránulos como las ya nombradas

histamina y heparina, los factores quimiotáticos para eosinófilos y neutrófilos, el fator acivador de las plaquetas, enzimas como la triptasa y la β-glucosaminidasa. Otros sintetizados de novo y derivados de la membrana por las vias de la fosfolipasa A, o de la ciclooxigenasa como la sustancia de acción tardia de la anafilaxis (SRS-A compuesta por los leucotrienos C_4, D_4, E_4), el leucotrieno B_4, la prostalglandina E_2 y el tromboxano A_2. Los basófilos contienen principalmente histamina, sustancia de reaccion lenta de la anafilaxis y proteasas inflamatorias (MYGIND, 1986).

La degranulación es un proceso secretorio activo que consume energia y que requiere calcio. El proceso comienza en la superficie celular con la interacción entre el alergeno y los fragmentos Fab de moléculas Ig E adyacentes. El antigeno debe ser divalente (dos determinantes antigénicos) o multivalente ya que el *puenteo* de las moléculas de Ig E es esencial para la agregación de los receptores de Ig E que a su vez activan los

enzimas, como la metil transferasa, que reorientan fosfolípidos de la membrana celular. Esto hace que se abran las puertas del calcio con lo que se produce un flujo de calcio extracelular hacia el interior de la célula. El calcio induce una activación de los microtúbulos produciendose una confluencia de las membranas celular y perigranular. La liberación de histamina tiene lugar por intercambio iónico con el Na^+.

Cuando los mediadores son liberados, la estructura laminar de los gránulos es reemplazada por un material floculoso laxo. Los basófilos humanos exteriorizan cada gránulo por separado, mientras que en los mastocitos los gránulos se fusionan intracelularmente y salen por una canal común. Los gránulos no necesitan ser expulsados de la célula para liberar los mediadores al líquido extracelular (MYGIND, 1986).

La respuesta de las células secretoras al estímulo alergénico depende del contenido de mediadores, el número de moléculas de Ig E que dispone en su superficie celular, del nivel de

calcio intracelular, y de la relación AMPc/GMP. Niveles altos de AMPc hacen a la células mas resistente a la estimulación, y el mismo efecto tienen bajos niveles de GMP.

Una vez liberados al exterior, los mediadores bioquímicos contenidos en los gránulos, y los sintetizados *de novo* ejercen su accion a diferentes niveles. Sobre la permeabilidad vascular y sobre el músculo liso actuan la histamina, la SRS-A, la PGD_2, y el TxA_2; como sustancias activadoras de la plaquetas actuan el PAF y el TxA_2; el ECF, el LTB_4, y el NCF son factores quimiotácticos para neutrófilos, eosinófilos, o ambos; los enzimas como la kalicreína contribuyen a la inflamación por la vía de la bradiquinina. La histamina contribuye a la reacción inmediata tras la exposición al alergeno, y a la fase tardía facilitando la migración de inmunoglobulinas y células inflamatorias al foco inflamatorio.

CONJUNTIVITIS ALERGICAS

En 1906, Clemens von Pirquet define la alergia como una alteracion o elevación de la capacidad de respuesta frente a sustancias extrañas al organismo. Es tipico que la respuesta sea inducida por estímulos normalmente inócuos. La conjuntiva es un sitio frecuente de tales reacciones y sus manifestaciones son a menudo dramáticas por su intensidad. Es facilmente accesible a alergenos de contacto o transmitidos por el aire, es un lugar de infecciones bacterianas recurrentes y con frecuencia expuesta a drogas. Además por su proximidad con la delicada piel de los párpados, en si muy reactiva, resulta a menudo en una dermatoconjuntivitis, que por su intensidad puede ser alarmante. La conjuntiva es marcadamente sensible a tales agresiones, diez o mas veces que la piel segun los efectos comparativos de inyecciones intramucosas e intradermicas (DUKE-ELDER, 1965).

Hipersensibilidad conjuntival

El desarrollo de una hipersensibilidad local frente a un antígeno específico en la conjuntiva fue ya ampliamente demostrado por Weimberg y Julien (1913), Von Szily (1914), Van Es y Schalk (1918), Woods (1924) y otros, que demostraron no sólo que la conjuntiva podía ser sensibilizada de igual modo que otros tejidos formando parte de procesos anafilácticos generales, sino que también mostraba una sensibilidad local muy marcada si se producía un contacto inmediato con el alérgeno. Así también lo demostraron los experimentos de Ratner y cols (1927) en cobayas. Chait (1950) demostró que la conjuntiva podía servir de vía de entrada a alergenos originando reacciones sistémicas (DUKE-ELDER, 1965).

Tipos de Conjuntivitis Alérgicas

1) Conjuntivitis alérgica simple

a) del tipo anafiláctico inmediato (fiebre del heno), mediada por anticuerpos circulantes

α) Conjuntivitis atópica: debida a contactantes, inhalantes, o ingestantes. Forma aguda o crónica

b) del tipo retardado (tuberculínico), transferible por células linfoides

α) Dermatoconjuntivitis de contacto: causada por la aplicación tópica de productos químicos

β) Conjuntivitis alérgica microbiana: originada por organismos vivos o muertos, o sus productos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos

γ) Queratoconjuntivitis medicamentosa: debida a la ingestión de sustancias tales como arsénico y oro

2) Conjuntivitis alérgica intersticial

a) Queratoconjuntivitis flictenular.- reacción de origen retardado, representa una alergia microbiana endógena

b) Conjuntivitis vernal.- es presuntamente una enfermedad de origen alérgico de tipo inmediato. La etiología es discutida pero representa probablemente una alergia exógena (DUKE-ELDER, 1965).

Conjuntivitis Alérgica Simple

Conjuntivitis Atópica

Desde el punto de vista clínico las conjuntivitis atópicas se clasifican en agudas o crónicas; ambas presentan la misma patología general y síntomas clínicos difiriendo solamente en la duración y severidad. Entre ambos extremos se encuentran las formas subagudas (DUKE-ELDER, 1965).

1) Conjuntivitis atópica aguda.- Se produce una reacción inflamatoria aguda minutos después de la exposición a un alergeno al cual el paciente

está sensibilizado. El cuadro clínico consiste en hiperemia brusca con quémosis intenso que sobrepasa la córnea, así como picor intenso, escozor, fotofobia y lagrimeo profuso.

Histopatologicamente la reaccion es de tipo papilar con vasodilatación intensa y exudación intensa con abundantes eosinófilos. Las pruebas intradérmicas de hipersensibilidad inmediata son positivas. La sintomatología remite rapidamente al cesar el contacto con el alergeno. Por el contrario, si este persiste la inflamación pasa a una fase subaguda o crónica.

2) Conjuntivitis atópica crónica.- Se desarrolla en pacientes menos sensibles o con exposiciones repetidas a un alergeno mas diluido y es la forma mas común de conjuntivitis atópica simple. la conjuntiva tiene un aspecto inflamado y lechoso especialmente en la mitad temporal del fornix inferior. En la forma subaguda suele haber hiperemia y quemosis mientras que en la cronica el aspecto de la mucosa es palido. La secrecion es moderada de tipo seroso. Histopatologicamente, la

reaccion es de tipo papilar pudiendo aparecer folículos en los casos crónicos en la conjuntiva palpebral inferior. Hay congestión, edema e infiltrado celular con linfocitos pequeños, células plasmáticas y eosinófilos; estos últimos aparecen frecuentemente en la secreción y en los frotis conjuntivales. Las pruebas cutáneas de alergia muestran un resultado positivo en 15-30 minutos (DUKE-ELDER, 1965; THEODORE, BLOOMFIELD & MONDINO, 1983).

La suavidad de los signos contrasta con la intensidad de los síntomas. Consisten estos en picor y escozor constante que obligan al paciente a frotarse continuamente los ojos con lo que se intensifican sus molestias. La sintomatología se acentúa, y a menudo se desencadena, por irritantes atmosféricos como humo de tabaco, gases de la combustion, viento o cambios térmicos.

Las complicaciones oculares son excepcionales casi siempre limitadas a la atopia polínica severa. La afectación de la córnea ocurre en el 2 % de los casos en forma de queratitis epitelial

punctata. Se han observado epiescleritis recurrentes, iritis plásticas, y neurorretinitis edematosa recurrentes. Estas complicaciones son estacionales y pasajeras desapareciendo tras la desensibilización. Las manifestaciones sistémicas de la atopia son mas frecuentes e incluyen rinitis, sinusitis, eczema, artritis y ocasionalmente migraña (DUKE-ELDER, 1965).

3) Tipos de conjuntivitis atópicas:

a) Atopia a pólenes, polinosis, fiebre del heno. Es la mas común y típica. La alergia conjuntival se asocia a otras localizaciones como la nasal, sinusal o bronquial. Tiene frecuentemente un caracter hereditario con transmisión dominante. El principal alergeno es el polen, preferentemente el polen de hierba; y la prevalencia es mayor en el medio rural en los meses de Abril a Septiembre dependiendo del tipo de polen.

La fiebre del heno comienza a manifestarse tras la pubertad, aunque en los casos de mayor caracter hereditario puede empezar antes y con la

edad tiende a suavizarse y a remitir. Los episodios tienen un comienzo brusco: en pocos minutos los ojos se tornan húmedos y de color rojo brillante, a veces con edema palpebral, además hay picor intenso y escozor. A estos síntomas se añade un intenso coriza y se intensifican en situaciones ambientales de humos o cambios de temperatura. Al desaparecer el alergeno remite el cuadro en pocas horas sin secuelas. Sin embargo tras exposiciones repetidas y frecuentes, la conjuntiva toma un aspecto inflamado y los ojos se vuelven irritables hasta que acaba la estación del polen. La irritación continua da lugar a la formación de folículos y papilas que desaparecen al eliminar el estímulo alergénico durante una temporada (DUKE-ELDER, 1965).

b) Atopia a otras proteínas vegetales. Es menos frecuente que la anterior pero igualmente dramática. Se ha descrito la hipersensibilidad conjuntival frente a maiz, trigo y rosas, flor de centeno y otros. También las esporas de los hongos no patógenos pueden actuar como alergenos

especialmente en ambientes humedos DUKE-ELDER, 1965).

c) Atopia a proteinas animales. Los derivados de la piel de algunos animales especialmente gatos y caballos, y con menos frecuencia perros, pueden actuar como atopenos inhalantes y producir asma o conjuntivitis atópica. Tambien la lana de los jerseis o las plumas de ave de colchones y almohadas pueden dar el mismo cuadro. Las reacciones suscitadas pueden ser muy sensibles e indiscriminadas, o por el contrario ser especifica a una determinada raza como los gatos siameses

d) Atopia debida a ingestantes. En el 1 % de los individuos con alergia alimenticia se desarrollan conjuntivitis atópicas. No es bien conocido si la sensibilizacion es frente a algun producto de la digestión o del metabolismo. Los productos mas frecuentemente implicados son huevos, leche, pescado, moluscos, crustaceos, cereales, arroz, frutas y chocolate (DUKE-ELDER, 1965).

CONJUNTIVITIS VERNAL

La conjuntivitis vernal es una inflamación intersticial de la conjuntiva, bilateral y recurrente, con incidencia periodica estacional, de caracter autolimitado y etiología desconocida. Se caracteriza por la presencia de papilas aplanadas generalmente en la conjuntiva tarsal con disposición en empedrado, hipertrofia gelatinosa de la conjuntiva límbica, discreta o confluyente, y un tipo especial de queratitis; se asocia a picor, hiperemia lagrimeo, y secreción mucosa o lardácea que contiene eosinófilos (DUKE-ELDER, 1965).

Historia

La conjuntivitis vernal fue inicialmente descrita por Arlt en 1846 tras la observación de múltiples casos de inflamación e infiltración

limbica. En 1871, von Graefe describió las proliferaciones típicas de la conjuntiva tarsal a las que denominó "granulaciones en pavimento". En 1872, Laemisch introdujo el término catarro vernal o primaveral. Horner, en 1880, describió unos puntos blancos que aparecian a ambos lados del limbo, y que Trantas nueve años mas tarde confirmó y denominó "puntos de Trantas-Horner". En 1886, Gradle describió la semejanza entre la conjuntivitis vernal y la de la fiebre del heno. Herbert en 1903, descubrió eosinófilos en el frotis conjuntival de estos pacientes. El trabajo mas exhaustivo sobre esta enfermedad fué publicado en 1950 por BEIGELMAN

Epidemiología

La conjuntivitis vernal afecta principalmente a varones, 70 a 90% segun las series, hasta la pubertad, a partir de entonces aumenta la prevalencia en mujeres y a los 20 años ambos sexos

estan igualmente afectados. La mayor prevalencia se situa entre los 11 y los 13 años. La enfermedad se suaviza entre los 16 y 21 años remitiendo. Después de los 30 años solo el 6% de los pacientes padecen la enfermedad (DUKE-ELDER, 1965; SMOLIN & O'CONNOR, 1981; HIDALGO et al., 1985).

Todas las razas son susceptibles de padecer la enfermedad aunque la raza negra parece exibir mas frecuentemente la forma límbica (SMOLIN & O'CONNOR, 1981), sin embargo estos pueden sufrir las formas mas severas de la forma palpebral (THEODORE, BLOOMFIELD & MONDINO, 1983).

La conjuntivitis vernal es una enfermedad muy extendida y varia en prevalencia e intensidad segun el área geográfica. Es mas frecuente y rigurosa en los paises cálidos, esto es, área mediterranea, Africa central y norte, America, especialmente en las altiplanicies mejicanas. En estas áreas la forma predominante es la límbica, mientras que en Europa central y norte la forma habitual es la palpebral (DUKE-ELDER, 1965; SMOLIN & O'CONNOR, 1981)

El ritmo estacional es una de las características de la conjuntivitis vernal. En general, los episodios comienzan en los meses cálidos y remiten en los meses frios. Se ha observado en casos de emigrantes del hemisferio sur al norte como se ha modificado la época de comienzo y remisión de los episodios. En nuestro área geográfica la enfermedad comienza en primavera y se prolonga durante el verano, remitiendo progresivamente. En invierno los sintomas desaparecen habitualmente pero no los cambios proliferativos, que solo en la forma límbica leve suelen remitir.

Clínica

La conjuntivitis vernal es una enfermedad binocular, aunque el comienzo puede no ser simultáneo en ambos ojos. Las manifestaciones conjuntivales pueden encontrarse en dos formas diferentes, la palpebral y la límbica, aunque en

un amplio porcentaje de casos, 30-70 %, ocurren simultaneamente (DUKE-ELDER, 1965).

1) Síntomas

El picor es la queja mas frecuente de los pacientes con conjuntivitis vernal. Aparece como el síntoma más precoz cuando los cambios conjuntivales son aún minimos. Durante el curso de la enfermedad el picor acompaña a la recurrencias y exacerbaciones, desapareciendo en las remisiones.

Sensación de cuerpo extraño, quemazón, lagrimeo, y fotofobia en caso de participación corneal, son tambien síntomas de la conjuntivitis vernal aunque ocurren con menor frecuencia (BEIGELMAN, 1950).

2) Signos

Las dos formas de conjuntivitis vernal generalmente ocurren juntas, aunque predomina una

de ellas. La forma límbica es predominante en negros e indios americanos. La forma palpebral interesa predominantemente la conjuntiva tarsal superior. Los cambios en la conjuntiva tarsal inferior, si existen, son muy moderados, y solo excepcionalmente se afecta la plica (DUKE-ELDER, 1965).

Se pueden distinguir dos estadios:

Primer estadio.- Existe solamente hiperemia conjuntival, secreción escasa y picor intenso, puede no progresar y quedar en una forma abortiva adoptando la conjuntiva un aspecto deslustrado y leñoso (DUKE-ELDER, 1965), o progresar en el plazo de dias, a lo sumo dos semanas, a la forma hiperplásica (BEIGELMAN, 1950).

Segundo estadio.- Como consecuencia de la hiperplasia tisular la conjuntiva adopta un aspecto engrosado, y con la ayuda de magnificación pueden observarse diminutas papilas menores de 0,1 mm. La vascularización de estas papilas es característica. En el área afectada, una trama vascular profunda envia ramas perpendiculares, que

a simple vista parecen petequias, y que a su vez originan una segunda trama superficial confiriendo a la conjuntiva un aspecto reticular característico. Mas frecuente que esta forma "lisa" de conjuntivitis vernal es la formación de papilas gruesas de diferentes tamaños, separadas o agrupadas, y que afectan principalmente al borde superior de la conjuntiva tarsal (BEIGELMAN, 1950; DUKE-ELDER, 1965). La abundancia de papilas hace que se aplanen debido a la presión contra la córnea, adoptando el aspecto en empedrado tan característico (ALLANSMITH, 1978). Durante los periodos de actividad las papilas en empedrado se vuelven hiperémicas e inflamadas con edema e infiltrado celular inflamatorio (EASTY, 1985). Como resultado de la hiperplasia tisular puede aparecer un ptosis de 2-3 mm que suele ser simétrico y confiere un aspecto soñoliento al paciente. Las papilas estan cubiertas por un velo lechoso que se retira facilmente con una torunda de algodón (ALLANSMITH, 1978).

En el párpado inferior suele acumularse, en el tercio interno, una secreción mucosa compacta de color amarillento sucio pero que no pega los párpados. Histológicamente está formada por moco, células epiteliales descamadas, celulas mononucleadas y polimorfonucleares, sobre todo eosinófilos así como gránulos eosinofílicos (ALLANSMITH, 1978); esta secreción es notablemente alcalina (DUKE-ELDER, 1965)

La forma límbica de la conjuntivitis vernal se inicia por una congestión vascular que se acompaña de una opacificación difusa o localizada del limbo con pérdida del patrón reticulado y sin engrosamiento. Posteriormente, en el curso de semanas o meses, aparecen sobre el limbo múltiples nódulos, pequeños, semitransparentes y gelatinosos que son esencialmente papilas como las tarsales. El sitio predilecto de aparición es a ambos lados de la córnea, en la hendidura interpalpebral. El color de estos nódulos es variable dependiendo del grado de vascularización, estando mas conges-

tionados en los meses cálidos. (BEIGELMAN, 1950; DUKE-ELDER, 1965).

Entre los nódulos límbicos pueden aparecer acúmulos de aspecto calcáreo conocidos como puntos de HORNER-TRANTAS y que varían considerablemente en número, tamaño, forma, color y localización, aunque mas frecuentemente son pequeños, redondos, blancos, y se localizan preferentemente en el limbo superior. Una característica importante es su caracter efímero, solo unos dias o a lo sumo una semana. (BEIGELMAN, 1950). Pueden aparecer en cualquier estadio y estan constituidos por acúmulos de eosinófilos (ALLANSMITH, 1978). También pueden aparecer en el limbo fositas marginales o estructuras linfoides que representan, en opinión de HORNER, áreas de regresión entre las formaciones hiperplásicas que han recobrado su transparencia normal (BEIGELMAN, 1950).

