MARCO ANTONIO DE CAMPOS MACHADO

**Modelo experimental de conjuntivite alérgica crônica
em camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo,
para obtenção de título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Oftalmologia
Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

São Paulo
2005

MARCO ANTONIO DE CAMPOS MACHADO

**Modelo experimental de conjuntivite alérgica crônica
em camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo,
para obtenção de título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Oftalmologia
Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

São Paulo
2005

*“Quando nada parece surtir efeito,
Eu vou ter com o homem que trabalha as pedras
E o observo marretando a rocha, cerca de uma centena de vezes,
Antes que ela dê o menor sinal de rachar.
Mas a centésima primeira marretada a divide em duas.
E eu fico sabendo que isto não é obra desta última marretada –
E sim de todas que vieram antes.”*

Jacob Riis

ESTE TRABALHO É DEDICADO

A minha esposa **ALESSANDRA**,

Pelo carinho, compreensão, paciência e,
especialmente, pelo apoio incondicional aos meus
sonhos.

Aos meus pais, **ANTONIO CARLOS** e **MARIA
APARECIDA**, meu irmão **ANTONIO CARLOS** e
minha irmã **LARISSA**, pelo apoio, amor, carinho e
compreensão.

Aos meus padrinhos **THOMAZ CAMANHO NETO**
e **LUCIA ANA CAMANHO**, que tem me orientado
meus passos através de seus conselhos,
paciência e carinho.

HOMENAGEM

Ao ***Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo,***

pela inmensurável paciência, compreensão,
ensinamentos e amizade durante toda essa longa
jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. José Carlos Eudes Carani**, pelo desprendimento de compartilhar sua sabedoria e experiência na concretização do projeto da Tese.

Ao **Prof. Dr. Newton Kara-José**, por ser um dos principais responsáveis pela minha entrada no Departamento de Oftalmologia e por todo apoio durante todos esses anos.

Ao **Prof. Dr. Luiz Antonio Vieira**, pelos momentos de apoio e ensino, contribuindo de forma indescritível em nosso saber.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues-Alves**, pela inestimável contribuição neste projeto, pelas suas palavras amigas e suas valiosas sugestões.

Ao **Prof. Dr. Marcel Cerqueira César Machado**, por sua compreensão, apoio, e ser sempre um modelo de médico, pesquisador e pessoa que sigo desde o meu ingresso na medicina.

Ao **Prof. Dr. Alberto Jorge Betinjane**, pela compreensão e incentivo no desenrolar deste trabalho.

À **Prof. Dra. Maria Cristina Martins**, pela inestimável contribuição na análise histológica, sem a qual esse trabalho seria impossível.

À **Prof. Dra. Vera Regina Cardoso Castanheira**, pela incansável disposição em apoiar este e outros projetos.

À **Prof. Dra. Suzana Matayoshi**, pelos momentos de colaboração e apoio.

Ao **Prof. Dr. Elias Rodrigues Paiva**, pela inestimável contribuição, orientando-me nos estudos estatísticos.

Ao **Prof. Dr. Milton Ruiz Alves**, por compartilhar seus conhecimentos, oferecendo suas palavras de apoio e estímulo.

Ao **Prof. Dr. Mario Luiz Monteiro Ribeiro**, pelo estímulo e por compartilhar seus conhecimentos conosco.

Ao **Dr. Tadeu Cvintal**, por guiar-me nos primeiros passos na Oftalmologia.

Ao **Dr. Agenor Melo Filho**, pelos momentos de desprendimento e apoio, onde ofereceu valiosas contribuições, sugestões e conselhos.

Ao **Dr. Rodolfo Kiyooki Hanashiro**, pelo apoio e incentivo no desenrolar deste trabalho.

Ao **Dr. Wilson Nahmatallah Obeid**, pelo apoio para a finalização desse projeto.

Ao **Ulisses Rodrigues da Silva**, pelo grande apoio e desmedida paciência durante todo o projeto da Tese.