La conjuntiva bulbar suele mantener su aspecto normal, a pesar de los cambios tarsales y

límbicos, aunque con cierta frecuencia aparece hiperémica y quemótica (BEIGELMAN, 1950).

En los casos, graves las lesiones límbicas pueden extenderse a la córnea. El epitelio corneal puede ser invadido por lesiones idénticas a las del límbo esclerocorneal y que destruyen la capa de Bowman. Es característico que mientras esta invasión avanza hacia el centro y la periferia deja la unión esclerocorneal libre y bien definida. En ocasiones, este tejido invasor puede vascularizarse semejando un pannus, e incluso pueden aparecer sobre él pequeños nódulos con puntos de HORNER-TRANTAS siendo preciso diferenciarlo del tracomatoso (BEIGELMAN, 1950; DUKE-ELDER, 1965).

Además de las alteraciones corneales causadas por la invasión directa de las lesiones límbicas, la córnea puede afectarse en el curso de la conjuntivitis vernal y así pueden aparecer lesiones epiteliales conocidas como "queratitis epitelialis vernalis" de Togby (TOGBY, 1963). Ocurre mas frecuentemente en la forma palpebral y

en su forma básica la lesión es puntiforme; consiste en pequeñas placas grisaceas de epitelio necrosado en los dos tercios superiores de la córnea, que tiñen con fluoresceína y causan fotofobia, posteriormente pueden ser confluyentes y producir opacidades de forma variada en la córnea. La úlcera corneal vernal es mas infrecuente, aparece preferentemente en la forma palpebral, se situa en la parte superior de la cornea y es de forma ovalada con el eje mayor transversal. Está limitada a las capas superiores de la córnea y no suele vascularizarse. El centro lo forma un material necrótico y el suelo está infiltrado. Se acompaña de escasos síntomas de irritación, no progresa y puede durar varias semanas dejando al cicatrizar una opacidad en la lámina de Bowman (BEIGELMAN, 1950; DUKE-ELDER, 1965).

Otras complicaciones son el pseudogerontoxon, el queratocono y el queratoglobo.

Anatomía Patológica

Existen tres formas anatomoclínicas de la enfermedad: palpebral, límbica y mixta. Histológicamente las tres formas son similares diferenciándose solo en la localización de las lesiones.

Los cambios ocurren en el epitelio y en la sustancia propia, siendo estos últimos los mas extensos y precoces.

Al microscopio óptico se observa:

1) Sustancia propia: los primeros cambios consisten en vasodilatación y edema. Pronto aparece el infiltrado celular constituido principalmente por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos, además pueden encontrarse en cantidades variables otras células como basófilos, neutrófilos, fibroblastos, histiocitos y mastocitos que incluso infiltran el epitelio (BEIGELMAN, 1950; ALLANSMITH, 1978).

En los primeros estadios de la enfermedad el infiltrado muestra tendencia a ser perivascular y se situa inmediatamente debajo del epitelio. Posteriormente las células inflamatorias se dispersan por toda la sustancia propia y su relación con los vasos se hace menos patente, además aparecen nuevos vasos y se hipertrofia el tejido conectivo; como consecuencia se forman nódulos elevados sobre la placa tarsal que conforman el estroma de las papilas. En este estadio el número total de células inflamatorias no excede del normal; así podria ser que la proliferación conjuntiva fibrosa fuera un mecanismo de acomodación para albergar un número absoluto mayor de células inflamatorias (ALLANSMITH, 1978)

Los linfocitos pueden encontrarse aislados, dispersos, agrupados y en grandes masas, a veces formando pseudofolículos que carecen de centro germinal (BEIGELMAN, 1950). Mediante el uso de anticuerpos monoclonales se ha observado en los enfermos de conjuntivitis vernal un aumento de linfocitos inductores/estimulantes y de linfocitos

supresores/citotóxicos respecto de la población normal. Además los linfocitos inductores/ estimulantes constituyen el componente mas importante de las células T en el infiltrado celular. Estas células se encuentran en su mayoria en grandes grupos alrededor de los vasos sanguíneos o, menos frecuentemente, diseminados por la sustancia propia cerca del epitelio. Por el contrario los linfocitos supresores/citotóxicos, localizados en su mayoria en la sustancia propia próxima al epitelio o en el epitelio mismo representan una mínima parte del infitrado por linfocitos T (BHAN, FUJIKAWA & FOSTER, 1982; FUJIKAWA, FOSTER & BHAN, 1986).

Las células plasmáticas aparecen después que los linfocitos en el infiltrado celular y se encuentran en número elevado durante las exacerbaciones, desapareciendo en las remisiones. ALLANSMITH ha encontrado células plasmáticas productoras de Ig A, Ig D e Ig E en número elevado (ALLANSMITH, 1978). En la conjuntivitis vernal, los plasmocitos productores de Ig E estan elevados

tres veces respecto de los individuos normales segun revelan estudios realizados con anticuerpos fluorescentes (BLOCH-MICHEL et al, 1977; CARRERAS, 1983).

Los eosinófilos aparecen en menor proporción y se distribuyen por las capas superficiales del estroma cerca del epitelio, al cual pueden atravesar por movimientos ameboides y aparecer en las secreciones de estos pacientes. A veces pueden ser vistos atravesando las paredes de los vasos. Durante las remisiones el número de eosinófilos puede no disminuir apreciablemente.

Los mastocitos se localizan muy cerca de los vasos, incluso en sus paredes, y aparecen masivamente durante las remisiones.

Los histiocitos estan presentes siempre y muestran actividad fagocítica (BEIGELMAN, 1950).

En estadios avanzados se puede apreciar un aumento de las células fijas del tejido conjuntivo, pero siempre moderada y fuera de toda proporción con la hiperplasia de las fibras conectivas (MORGAN, 1971).

Los haces de colágeno de la sustancia propia sufren desde el principio de la enfermedad una hiperplasia, y en las capas profundas se anastomosan libremente dando lugar a una red irregular cuyos espacios contienen células inflamatorias, invaginaciones epiteliales, vasos sanguíneos y quistes. Mas importante que la hiperplasia es la degeneración hialina que sufren las fibras de colageno, uniéndose estas en bandas homogéneas acidofilicas. Este proceso de degeneración es mas evidente en las capas superficiales subyacentes al epitelio. Durante las remisiones el tejido conectivo se desintegra y los fragmentos pueden ser retirados por lo que la lesión exuberante se reduce. También ocurren degeneraciones grasa y calcárea en áreas aisladas (BEIGELMAN, 1950).

En la forma límbica ocurren los mismos cambios, proliferación del tejido fibroso con degeneración hialina del estroma e infiltración por células plasmaticas, linfocitos y eosinófilos BEIGELMAN, 1950).

2) Epitelio: Los cambios epiteliales aparecen precozmente, ocurriendo fenómenos proliferativos y degenerativos. Los cambios degenerativos son mas precoces y evidentes en las capas superficiales donde aparecen vacuolas y gránulos acidofílicos en el citoplasma y picnosis en el núcleo. A veces el epitelio que recubre la parte mas elevada de las papilas puede quedar reducido a una sola capa de células. Los fenómenos degenerativos son mas frecuentes en la forma límbica. Los cambios proliferativos consisten en aumento del número de capas hasta cinco, diez o mas capas de células irregulares y edematosas, tanto del tipo cúbico como del tipo en empalizada, o bien en la proliferación del epitelio hacia el interior de la masa fibrosa subyacente, unas veces en forma de cordones sólidos y otras de procesos glandulares simples con eósinofilos en su luz, que pueden ofrecer al corte el aspecto de nidos celulares o quistes. Las células caliciformes aumentan extraordinariamente en número y actividad, especialmente en los fondos de saco que se forman

entre las papilas. Los cambios degenerativos y proliferativos unidos a cierta queratinización dan lugar la transformación de un epitelio columnar estratificado con 2 ó 3 capas, en un epitelio escamoso estratificado con 8 ó 9 capas (BEIGELMAN, 1950; DUKE-ELDER, 1965).

En intima relación con los cambios degenerativos del epitelic estan los pseudoquistes y los puntos de HORNER-TRANTAS. Los pseudoquistes se originan aparentemente por dos mecanismos: el primero consiste en la aposición de dos capas epiteliales entre las papilas con acúmulo de mucina, procedente de la acumulación mucinosa de las células epiteliales, en el fondo de la cripta. El segundo consiste en degeneración de las células epiteliales mas internas de la capa epitelial hiperplásica. Los puntos de HORNER-TRANTAS son áreas circunscritas de células epiteliales que han degenerado rapidamente en una masa amorfa. A veces pueden encontrarse gránulos eosinofílicos procedentes de la desintegración de eosinófilos. Se situan en las capas profundas del epitelio o en

las prolongaciones epiteliales; con el tiempo progresan hacia las capas superficiales y rompen a traves del epitelio (BEIGELMAN, 1950).

Con el microscopio electrónico se observa, además de lo descrito, la presencia de basófilos como una constante de la enfermedad; se situan en la sustancia propia y en el epitelio. Allansmith encuentra 200 basófilos por milímetro cúbico en la conjuntiva de los pacientes de conjuntivitis vernal y ninguno en las conjuntivas normales. También encuentra mastocitos de modo rutinario en el epitelio; normalmente estan ausentes en esa situación (ALLANSMITH, 1978). Se ha comprobado ademas que en las fases agudas el 80% de los mastocitos están degranulados mientras que en las conjuntivas normales estan integros (HENRIQUEZ et al, 1983).

Tratamiento

La desensibilización del paciente frente a los alergenos no ha sido suficientemente

investigada debido probablemente a la multitud de ellos que parecen intervenir en la etiología, sin embargo, la experiencia existente no demuestra, hasta el momento, que produzca una mejoría significativa (EASTY, 1985).

Los antihistamínicos, locales o sistémicos, han mostrado ser efectivos solo en los casos leves (EASTY, 1985).

Los corticosteroides por vía tópica es la terapia mas efectiva de la que se dispone, no obstante, los efectos secundarios de esta (glaucoma, formación de cataratas y agravamiento de úlceras corneales), y la duración de la enfermedad limitan considerablemente su uso (ALLANSMITH, 1978).

El cromoglicato disódico, desde su introducción (EASTY et al, 1971), ha confirmado su efecto beneficioso en los pacientes con conjuntivitis vernal, aunque no elimina la necesidad del uso de antiinflamatorios mas potentes, como los corticosteroides durante los episodios agudos (EASTY, 1985). Su única propiedad

es la de prevenir la degranulación del mastocito (ALLANSMITH, 1978).

En nuestro medio, el uso de cromoglicato disódico no se ha mostrado eficaz (HIDALGO & CARRERAS, 1982) y de igual modo en Israel (HYAMS, BIALIK & NEUMANN, 1975)

Los ensayos realizados con el ácido acetilsalicílico por vía oral han resultado esperanzadores (ABELSON, BUTRUS & WESTON 1983; HIDALGO & CARRERAS 1986)

En los casos severos, con persistencia de los síntomas y signos intensos a pesar del tratamiento, puede ser necesaria la hospitalización en tanto que dicha medida aisla al paciente de los alergenos ambientales usuales (EASTY, 1985)

Entre la terapeútica de apoyo, las compresas frias, los colirios astringentes, mucolíticos como las soluciones al 1 y 2 % de carbonato sódico monohidratado (THEODORE, BLOOMFIELD & MONDINO, 1983) o la acetilcisteína en gotas para disolver

la secreción mucosa (EASTY, 1985), son de cierta utilidad para aliviar los síntomas.

La crioterapia o la excisión de las vegetaciones proporcionan un alivio efímero (THEODORE, BLOOMFIELD & MONDINO, 1983). Cuando se forman placas corneales los pacientes dejan de responder a la terapia con corticosteroides tópicos, siendo necesario la eliminación de dicha placa.

Etiopatogenia

La patogenia de la conjuntivitis vernal permanece en discusión. Se han considerado tres posibles teorías no excluyentes entre sí. Así, se han implicado determinados factores físicos, alteraciones endocrinas, y un estado alérgico.

La incidencia estacional de la conjuntivitis vernal ha sugerido que factores como el calor, la humedad, y especialmente la luz, sobre todo en la porción ultravioleta del espectro, desempeñen algun papel, no como factores etiológicos por sí

mismos, sino como contribuyentes o desencadenantes de la enfermedad.

Una alteración endocrina ha sido siempre implicada en todas las enfermedades de etiología oscura como es el caso de la conjuntivitis vernal. Así, se ha hecho responsable en este caso a un tipo especial de constitución denominada tipo linfático que se caracteriza por labilidad vasomotora, taquicardia, hiperplasia linfoide e hipoadrenalismo general (ANGELUCCI, 1848). Parece evidente que la conjuntivitis vernal se asocia frecuente, pero no invariablemente a trastornos constitucionales de este tipo, y la preponderancia en jóvenes sugiere una influencia endocrina, lo que no implica que dicha diátesis sea causal (DUKE-ELDER, 1965).

Actualmente parece estar bien establecido que en la conjuntivitis vernal esta implicado un mecanismo de hipersensibilidad tipo I. La etiología alérgica se apoya en los siguientes datos: a) tendencia a afectar a individuos jóvenes, b) ocurrencia estacional de los

episodios, c) presencia de abundantes eosinófilos en la secreción conjuntival (DUKE-ELDER, 1965), d) considerable incidencia de otras enfermedades atópicas en los pacientes de conjuntivitis vernal y en sus familiares (SMOLIN & O´CONNOR, 1981), e) la existencia de un paralelismo clínico entre la conjuntivitis vernal y la conjuntivitis de la fiebre del heno cuyo caracter atópico esta bien establecido (GRAYSON, 1979), f) positividad de las pruebas cutáneas de alergia en un alto porcentaje de pacientes con conjuntivitis vernal, significativamente mayor que el correspodiente para la población general pero no tan alto como en la fiebr del heno (ALLANSMITH & GILLETTE, 1980), g) los pacientes con conjuntivitis vernal muestran niveles medios de Ig E en suero y lágrima mas altos que los individuos normales aunque solo los niveles séricos son significativamente mas altos; los niveles séricos y lagrimales de Ig E de enfermos y normales muestran respectivamente una correlación significativa, lo que sugiere que los niveles de Ig E en lágrima son una función de los

niveles de Ig E en suero (ALLANSMITH, HAHN & SIMON, 1976), h) presencia de anticuerpos Ig E específicos frente a alergenos inhalantes en la secreción lagrimal de los pacientes con conjuntivitis vernal (BALLOW y MENDELSON, 1980; EASTY et al., 1980), i) los niveles de histamina en lagrima estan significativamente elevados en los pacientes con conjuntivitis vernal respecto de los sujetos normales (ABELSON et al., 1977), o afectos de otras inflamaciones oculares (ABELSON, BAIRD & ALLANSMITH, 1980), j) elevación en lágrima de la proteina básica mayor del eosinófilo y de los cristales de Charcot-Leyden respecto de individuos normales o afectos de otras enfermedades oculares (UDELL et al., 1981).

No obstante, la evidencia de un mecanismo alérgico en la conjuntivitis vernal no es concluyente para explicar la patogenia.

Así, Allansmith señala la existencia, minoritaria, de casos de conjuntivitis vernal sin picor, con papilas, y sin eosinofilos en los frotis conjuntivales cuya relacion con la

conjuntivitis vernal típica está aún por dilucidar (ALLANSMITH, 1978). Además, la existencia de la conjuntivitis gigantopapilar de los portadores de lentillas en la que la histología es idéntica a la de la conjuntivitis vernal, aunque con menos eosinófilos, y cuadro clínico indistiguible con esta última, junto con la existencia de enfermos con Ig E sérica elevada y otros con Ig E normal, han llevado a Allansmith, a Easty y a Baryshak a sugerir que la conjuntivitis vernal es un síndrome plurietiológico. En los climas cálidos, en un gran número de pacientes, la sintomatología dura todo el año, la Ig E es normal en suero y lágrima, no hay una historia familiar de atopia, y no responden al tratamiento con cromoglicato disódico (ALLANSMITH, 1978; BARYSHAK et al., 1982; EASTY et al., 1980; HIDALGO Y CARRERAS, 1986)).

Easty clasifica las conjuntivitis por hipersensibilidad inmediata en cinco grupos atendiendo a sus características:

1) Conjuntivitis tipo fiebre del heno, con cambios conjuntivales clínicos mínimos y

transitorios, asociados a Ig E especifica en lágrima y habitualmente en suero

2) Conjuntivitis vernal con papilas finas sin Ig E especifica en suero o lágrima.

3) Conjuntivitis vernal con Ig E especifica en lágrima pero no en suero.

4) Conjuntivitis vernal asociada a enfermedades atópicas en niños, con papilas en empedrado, elevación de la Ig E sérica y anticuerpos específicos en suero y lágrima.

5) Conjuntivitis vernal de comienzo tardío asociado a atopia severa, con signos y síntomas acentuados, Ig E sérica muy elevada e hipersensibilidad a un amplio espectro de alergenos (EASTY, 1985).

También sugiere que el grupo sin Ig E y sin historia familiar de atopia esta mediado por una subclase de la Ig G. Sin embargo su estudio realizado con inmunofluorescencia no aporta ningun resultado concluyente (EASTY et al., 1977).

En la conjuntivitis vernal los mecanismos atópicos realizan un papel primordial, no obstante la coincidencia de basófilos en el tejido conjuntival, el aumento de número de mastocitos, la lesión endotelial diseminada, el gran aumento de la masa tisular y el aumento de linfocitos y células plasmáticas indican que está ocurriendo algo más que una simple anafilaxis (ALLANSMITH, 1978). Así, diversos autores (MEISLER et al., 1980; SMOLIN y O'CONNOR, 1981) coinciden en la participación de un mecanismo de hipersensibilidad mediada por células, o tipo IV. El aspecto clínico e histológico es consistente con un mecanismo conjunto de hipersensibilidad tipos I y IV, y en especial un tipo de esta última, la hipersensibilidad basofílica cutánea (SMOLIN & O'CONNORS, 1981; KELLEY, 1985). Consiste esta última en una inmunidad mediada por células T con infiltración prominente de basófilos y mastocitos, y que a menudo aparece sobre un substrato alérgico. Existen suficientes razones para considerar que ambas formas de inmunidad se

refuerzan entre si. Las linfoquinas de los linfocitos activados promueven tanto la acumulación local de mastocitos y basófilos, como una respuesta local y sistémica de anticuerpo Ig E, que a su vez lleva a una infiltración celular local, liberación de mediadores de los mastocitos y probablemente otras formas de respuesta inmune (WAKSMAN, 1980).

OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVOS DEL TRABAJO

La conjuntivitis vernal es un padecimiento alergico crónico descrito exclusivamente en la clínica humana. La investigación de su patogenia está sujeta por tanto a las limitaciones que impone el estudio de pacientes en el medio clínico.