A todos os **professores, pós-graduandos, funcionários e residentes** do Departamento de Oftalmologia (FMUSP), pela acolhida e amizade em todos esses anos de convívio.

A todos os **funcionários, professores e pós-graduandos** do Instituto de Ciências Biológicas IV (USP), pelo apoio e amizade em todos esses anos de convívio.

À **Regina Ferreira de Almeida**, pela disponibilidade, apoio e desmedida paciência durante todos esses anos.

À **Marja Elizabeth Lintulahti Olandim**, pela ajuda na elaboração da versão deste trabalho para o Inglês.

Especialmente, agradeço a ***Deus***, por ter posto em meu caminho todas estas pessoas maravilhosas que tanto me ajudaram e por ter me dado muito mais do que esperava.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Conjuntiva.....	02
1.2. Histórico.....	03
1.3. Classificação das conjuntivites alérgicas.....	04
1.3.1. Conjuntivite Alérgica Sazonal.....	05
1.3.2. Conjuntivite Primavera.....	06
1.3.3. Ceratoconjuntivite Atópica.....	08
1.3.4. Conjuntivite Papilar Gigante.....	10
1.3.5. Conjuntivites de contato.....	11
1.4. Histopatologia.....	12
1.5. Resposta Imune na Alergia Ocular.....	14
1.6. Modelos Experimentais.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Animais.....	32
3.2. Preparação da Solução para Imunização e Provocação.....	32
3.3. Imunização e Provocação dos Animais.....	33
3.4. Avaliação Clínica e Histopatológica.....	34
3.5. Avaliação Laboratorial.....	35
3.5.1. Detecção de anticorpos IgE e IgG totais e específicos para Dpt....	36
3.5.2. Experimento de proliferação de linfócitos específicos para Dpt....	37
3.5.3. Detecção das citocinas produzidas pelos linfócitos estimulados em cultura.....	38
3.6. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Gradação clínica e histopatológica.....	41
4.2. Dosagem de IgE total e Específica.....	42
4.3. Proliferação de Linfócitos específica para Dpt.....	44
4.4. Dosagem de IgG total e Específica.....	45
4.5. Citocinas produzidas pelos linfócitos aos estímulos com Dpt.....	46
4.6. Alterações anatomopatológicas na conjuntivite alérgica crônica.....	50
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	85
7. REFERÊNCIAS.....	87

Fontes consultadas

Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS

Al	Alabama
Ca	Califórnia
Co.	Corporation
com	contagem por minuto
ConA	Concanvalina A
Dpt	<i>Dermatophagoides Pteronyssinus</i>
Dr.	Doutor
et al.	e outros
FcεRI	Receptor de Alta Afinidade
FcεRII	Receptor de Alta Afinidade
GM-CSF	Fator de Estimulação de Colônia de Granulócitos e Macrófagos
³ H-TdR	ComTimidina Tritiada
IFN-γ	Interferon Gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Inc.	Incorporation
i.p.	intraperitoneal
n	número
n.s.	não significante
OD	Olho Direito
OE	Olho Esquerdo
p.	página
pg	picograma
Prof.	Professor
Prol.	Proliferação
Th	T auxiliadora
x	vezes
X ²	Qui-quadrado

LISTA DE SÍMBOLOS

Al (OH)^3	hidróxido de alumínio
*	asterisco
$^{\circ}\text{C}$	graus celsius
CO_2	dióxido de carbono
H_2O_2	dióxido de hidrogênio
H_2SO_4	ácido sulfúrico
mg	miligrama
ml	mililitro
mm^3	milímetro cúbico
mM	miliMol
nm	nanômetro
pg	picograma
%	porcentagem
+	cruz
μl	microlitro
μm	micrômetro