La disponibilidad de un modelo animal de una enfermedad humana es una util herramienta que permite la manipulación de alguna de las variables que intervienen en el proceso patológico.

Existen algunos modelos animales de padecimientos alérgicos agudos de la conjuntiva, pero el desarrollo de un modelo crónico ha exigido un conocimiento muy preciso de la patogenia de los mecanismos celulares inmunológicos. Solo recientemente se ha obtenido un modelo de respuesta crónica en cobayas. En la rata, los modelos existentes se han limitado a la fase aguda solamente. Dado que el sistema inmunológico de la rata es el mejor conocido, cualquier modelo desarrollado en este animal permite una más facil compresión de los mecanismos fisiopatológicos.

Nuestro empeño ha sido la elaboración de un modelo experimental de conjuntivitis alérgica crónica en ratas que nos permita estudiar alguno de los fenómenos inflamatorios propios de la conjuntivitis vernal.

MATERIAL
Y
METODOS

MATERIAL Y METODOS

Animales

Como animales de experimentación se usaron ratas macho de la cepa Wistar exogámicas, con un peso inicial aproximado de 150 gramos (Pan Lab S.L.). Se observó en las ratas hiperemia y secreción en ausencia de cualquier manipulación. El frotis practicado teñido con gram reveló la presencia de diplobacilos gram negativos que, según el antibiograma realizado, eran sensibles a la neomicina por lo que se instauró tratamiento tópico con esta.

Antígenos

Se usaron los siguientes antígenos: extracto proteico de Nippostrongilus brasiliensis (Nb), extracto proteico de Ascaris suum, y conjugados hapteno-proteína.

Extracto proteico de Nippostrongilus brasiliensis (Nb). Se obtuvo a partir de larvas en tercer estadio liofilizadas. Se trituraron en solución salina al 9% y se congelaron en nitrógeno líquido y descongelaron a 37°C repetidamente. Tras la centrifugación del homogenizado a 17.000 g durante 60 minutos a 4°C, se dializó el sobrenadante durante 48 horas en PBS 0,15 M a pH 7.3 en cuatro cambios de 2.5 litros. Se centrifugó nuevamente y se filtró con Millipore 0.45 µm antes de hacer las alicuotas y guardar a -20°C. La determinación de proteinas se realizó por el método de Bradford contra una curva standard de albúmina bovina (Bio Rad) (KOJIMA & OVARY, 1975).

Extracto proteico de Ascaris suum (Asc). Se obtuvieron áscaris adultos vivos del intestino de cerdos sacrificados en el Matadero Municipal. Se lavaron varias veces en exceso de salino para eliminar restos intestinales. Se trituraron y se homogenizaron a 4°C en Potter-Elvehjem con asistencia eléctrica, con una relación de una parte de gusanos y dos partes de Tris-ClH 0.1 M,

a pH 7.2. Se centrifugaron a 12.000 g durante 30 minutos a 4°C y se extrajo el sobrenadante opalescente que se dializó de igual modo que para el Nb. Se hicieron alicuotas y se conservaron a -20°C tras medir el contenido proteico por el método de Bradford (Bio Rad) (DOBSON, MORSETH & SOULSBY, 1971)

Conjugados hapteno-proteina. Como proteínas portadoras se usaron las albúmina séricas bovina, porcina, ovina, equina, y humana, ovoalbúmina, gammaglobulina bovina y porcina (Sigma), la proteína del extracto proteico de Nippo (Nb) y la proteína del extracto de áscaris (Asc). Como haptenos se usó el TNP (ácido 2,4,6 Trinitro-bencenosulfónico de Eastman). Para la conjugación se disolvieron por separado la proteína y el hapteno en bicarbonato sódico 1 M. Mientras se mantenía el recipiente con la proteína en agitación continua se añadió el hapteno gota a gota, se protegió de la luz con papel de aluminio y se dejó en agitación dos horas a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C (HUDSON & HAY,

1978). Se dializó en membrana con PBS 0.15 M pH 7.3 cuatro cambios de 2.5 l cada uno, finalizando cuando la lectura del baño en espectrofotómetro a 360 nm era inferior a 0.005 (GARVEY, CREMER & HUDSON, 1977). Se filtró el conjugado con Millipore 0.45 µm, se hicieron alícuotas y se conservaron a 4°C. Los antígenos fueron preparados calculando un índice de conjugación de 15 moles de hapteno por mol de proteína en el caso de las albúminas, 5 moles de hapteno por mol de proteína en el caso de las globulinas y 7 moles de hapteno por 100.000 dalton de proteína en el caso del Asc y del Nb. Todos los antígenos fueron preparados *ad hoc* para cada grupo de experimentación.

Adyuvante.

Se usó la alúmina (hidróxido de aluminio, de Merck) en suspensión en Tris-ClH a pH 7.3, esterilizada en autoclave, dividida en alícuotas y conservada a 4°C (LEVINE & VAZ, 1971; MURPHEY et al., 1974).

Marcaje de Albúmina Sérica Bovina con I^{125} (BSA-I^{125})

En un tubo de plástico sumergido en cubeta a 4°C se añadieron en el siguiente orden 1) 500 µCi de I^{125} (5 µl), 2) 200 µg de BSA (500 µgr) 3) 5 µl de una solución conteniendo INa 0.6 mg/ml en tampón salino Veronal (VBS), 4) 5 µl de una solución de Lactoperoxidasa 1 mg/ml, 5) 5 µl de peróxido de hidrógeno diluido al 1/10.00. Se agitó cuidadosamente y se dejó 15 minutos a 4°C y se añadieron 10 µl de una solución conteniendo INa 6 mg/ml y N_3Na 0.03 mg/ml, en VBS para detener la reacción. Se completó el volumen hasta 2 ml con VBS. Para la determinación del grado de unión se determinó el número de cuentas por minuto (cpm) en contador de radiaciones gamma, de una alícuota de 10 µl de la solución final. Posteriormente se añadieron a esta alícuota, 10 µl de suero humano normal y 3 ml de ácido tricloroacético al 20 %, se mezcló y se centrifugó a 3.000 g durante 60 minutos eliminando el sobrenadante. Se determinaron las cpm del precipitado. El

porcentaje de albúmina unida se determino por la relación entre el número de cpm antes y después de precipitar. Finalmente se dializó en membrana durante una noche a 4°C en dos litros de VBS con agitación rotatoria y se hicieron alícuotas y se conservaron a -70°C (MISHEL & SHIIGI 1980).

Inmunización.

Se indujo un estado de hipersensibilidad tipo I siguiendo la pauta de Tada:

1) Inyección intraperitoneal en el dia 0 de 1 µgr de la proteína del parásito (Asc o Nb) con 1 mg de alúmina en 0.5 ml de ClNa 0.15 M para sensibilizar a los linfocitos T coadyuvantes/ estimulantes frente a la proteína portadora.

2) Inyección intraperitoneal de 1 µg de TNP-Asc o TNP-Nb, respectivamente, con 1 mg de alúmina y en 0.5 ml de ClNa 0.15 M, que sensibiliza a las celulas B frente a la proteína portadora y al hapteno (TADA OKUMURA & TANIGUCHI, 1974; ISHIZAKA, 1978).

Además se ensayaron otras dosis de inmunización con el Asc:

Dia 0: 0.1 µg Asc. Dia 15: 1 µg Asc-TNP.

Dia 0: 10 µg Asc. Dia 15: 10 µg Asc-TNP.

Dia 0: 100 µg Asc. Dia 15: 100 µg Asc-TNP.

Siempre con el mismo adyuvante y en el mismo vehiculo.

Sangrado.

Se realizó en uno de los grupos transcurridos cinco dias de la inmunización por punción intracardiaca bajo anestesia con éter. Para la extracción del suero se centrifugó a 2.500g durante 10 minutos, guardando el sobrenadante a -20°C.

Provocación de la respuesta alérgica en la conjuntiva.

En los grupos inmunizados con Nb y TNP-Nb, el antígeno usado para la provocación de la respuesta alergica en la conjuntiva fué introducido por via

intraconjuntival con jeringuilla de insulina calibre 26 G, en un volumen de 5 µl conteniendo 5 µg de proteína. Se estudió la respuesta frente a TNP-Nb, TNP-Pv (TNP conjugado a una proteína no usada en la inmunización, cada vez distinta y no repetida) y a Pv (la misma proteína sin conjugar). Como Pv se usaron las albúmina séricas bovina, porcina, ovina, equina, humana, ovoalbúmina, y las gammaglobulina bovina y porcina (Sigma), La estimulación de la respuesta alérgica fué iniciada una semana después de la inmunización y repetida a intervalos semanales hasta agotar clinicamente dicha respuesta. La observación se hizo con luz ambiente, sin magnificación y valorada según el grado de edema conjuntival. Los grupos de ratas inmunizados con Asc y TNP-Asc fueron provocados instilando previamente sobre la conjuntiva 5 µl de Ditiotreitol 0.01 M 5 minutos antes de la aplicación del antígeno, tambien tópicamente (TROCME et al., 1986), en un volumen de 5 µl conteniendo 5 µg de proteínas. Se estudió la respuesta frente a TNP-Asc, Asc, TNP-Pv, y Pv.

Detección de Anticuerpos de la Clase Ig E Circulantes.

Se realizó por el método de la anafilaxia cutánea pasiva (PCA). En el lomo de ratas no inmunizadas rapado 48 horas antes, y bajo anestesia por inhalación de éter, se inyectaron intradermicamente con aguja 26 G. 0.1 ml de los sueros diluidos de las ratas en estudio y sueros normales de control. Transcurridas 48 horas se inyectó en la vena dorsal del pene 1 ml de una solución conteniendo 1 mg/ml de TNP-Asc o TNP-Pv con azul de Evans al 0.5 %, previa inyección de histamina como control positivo de la reacción. A la media hora se sacrificaron los animales y se les quitó la piel observando en el dorso el resultado de la reacción por la tinción que provoca la extravasación del azul de Evans unido a las proteinas séricas(WATANABE & OVARY, 1977).

Valoración Cuantitativa Objetiva de la Respuesta.

En dos grupos de ratas inmunizados con 1 µg Asc en el día 0 y 1 µg TNP-Asc en el día 15 el primero; y 10 µg Asc en el día 0 y 10 µg TNP-Asc en el día 15 el segundo se estimuló la respuesta conjuntival con TNP-Asc en el ojo derecho, y Pv en el ojo izquierdo en el primer grupo, mientras que el segundo grupo recibió TNP-Pv en el ojo derecho y Pv en el ojo izquierdo. Inmediatamente después de la provocación se inyectó en la vena dorsal del pene de cada rata una solución conteniendo 1 µg de BSA-I[illegible] en 0.5 ml de cloruro sódico 0.15 M. Transcurrida media hora se sacrificaron los animales y se extirparon en bloque: globos oculares, conjuntivas y anejos, y contenido orbitario de ambos ojos por separado. Se pesó cada bloque individualmente en balanza Metzler de precisión, y se midió en un contador gamma el número de cpm de cada ojo, estableciendo un cociente entre el número de cpm y el peso de cada ojo (ALLANSMITH et al. 1981).

Métodos Histológicos.

Las conjuntivas y el parpado superior de ambos ojos fueron extirpados a los 30 minutos, 24, y 48 horas de la estimulación y fijadas en formol al 10 %, procesadas e incluidas en parafina. Se hicieron cortes de 3 µm de espesor sagitales a la conjuntiva y montados sobre portas albuminados. Se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina y con PAP y contraste con Verde-Metilo-Pironina de Branchet.

Recuento del Infiltrado Inflamatorio.

Se realizo a doble máscara en cortes teñidos con hematoxilina-eosina o con PAP de ratas pertenecientes a los grupos G, H e I en las que el ojo derecho había sido estimulado con TNP-Asc y el izquierdo con TNP-Pv. Se contó el infiltrado con el objetivo 40X y ocular 10X con rejilla. Para el recuento se subdividió el espacio subepitelial en campos de 50 cuadriculas cada uno y se anotó el

numero total de células por campo hasta recorrer todo el espacio subepitelial. Finalmente se hizo la media de células por campo de cada pieza. La comparación estadística se realizó con el test de muestras apareadas de Wilcoxon. Otras comparaciones se realizaron por el test de Student y por el coeficiente de correlación de Kendall.

Método Peroxidasa-Antiperoxidasa

Se realizó con la técnica de Sternberger (STERNBERGER, 1979)

1º Desparafinado

- Se escogen los cortes de conjuntiva a estudiar y cortes de conjuntiva y ganglio para los controles positivo y negativo.
- Con lapiz de punta de diamante se enmarcan los cortes en un doble círculo y se identifican convenientemente.
- Se sumergen en tres baños de xilol de diez minutos de duración cada uno.

- Se lavan en alcohol absoluto.
- Se sumergen en baño alcohol absoluto durante tres minutos.
- Se sumergen en alcohol de 95° durante tres minutos

2º Primera inhibición de la actividad peroxidasa endógena

- Se sumergen en una solución conteniendo 0.3 ml de ClH al 2% por cada 25 ml de alcohol absoluto durante 30 minutos.

3º Rehidratación

- Se procede a la hidratación hasta agua destilada siguiendo concentraciones decrecientes de alcohol.

4º Segundo bloqueo de la actividad peroxidasa endógena.

- Se secan las preparaciones hasta el borde interno del marco

- Se añade peróxido de hidrógeno al 3 % sobre las piezas hasta cubrirlos y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Se lavan con PBS 0.15 M a pH 7.6 con tres baños de 5 minutos.

5º Bloqueo de la fijación inespecífica.

- Se secan los portas hasta el borde interno del marco.
- Se añade suero bloqueante al 1/10 sobre los cortes cubriendo la preparación, y se incuban en cámara húmeda a 37°C en estufa durante 30 minutos.
- Se elimina el exceso de suero sin lavar, solo agitando el porta.

6º Fijación del anticuerpo primario.

- Se secan los portas hasta el borde del marco.
- Se añade el anticuerpo primario sobre el especimen en estudio y sobre el control

positivo, dejando los controles negativos con suero bloqueante.

- Se incuba en cámara húmeda a 4°C durante 24h.
- Se lavan tres veces con PBS.

Fijación del anticuerpo de enlace.

- Se secan los portas hasta el borde interno del marco.
- Se añaden sobre todos los cortes 1-3 gotas del anticuerpo de enlace hasta cubrirlos.
- Se incuban a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda.
- Se lavan tres veces con PBS.

Fijación del anticuerpo marcador.

- Se secan los portas hasta el borde del marco.
- Se añaden 1-3 gotas del anticuerpo marcador sobre todos los cortes.
- Se incuban en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.
- Se lavan tres veces con PBS.

9º Revelado con solucion substrato.

- Se secan los portas hasta el borde del marco.
- Se incuban con una solución de diaminobencidina (DAB) al 0.05 % en TBS a la que se le ha añadido una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % en agua destilada por cada 2 ml de solución de DAB. El proceso de revelado se efectúa bajo control microscópico, con un tiempo máximo de revelado de 10 minutos.
- Se lavan con agua destilada abundantemente para detener el revelado.

10º Tinción de contraste con VMP.

- Se tiñe con VMP durante 10 minutos.

11º Deshidratación y montaje.

- Se sumergen directamente en alcohol de 95°C y alcohol absoluto.
- Se sumergen en xilol, y se montan en medio inerte.

Como anticuerpos primarios se usaron antisueros en conejo frente a Ig E e Ig G a de rata (RARat/Ig E y RARat/Ig G a), amablemente cedidos por los Drs. Ishizaka, a las diluciones de 1/1000 y 1/2000 respectivamente, montados en PBS con suero bloqueante al 1/100.

Como anticuerpo de enlace se usó un antisuero de cabra frente a Ig G de conejo (GAR/Ig G) a la dilución 1/50.

Como anticuerpo marcador unido inmunologicamente a la peroxidasa se usó un antisuero de conejo (PAP/R) a la dilución 1/50.

El suero bloqueante usado fue un suero normal de cerdo.

El PBS se realizó atendiendo a la siguiente fórmula:

ClNa: 7.75 g/l; K_2HPO_4: 1.50 g/l; KH_2PO_4: 0.2 g/l. El pH se ajustó a 7.6 con NaOH.

Como control positivo se usó un corte de ganglio de rata al que se le hizo la tinción completa. Como controles negativos se usaron un corte de ganglio y uno de conjuntiva que no fueron

incubados con el anticuerpo primario, siguiendo después el protocolo completo.

RESULTADOS

RESULTADOS

El lote de ratas inmunizadas en el dia 0 con 1 µg de Nb más 1 mg de alúmina, y 1 µg de TNP-Nb más 1 mg de alúmina en el día 15, fué dividido para la provocación, a partir del día 21 en dos grupos:

En el primer grupo, Nb 1 (Ver tabla 1), se inyectó en la conjuntiva del ojo derecho una solución conteniendo 1 mg/ml de TNP-Nb, y en el ojo izquierdo TNP-Pv a la misma concentración, siendo el volumen inyectado en cada conjuntiva de 10 µl aproximadamente. La pequeña burbuja y los signos irritativos desaparecían en pocos minutos después de la inyección. A los 10 minutos de la provocación comenzaban a aparecer signos inflamatorios consistentes en edema, hiperemia y secrecion acuosa. que eran de intensidad máxima a los 30 minutos.

La provocación de la respuesta alérgica fué iniciada una semana después de la inmunización y

GRUPO Nb 1

Inmunización = Dia 0; 1 µgr Nb;
Dia 15; 1 µgr TNP-Nb

RATA	SEMANA 1		2		3		4		5		6		7		8	
	OD: TNP-Nb / OI: TNP-PV															
Nº	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
1	+	+/-	+	+	+	+/-	++	-	++	-	++	++	++	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+/-	++	-	++	-	++	+	++	+	+	+
3	+	-	-	-	+	+/-	++	-	++	+	++	++	++	+/-	+	-
4	-	-	-	-	+	+	++	-	++	+	++	+	++	+	+/-	+/-
5	+	+	-	-	+	+/-	++	-	++	+	++	+	++	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+	++	-	+/-	-	+/-	+/-	++	+	M	
7	+	+	+	+	+	+/-	++	-	+	-	++	++	++	+/-	+	+
8	-	+/-	+	+	+	-	++		+	-	++	++	++	+/-	+	+/-

M; Encontrada muerta.

TABLA 1

realizada a intervalos semanales hasta que dejaron de observarse signos inflamatorios inmediatos tras la inyeccion del antigeno.

La valoración de la intensidad de los signos clinicos de la respuesta alergica se hizo en cruces:

- : No hay respuesta (foto 1)

+/- : Dudoso

+ : Leve o moderada. Existe respuesta inflamatoria, evidente al comparar con el ojo control (foto 2)

++ : Intensa. El edema produce protusión intensa levantando la conjuntiva (foto 3)

+++ : La protusion provocada por el intenso edema hace que el borde palpebral se despegue del ojo

Como proteínas portadoras del hapteno en el caso de la proteina variable (Pv) fueron usadas semanalmente: 1) albúmina bovina, 2) ovoalbúmina, 3) albúmina bovina, 4) albúmina de cerdo,

FOTO 1

(Respuesta negativa)

FOTO 2

(Respuesta de una cruz)

FOTO 3

(Respuesta de dos cruces)

5) gammaglobulina bovina, 6) albúmina equina, 7) albúmina humana, 8) hemocianina de lapa (KLH)

En los ojos provocados con TNP-Nb, la respuesta fué moderada en las tres primeras provocaciones con edema e hiperemia evidentes pero no intensos, siendo máxima entre la cuarta y la séptima semanas, en que el edema provocaba gran protusión de la conjuntiva e hinchazón del párpado superior en el 85% de los casos, y moderada o leve en el resto.

En los ojos provocados con TNP-PV, la respuesta fué más moderada en la mayoría de los casos e incluso difícil de valorar o negativas. La máxima intensidad se registró en las semanas 5ª y 6ª en todos los individuos que dieron una respuesta similar en el ojo contralateral provocados con TNP-Nb. En la octava semana la respuesta inflamatoria disminuyó notablemente y se interrumpieron las provocaciones.

El segundo grupo, Nb 2, (Ver tabla 2) fué provocado con TNP-Pv en el ojo derecho, y la misma Pv en el ojo izquierdo, en el mismo orden

GRUPO Nb 2

Inmunización = Dia 0: 1 µgr Nb;
Dia 15: 1 µgr TNP-Nb

	SEMANA																	
RATA	1		2		3		4		5*		6		7		8			
	⟵⟵⟵⟵⟵⟵⟵⟵		OD: TNP-PV / OI: PV				⟵⟵⟵⟵⟵⟵⟵		⟵⟵⟵⟵⟵⟵		OD: TNP-Pv / OI: TNP-Nb				⟵⟵⟵⟵⟵⟵	
Nº	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
1	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	++	-	++	++	+	++	+	+/-		
2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	++	+	+	+	+		
3	+	-	+	-	+/-	-	M											
4	+	-	+	-	-	-	-	-	+	--	++	++	+	+	+	+/-		
5	+	-	+	-	-	-	-	-	++	--	++	+	+	++	+/-	+/-		
6	+	-	+	-	-	-	-	-	++	--	++	++	M					
7	+	-	-	-	M													

(*): En la cuarta semana se inyectó a todas las ratas una nueva dosis de 1 µgr de TNP-Nb por vía intraperitoneal.

M: Encontrada muerta.

TABLA 2

que el grupo Nb 1. La Pv, usada como control, no provocó en ningun momento la aparición de signos inflamatorios, aparte de la hinchazón inicial producida por la inyección de antígeno, y que cedió antes de 10 minutos. En las ratas provocadas conjuntivalmente con TNP-Pv se observó una respuesta positiva con signos inflamatorios leves o moderados en la mayoría de los casos en las primerasdos semanas. En la tercera y cuarta semana la respuesta se hizo negativa en todos los casos.

En este momento se administró una nueva inyección intraperitoneal de 1 µg de TNP-Nb y se procedió a provocar el ojo izquierdo con TNP-Nb. En la siguiente provocación hubo una respuesta intensa en ambos ojos en todas las ratas, con escasas diferencias entre los ojos provocados con TNP-Pv y los provocados con TNP-Nb, mayor que la conseguida en las primeras estimulaciones en los ojos provocados con TNP-Pv, y similar a las obtenidas en el segundo grupo. Esta respuesta aumento en intensidad en la sexta

GRUPO Asc 1

Inmunización ♦ Dia 0; 1 µgr Asc;
Dia 15; 1 µgr TNP-Asc

	SEMANA																			
RATA	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	♦ OD: TNP-Asc / OI: Asc ♦																			
Nº	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
1	+	-	++	-	++	--	+	++	+	++	+	++	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
2	+/-	-	+	-	++	-	+	++	+	++	+	++	+	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-	-
3	+	-	+	-	+++	--	+++	+++	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
4	-	-	+/-	-	+	-	-	+	+	++	++	++	-	+/-	+/-	-/-	-	+/-	-	-
5	+	-	++	-	++	--	--	++	+	++	+	++	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-	-
6	+	-	+	-	++	--	++	+	+	+	+	+	+/-	-/-	+	+	+/-	+/-	-	-
7	+/-	-	+	-	+	-	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	-	-

En todos los ojos se administró DTT por vía tópica 5 minutos antes de la provocación

Después de la décima semana, se hacen tres provocaciones más que resultan negativas en todas las ratas

TABLA 3

semana , y a partir de la séptima decreció hasta hacerse debil o moderada en la octava.

El primer lote de animales, inmunizado en el dia 0 con 1 µg de Asc mas 1 mg de alúmina, y 1 µg de TNP-Asc mas 1 mg de alúmina en el dia 15, Asc-1 (Ver tabla 3) fué provocado a a partir del dia 21 con la aplicación del antígeno en gotas sobre la conjuntiva, previa administración también tópica cinco minutos antes de 5 µl de una solución 0.1 M de Ditiotreitol. En el ojo derecho se aplicó TNP-Asc, y en el contralateral solamente Asc. Durante las primeras dos semanas se apreció una respuesta positiva solo en los ojos provocados con TNP-Asc, en tanto que en los provocados con Asc fueron negativos. En la tercera semana la respuesta en el ojo derecho se hizo muy intensa llegando el edema a separar el borde palpebral del ojo. Al mismo tiempo apareció una respuesta positiva, e incluso intensa en los ojos provocados con Asc que llegó a alcanzar la intensidad de los ojos provocados con TNP-Asc. Esta respuesta se mantuvo, aunque disminuyendo de intensidad,

durante tres semanas mas, y comenzó a hacerse dudosa o negativa a partir de la séptima gradualmente hasta la décima. En las semanas undécima y duodecima los signos inflamatorios inmediatos eran mínimos o ausentes deteniendose las provocaciones en la semana decimotercera.

Un lote de animales fué inmunizado en el día 0 con 0.1 µg de Asc mas 1 mg de alúmina, y 1 µg de TNP-Asc mas 1 mg de alúmina en el día 15 y estimulado a partir del día 21 con TNP-Asc en el ojo derecho y TNP-Pv en el ojo izquierdo. Las respuestas fueron negativas o dudosas durante tres semanas por lo que se desechó este grupo y esta pauta de inmunización.

Se inmunizaron otros tres grupos:

G) día 0: 1 µg de Asc mas 1 mg de alúmina; día 15: 1 µg de TNP-Asc mas 1 mg de alúmina

H) día 0: 10 µg de Asc mas 1 mg de alúmina; día 15: 10 µg TNP-Asc mas 1 mg de alúmina

I) día 0: 100 µg de Asc mas 1 mg de alúmina; día 15 100 µg de TNP-Asc mas 1 mg de alúmina.

El primero de ellos, grupo G, fue provocado durante tres semanas con TNP-Asc en el ojo derecho, y TNP-Pv en el ojo izquierdo. Los dos grupos restantes, grupos H e I fueron subdivididos para la provocación, y en ambos se realizó de la misma manera:

rata 1, ojo derecho: TNP-Asc, ojo izquierdo: Asc; ratas 2 y 3, ojo derecho: TNP-Asc, ojo izquierdo: TNP-Pv; ratas 4 y 5, ojo derecho TNP-Pv, ojo izquierdo: Pv.

Como proteína portadora variable (Pv) fueron usadas por orden: albúmina bovina, albúmina de cerdo y albúmina de oveja.

Las respuestas obtenidas (Ver tablas 4, 5 y 6) fueron mas evidentes en los ojos provocados con TNP-Asc, que llegaron a exhibir la máxima intensidad descrita para los grupos anteriores.

GRUPO 6
Inmunización ♦ Dia 0; 1 µgr Asc
Dia 15; 1 µgr TNP-As

RATA	SEMANA 1		2		3	
	OD; TNP-ASC / OI; TNP-PV					
Nº	D	I	D	I	D	I
1	+	+/-	+/-	+/-	+	+
2	+	-	+/-	+/-	+	+/-
3	++	+	++	+/-	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+/-	+/-
7	+	+	++	+	+/-	+/-
8	++	+	+	+	+	+
9	++	+	+++	+	++	+
10	+	-	+++	+	++	+

TABLA 4

GRUPO H
Inmunización ♦ Día 0: 10 µgr Asc
Día 15: 10 µgr TNP-As

RATA	SEMANA 1 D	1 I	2 D	2 I	3 D	3 I
Nº	OD: TNP-ASC / OI: ASC					
1	+	+	++	+	+/-	-
	OD: TNP-ASC / OI: TNP-PV					
2	+++	++	+++	+	++	++
3	+	-	+/-	+	+/-	+
	OD: TNP-PV / OI: PV					
4	+/-	-	+	-	+	-
5	-	-	-	-	-	-

TABLA 5

GRUPO I
Inmunización : Dia 0; 100 µgr Asc
Dia 15; 100 µgr TNP-As

RATA	SEMANA 1 D	1 I	2 D	2 I	3 D	3 I
	OD: TNP-ASC / OI: ASC					
Nº1	+	+	++	++	++	++
	OD: TNP-ASC / OI: TNP-PV					
2	+++	+/-	+++	++	++	++
3	+/-	+/-	+	-	+	-
	OD: TNP-PV / OI: PV					
4	-	+/-	-	-	-	-

TABLA 6

La provocacion con TNP-Pv dio respuestas debiles y efimeras cuando al ojo contralateral se administraba Pv, sin embargo, en los casos en que este era provocado con con TNP-Asc, la respuesta frente a TNP-Pv fué intensificándose en sucesivas provocaciones.

En los grupos G H, e I se administró DTT por via tópica 5 minutos antes de la provocación con el antigeno

En todos los grupos, Nb-1, Nb-2, Asc-1, G, H, e I, se observaron las conjuntivas 24 y 48 horas después de cada provocacion. Estas presentaban un aspecto deslustrado, borramiento del dibujo vascular, engrosamiento e hiperemia. Estos signos fueron mas intensos y duraderos en las ratas que fueron provocadas con el hapteno unido a la proteína portadora usada en la inmunización, Nb y Asc.

Para la valoración objetiva de la respuesta inflamatoria en la conjuntiva se inmunizaron dos grupos con las siguientes pautas:

grupo J: día 0: 1 µg Asc mas 1 mg de alúmina; día 15: 1 µg TNP-Asc mas 1 mg de alúmina.

grupo I: día 0: 10 µg Asc mas 1 mg de alúmina; dia 15: 10 µg de TNP-Asc mas 1 mg de alúmina

En el día 21, se procedió a la provocación de la respuesta alérgica en ambos grupos. Tras la administración tópica del Ditiotreitol sobre la conjuntiva, se provocó la respuesta alérgica e inmediatamente después se inyectó 1 µg de BSA-I^{125} en la vena dorsal del pene. Transcurrida media hora se extirparon los globos oculares, y tras ser pesados, se midió el número de cuentas por minuto (cpm) en un contador de radiaciones gamma. Se establecieron los cocientes entre las cpm y el peso en cada rata, y se compararon estadísticamente en ambos grupos. El primer grupo (Ver tabla 7) se provoco con TNP-Asc en el ojo derecho, mientras el ojo izquierdo recibió albúmina bovina como control. La comparación estadística dió una t_{11}= 3'797 con 11 grados de libertad, siendo significativo para p<0'002.

Comparación entre los ojos provocados con TNP-Asc (OD)
y los ojos control (OS) a los que se les administró BSA.

Test de Student.

Grupo J → Día 0: 1 µg Asc
Día 15: 1 µg TNP-Asc

RATA	MASA (mg)		CPM		CPM / MASA	
Nº	OD	OS	OD	OS	OD	OS
1	563	463	2.965	2.154	5'266	4'650
2	642	490	6.144	1.468	9'570	2'996
3	484	597	1.251	1.567	2'585	2'625
4	661	663	2.870	1.453	4'342	2'192
5	505	426	1.398	1.127	2'768	2'646
6	698	701	2.082	1.347	2'983	1'922
7	635	602	3.827	2.416	6'027	4'013
8	625	630	3.946	2.107	6'314	3'344
9	649	438	6.537	2.742	10'072	6'206
10	568	560	2.152	1.451	3'789	2'591
11	702	613	5.770	2.604	8'219	4'248
12	525	422	1.886	1.106	3'592	2'621

t_{exp} = 3,797
grados de libertad = 11
$p < 0,002$

TABLA 7

Comparación entre los ojos provocados con TNP-BSA (OD) y los ojos control (OS) a los que se les administró BSA.

Test de Student.

Grupo K Inmunización → Dia 0: 10 µg de Asc

Dia 15: 10 µg de TNP-Asc

RATA	MASA (mg)		CPM		CPM / MASA	
Nº	OD	OS	OD	OS	OD	OS
1	531	549	3.312	2.080	6´237	3´789
2	548	673	1.279	680	2´334	1´010
3	477	783	2.615	2.212	5´482	2´825
4	531	567	3.353	2.266	6´315	3´996
5	457	554	1.505	1,783	3´293	3´218

t_{exp} = 3´671

grados de libertad = 4

p < 0´02

TABLA 8

El segundo grupo (Ver tabla 8) fué provocado con TNP-Pv en el ojo derecho y Pv en el ojo izquierdo, usandose igualmente albumina bovina como Pv. La comparación estadística con el test de Student dió una t_{exp}= 3'671 con 4 grados de libertad, siendo significativo para $p<0.05$.

La detección de anticuerpos de la clase Ig E circulantes se realizó por el método de la anafilaxia cutánea pasiva (PCA). Se estudiaron los sueros de las ratas 1, 2 y 4 del grupo H y y de las ratas 1, 2, 3, y 4 del grupo I a las diluciones 1:2, 1:5 y 1:10; y de los grupos J y K a las diluciones 1:4 y 1:8. Como antigenos se usaron el TNP-Asc en todos los grupos y TNP-Pv en los grupos J y H. (foto 4)

El resultado en el grupo H a la dilución 1:2 fué positivo en la rata H-1 con 12 mm de Ø y en la rata H-2 con 15 mm mm de Ø. La rata H-4 fue negativa. A la dilución 1:5, la rata H-1 fué dudosa con una respuesta menor de 5 mm; la rata H-2 dió un halo de 1'3 mm de Ø. A la dilución 1:10

la rata H-2 dió una respuesta positiva con 10 mm de Ø.

En el grupo I, a la dilución 1:2 fué positiva para las ratas I-1 con 25 mm de Ø e I-2 con 26 mm de Ø, y negativa para las ratas I-3 e I-4. A la dilución 1:5, la respuesta fué positiva para I-1 con 18 mm de Ø, y con 15 mm para I-2. A la dilución 1:10, la rata I-1 dió una respuesta positiva con 10 mm de Ø, y la rata I-2 dió 6 mm de Ø

En los grupos J y K, la provocación de la PCA con TNP-Asc fue positiva a la dilución 1:4 en las ratas J-2 con 12 mm de Ø,, J-7 con 5 mm de Ø, J-11 con 10 mm deØ, K-3 con 20 mm de Ø y K-4 con 18 mm de Ø. En la rata J-3 la respuesta fué dudosa con 3 mm de Ø. A la dilución 1/8 fué positivo para el suero de la rata K-3 con 11 mm de Ø. Para la provocación de la PCA con TNP-Pv se hizo una colección de los sueros de las ratas. La respuesta fue positiva a la dilución 1:2 con 6 mm de Ø.

La investigacion de anticuerpos de la clase Ig G a con sueros calentados a 56°C durante 2

horas y un periodo de incubación de 4 horas dio resultados negativos o dudosos con halos de tinción menores de 2 mm de Ø

FOTO 4

(Resultados de las PCAs grupos J y K)

(Antigeno usado: TNP-Asc)

Histología

Tras la tercera provocación, las ratas de los de los grupos G, H, e I, fueron sacrificadas a los 30 minutos, 24 y 48 horas y se extirparon las conjuntivas de ambos ojos.

La tinción con hematoxilina-eosina mostró en las ratas sacrificadas a los 30 minutos de la provocación, un intenso edema del estroma y el epitelio con desestructuración y pérdida de la arquitectura, intensa vasodilatación arteriolar y capilar (foto 6), degranulación intensa y extensa de los mastocitos y escaso infiltrado inflamatorio (foto 7), aunque mayor que en los controles (foto 5).

A las 24 horas el infiltrado inflamatorio era evidente aunque moderado compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y, en menor cantidad macrofagos y monocitos y PMNN (fotos 8 y 9).

A las 48 horas el infiltrado inflamatorio era intenso, de localización preferentemente

subepitelial y perivascular con infiltracion del epitelio. El edema persistia a las 48 horas con desestructuración completa y pérdida de la arquitectura del epitelio y estroma. Los mastocitos aparecian completamente granulados en la mayoría de los casos (fotos 10 y 11)

En la mayor parte de los casos se observó proliferación epitelial con aumento del número de capas, y formación de papilas con proliferación conectiva, y con un eje vascular.

Las tinciones con PAP para Ig E y Ig G-a mostraron abudantes células teñidas en ambos ojos de las ratas provocadas (fotos 12-15). El contraste con verde-metilo-pironina que tiñe el ADN de azul verdoso, el ARN de rojo y los gránulos epiteliales también de rojo, mostró que se trataban de células plasmáticas y de mastocitos y algunos eosinófilos. Los plasmocitos teñidos fueron hallados en situación subepitelial y perivascular, y algunas veces infiltrando el epitelio (fotos 16-22).

Se compararon los ojos estimulados con TNP-Asc con los ojos estimulados con TNP-Pv en cuanto al número de celulas componentes del infiltrado, edema epitelial, proliferación epitelial y formación de papilas.

En primer lugar se procedió a comparar estadísticamente los resultados de los dos observadores y no se encontraron diferencias significativas entre ambos (Tabla 9).

Posteriormente se comparó el infiltrado inflamatorio entre los ojos provocados con TNP-Asc y los provocados con TNP-Pv (Tabla 10). Los resultados mostraron que existía un mayor infiltrado estadísticamente significativa con $p < 0.02$ en los ojos provocados con la proteína portadora usada en la inmunización unida al hapteno respecto de los provocados con la proteína variable conjugada también al hapteno.

También se estudió el número de plasmocitos productores de Ig E (Tabla 11) y de Ig G_{2a} (Tabla 12) en ambos grupos:

La comparación estadística mostró que no existían diferencias significativas entre los ojos provocados con TNP-Asc y los provocados con TNP-Pv

Sin embargo, el número de plasmocitos productores de Ig E sí estaba en relación con la intensidad del infiltrado inflamatorio y existía una correlación positiva estadísticamente significativa con $p < 0'05$ entre ambos (Tabla 13).