LISTA DE SIGLAS

Asymp. Sig.	Estatística de significância não paramétrica
CD ₃	Bloco de Diferenciação 3
CD ₄	Bloco de Diferenciação 4
CD ₈	Bloco de Diferenciação 8
CD23	Bloco de Diferenciação 23
CD34	Bloco de Diferenciação 34
CD40	Bloco de Diferenciação 40
CD40L	Bloco de Diferenciação 40L
DMEM	Meio para Águia Modificado Dulbecco's
ECP	Proteína Catiônica Eosinofílica
EDN	Neurotoxina Derivada do Eosinófilo
EPO	Peroxidade Eosinofílica
ELISA	Teste Imunoenzimático
E-Selectina	Molécula de Adesão nas interações entre Leucócitos e o Endotélio
EUA	Estados Unidos da América
HEPES	Ácido N-(2-hidro-xietil) piperazina-N'-2etanossulfônico
HRPO	Peroxidase de Raiz Forte
ICAM-1	Molécula de Adesão Celular -1
IPI-ASAC	Farmácia Imunológica Internacional
MALT	Tecido Linfóide Associado às Mucosas
MBP	Proteína Básica Maior
MCt	Mastócito de Mucosa
MCtc	Mastócito de Tecido Conectivo
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
RAST	Teste do Anticorpo IgE Alérgeno-Específico
USP	Universidade de São Paulo
VCAM-1	Molécula Vascular de Adesão Celular -1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Infiltração linfocitária encontrada na córnea dos camundongos cronicamente estimulados com antígenos do <i>Dermathophagoides pteronyssinus</i> (Dpt).....	53
Figura 2 –	Aparecimento de neovasos sob o epitélio da córnea.....	54
Figura 3 –	Região limbar da conjuntiva de um camundongo normal no painel da esquerda. Afilamento e modificação da celularidade decorrente da conjuntivite crônica induzida no painel da direita.....	55
Figura 4 –	Sinais clínicos de ceratoconjuntivite. Painel A, camundongo normal. Painel B, fase aguda da ceratoconjuntivite com opacidade corneana e lacrimeja mento. Painel C, camundongo com ceratoconjuntivite crônica.....	56
Figura 5 –	Conjuntiva normal (painel da esquerda) de um camundongo não imunizado. No painel da direita, o aumento de celularidade e desorganização da anatomia normal.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela A -	Tipos de hipersensibilidade, mecanismos envolvidos e exemplos de manifestações clínicas.....	17
Tabela B -	Solução de imunização dos camundongos.....	33
Tabela C -	Gradação clínica dos camundongos após a imunização.....	34
Tabela 1A -	Tabela descritiva das médias das gradações clínicas e histopatológicas da conjuntivite alérgica crônica induzida nos camundongos.	41
Tabela 1B -	Tabela descritiva das médias das gradações clínicas e histopatológicas da conjuntivite alérgica crônica nos camundongos não sensibilizados com Dpt.....	42
Tabela 2 -	Gradações clínicas e histopatológicas da conjuntivite alérgica crônica induzida nos camundongos.....	42
Tabela 3 -	Tabela descritiva das médias das variáveis IgE Total e Específica..	43
Tabela 4 -	Dosagem das variáveis Ige Total e Específica.....	43
Tabela 5 -	Tabela descritiva das médias da Proliferação Linfocítica Específica para Dpt.....	44
Tabela 6 -	Proliferação Linfocítica Específica para Dpt.....	44
Tabela 7 -	Tabela descritiva das médias variáveis IgG Total e Específica....	45
Tabela 8 -	Dosagem das variáveis IgG Total e Específica.....	46
Tabela 9 -	Tabela descritiva das médias da produção de IL-5 na cultura de células.....	47
Tabela 10 -	Produção de IL-5 na cultura de células.....	47
Tabela 11 -	Tabela descritiva das médias da produção de IL-8 na cultura de células.....	47
Tabela 12 -	Produção de IL-8 na cultura de células.....	48
Tabela 13 -	Tabela descritiva das médias da produção de IL-13 na cultura de células.....	48
Tabela 14 -	Produção de IL-13 na cultura de células.....	48
Tabela 15 -	Tabela descritiva das médias da produção de IL-4 na cultura de células.....	49
Tabela 16 -	Produção de IL-4 na cultura de células.....	49
Tabela 17 -	Tabela descritiva das médias da produção de IL-10 na cultura de células.....	49
Tabela 18 -	Produção de IL-10 na cultura de células.....	50
Tabela 19 -	Tabela descritiva das médias da produção de IFN- γ na cultura de células.....	50
Tabela 20 -	Produção de IFN- γ na cultura de células.....	50
Tabela 21 -	Alterações anatomopatológicas na conjuntivite alérgica crônica..	52
Tabela 22 -	Degenerações conjuntivais na conjuntivite alérgica crônica na linhagem C57Bl/6.....	52