También existía una correlación estadísticamente significativa con $p < 0'01$ entre el número de plasmocitos productores de Ig G_{2a} y el infiltrado inflamatorio (Tabla 14).

Del mismo modo, había una correlación positiva estadísticamente significativa con $p < 0'05$ entre el número medio por campo de plasmocitos productores de Ig E, y el de plasmocitos productores de Ig G_{2a} (Tabla 15). El porcentaje de plasmocitos productores de Ig E era mayor que el de Ig G_{2a}, siendo la diferencia estadísticamente significativa con $p < 0'02$ (Tabla 16).

FOTO 5

(Conjuntiva control teñida con

hematoxilina-eosina)

FOTO 6

(Conjuntiva a los 30' de la provocación

teñida con hematoxilina-eosina)

FOTO 7

(Conjuntiva a los 30' de la provocación

teñida con hematoxilina-eosina)

FOTO 8

(Conjuntiva a las 24 horas de la provocación con TNP-Pv. Teñida con hematoxilina-eosina)

FOTO 9

(Conjuntiva a las 24 horas de la provocación con TNP-Asc. Teñida con hematoxilina-eosina)

FOTO 10

(Conjuntiva a las 48 horas de la provocación con TNP-Pv. Teñida con hematoxilina-eosina)

FOTO 11

(Conjuntiva a las 48 horas de la provocación con TNP-Asc. Teñida con hematoxilina-eosina)

FOTO 12

(Conjuntiva provocada con TNP-Pv.

Tinción con PAP para Ig E sin contrastar)

FOTO 13

(Conjuntiva provocada con TNP-Asc.

Tinción para Ig E sin contrastar)

FOTO 14

(Conjuntiva provocada con TNP-Pv.

Tinción con PAP para Ig G_{2a} sin contrastar)

FOTO 15

(Conjuntiva provocada con TNP-Asc.

Tinción con PAP para Ig G sin contrastar)

FOTO 16

(Control positivo de ganglio linfático.

Tinción con PAP para Ig E y contrastada con VMP)

FOTO 17

(Control positivo de ganlio linfático.

Tinción con PAP para Ig E y contrastada con VMP)

FOTO 18

(Conjuntiva provocada. Tinción con PAP para Ig E y contrastada con VMP)

FOTO 19

(Conjuntiva provocada. Tinción con PAP

para Ig E y contrastada con VMP)

FOTO 20

(Conjuntiva provocada. Tinción con PAP

para Ig E y contrastada con VMP)

FOTO 21

(Conjuntiva provocada. Tinción con PAP para Ig G$_{2a}$ y contrastada con VMP)

FOTO 22

(Conjuntiva provocada. Tinción con PAP para Ig G-a y contrastada con VMP)

Comparación entre los resultados de los observadores en el contaje del número de células por campo.

Test de Student.

Nº PIECA	OBSERVADOR X	OBSERVADOR Y	MEDIA (X+Y)/2	PIEZA IDENTIFICADA
1	66	64	65	H3-OD
2	67	45	56	I2-OS
3	76	60	68	G5-OS
4	59	68	64	H2-OS
5	55	118	87	H3-OS
6	118	111	115	G9-OD
7	49	54	52	G7-OS
8	38	39	39	G8-OS
9	74	65	70	G8-OD
10	69	110	90	G5-OD
11	41	92	67	G3-OS
12	52	69	61	G2-OS
13	113	106	110	I2-OS
14	101	130	116	G4-OD
15	99	90	95	H4-OD
16	96	74	85	G1-OS
17	73	66	70	G9-OS
18	25	39	32	I4-OS
19	83	64	74	G2-OD
20	107	86	97	I1-OD
21	47	40	44	G6-OD
22	145	189	167	G10-OS
23	29	47	38	G7-OS
24	117	64	91	H2-OD
25	259	246	253	G10-OD
26	63	48	56	H1-OS
27	90	63	77	G1-OD

t_{exp} = 0'4 con 26 g.l.
No significativo

TABLA 9

Comparación en número de celulas por campo entre TNP-Asc (OD) y TNP-Pv (OS).

N = nº células/nºcampos. media de los dos observadores.

Test de Wilcoxon pareado.

	N			
Rata	A (OD)	B (OS)	A-B	R
G1	77	85	-8	-1
G2	74	61	13	2
G4	116	33	83	9
G5	90	68	22	4
G7	38	52	-14	-3
G8	70	39	31	6
G9	115	70	45	7
G10	253	167	18(	10
H2	91	64	27	5
I2	110	56	64	8

R = -4
$p < 0.02$

TABLA 10

Comparación en el número de plasmocitos productores de Ig E entre TNP-Asc (OD) y TNP-Pv (OS)

$$N = \frac{\text{Nº plasmocitos productores de Ig E por campo}}{\text{número total de células por campo.}} \times 100$$

Test de Wilcoxon pareado.

	N			
Rata	A (OD)	B (OS)	A-B	R
G1	1'3	17'6	-16'3	-9
G2	5'4	6'6	-1'2	-3
G4	4'3	3	1'3	4
G5	3'3	8'8	-5'5	-7
G7	2'6	0	2'6	6
G9	0'9	11'4	-10'5	-8
G10	7'9	8'4	-0'5	-1
H2	1'1	0	1'1	2
I2	0	1'8	-1'8	-5

R = 10
n = 10 parejas
No significativo

TABLA 11

Comparación en el número de plasmocitos productores de Ig G_{2a} entre TNP-Asc (OD) y TNP-Pv (OS)

$$N = \frac{\text{Nº plasmocitos productores de Ig } G_{2a} \text{ por campo}}{\text{número total de células por campo.}} \times 100$$

Test de Wilcoxon pareado.

	N			
Rata	A (OD)	B (OS)	A-B	R
G1	5'3	12'5	-7'2	-8
G2	0'1	2'8	-2'7	-5½
G4	3'3	1'5	1'8	4
G5	1	3'7	-2'7	-5½
G7	0	0'2	-0'2	-1
G9	2'2	0'43	-1'7	3
G10	5'5	2'7	2'8	7
H2	1'1	0	1'1	2

R = 16
n = 8 parejas
No significativo.

TABLA 12

Coeficente de correlación de Kendall entre el número total de células y el número de plasmocitos por campo productores de Ig E.

Nx: número medio por campo de células.
Ny: número de plasmocitos productores de Ig E.
Rx: rango de Nx
Ry: rango de Ny

PIEZA	Nx	Ny	Rx	Ry
G4-OS	33	0'50	1	4
G7-OD	38	0'83	2	8
G7-OS	52	0'25	3	1½
I2-OS	56	1'33	4	10
G2-OS	61	4'13	5	14
H2-OS	64	0'25	6	1½
H3-OD	65	0'58	7	6
G3-OS	67	2'75	8	11
G5-OS	68	5'90	9	16
G9-OS	70	8'18	10	17
G2-OD	74	3'78	11	13
G1-OD	77	1	12	9
G1-OS	85	14'75	13	20
G5-OD	90	3'22	14	12
H2-OD	91	0'53	15	5
H4-OD	95	8'53	16	18
I2-OD	110	0'40	17	3
G9-OD	115	0'69	18	7
G4-OD	116	5'09	19	15
G10-OS	167	14'17	20	19
G10-OS	253	20'45	21	21

$\tau = 0'39$
$p < 0.05$

TABLA 13

Coeficiente de correlación de Kendall entre el número total de células y el número de plasmocitos por campo productores de Ig G_{2a}.
Nx: número medio de células por campo.
Nz: número medio de plasmocitos productores de Ig G_{2a} por campo.
Rx: rango de Nx
Rz: rango de Nz

PIEZA	Nx	Nz	Rx	Rz
G4-OS	33	0'46	1	5
G7-OD	38	0	2	1
G7-OS	52	0'08	3	2
G2-OS	61	1'71	4	10
H3-OD	65	0'50	5	6
G3-OS	67	0'82	6	7
G5-OS	68	2'46	7	11½
G9-OS	70	0'33	8	4
G2-OD	74	0'11	9	3
G1-OD	77	4'13	10	15
G1-OS	85	10'60	11	16
G5-OD	90	0'90	12	8
H2-OD	91	3'50	13	13
G9-OD	115	2'46	14	11½
G4-OD	116	3'80	15	14
G10-OS	167	1'55	16	9
G10-OD	253	36'00	17	17

$\tau = 0'51$
$p < 0.01$

TABLA 14

Coeficente de correlacion de Kendall entre el número medio de plasmocitos por campo productores de Ig E.y el número medio por campo de plasmocitos productores de Ig G₂a.
Ny: número medio por campo de plasmocitos productores de Ig E.
Nz: número medio por campo de plasmocitos productores de Ig G₂a.
Ry: rango de Ny
Rz: rango de Nz

PIEZA	Ny	Nz	Ry	Rz
G7-OS	0'25	0'07	1	2
G4-OS	0'50	0'46	2	5
H2-OD	0'53	3'50	3	13
H3-OD	0'58	0'50	4	6
G9-OD	0'69	2'46	5	11½
G7-OD	0'83	0'00	6	1
G1-OD	1'00	4'13	7	15
G3-OS	2'75	0'82	8	7
G5-OD	3'22	0'90	9	8
G2-OD	3'78	0'11	10	3
G2-OS	4'13	1'71	11	10
G4-OD	5'09	3'80	12	14
G5-OS	5'90	2'46	13	11½
G9-OS	8'18	0'33	14	4
G10-OS	14'17	1'55	15	9
G1-OS	14'75	10'60	16	16
G10-OS	20'45	36'00	17	17

$\tau = 0'36$
$p < 0.05$

TABLA 15

Comparación entre el porcentaje de plasmocitos productores de Ig E y el porcentaje de plasmocitos productores de Ig G_{2a}.

$$N = \frac{\text{número plasmocitos por campo}}{\text{número total de células por campo.}} \times 100$$

Py: Plasmocitos productores de Ig E
Pz: Plasmocitos productores de Ig G_{2a}

Test de Wilcoxon pareado.

	N			
Pieza	Py	Pz	Py - Pz	R
G1-OD	1'3	5'3	-4	-12
G1-OS	17'6	12'5	5'1	13½
G2-OD	5'4	0'1	5'3	15
G2-OS	6'6	2'8	3'8	11
G4-OD	4'3	3'3	1'0	5
G4-OS	3	1'5	1'5	7
G5-OD	3'3	1	2'3	8
G5-OS	8'8	3'7	5'1	13½
G7-OD	2'6	0	2'6	10
G7-OS	0	0'2	-0'2	-4
G9-OD	0'9	2'2	-1'3	-6
G9-OS	11'4	0'4	10'9	17
G10-OD	7'9	5'5	2'4	9
G10-OS	8'4	2'7	5'7	16
H2-OD	1'1	1'1	0	1½
H2-OS	0	0	0	1½
H3-OD	0'9	0'8	0'1	3

R = 22
n = 17 parejas
p < 0'02

TABLA 16

DISCUSION

DISCUSION

La respuesta por Ig E depende de factores genéticos, tipo y dosis de antígeno, páuta de administración, tipo de adyuvante, el papel desempeñado por los helmintos, vias de administración, y de la edad (BAZIN & PAUWELS, 1982).

Los factores genéticos desempeñan un papel importante en la respuesta mediada por Ig E. La primera evidencia de un control genetico de la producción de Ig E fué puesta de manifiesto en el ratón, en el que la respuesta reaginica esta bajo control genético ligado al complejo mayor de histocompatibilidad H-2 (REVOLTELLA & OVARY, 1969; LEVINE & VAZ, 1970). En la rata se ha demostrado, en razas endogámicas (LOU-OKA), que el complejo mayor de histocompatibilidad, (Rt-1), puede desempeñar un importante papel en el control de los niveles maximos y la cantidad total de Ig E especifica sintetizada tras la inmunizacion (BAZIN, PLATEAU & PAUWELS, 1981).

Existen diferencias entre las diferentes cepas de ratas en la producción de anticuerpos reagínicos. La cepa Wistar exogámica, que nosotros hemos utilizado, es comparable con la Brown Norway en la producción de tales anticuerpos, y ambas responden mejor a la inmunización que las cepas ACI y F344 (MURPHEY et al, 1974) o la Sprague-Dawley (ABADIE & PROUVOST-DANON, 1980). La cepa Brown-Norway ha sido clasificada junto con la Maxx, como "alta reagín-respondedora", mientras que otras, como la Fisher y la Lewis, son "reagín-respondedoras bajas" (SMITH & PETILLO, 1976). La cepa Wistar ha sido ampliamente utilizada en la investigación de las respuestas mediadas por Ig E (BAZIN & PLATTEAU, 1976; PAUWELS et al., 1979; PAUWELS et al. 1983; TADA, OKUMURA & TANIGUCHI, 1972; MOTA, 1964; WATANABE & KOBAYASI, 1983; MAYRHOFER, BAZIN & GOWANS, 1976; BAZIN, BECKERS & QUERINJEANL, 1974; ISO et al. 1980).

Se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles basales de Ig E en la ratas de cepas endogamicas y la respuesta inmune reagínica

(ABADIE & PROUVOST-DANON, 1980; BAZIN & PAUWELS, 1982). En las ratas de la cepa Wistar R los niveles medios basales de Ig E son de 0,02 mg/ml (BAZIN, BECKERS & QUERINJEAN, 1974).

La edad de las ratas es un factor importante en la producción de Ig E. Se ha demostrado en la cepa Brown-Norway como la respuesta de Ig E específica alcanza el máximo en ratas de 2 meses y decrece progresivamente con la edad. Los niveles totales de Ig E en suero aumentan progresivamente desde la edad de 1 mes hasta los 5 meses, y decrecen gradualmente hasta la edad de 1 año (PAUWELS et al., 1979). Las ratas que hemos utilizado empezaron a ser inmunizadas entre las 3 y las 5 semanas de edad y se mantuvieron hasta un tiempo máximo de 4 meses.

La respuesta mediada por Ig E es timodependiente, y todos los antígenos capaces de estimular una respuesta por Ig E son timodependientes. Los antígenos derivados de parásitos como el Nippostrongylus brasiliensis y el Ascaris suum y los conjugados hapteno-proteína

se usan frecuentemente en la respuesta inmune mediada por Ig E, y está generalmente aceptado que las proteínas conjugadas son los antígenos más apropiados para la inducción de tales respuestas (ISHIZAKA, 1976; BAZIN & PAUWELS, 1982).

La inmunización con el extracto proteico de Nippostrongylus brasiliensis, Nb, producido por el método ya descrito (KOJIMA & OVARY, 1975), estimula en el ratón la producción de Ig E y de Ig G$_{2a}$ frente al hapteno usado en la inmunización (OVARY et al., 1971), e igualmente en la rata (OGILVIE, 1967; WILSON & BLOCH, 1968).

El extracto crudo de áscaris, preparado según la técnica descrita en esta tesis (DOBSON, 1971), es capaz de estimular la producción de anticuerpos de la clase Ig E e Ig G$_{2a}$ cuando es administrado con alúmina, como se ha demostrado en cobayas (STREJAN & CAMPBELL, 1966), ratas (STREJAN & CAMPBELL, 1968), y conejos (STREJAN & CAMPBELL, 1970). Su capacidad inmunogénica para la producción de reaginas es superior a la de otros antígenos comúnmente usados como la ovoalbúmina,

KLH o la albúmina bovina (STREJAN et al 1973). El antígeno Asc-1, aislado del extracto de áscaris, de P.M. 18.000 dalton es el responsable de las propiedades antigénicas del extracto (HUSSAIN, BRADBURY & STREJAN, 1973).

El índice de conjugación del hapteno a la proteína portadora tiene importancia en la producción de anticuerpos anti-hapteno. Se ha demostrado en cobayas que un bajo índice de conjugación (ej: 8 grupos hapténicos por mol de proteína) induce la formación de anticuerpos en gran cantidad contra la proteína portadora y contra el hapteno, y que la especificidad de los anticuerpos anti-hapteno es mayor que en el caso de un alto índice de conjugación (30 ó mas grupos hapténicos por mol de proteína. Los autores sugieren que en las proteínas con un alto índice de conjugación el hapteno "cubre" o modifica los determinantes antigénicos de la proteína portadora de modo que el anticuerpo no puede reaccionar con los determinantes antigénicos de la molécula nativa. Así, las proteínas con un bajo índice de

conjugación aparecen como los mejores inmunógenos en la producción de anticuerpos anti-hapteno (QUIJADA et al., 1974). Los conjugados TNP-Asc usados en esta tesis tenían 7 moles de TNP por mol de Asc. En la rata se ha demostrado que el hapteno conjugado al Asc posee una capacidad inmunogénica mayor que unido a otras proteínas. Además, si el índice de conjugación al hapteno es muy elevado no es más inmunogénico y produce otras clases de anticuerpos diferentes de la Ig E (STREJAN & MARSH, 1971)

Levine y Vaz (1970) demostraron en ratones que se podía inducir la formación persistente y repetible de reaginas con dosis pequeñas, del orden de 0´1 a 1 µg de ovoalbúmina con adyuvante de alúmina, repetidas de modo espaciado. Dosis mayores, del orden de 100 µg inducían grandes títulos de Ig G_1 pero respuestas débiles y transitorias de reaginas. Pequeñas dosis de inmunización, del orden de 1 a 10 µg, contribuyen a una respuesta prolongada y repetible, mejor que altas dosis de inmunización, superiores a 1 mg,

que inducen una supresión de la respuesta secundaria. (JARRET & STEWART, 1974; PAUWEL et al., 1978). En ratas Wistar se ha comprobado la presencia de reaginas en suero hasta 70 días, tras una sola inyección de ovoalbúmina, independientemente de la dosis empleada en un rango entre 1 µg y 100 µg, con coadyuvante de alúmina (MURPHEY et al., 1974)

La mayoría de los estudios de la producción de reaginas en ratas han sido realizados usando la administración intraperitoneal del antígeno (BAZIN & PAUWELS, 1982). También han sido utilizadas otras vías de inmunización. La administración oral es capaz de producir una respuesta repetible mediada por Ig E (BAZIN & PLATTEAU, 1976; JARRETT et al., 1976) pero con frecuencia puede inducir tolerancia (BAZIN & PAUWELS, 1982). La administración por aerosol es capaz también de inducir una respuesta mediada por Ig E (VAN HOUT & JOHNSON, 1972), sin embargo, la inducción de la respuesta es inconstante (BAZIN & PAUWELS, 1982). La inmunización por via intraperitoneal

(ALLANSMIITH, 1981), intraduodenal, intragástrica (PU et al., 1983) o intraconjuntival (HENRIQUEZ et al.,1983; PU et al., 1983) inducen un estado de hipersensibilidad capaz de producir una respuesta local en la conjuntiva. En nuestro modelo la inmunización por vía intraperitoneal fué efectiva para la inducción de un estado general de hipersensibilidad que permitió la provocación de la respuesta alérgica a nivel conjuntival. Como se demostrará mas adelante, en algunos grupos la provocación conjuntival servía como dosis de recuerdo.