RESUMO

Machado MAC. *Modelo experimental de conjuntivite alérgica crônica em camundongos [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

INTRODUÇÃO: A conjuntivite alérgica é a forma mais comum de doença alérgica que afeta o olho. Neste trabalho, desenvolvemos um modelo murino reprodutível e simular a doença humana, para possibilitar o estudo dos mecanismos fisiopatológicos da conjuntivite alérgica crônica. **MÉTODOS:** Imunizamos os camundongos BALB/c e C57Bl/6 com extrato do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt). Foi realizada a dissecação dos linfonodos ilíacos e para-aórticos, e a enucleação dos olhos. O plasma obtido pela punção cardíaca foi utilizado para a dosagem de IgE e IgG totais e específicas para Dpt. Os olhos enucleados foram enviados para estudo anátomo-patológico da conjuntiva e córnea. **RESULTADOS:** 1) Houve uma diferença estatisticamente significativa entre as duas linhagens (BALB/c e C57Bl/6) para os grupos imunizados com 5 µg e 500 µg na gradação clínica e histopatológica, dosagens de IgE Total e Específica, proliferação de linfócitos específica para Dpt e IgG Específica, e na dosagem das IL-5, IL-8 e IL-13; 2) Os níveis de IgG Total não se mostraram significantes para as duas linhagens nos grupos imunizados com 5 µg e 500 µg; 3) Os níveis de IL-4 e IL-10 tiveram uma diferença significativa nos animais da linhagem BALB/c imunizados com 5 µg e 500 µg, mas não nos camundongos da linhagem C57Bl/6; 4) Os níveis de IFN-γ foram maiores nos camundongos C57Bl/6 que receberam as menores quantidades de antígeno. Porém nos camundongos BALB/c o fenômeno foi o inverso; 5) O exame histológico revelou afilamento corneano, infiltrado linfocítico corneano e conjuntival, degeneração da conjuntiva e úlceras de córnea nos animais que obtiveram as maiores gradações clínicas da doença (camundongos BALB/c imunizados com 500 µg de Dpt e camundongos C57Bl/6 imunizados com 5 µg. **CONCLUSÃO:** Desenvolveu-se um modelo simples e reprodutível de conjuntivite alérgica crônica do *Dermatophagoides pteronyssinus* depois de repetidas exposições ao antígeno, o qual apresenta manifestações clínicas similares à doença humana, e serve como modelo de estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da doença.

Descritores: 1.CAMUNDONGOS 2.MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS 3.CONJUNTIVITE ALÉRGICA/fisiopatologia 4.DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS/imunologia 5.CITOCINAS/análise

SUMMARY

Machado MAC. Experimental model of chronic allergic conjunctivitis in murines [*thesis*]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

INTRODUCTION: Allergic conjunctivitis is the most common form of allergic disease that affects the eye. In this study we developed a reproducible mouse model and simulated human disease to enable the study of physiopathologic mechanisms of chronic allergic conjunctivitis. **METHODS:** We immunized BALB/c and C57B1/6 mice with *Dermatophagoides Pteronyssinus* (Dpt) dust mite extract. The iliac and paraaortic lymph nodes were dissected and the eyes were enucleated. The plasma obtained by cardiac puncture was used to measure Total and Specific IgE and IgG and Dpt-specific. Lymph node cells were used to measure Dpt specific proliferation cytokine detection in the culture supernatant. Eyes were enucleated for histopathological analysis of the conjunctiva and cornea. **RESULTS:** 1) There was a statistically significant difference between the 2 strains (BALB/c and C57B1/6) for the 2 groups immunized with 5µg and 500µg in the clinical and histopathological score, Total and Specific IgE dosages, proliferation Dpt-specific lymphocytes, dust mite Specific IgG, and in the levels of IL-5, IL-8 and IL-13; 2) The level of Total IgG was not significantly different between the 2 lineages in the groups immunized with 5µg and 500µg; 3) The levels of IL-4 and IL-10 showed a significant difference in BALB/c mice sensitized with 5µg and 500µg, but not in C57B1/6 mice; 4) The IFN-γ levels were higher in C57B1/6 mice that received the smallest quantity of antigen. But among BALB/c mice the phenomenon was inversed; 5) The histological examination revealed that there was a tapering of the cornea, lymphocytic infiltration of the cornea and conjunctiva, conjunctival degeneration and corneal ulcers in the animals that developed the highest clinical scores of disease (BALB/c immunized with 500 ug of Dpt and C57B1/6 immunized with 5 µg of Dpt). **Conclusion:** A simple and reproducible model of chronic allergic conjunctivitis to *Dermatophagoide pteronyssinus* was developed after repeated exposure to the allergen, which exhibit similar clinical manifestations as human disease, therefore serving as a template to study the immunological mechanisms involved in the development of disease.

Keywords: 1.MICE 2.DISEASE MODELS, ANIMAL 3.ALLERGIC CONJUNCTIVITIS/physiopathology 4.DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS/immunology 5.CYTOKINES/analysis

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conjuntiva

A conjuntiva é uma membrana vascular mucosa transparente que recobre a porção anterior do globo ocular e a superfície interna das pálpebras. Estende-se ela desde o limbo corneoescleral até a junção mucocutânea das pálpebras.

A conjuntiva divide-se em duas camadas, o epitélio e a substância própria. O epitélio é contínuo com a margem palpebral e é composto por várias camadas de células escamosas não queratinizadas na sua superfície, uma camada média de células poliédricas, e uma camada basal de células colunares e cuboidais. O epitélio contém numerosas glândulas mucosas unicelulares (células caliciformes) que secretam a camada de muco da lágrima, um excelente lubrificante, que é de suma importância para a estabilização do filme lacrimal. Sem a camada de mucina do filme lacrimal, as outras camadas da lágrima se desestabilizariam, e a córnea poderia ser comprometida pela exposição, ressecamento, desnutrição ou por infecções. O muco reduz a fricção e a adesão entre as pálpebras, contendo, ainda, células de defesa (Grove, 1988).

A substância própria pode ser dividida em camada superficial e camada fibrosa profunda. A camada superficial, composta por tecido adenóide, é fina e contém várias células inflamatórias. A camada profunda é espessa, e possui fibras elásticas e colágenas, juntamente com os vasos e nervos que suprem a conjuntiva.

O epitélio normalmente não contém células inflamatórias como os mastócitos, eosinófilos ou basófilos. Essas células comumente se encontram

na camada logo abaixo da epitelial, dentro da substância própria. Essas células inflamatórias migram para dentro do tecido em resposta a vários estímulos inflamatórios.