La cantidad de Ig E específica que se produce inmunizando solamente con el antígeno es muy pequeña, y en general es necesario un adyuvante para una produccion primaria sustanciosa de Ig E (BAZIN & PAUWELS, 1982,). El tipo de adyuvante es muy importante La alúmina, $Al(OH)_3$, utilizada en este estudio, es un buén adyuvante, comparable a la Bordetella pertussis en la producción de anticuerpos de la clase Ig E (JARRETT, et al., 1972) y de la clase Ig G_{2a} (SMITH et al., 1973;

MURPHEY et al., 1974). De hecho Pauwels et al., (1979) no encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de Ig E en ratas Wistar inmunizadas frente ovoalbúmina con coadyuvante de $Al(OH)_3$ o con Bordetella pertussis. No es bién conocida la acción de la alúmina. Se ha postulado que la alúmina podría favorecer la presencia de células T adyuvantes/estimulantes especializadas en la cooperación con las células B productoras de Ig E (KISHIMOTO & ISHIZAKA, 1973). La hipótesis de un mecanismo depot establece que la alúmina inmoviliza el antígeno, evitando la diseminación prematura desde el lugar de la inmunización o desde el ganglio linfático de drenaje, y permite así la lenta liberación del antígeno hacia el sistema inmune, con una estimulación antigénica prolongada. Es necesaria una buena adsorción del antígeno a la alúmina para una completa actividad del adyuvante. Otra explicación es que la alúmina evita la solubilidad del antígeno y la posibilidad de tolerancia (BOMFORD, 1984). Respecto de la actuación del

antígeno sobre el sistema inmune, la alúmina ocasiona la acumulación de macrófagos en lugar de la inyección, y se sugiere que de esta manera se presenta el antígeno a los linfocitos T. Además, la alúmina es fagocitada por los macrófagos y es tóxica para ellos *in vitro* y podría inducir cambios en la membrana plasmática o en la lisosomial y esto induciría una mejor presentación del antígeno o la secreción de factores. La alúmina también produce un atrapamiento de los linfocitos en el ganglio linfático y una reconducción de los linfocitos hacia el ganglio linfático (BOMFORD, 1984). En cualquier caso, el papel de los macrófagos tisulares en la presentación el antígeno y la ausencia de antígeno libre circulante parecen ser factores de vital importancia para que se produzca una respuesta del tipo Ig E. Esto ha sido demostrado por Kudo, Sehon y Schwenk (1978), quienes han logrado respuestas del tipo Ig E en cepas de ratones, tanto altamente respondedores como pobremente respondedores, inmunizados con macrófagos singeneicos previamente

inmunizados con el antígeno. La alúmina ha mostrado además que precipita una respuesta, en curso, mediada por Ig E, cuando es administrada sola en ratas inmunizadas anteriormente y clasificadas como no respondedoras (BERGSTRAND et al., 1983).

El adyuvante completo de Freund (CFA) induce respuestas mediadas por reaginas débiles y transitorias, o nulas, y se ha sugerido que podría tener un efecto inhibitorio (TADA, OKUMURA & TANIGUCHI, 1972; KISHIMOTO & ISHIZAKA, 1973; PAUWELS et al, 1979; CARRERAS & PRENDERGAST, 1986).

Así, en la exposición inicial el macrófago presenta el antígeno a los linfocitos T adyuvantes/estimulantes y B^a al tiempo que los estimula. Las celulas T adyuvantes/estimulantes, a su vez, cooperan con los linfocitos B^a en la producción de Ig E. El antígeno tambien estimula a las células T supresoras que a su vez regulan a los linfocitos T adyuvantes/estimulantes y a los

linfocitos B (OVARY et al, 1978; ROITT, BROSTOFF & MALE, 1985).

El esquema de inmunización utilizado conduce a la producción de anticuerpos circulantes del tipo Ig E y a una respuesta de hipersensibilidad inmediata. La inyección de la proteína portadora sin conjugar con el adyuvante de alúmina sensibiliza a las células T específicas para el portador. Tras una segunda inyección de proteína portadora unida al hapteno más el adyuvante, estas células T colaboran con células B^{ε} específicas del hapteno y las estimulan para la formación de anticuerpos de la clase Ig E frente al hapteno. Esto ha sido demostrado tanto en el caso del Asc y TNP-Asc en conejos (KISHIMOTO & ISHIZAKA, 1973) y ratas (TADA, OKUMURA Y TANIGUCHI, 1974), como en el caso del Nb y TNP-Nb, en ratones (KOJIMA & OVARY, 1975). Este esquema de inmunización aumenta la respuesta de anticuerpos de la clase Ig E frente al hapteno por el llamado "efecto portador" (ISHIZAKA, 1976). El animal queda además inmunizado frente a la proteína portadora en el

caso del Asc (STREJAN & CAMPBELL, 1966), y se produce un estado de inmunidad celular además del estado de inmunidad humoral (McMYNE & STREJAN, 1981). La misma pauta de inmunización con Nb y TNP-Nb, ha conducido a la aparición de respuestas de hipersensibilidad inmediata en la conjuntiva (CARRERAS & PRENDERGAST, 1986)

El intervalo entre la inyección de la proteína portadora y la inyección del hapteno unido a dicha proteína tiene importancia en la producción de Ig E. Kojima y Ovary (1975) observaron en ratones que el número de células adyuvantes/estimulantes alcanzaban el máximo nivel 14 días después de la exposición a la proteína portadora y que la exposición al hapteno en ese momento inducía la máxima respuesta a este. En nuestro modelo las ratas fueron inmunizadas con el portador en el día 0, y con el hapteno unido a la proteína portadora en el día 15.

Nuestra ratas produjeron anticuerpos de la clase Ig E contra los antígenos empleados. Las PCAs realizadas confirmaron la existencia de

anticuerpos de la clase Ig E frente al TNP-Asc y frente al hapteno. Los títulos obtenidos frente a TNP-Asc son muy superiores a los obtenidos frente al hapteno conjugado a otra proteína portadora. Tada, Okumura y Taniguchi (1972) encontraron también mayores títulos de reaginas frente a DNP-Asc que frente a DNP-BSA en ratas Wistar inmunizadas con Asc y con DNP-Asc. Existen varias razones que los explican. En primer lugar, el uso de derivados hapténicos de baja conjugación producen la formación de anticuerpos frente al hapteno y frente a la proteína portadora de gran afinidad, mientras que los derivados hapténicos de alto índice de conjugación producen gran cantidad de anticuerpos frente al hapteno y no frente a la proteína portadora y son de baja afinidad; además el título de anticuerpos obtenidos es mayor en el primer caso (QUIJADA et al, 1974). En nuestro modelo el bajo índice de conjugación utilizado permitió la formación de anticuerpos de la clase Ig E frente al hapteno y frente a la proteína portadora, de modo que la respuesta frente al

TNP-Asc estuvo mediada por anticuerpos frente al hapteno, la proteína portadora y frente a nuevos determinantes antigénicos desarrollados por el conjugado hapteno-proteína (ISHIZAKA, 1976). En segundo término, cuando el hapteno va unido a una proteína portadora diferente de la usada para la inmunización y no relacionada con ella, solamente se miden los anticuerpos de la clase Ig E contra el hapteno y no contra la proteína portadora, Asc (OVARY & BENACERRAF, 1963). Cuando se usa el hapteno unido a la misma proteína usada en la inmunización la reacción se desencadena frente al hapteno, la proteína portadora y frente a ambos (TADA, OKUMURA & TANIGUCHI, 1974). Así, en la respuesta frente a TNP-Asc intervinieron anticuerpos frente al TNP, y frente a la proteína portadora, y frente al conjugado en sí, mientras que al usar el TNP unido a una proteína diferente, albúmina bovina, solo se detectaron anticuerpos frente al hapteno. El moderado título de anticuerpos conseguido frente a ambos se debe a que las dosis de inmunización usadas en nuestro

modelo, 1 ó 10 µg, fueron considerablemente menores que las usadas por otros autores que consiguen títulos mayores (TADA, OKUMURA & TANIGUCHI, 1974). Sin embargo pequeñas dosis de inmunización permiten una respuesta repetible y prolongada, más apta para nuestro modelo, mientras que altas dosis de inmunización producen una respuesta de corta duración (JARRETT & STEWART, 1974; PAUWELS et al., 1978; JARRETT & HALL, 1981).

Los anticuerpos de la clase Ig G_{2a} son capaces de unirse a los mastocitos y provocar la degranulación tras reaccionar con el antígeno (BACH, BLOCH & AUSTEN, 1971). La investigación de estos anticuerpos frente a TNP-Pv no dió unos resultados claramente positivos, si bién sí mostró leves indicios de positividad. Jarrett y Stewart (1974) tampoco encontraron anticuerpos de la clase Ig G_{2a} en ratas inmunizadas frente a ovoalbúmina. Smith et al (1973) estudiaron la formación de reaginas en ratas inmunizadas con DNP-BGG y concluyeron que la detección de anticuerpos de la clase Ig G_{2a} por los métodos al uso

(termoestabilidad y periodo de incubación de 2-4 horas) no podían ser utilizados sin fraccionar previamente el suero.

La respuesta inflamatoria inmediata tras la administración del DTT y del antígeno sobre la conjuntiva consistió en un edema palpebral y conjuntival, e hiperemia intensos, llegando en algunos casos a separar el borde del párpado del globo ocular. La histología a los 30 minutos mostró degranulación intensa y extensa de los mastocitos con vasodilatación capilar y arteriolar, edema epitelial y estromal intenso que producían desestructuración importante de estroma y epitelio. Esta es la típica respuesta de las mediadas por Ig E en la conjuntiva como han descrito otros autores en humanos (THEODORE, BLOOMFIELD & MONDINO, 1983), ratas (ALLANSMITH et al., 1981; HENRIQUEZ et al., 1983; CARRERAS & PRENDERGAST, 1986), cobayas (DWYER & DAROUGAR, 1971; KHATAMI et al., 1984; HALL et al., 1984).

El ditiotreitol (DTT) es un compuesto sulfidrílico y comparte con otros compuestos de su

clase, como la iodoacetamida, la capacidad de romper la uniones intercelulares fuertes, como las que tienen lugar entre las células epiteliales (EPSTEIN & ANDERSON, 1984), y facilita de esta manera la penetración del antígeno en la submucosa (TROCME et al., 1986), con lo que se evita el trauma inducido por la inyección del antígeno.

Tras la entrada del antígeno, TNP-Asc, TNP-Nb (inyectado), TNP-Pv, o Asc, se une a dos o más moléculas de Ig E fijadas a la superficie del mastocito y se produce la degranulación de este que libera factores quimiotácticos, y sustancias activadoras y espasmógenas. Estos mediadores producen la vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, edema y la atracción de eosinófilos, neutrófilos y monocitos, incluyendo linfocitos (ROITT, BROSTOF & MALE, 1985), como ocurrió en nuestros casos.

Allansmith et al. (1981) estudiaron los fenómenos anafilácticos inmediatos en ratas inmunizadas con ovoalbumina mas alúmina. Para la provocación de la respuesta inyectaron ovoalbúmina

en la conjuntiva, párpado y en el espacio retrobulbar de las ratas. Tras 15-45 minutos observaron inflamación de los tejidos oculares más prominentes en el párpado y aumento de peso del contenido orbitario respecto de los ojos control. Posteriormente, (ALLANSMITH et al., 1983) estudiaron los cambios inducidos en los mastocitos tras la provocación en un modelo similar. Observaron que a la media hora de la provocación los mastocitos estaban completamente degranulados. A la hora estaban degranulados o presentaban exocitosis. A las seis horas, el 70% estaban degranulados pero ninguno presentaba exocitosis. A las 24 horas, todos los mastocitos estaban granulados. No encontraron cambios en el número de mastocitos respecto de los ojos control.

La valoración cuantitativa objetiva de la respuesta demostró el aumento de la permeabilidad vascular que sucede en los fenomenos anafilácticos tras la liberación de mediadores por los mastocitos, inducida por la unión del antígeno con la Ig E unida al mastocito. Los ojos estimulados

con el antigeno, TNP-Asc o TNP-Pv mostraron mayor retención de BSA-I^{125} que los ojos control a los que se les administró solo la Pv con una diferencia estadisticamente significativa en ambos casos. Además algunos casos en los que no se observó una respuesta clínica evidente, si mostraron una mayor retención de BSA-I^{125} por lo que la sensibilidad de la prueba es patente. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Allansmith et al. (1981) quienes tras inyectar el antigeno en los anejos oculares, y albúmina de rata marcada con I^{125} obtienen diferencias significativas entre los ojos provocados y los ojos control. Este modelo es comparable al usado por Iso et al. (1980) para el ensayo de la eficacia de fármacos antinflamatorios. Estos autores inducen una PCA local en la conjuntiva y miden la eficacia de los farmacos usados por la cantidad de colorante extravasado. Nuestro método es mas simple y tiene menos fuentes de error.

Trocmé et al. (1987) en un modelo de ratas inmunizadas con DNP-Asc provocan la respuesta con

DNP-lisina por vía tópica y observan que el hapteno induce una respuesta inflamatoria de tipo anafiláctico con edema, vasodilatación y retención de BSA-I^{125}, incluso en los casos en que no hubo respuesta clínica evidente. Nuestros métodos similares dieron resultados coincidentes como se observa en lo expuesto.

La fase tardía de la anafilaxis es consecuencia de los mediadores farmacológicos derivados de los mastocitos. Comienza tras 4-6 horas de la exposición al antígeno y termina entre las 24 y las 48 horas, y se caracteriza por eritema e infiltración. El infiltrado celular de la fase tardía de la anafilaxis a las 8 horas se caracteriza en el humano por un aumento en diez veces en el número de células infiltrantes, la mitad mononucleares, en su mayoría linfocitos (SOLLEY et al., 1976). Tanenbaum et al., (1980) estudian la fase tardía en la piel de la rata y encuentran que a las 8 horas el infiltrado celular está compuesto principalmente por neutrófilos mientras que los linfocitos eran escasos. A las 24

horas, los linfocitos y los macrófagos dominaban el infiltrado. En roedores, el infiltrado inicial está principalmente compuesto por neutrófilos y eosinófilos. Estas células son gradulamente reemplazadas entre las 8 y las 24 horas por células mononucleares (KALINER, 1984). Allansmith et al. (1984) estudiaron la fase aguda y tardía de la anafilaxis en el párpado de las ratas y observaron que a las 6 horas los signos clínicos eran muy leves y que a las 24 horas los ojos aparecían normales. A las 6 horas, eosinófilos y neutrófilos habian alcanzado el máximo nivel, mientras que los linfocitos no presentaban modificación en el número o en la morfología. A las 24 horas, eosinófilos y neutrófilos volvieron a los niveles basales, y los linfocitos seguian sin mostrar variaciones

En nuestro modelo las ratas provocadas con TNP-Pv, y TNP-Asc, que inducen una respuesta del tipo humoral, mostraban a las 24 horas inflamación evidente de la conjuntiva caracterizada por hiperemia, leve edema de la conjuntiva, que

presentaba un aspecto deslustrado, con borramiento del dibujo vascular, y engrosamiento. Estos fenómenos eran mas leves o no existian en todos los casos a las 48 horas La histologia de las piezas a las 24 y 48 horas mostró un infiltrado preferentemente linfomonocitario, con presencia de moderados eosinófilos y algunos neutrófilos.

Estos resultados en la conjuntiva de la rata coinciden con los descritos para la fase tardía descritos para el hombre y la rata por Solley et al. (1976), Tanenbaum et al. (1980) y Kaliner (1984).

La duración de la respuesta mediada por Ig E es multifactorial y depende de factores genéticos, de la dosis de inmunización inicial, y de mecanismos de cooperación celular que regulan el mantenimiento, agotamiento o la supresión de la respuesta de Ig E.

En nuestro modelo las ratas de la cepa Wistar fueron inmunizadas con dosis mínimas de antígeno, del orden de 1 µg, y se obtuvieron respuestas inflamatorias en la conjuntiva mediadas por Ig E

hasta 9-10 semanas provocando semanalmente. La inmunización con dosis menores en la presentación del portador, 0'1 µg de Asc, fracasó en la obtención de una respuesta inmune en la conjuntiva. La inmunización inicial con dosis mayores, 10 ó 100 µg, de antígeno también se mostró eficaz para la consecución de una respuesta alérgica en la conjuntiva, y de mayor intensidad en las primeras provocaciones que las conseguidas con dosis menores, si bién la investigación de la duración de dicha respuesta no se realizó mas allá de la tercera provocación.

También se observo que las ratas provocadas con TNP-Nb (grupo Nb-1) o TNP-Asc (grupos G, H, e I) en un ojo, y TNP-Pv en el contralateral, mantuvieron la respuesta durante mas tiempo que las ratas provocadas con TNP-Pv en un ojo y la misma Pv en el contralateral (grupos Nb-2, G, H, e I). Se observó también que la reinmunización con una nueva dosis de TNP-Nb (grupo Nb-2) restableció la respuesta frente a TNP-Pv que se mantuvo

durante mas tiempo al cambiar la provocacion del ojo contralateral con TNP-Nb.

Estos resultados se explican a la luz de los mecanismos celulares que regulan las respuestas inmunologicas mediadas por Ig E.

Es conocida la cooperación entre los linfocitos T adyuvantes/estimulantes especificos de la proteina portadora con las celulas B^+ en la producción de anticuerpos de la clase Ig E frente al hapteno, y en el desarrollo de celulas B^+ memoria para el desarrollo de una respuesta secundaria, y la liberación por las células T adyuvantes estimulantes de factores solubles que estimulan la producción de Ig E por las células B^c (ISHIZAKA, 1974, ISHIZAKA, 1976)).

En nuestro modelo la provocación de la respuesta alérgica con TNP-Nb (grupos Nb-1 y Nb-2), o con TNP-Asc (grupos Asc-1, G, H, e I), al tiempo de provocar la degranulación de los mastocitos, estimulaban las células especificas de la proteina portadora que colaboraban con las celulas B^+ especificas del hapteno para la

producción de Ig E frente a este, de modo que perpetuaban la formación de Ig E. La provocación con TNP-Pv no estimula la formación de Ig E por ser el portador una proteína no reconocida por los linfocitos T, y por tanto no colaboran con las células B (OVARY & BENACERRAF, 1963; ISHIZAKA, 1974). Otros autores (KISHIMOTO & IHIZAKA, 1973) observaron *in vitro* en linfocitos de conejo sensibilizados frente a Asc y DNP-Asc que la adicion del hapteno unido a una proteína heterologa, DNP-KLH, no estimulaba la formación de Ig E, pero si se añadia el conjugado en presencia de Asc si se producian anticuerpos Ig E frente al hapteno. Por tanto en nuestro modelo la provocacion solo con TNP-Pv agota la producción de Ig E ya que no estimula la formación de células memoria; sin embargo cuando un ojo es provocado con TNP-Pv y el contralateral con TNP-Asc, este último antigeno favorece la formación de células memoria que perpetuan la formación de Ig E en ambos ojos. Jarrett y Hall (1981) mostraron en ratas que la inmunización repetida por via

intraperitoneal con dosis mínimas de antígeno, 1 ng, permitía la producción sostenida de Ig E frente al antígeno. En nuestro modelo la administración de TNP-Nb intraconjuntival, o de TNP-Asc por vía tópica en la conjuntiva en dosis mínimas (5-10 µl conteniendo 5-10 µg de proteína) de modo repetido, tenían un efecto reinmunizador sobre las ratas. Hall et al. (1984) observaron en cobayas que la administración repetida de antígeno sobre la conjuntiva sensibilizaba a los animales induciendo un estado de hipersensibilidad inmediata.

En el grupo Nb-2, la respuesta frente a TNP-Pv se agotó precozmente, y fué reestablecida tras una inyección de TNP-Nb en la cuarta semana. Las sucesivas provocaciones con TNP-Nb y TNP-Pv permitieron un mantenimiento mas prolongado de esta respuesta. Kishimoto e Ishizaka (1973) obtienen en conejos una respuesta frente a DNP-Asc en conejos inmunizados que no habían respondido previamente, tras la inyección de una nueva dosis

de DNP-Asc y restableciendo así las poblaciones de linfocitos T y B.

En los grupos Nb-1, Nb-2, y Asc-1, la respuesta frente a todos los antígenos empleados fué progresivamente disminuyendo a partir de la séptima semana hasta agotarse completamente. Tada Okumura y Taniguchi (1974), estudiaron la supresión de la respuesta en ratas inmunizadas con Asc y DNP-Asc y encontraron que se debía a la existencia de células T supresoras específicas de la proteína portadora, que liberaban factores que inhibían la respuesta frente al hapteno. Tal factor soluble fué identificado por Ishizaka (1981), quien estudió sus propiedades y efectos. Jarrett y Hall (1981) encontraron que la estimulación repetida, en ratas, con dosis mínimas de ovoalbúmina ademas de ser un estímulo para las células efectoras de la respuesta Ig E, también lo eran para la formación de un mecanismo selectivo de supresión de dicha respuesta y que progresivamente se iba haciendo dominante. En nuestro modelo, la provocación repetida de la

respuesta con TNP-Mb o TNP-As además de ser un estímulo para la producción de anticuerpos de la clase Ig E, también lo es para la inducción de un mecanismo supresor mediado por células T supresoras específicas de la proteína portadora, que progresivamente se va imponiendo hasta que finalmente suprime la respuesta. Las enfermedades alérgicas y entre ellas, la conjuntivitis vernal, son en general de curso autolimitado. Nuestro modelo puede permitir estudiar qué factores sistémicos o locales pueden acortar o alargar el curso de la respuesta conjuntival.

Después de repetir la provocación conjuntival el cuadro histológico a los 30 minutos consistía fundamentalmente en degranulación intensa y extensa de los mastocitos, vasodilatación de arteriolas y capilares, y edema conjuntival extenso. En las piezas observadas en este periodo, el número de células por campo era algo superior al de los controles, si bien el número de piezas no permitió hacer valoraciones estadísticas.

Exceptuando este discreto aumento de la celularidad, la reaccion era en todo igual a la fase aguda observada en otros modelos de hipersensibilidad inmediata en la conjuntiva (DWYER, & DAROUGAR, 1971; ALLANSMITH et al., 1981; HENRIQUEZ et al., 1983; KHATAMI et al., 1984; CARRERAS, & PRENDERGAST, 1986). Los controles presentaban algunos linfocitos y macrófagos en el estroma y escasas plasmáticas, al igual que se describe para la conjuntiva normal de la rata por otros autores (BETSER, NICHOLS & DAWSON, 1987)

A las 24 y 48 horas, las conjuntivas provocadas con TNP-Asc o TNP-Pv presentaban un infiltrado inflamatorio de células linfo-mononucleares con predominio de células plasmáticas, un moderado número de eosinófilos, escasos neutrófilos y basófilos, es decir un infiltrado de tipo crónico no granulomatoso, que se parece al descrito por Beigelman (1950) en la conjuntivitis vernal. En este aspecto, la histología de las ratas de nuestro modelo, estimuladas repetidamente parece diferir de las de

otros modelos en las que solo se hizo una provocación. Allansmith et al. (1984) encuentran un abundante número de eosinófilos en las primeras seis horas despues de la provocación de la anafilaxis local en el párpado de ratas inmunizadas. A las 24 horas el número de eosinófilos era escaso, y no observo alteraciones en el número o en la morfología de los linfocitos durante las primeras 24 horas. Dwyer y Darougar (1971), en un modelo en cobayas observan que a las 24 horas de la provocación conjuntival la conjuntiva presenta un moderado número de eosinófilos, y no encuentran ningun otro tipo celular en el infiltrado. Khatami et al. (1984), también en cobayas, observaron que una sola provocación de la respuesta alérgica en la conjuntiva inducía la aparición de eosinófilos pero no de otros tipos celulares, y que la degranulación del mastocito inducida por el compuesto 48/80, inducía fenomenos anafilácticos agudos pero sin aparición de eosinófilos. Tras provocaciones repetidas de la conjuntiva observan

un gran número de eosinófilos y un infiltrado creciente por células linfoides.

En la conjuntivitis vernal, el número de eosinófilos es variable y depende del estadío de la enfermedad (BEIGELMAN, 1950). Easty et al. (1979) no encuentran eosinofilos en pacientes con conjuntivitis vernal tratados con cromoglicato disódico. Allansmith et al. (1984), en un modelo de anafilaxis en ratas, encuentran escasos eosinófilos a las 24 horas de la provocación. En nuestro modelo las piezas fueron examinadas a las 24 y 48 horas de la provocación lo que puede explicar el reducido numero de eosinófilos encontrado.

Para completar el estudio es necesario el estudio histológico con tinciones de Unna y de Luna, y estudiar la histología a las 6 horas de la provocación.

Otros cambios histológicos propios de la conjuntivitis vernal como la gran proliferación del colageno y los fenomenos degenerativos de este y del epitelio, no han sido observados en nuestro

modelo probablemente debido a que necesitan un mayor tiempo para desarrollarse que el empleado en nuestro modelo.

Un hallazgo prominente es la presencia de plasmocitos productores de Ig E y de Ig G a en la conjuntiva de las ratas provocadas, demostrados por el metodo de la PAP. Gudmundnson et al. estudiaron mediante inmunofluorescencia el contenido en células plasmáticas de la conjuntiva de ratas normales, no inmunizadas y observaron que la sustancia propia solo contenia escasas células plasmáticas, que contenian Ig A. Allansmith, Hahn y Simon (1976) observaron en individuos afectos de conjuntivitis vernal, la presencia de células que contenian Ig E en su citoplasma mediante inmunofluorescencia, y que consideraron celulas plasmáticas. Bloch-Michel et al. (1976) consiguen idénticos resultados en inviduos con conjuntivitis alergicas y conjuntivitis vernales.

Mayrhofer, Bazin, y Gowans (1976) en un estudio con ratas parasitadas con Nippostrongylus brasiliensis negaron que los plasmocitos

portadores y productores de Ig E acudieran al foco inflamatorio o que colonizaran la mucosa intestinal, y sugirieron que las células que daban positiva la inmunofluorescencia para Ig E eran mastocitos atípicos que contenían Ig E, tanto en su superficie como intracitoplasmática.

Carreras (1983) demostró, mediante técnica de PAP y contraste con verde-metilo-pironina, que las células Ig E positivas encontradas en la conjuntiva de pacientes con conjuntivitis vernal correspondían realmente a células plasmáticas productoras de Ig E

En nuestro modelo la presencia de plasmocitos productores de Ig E en la conjuntiva se basa en la morfología de estas células en todo compatibles con la de los plasmocitos, como se observa en los ganlios control, con tinción positiva de color marrón por la PAP y tinción uniforme del citoplasma de rojo por la presencia de abundante RNA en el citoplasma; y la diferencia morfológica de estas células con la de los mastocitos que muestran una tinción positiva con PAP.

Estos resultados, obtenidos en nuestro modelo, apoyan que los plasmocitos productores de Ig E siguen el mismo comportamiento que el resto de las células plasmáticas y acuden al foco donde tiene lugar la reaccion antigeno-anticuerpo, en nuestro caso la mucosa conjuntival, donde se producen los fenómenos alérgicos.

Desde el punto de vista histológico nuestros resultados concuerdan con las descripciones de la fase tardía de la anafilaxis (KALINER, 1984) y de las inflamaciones crónicas no granulomatosas (YANOFF & FINE, 1975). Gell y Hinde (1954) analizaron exhaustivamente las fases inmediata y tardía de la reacción de Arthus. La fase tardía, caracterizada por linfocitos monocitos, histiocitos y células plasmáticas, similar a la encontrada en nuestros casos, se parecía según estos autores a las reacciones de la tuberculina, y solamente se producía plenamente a los 6 días de la provocación, en experimentos pasivos cuando se transfería células sanguíneas de un animal inmunizado. Es decir, dependía de la presencia de

células capaces de convertirse en células plasmáticas. En el lenguaje de la inmunología actual diríamos que depende de linfocitos B memoria. Las similitudes con la reacción de la tuberculina y el tipos de infiltrado sugieren un implicación de los mecanismos de la inmunidad celular. En la patogenia de la conjuntivitis vernal, Allansmith (1978), y Smolin y O'Connors (1981) también han sugerido la implicación de mecanismos de inmunidad celular e hipersensibilidad de tipo IV, además de la hipersensibilidad de tipo I. Sin embargo en nuestro modelo, aunque el infiltrado inflamatorio era mas intenso en los ojos provocados con TNP-Asc que en los provocados con TNP-PV, el porcentaje de células plasmáticas productoras de Ig E o de Ig G era similar con ambos antígenos. Existe considerable evidencia bibliográfica sobre la importancia de la proteína portadora para la estimulación de la inmunidad celular (OVARY & BENACERRAFF, &, 1963; KISHIMOTO & ISHIZAKA, 1973; TADA, OKUMURA & TANIGUCHI, 1974; KOJIMA & OVARY,

1975; TADA, 1975; ISHIZAKA, 1976; ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1976). En cambio el hapteno unido a otra proteína si puede hacer efectivos mecanismos dependientes de la inmunidad celular. De hecho McMyne y Strejan (1981), trabajando en ratas con Asc como proteína portadora, y DNP como hapteno, ha mostrado que hay reacciones de hipersensibilidad celular frente a DNP-Asc pero no frente a DNP unido a otra proteína. La hipersensiblidad celular podría ser un factor que explicase la mayor intensidad del infiltrado en los ojos con TNP-Asc que en los provocados con TNP-Pv, pero no hay que olvidar el mayor titulo de anticuerpos de la clase Ig E era mayor frente a TNP-Asc, y que en general los conjugados haptènicos conjugados con la misma proteína portadora que la usada en la inmunización exhibian mas determinantes antigénicos que los conjugados a otras proteínas.

El porcentaje similar de células plasmáticas productoras de Ig E y de Ig G en los ojos provocados con TNP-Asc y en los provocados con

TNP-Pv sugiere que los mecanismos de inmunidad celular no estan implicados, al menos directamente, en la localización de las células plasmáticas en la conjuntiva. Okudaira, Komagata, y Ogita (1980) han mostrado en ratones *desnudos* que la evolución de las celulas B memoria a células plasmáticas es independiente de los linfocitos T, aunque la producción de las células memoria si depende de las células T. La presencia del antígeno haptènico y el medio bioquímico de la inflamación producida por la degranulación de los mastocitos producen estímulos quimiotácticos suficientes para el acúmulo de células plasmáticas en el foco inflamatorio. Esto ocurria cuando el otro ojo era estimulado con TNP-Asc, que estimula los mecanismos de inmunidad celular, ademas de la humoral. De hecho, en ratas en las que se estimulaba solo con TNP-Pv no se lograba mantener la respuesta. La estimulación con la proteina portadora en el otro ojo probablemente estimula la produccion de células B memoria que se transforman

en plasmáticas y acuden a la conjuntiva contralateral.

Nuestro modelo muestra que en la medida en que se parece a la conjuntivitis vernal, los mecanismos de inmunidad celular no son determinantes de la lesion local, que se podria explicar por las estimulaciones locales repetidas, pero si el estado alérgico preciso para que tal lesion pueda producirse.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La inmunización con el método utilizado en nuestro trabajo conduce a la formación de anticuerpos de la clase Ig E.

2. En ratas inmunizadas segun esta pauta la administración de los antigenos provoca una respuesta de tipo inmediato consistente en edema, hiperemia y lagrimeo, típica de un estado de hipersensibilidad tipo I.

3. La reacción es objetivable y medible mediante el uso de albumina marcada con I^{125} por el metodo descrito en este trabajo.

4. La provocación es repetible, obteniendo una respuesta muy breve cuando se estimula solo con el hapteno, pero se puede mantener durante más tiempo usando el hapteno unido a la proteina portadora usada en la inmunización. En este último caso la respuesta se agota en un tiempo mas o menos largo.

5. En las estimulaciones repetidas, la reaccion tiene una fase inmediata, caracterizada por edema hiperemia y secreción lagrimal, y una fase tardia caracterizada por engrosamiento y deslustramiento conjuntival con hiperemia difusa y perdida del dibujo vascular.

6. Histológicamente la fase inmediata consiste en degranulacion intensa y extensa de los mastocitos, vasodilatación capilar y arteriolar, y edema intenso que altera notablemente la arquitectura conjuntival. La fase tardia consiste en un infiltrado por linfocitos y celulas plasmáticas, com moderado número de eosinófilos y mastocitos, y escasos neutrófilos y macrófagos.

7. Las estimulaciones repetidas conducen a un acumulo de células plasmáticas de Ig E e Ig G.a en el estroma conjuntival.

9. La infiltración celular es mayor con el TNP unido a la misma proteína portadora que cuando va unido a una proteína no usada en la inmunización

9. La infiltración por células plasmáticas productoras de Ig E y de Ig G a es igual con los dos tipos de antígenos usados en provocación.

10. Los mecanismos de inmunidad celular son esenciales para el mantenimiento de un estado alérgico. Pero una vez que se mantiene este estado los mecanismos dependientes de la inmunidad humoral son suficientes para explicar la lesión local.

11 Nuestro modelo de conjuntivitis alérgica experimental puede proporcionar claves para explicar, al menos, alguno de los fenómenos y mecanismos implicados en la la patogenia de las conjuntivitis alérgicas y en particular de la conjuntivitis vernal, y de los factores que la mantienen.

12. Este modelo puede servir también para comparar cuantitativa y objetivamente diferentes fármacos usados en el tratamiento de las conjuntivitis alérgicas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

ABADIE, A & PROUVOST-DANON, A.: Specific and total Ig E responses to antigenic estimuli in Brown-Norway, Lewis and Sprague-Dawley rats. Immunology, 39:561, 1980.

ABELSON, M.B., BAIRD, R.S., & ALLANSMITH, M.R.: Tear histamine levels in vernal conjunctivitis and other ocular inflammations. Ophthalmology 87:812, 1980.

ABELSON, M.B., BUIRUS, S.I. y WESTON, J.H.: Aspirin therapy in vernal conjunctivitis. Am. J. Ophthalmol. 95:502, 1983.

ABELSON, M.B., SOTTER, N.A., SIMON, M.A., DOHLMAN, N.J. y ALLANSMITH, M.R.: Histamine in human tears. Am. J. Ophthalmol , 83:417, 1977.

ALLANSMITH, M.R.: Vernal Conjunctivitis. En "Clinical Ophthalmology" vol 4, cap 8. T. D. DUANE (ed) Hagerstown Md. Harper & Row, Philadelphia 1978.

ALLANSMITH, M.R., BAIRD, R.S., HENRIQUEZ, A.S., & BLOCH, K.J.: Sequence of mast-cell changes in ocular anaphylaxis. Immunology, 49:281, 1983.

ALLANSMITH, M.R., BAIRD, B.S., GREINER, J.V. & BLOCH, K.J.: Late phase reactions in ocular anaphylaxis in the rat. Allergy Clin.Immunol. 73:49, 1984.

ALLANSMITH, M.R., BLOCH, K.J., BAIRD, R.S. & SINCLAIR, K: Ocular anaphylaxis: Induction by local injection of antigen. Immunology, 44:623, 1981.

ALLANSMITH, M.R. y GILLETTE, T.H.: Secretory component in human ocular tissues. Am. J. Ophthalmol. 89:353, 1980.

ALLANSMITH, M.R., HAHN, G.S. y SIMON, M.A.: Tissue, tear and serum Ig E concentration in vernal conjunctivitis. Am J. Ophthalmol. 81:506, 1976.

ANGELUCCI, 1848.: Citado por DUKE-ELDER, S. y LEIGH, A.G. System Of Ophthalmology. Vol. III, part 1, Henry Kimpton, Londres 1965.

BACH, M.K., BLOCH, K.J., AUSTEN, K.F.: Ig E and Ig Ga antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells. II Interaction of Ig Ga and Ig E at the target cell. J. Exp. Med. 133:772, 1971.

BALLOW, M., y MENDELSON, L.: Specific Immunoglobulin E antibodies in tear secretion of patient with vernal conjunctivitis. J. Allergy. Clin. Immunol. 66:112, 1980.

BARYISHAK, Y.R., ZAVARO, A., MONSELISE, M., SAMRA, Z. y SOMPOLINSKY, D.: Vernal conjunctivitis in an Israeli group of patients and its treatment with

sodium cromoglycate. Br. J. Ophthalmol. 66:118, 1982.

BAZIN, H., BECKER, A. & QUERINJEANL, P.: Three classes and four (sub)classes of rats immunoglobulins: Ig M, Ig A, Ig G1, Ig G2a, Ig G2b, Ig G2c. Eur. J. Immunol. 4:44, 1974.

BAZIN, H. & PAUWELS, R.: Ig E and Ig G2a isotypes in the rat. Prog. Allergy 32:52, 1982.

BAZIN, H. & PLATTEAU, B.: Production of circulating reaginic (Ig E) antibodies by oral administration of ovoalbumin to rats. Immunology, 30:679 1976.

BAZIN, H., PLATTEAU, B. & PAUWELS, R.: Genetic control of the Ig E reaginic immune response. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 66:(Suppl. 1):19, 1981.

BEIGELMAN, M.N.: Vernal Conjunctivitis. University of Southern California Press. Los Angeles 1950.

BERGSTRAND, H., ANDERSSON, I., NYSTRöM, I., PAUWELS, R. & BAZIN H.: The non specific enhnancement of allergy. II. Precipitation of anaphylactic *in vitro* response capacity and serum Ig E and Ig G... antibody synthesis in primed but non-responding rats by injection of alum. Allergy, 38:247. 1983.