Os linfócitos estão dispersos na camada epitelial da conjuntiva e formam uma camada distinta dentro da substância própria, onde algumas vezes se agrupam em folículos. Os linfócitos intra-epiteliais são predominantemente CD8, enquanto na substância própria eles estão distribuídos igualmente entre as populações de CD4 e CD8. Há também uma grande quantidade de linfócitos com o receptor, que não apresentam restrição de apresentação de antígeno para o Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) I ou II, e que podem ser duplo-positivos (CD4 e CD8) ou duplo-negativos (apresentam apenas o CD3). Os linfócitos presentes na conjuntiva comportam-se como outros linfócitos em superfícies mucosas do organismo e, portanto, ela está incluída no Tecido Linfóide Associado às Mucosas ou “Mucosal-Associated Lymphoid Tissue” (MALT).

Assim, a conjuntiva por apresentar células de defesa contra as infecções e entrar em contato direto com o meio exterior, ocupa um importante papel no sistema de defesa imunológica externa do olho.

1.2 Histórico

A conjuntivite alérgica é uma patologia ocular muito comum, que faz parte de um espectro maior de doenças alérgicas. Em 1819, foi reconhecida como uma doença ocular por Bostock, que descreveu uma condição irritativa semelhante à doença observada na mucosa nasal durante a primavera, na

colheita de feno, doença esta que ficou conhecida como Febre do Feno. Mas observou também que, além dos sintomas inflamatórios da árvore respiratória, continha um componente ocular importante, ou nas palavras de Bostock “uma afecção do tórax e dos olhos”.

O termo atopia, de origem grega, significando doença estranha, foi inicialmente usado por Cocoa e Cooke, em 1923, para referir-se a indivíduos com a capacidade de tornarem-se sensíveis a certas proteínas, às quais estão expostos no meio ambiente ou nas suas moradias, mas que não estimulam uma resposta imune discernível na maioria dos indivíduos. A ceratoconjuntivite atópica só foi definida como tendo etiopatogênese alérgica por Hogan, em 1953, numa associação com a dermatite atópica. E finalmente Bloch-Michel e colaboradores (1977), estudando os plasmócitos na alergia ocular, demonstraram por imunofluorescência a produção de IgE, que posteriormente passou a ser detectada na lágrima dos indivíduos atópicos (Kari et al., 1985; Nomura e Takamura, 1998).

1.3 Classificação das conjuntivites alérgicas

A conjuntivite alérgica é uma das formas mais comuns das reações alérgicas, afetando cerca de 40 milhões de pessoas por ano nos Estados Unidos (Magone et al., 1998). As formas brandas ou moderadas de conjuntivite alérgica apresentam flutuação dos sintomas ocasionais de prurido, lacrimejamento e edema conjuntival. Nas formas crônicas da doença, por outro lado, os sintomas são mais graves, incluindo a dor, perda visual por cicatrizes corneanas, catarata, glaucoma e alterações palpebrais (McGill et al., 1998).

Existem várias classificações para as conjuntivites alérgicas (Ehlers e Donshik, 1992; Navarro et Al., 1992; Bruzini, 1994; Buckley, 1998). Dentre elas, a proposta por Friedlaender (1993) sugere que as conjuntivites alérgicas podem ser divididas em 5 categorias: (1) Conjuntivite Alérgica Sazonal, (2) Conjuntivite Primavera, (3) Ceratoconjuntivite Atópica, (4) Conjuntivite Papilar Gigante, e (5) Conjuntivite de Contato.

1.3.1 Conjuntivite Alérgica Sazonal

A conjuntivite alérgica sazonal corresponde a 25-50 % dos casos de conjuntivite alérgica (Donshik, 1988). Esse tipo de conjuntivite é autolimitada, e caracteriza-se por papilas tarsais pequenas, pela injeção conjuntival, bem como por graus variados de quemose (edema conjuntival) e edema palpebral.

Os pacientes que apresentam conjuntivite alérgica sazonal normalmente têm os sintomas de conjuntivite alérgica aguda num período de tempo definido. Na primavera predominam os pólenes das flores, no verão podem predominar os pólenes das gramíneas e, no outono, os pólenes de gramíneas como alérgenos predominantes. Tipicamente, tais pessoas apresentam-se sem sintomas durante os meses de inverno devido a menor transmissão aérea desses alérgenos.