BHAN, A.K., FUJIKAWA, L.S. y FOSTER, C.S.: T cell subsets and Langerhans cell in normal and diseased conjunctiva. Am. J. Ophthalmol. 94:205, 1982.

BLOCH-MICHEL, E., AUDOIN-BERAULT, J., HERMAN, D., DRY, J., CAMPINCHI, R.: Etude en immuno-fluorescence des plasmocytes de l conjunctiva allergique en particulier des cellules formatrices des immunoglobulines E. Arch. Opht. (Paris) 37:89, 1977.

BOMFORD, R.: Immunological adjuvants. Textbook of Immunopharmacology. Dale, M.M. & Foreman, J.C. (Ed) Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1984.

CARRERAS, B. & PRENDERGAST, R.B.: Immediate hypersensitivity immune reactions in the conjunctiva. IV International Symposium of Immunology and Immunopathology of the Eye. Padua, Italia, 1986.

CARRERAS, J.: Estudio de los plasmocitos en la conjuntivitis vernal mediante el método de la Inmunoperoxidasa. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada, 1983.

CHAIT, 1950: Citado por DUKE-ELDER, S. y LEIGH, A.G. System Of Ophthalmology. Vol. III, part 1, Henry Kimpton, Londres 1965.

DOBSON, C., MORSETH, D.H., & SOULSBY, E.J.L.: Immunoglobulin E type antibody induced by Ascaris

suum infections in guinea pigs. J. Immunology, 106:128, 1971.

DUKE-ELDER, S. y LEIGH, A.G.: System of Ophthalmology. Vol III, part 1, 1965. Henry Kimpton. Londres 1965.

DWYER, R.S.C. & DAROUGAR, S.: Models of immediate and delayed hypersensitivity in the guinea pig conjunctiva. Trans. Ophtal. Soc. U.K. 91:451, 1971.

EASTY. D.L. BIRKINSHAW, M., MERRET, T. MERRET, J., ENTWHISTLE, C. y AMER, B.: Immunological investigations in vernal eye disease. Trans. Opthalmol Soc. U. K. 100: 98, 1977.

EASTY. D.L., BIRKINSHAW, M., MERRETT, T., MERRETT, J. & MADDEN, P.: Immunology of vernal disease. En "The Mast Cell, its role in health and disease". Pepys, J. & Edwards, A.M. (Ed) University Park Press. Baltimore, 1979.

EASTY, D.L. RICE, N.S.C. y JONES, B.R.: Disodium cromoglycate in the treatment of vernal keratoconjunctivitis. Trans. Ophthalmol. Soc. U.K. 91:491, 1971.

EASTY, D.L. y SMOLIN, G.: External Eye Disease. Butterworth & Co Publishers Ltd. Londres 1985.

EPSTEIN, D.L. & ANDERSON, P.J.: The biochemistry of outflow mecahnisms. En "Glaucoma: applied pharmacology in medical treatment." Drance, S.M. & Neufeld, A.H. (Ed). Grune & Stratton Inc. Orlando, 1984.

GARVEY, J.S., CREMER, N.E., & SUSSDORF, D.H.: Methods in Immunology. 3rd Ed. Reading Mass. W.A. Benjamin Inc. 1977.

GELL, G.H. & HINDE, I.T.: Observations on the histology of the Arthus reaction and its relations to other known types of skin hypersensitivity. Int. Arch. Allery, 5:24, 1954.

GUDMUNDSON, O.G., SULLIVAN, D.A., BLOCH, K.J. & ALLANSMITH, M.R.: Immunoglobulin and secretory components in rats tears and ocular adnexa. En "Advances in Immunology and Immunopathology of the Eye. Ch.69. O'Connors, G,R. & Chandler, J.W. Pason Pub. New York, 1985.

GRAYSON, M.: Diseases of the Cornea., The C.V. Mosby Co., Saint Louis, Mo, 1979.

HALL, J.M., PRIBNOW, J.F., MEISLER, D., FRIEDLAENDER, M. & SCHOERONCK, B.: Immediate hypersensitivity in the guinea pig conjunctiva intravitreal and topical sensitization. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 25:212, 1984.

HENRIQUEZ, A.S., BLOCH, K.J., KENION, K.R., BAIRD, R.S., HANNINEN, L.A. & ALLANSMITH, M.R.: Ultrastructure of mast cell in rat ocular tissue undergoing anaphylaxis. Arch. Ophthalmol. 101:1439, 1983.

HIDALGO, J.M. y CARRERAS, B.: Ensayo clínico controlado a doble ciego sobre la eficacia del cromoglicato disódico en el tratamiento de la conjuntivitis vernal. Arch. Soc. Esp. Ofttal. 50:425, 1986.

HIDALGO, J.M. y CARRERAS, B.: Tratamiento de la conjuntivitis vernal con acido acetil-salicílico: prueba piloto y ensayo clínico controlado. Arch. Soc. Esp. Oftalmol. 50:445, 1986.

HIDALGO, J.M., CARRERAS, B. y GIRON, F.: El cromoglicato disódico en el tratamiento de la conjuntivitis vernal. Arch. Soc. Esp. Oftalmol. 6:565, 1982.

HUBSCHER, T.T.: Immune and biochemical mechanisms in the allergic disease of the upper respiratory tract; role of antibodies, target cells mediators and eosinophils. Annals of Allergy, 38:83, 1977.

HUDSON, L. & HAY, F.C.: Practical Immunology. Ch 1. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1978.

HUSSAIN, R., BRADBURY, S.M. & STREJAN, G.: Hypersensitivity to ascaris antigens. VIII. Characterization of a highly purified allergen. J. Immunology 111:260, 1973.

HYAMS, S.W. BIALK, M. y NEUMANN, E.: Clinical trial of topical disodium cromoglycate in vernal keratoconjunctivitis. J. Pediatric Ophthalmol. 12:116, 1975.

ISHIZAKA, K.: Cellular events in the Ig E antibody response. En "Advances in Immunology". Kunkel, H.G. & Dixon, F.J. (Ed) Vol.23, Academic Press, New York, 1976.

ISHIZAKA, K.: Regulation of the Ig E antibody response. Int. Arch. Allergy apll. Immun. 56 (Suppl.1):1, 1981.

ISHIZAKA, K. & IHIZAKA, T.: Mechanisms of reaginic hypersensitivity and Ig E antibody response. Immunological Rev. 41:109, 1978.

ISO, T., NAKAJIMA, N., SUDA, H. YAMAUCHI, H. & UDA, K.: Pasive anaphylaxis in rat conjunctiva and topical effects of antiallergic agents. Hypersensitivity in conjunctiva and drug efficacy. Ophthalmic Res. 12:9, 1980.

JARRETT, E.E.E. & HALL, E.: Regulation of ongoing Ig E antibody responses with minute doses of antigen. Eur. J. Immunol. 11:520, 1981.

JARRETT, E.E.E., HENDERSON, D. RILEY, P. & WHITE, R.G.: The effect of various adjuvants regimens and of nematode infection on the reaginic antibody response to egg albumin in the rat. Int Arch Allergy, 42:775, 1985.

JARRETT, E.E.E. & STEV[illegible] D.C.: Rat Ig E production. I. Effect of dose of antigen on

primary and secondary reaginic antibody responses. Immunology 27:365, 1974.

KALINER, M.M.: Hypotheses on the contribution of late-phase allergic responses to the understanding and treatment of allergic diseases. J. Allergy Clin. Immunol. 73:311, 1984.

KATZ, D.H.: The allergic phenotype: manifestation of "al ergic breakthrough" and imbalance in normal damping of Ig E antibody production. Immunological Rev. 41:78, 1978.

KELLEY, C.G. GUSS, R.B., y FRANKLIN, R.M.: Immunological diseases of the external eye. En "External Eye Disease". Easty, D.L. & O'Connor Ed. Butterworth & Co Publishers Ltd. Londres, 1985.

KHATHAMI, M., DONNELLY, J.J. JOHN, T. & ROCKEY, J.H.: Vernal conjunctivitis. Model studies in guinea pigs immunized topically with fluoresceinyl ovalbumin. Arch. Ophthalmol. 102:1683, 1984.

KISHIMOTO, T. & ISHIZAKA, K.: Regulation of antibody response in vitro. V. Effect of carrier specific helper cells on generation of hapten-specific memory cells of different immunoglobulins classes. J. Immunology, 111:1, 1973.

KISHIMOTO, T. & ISHIZAKA, K.. Regulation of antibody response in vitro. VI. Carrier specific helper cells for Ig G and Ig E antibody response. J. Immunology, 111:720, 1973.

KOJIMA, S. & OVARY, Z.: Effect of Nippostrongylus brasiliensis infection on anti-hapten Ig E antibody response in the mouse. I. Induction of carrier specific helper cells. Cell. Immunology, 15:274, 1975.

KUDO, K., SEHON, A.H. & SCHWENK R.J.: The role of antigen presenting cells in the Ig E antibody response. I. The induction of high titer Ig E antibody responses in Ig E high-responder and low-responder mice by the administration of antigen-

pulsed macrophages in the absence of adjuvants. J. Immunology, 126:403, 1981.

LEVINE, B.B. & VAZ, N.M.: Effect of combinations of inbred strains, antigen and antigen dose on immune resposiveness and reagin production in the mouse. A potential mouse model for immune aspects of human atopic allergy. Int, Arch. Allergy. 39:156, 1970.

MAYRHOFER, G., BAZIN, H. & GOWANS, J.L.: Nature of cells binding anti-Ig E in rats immunized with Nippostrongilus brasiliensis: Ig E synthesis in regional nodes and concentration in mucosal mast cells. Eur. J. Immunol. 6:537, 1976.

McMYNE, P.S. & STREJAN, G.H.: Relationships between cell-mediated immunity and the Ig E antibody response. IIDelayed hypersensitivity and antibody production to DNP-Ascaris conjugates. Cell. Immunology 58:312, 1981.

MEISLER, D.M., KRACHMER, J.H., STOCK, E.L. y METZGER, W.J.: Basophils in late skin reactions in vernal patients. ARVO abstracts, p.199. Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci. (Suppl.), 1981.

METZGER, H.: The Ig E-mast cell systemas a paradigm for the study of antibody mechanisms. Immunological Rev. 41:186, 1978.

MISHELL, B.B., & SHIIGI, S.M.: Selected Methods in Cellular Immunology. W.H. Freeman and Co. San Francisco, 1980.

MORGAN, G.: The pathology of vernal conjunctivitis. Trans. Ophthalmol. Soc. U. K. 91:467, 1971.

MOTA, I.: The mechanisms of anaphylaxis. I. production and biological properties of mast cell sensitizing antibody. Immunology, 7:681, 1964.

MURPHEY, S.M., BROWN, S., MIKLOS, N. & FIREMAN, P.: Reagin synthesis in inbred strains of rats. Immunology, 27:245, 1974.

MYGYND, N. Essential Allergy. Blackwell Scientific Publications. pag 1-9. Oxford, 1986.

OKUDAIRA, H., KOMAGATA, Y. & OGITA, T.: T cell dependent and independent steps in Ig E B memory cells development. Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 63:284, 1980.

OVARY, Z. & BENACERRAF, B.: Immunological specificity of the secondary response with dinitrophenylated proteins. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.. 114:72, 1963.

OVARY, Z., ITAYA, T., WATANABE, N. & KOJIMA, S.: Regulation of Ig E in mice. Immunological Rew. 41:26, 1978.

PAUWELS, R., BAZIN, H., PLATTEAU, B. & VAN DER STRAETEN, M.: Effect of antigen dose on the secondary Ig E response in BN rats. Int. Arch. Allergy appl. Immun. 57:472, 1978.

PAUWELS, R., BAZIN, H., PLATTEAU, B. & VAN DER STRAETEN, M.: The effect of age on Ig E production in rats. Immunology, 36:145, 1979.

PAUWELS, R., BAZIN, H., PLATTEAU, B. & VAN DER STRAETEN, M.: The influence of differents adjuvants on the production of Ig D and Ig E antibodies. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 130:49, 1979.

PAUWELS, R., VAN DER STRAETEN, M., PLATTEAU, B. & BAZIN, H.: The non-specific enhancement of allergy. 1. In vivo effects of Bordetella pertussis vaccine on Ig E synthesis. Allergy, 38:239, 1983.

PU, Z., PIERCE, N., SILVERSTEIN, A.M. & PRENDERGAST, R.A.: Conjunctival immunity: Compared effects of ocular or intestinal immunization in rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 24: 1411, 1983.

QUIJADA, L., KIM, Y.T., SISKIND, G.W. & OVARY, Z.: Immunogenicity of lowly and highly derivatized dinitrophenyl-bovine γ-globulin in different strains of guinea pigs. J. Immunology, 113:1296, 1974.

RATNER et al. (1927): Citado por DUKE-ELDER, S. y LEIGH, A.G. System Of Ophthalmology Vol. III, part 1, Henry Kimpton, Londres 1965.

REVOLTELLA, R. & OVARY, Z.: Reaginic antibody production in differents mouse strains. Immunology, 17:45, 1969.

ROITT, I.M., BROSTOFF, J. & MALE, D.K.: Immunology. Gower Medical Publishing. London, 1985.

SETZER, P.Y., NICHOLS, B.A., & DAWSON, C.R.: Unusual structure of rat conjunctival epithelium. Light and electron microscopy. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 27:531, 1987.

SMITH, S.R., HWANG, A., EICHELBERGER, J. & RANDELL, P.: Reaginic response in the rat.to alum precipitated antigens. II. Potentation of the Ig Ga and Ig E responses to dinitrophenylated bovine γ-globulin with Nippostrongylus brasiliensis. Int. Arch. Allergy, 44:382, 1973.

SMITH, S.R. & PETILLO, J.: Ig E production in five inbred rat strains following immunization with alum-precipitated egg albumin. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 52:21. 1976.

SMOLIN, G. y O'CONNOR, G.R.: Ocular Immunology. Cap 3 Atopic diseases affecting the eye. Lea & Febiger. Philadelphia, 1981.

SOLLEY, G.O et al: citado por Allasnmith, M.R., Baird, R.S., Greiner, J.V. & Bloch, K.J. en "Late phase reactions in ocular anaphylaxis in the rat." Allergy Clin. Immunol. 73:49, 1984.

STERNBERGER, C.A.: Immunocytochemitry. Ch 5. 2nd Ed. S. Wiley &sons. New York, 1979.

STREJAN, G. & CAMPBELL, D.H.: Hypersensitivity to ascaris antigen. I. Skin sensitizing activity to serum fractions from guinea pig conjuctiva sensitizied to crude extracts. J. Immunology. 98:893, 1966.

STREJAN, G.& CAMPBELL, D.H.: Hypersensitivity to ascaris antigens. IV. Production of homocytotropics antibodies in the rat. J. Immunology 101:628, 1968.

STREJAN, G. & CAMPBELL, D.H.: Hypersensitivity to ascaris antigens. V. Production of homocytotropic antibodies in the rabbit. J. Immunology. 106:1264, 1970.

STREJAN, G.H., HUSSAIN, R. & BRADBURG, S.(1973): Citado por TADA, T. en "Regulation of reaginic antibody formation in animals." Prog. Allergy 19:122 (Karger, Basel 1975).

STREJAN, G.H. & MARSH, D.G.: Hapten-carrier relatioships in the production of rat homocytotropic antibodies. J. Immunology, 107:306, 1971.

TADA, T., OKUMURA, K. & TANIGUCHI, M.: Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. VII. Carrier functions in the anti-hapten homocytotropic antibody response. J. Imunology, 108:1535, 1972.

TADA, T., OKUMURA. K. & TANIGUCHI, M.: Cellular basis of Ig E antibody formation in the rat. En "The biological role of the immunoglobulin E system". U.S. Department of Health Education and Welfare. Public Health Service 1974.

TANENBAUM, S et al.:citado por Allasnmith, M.R., Baird, R.S., Greiner, J.V. & Bloch, K.J. en."Late phase reactions in ocular anaphylaxis in the rat." Allergy Clin. Immunol. 73:49, 1984.

THEODORE, F.H., BLOOMFIELD, S.E., y MONDINO, B.J.: Cap 4 The Conjuntiva. Williams & Wilkins. Baltimore, 1983.

TOGBY, (1933): Citado por DUKE-ELDER, S. y LEIGH, A.G. System Of Ophthalmology. Vol. III, part 1, Henry Kimpton, Londres 1965.

TROCME, S.D., BAIRD. R.S., BLOCH, K.J., & ALLANSMITH, M.R.: Worm antigen induced ocular

anaphylaxis in rats infected with Nippostrongilus brasiliensis. Exp. Eye Res. 42:219, 1986.

TROCME, S.D., BANINI, S., TROCME, M.C., BARNEY, N.P., BLOCH, K.J. & ALLANSMITH, M.R.: A hapten model of topically-induced ocular anaphylaxis in the rat. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 28:264, 1987.

UDELL, I.J., GLEICH, G.J., ALLANSMITH, M.R. ACKERMAN, S.J. y ABELSON, M.R.: Eosinophil granule major basic protein and Charcot-Leyden crystal protein in human tears. Am. J. Ophthalmol. 92:824, 1981.

VAN ES & SCHALK (1928): Citado por DUKE-ELDER, S. y LEIGH, A.G. System Of Ophthalmology. Vol. III, part 1, Henry Kimpton, Londres 1965.

VAN HOUT, C.A. & JOHNSON, H.G.: Synthesis of rat Ig E by aerosol immunization. J. Immunology, 108:834, 1972.

VAZ, E.M., VAZ, N.M. & LEVINE, B.B.: Persistent formation of reagins in mice injected with low doses of ovalbumin. Immunology, 21:11, 1971.

VON SZILY (1914): Citado por DUKE-ELDER, S. y LEIGH, A.G. System Of Ophthalmology. Vol. III, part 1, Henry Kimpton, Londres 1965.

WAKSMAN, B.H.: Cellular hypersensitivity and immunity. Inflamation and cytotoxicity. En "Clinical Immunology" Vol.1, Cap.7 Charles W. Parker, Ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia 1980.

WATANABE, N. & KOBAYASI, A.: Sensitivity of passive cutaneous anaphylaxis in rat. I. Inverse relationships between PCA sensitivity and amount of Ig E present on mast cells. Int. Arch. Allergy appl. Immun. 72:53, 1983.

WEINBERG & JULIEN (1913): Citado por DUKE-ELDER, S. y LEIGH, A.G. System Of Ophthalmology. Vol. III, part 1, Henry Kimpton, Londres 1965.

WOODS (1924): Citado por DUKE-ELDER, S. y LEIGH, A.G. System Of Ophthalmology. Vol. III, part 1, Henry Kimpton, Londres 1965.

YANOFF, M. & FINE, B.S.: Ocular Pathology. Ch, 1. Harper & Row. Hagerstown, 1975.