A maior prevalência da conjuntivite alérgica sazonal ocorre na infância. Uma parcela desse grupo apresenta perda da sensibilidade alérgica na puberdade (menos de 50% dos casos). Nessa faixa etária o sexo masculino é predominante em relação à essa morbidade. A outra faixa etária que desenvolve este quadro alérgico vai dos 18 aos 35 anos. Nela, porém, a incidência alérgica sazonal é a mesma para ambos os sexos (Reiss et al., 1996).

Os sintomas oculares na conjuntivite alérgica sazonal são geralmente bilaterais e assimétricos e, muitas vezes, são acompanhados por sintomas nasais e respiratórios (Friedlaender, 1991).

O sintoma clássico é o prurido, relatado em 80 a 90% da população atingida (Friedlaender, 1991). Geralmente, apresenta-se como uma conjuntivite difusa com sinais de hiperemia, quemose, edema palpebral, lacrimejamento e secreção mucosa. Acomete a conjuntiva palpebral, bulbar e o limbo (Friedlaender, 1986). E, em alguns casos, pode ocorrer hipertrofia papilar com formação de pequenas papilas no tarso superior (Donshik, 1988).

A córnea é raramente atingida (Friedlaender, 1993; Reiss et al., 1996), mas pode haver um afinamento corneano periférico secundário à quemose da conjuntiva bulbar, que pode levar à turvação visual (Donshik e Ehlers, 1994).

1.3.2 Conjuntivite Primaveril

A conjuntivite primaveril é uma inflamação geralmente bilateral e crônica da conjuntiva, comumente associada a pessoas ou famílias com história de atopia. É também chamada de conjuntivite vernal, termo este que veio do latim *vernum* e significa “ocorrência na primavera” (Colby e Dohlman, 1996). Mais de 90 % destes pacientes exibem uma ou mais condições de atopia, como a asma, eczema ou rinite alérgica sazonal (Buckley, 1988). Esse tipo de conjuntivite é mais freqüente em regiões de clima quente, como na Itália, Grécia, Israel e partes da América do Sul (Allansmith e Baird, 1981; Archila et al., 1987). Ocorre, predominantemente, em crianças do sexo

masculino, raramente aparece antes dos 3 anos ou depois dos 25 anos de idade e, na maioria das vezes, torna-se inativa por volta da puberdade (Verdaguer, 1992).

A conjuntivite primaveril tem natureza sazonal, pode, porém, ter recorrência durante todo o ano ou não apresentar sazonalidade, conforme o clima local (Friedlaender, 1991).

O sinal clássico da conjuntivite primaveril é a presença das papilas gigantes, que freqüentemente se localizam na conjuntiva tarsal superior. As papilas assumem, então, uma forma típica, dando aspecto de paralelepípedos. Nos casos mais severos, essas papilas podem até provocar ptose mecânica. A forma limbar da conjuntivite primaveril geralmente afeta indivíduos com pele mais pigmentada, tendo as papilas na região limbar aparência gelatinosa e espessa. Essas papilas comumente estão associadas com pequenos nódulos sobrelevados, esbranquiçados (nódulos de Horner-Trantas), constituídos por eosinófilos degenerados, grânulos eosinofílicos e células epiteliais. Os nódulos de Horner-Trantas são transitórios e raramente aparecem antes de uma semana de evolução deste tipo de conjuntivite.

Em relação à córnea, podem ocorrer microulcerações epiteliais, originando uma ceratite ponteadada superficial, conhecida como ceratite epitelial primaveril de Tobgy (Friedlaender, 1986; Freitas e Belfort Jr., 1992). Essas microulcerações podem coalescer-se e formar macroulcerações, que se tratadas inadequadamente, costumam evoluir para a formação da úlcera em escudo (Cameron, 1995), sendo esta a causa mais importante de morbidade visual na conjuntivite primaveril (Friedlaender, 1986; Cameron, 1995).

Outra importante causa de morbidade visual em pacientes com conjuntivite primaveril é o desenvolvimento do ceratocone (Schliapnik et al., 1989).

1.3.3. Ceratoconjuntivite Atópica

A ceratoconjuntivite atópica é uma inflamação bilateral da conjuntiva e pálpebra com forte associação com a dermatite atópica. Em 1953, Hogan foi o primeiro a descrever esta associação. Esse autor reportou cinco casos de inflamação conjuntival em pacientes masculinos com dermatite atópica. A dermatite atópica, por sua vez, é uma doença hereditária que normalmente aparece na infância, sendo mais freqüente em homens (Donshik, 1988). Aproximadamente 3% da população é afetada pela dermatite atópica, e dessa, aproximadamente 25% a 42% têm envolvimento ocular (Braude e Chandler, 1984; Garrity e Liesegang, 1984; Rich e Hanifin, 1985).

A ceratoconjuntivite atópica costuma afetar pálpebras, conjuntiva, córnea e cristalino. É possível que a pele das pálpebras exiba uma dermatite eczematosa, e as margens palpebrais podem mostrar queratinização e disfunção das glândulas de Meibomius. A conjuntiva costuma apresentar-se hiperemiada, quemótica, e com formação de filamentos (Donshik, 1988). Há também uma reação papilar, em que as papilas tendem a ser menores que na conjuntivite primaveril, e, geralmente, localizam-se na conjuntiva tarsal inferior. E tal como na conjuntivite primaveril, os nódulos de Horner-Trantas podem ser observados no limbo nos casos de ceratoconjuntivite atópica (Donshik, 1988).

Nas fases mais avançadas da doença ocorre uma cicatrização conjuntival. O encurtamento dos fórnices pode ocorrer em aproximadamente 29% dos casos (Foster e Calonge, 1990), bem como levar a um quadro de olho seco, devido à perda das células caliciformes. É comum esse processo conjuntival desencadear entrópio, simbléfaro e até estenose do ponto lacrimal (Garritty e Liesegang, 1984).

O envolvimento corneano na ceratoconjuntivite atópica começa pela ceratite ponteadada epitelial, que freqüentemente atinge o terço inferior da córnea (Donshik, 1988). Com a progressão da doença, pode aparecer um defeito epitelial persistente, com subsequente vascularização e cicatrização corneana, resultando em perda de visão (Power et al., 1998).

Pacientes com ceratoconjuntivite atópica são mais susceptíveis a desenvolver catarata (Friedlaender, 1993). Esta, geralmente, tem crescimento lento, surgindo com mais freqüência após dez anos de aparecimento da dermatite atópica, e caracteriza-se por ser bilateral e simétrica. Mas muitas vezes é difícil determinar se a catarata aparece pelo tratamento com corticostéóides ou pela própria doença (Donshik e Ehlers, 1994).

O ceratocone também está associado à ceratoconjuntivite atópica (Sing e Mathur, 1968; Foster e Calonge, 1990). Uma teoria para explicar esta ectasia está no esfregar constante dos olhos pelo paciente, devido ao intenso prurido ocular (Greiner et al., 1985). Outra teoria seria um defeito na síntese de colágeno que os pacientes atópicos apresentam (Friedlaender, 1991). No estudo apresentado por Copeman (1965), 16% dos pacientes com ceratocone tinham dermatite atópica.

1.3.4. Conjuntivite Papilar Gigante

A conjuntivite papilar gigante, por sua vez, é uma inflamação de causa imunológica da conjuntiva tarsal superior, marcada pela presença de “papilas gigantes”, que apresentam um diâmetro maior que 0,3mm (Friedlaender, 1993). Acredita-se que este tipo de conjuntivite represente uma reação imunológica a uma variedade de corpos estranhos, os quais podem causar uma prolongada irritação mecânica da conjuntiva tarsal superior.

A conjuntivite papilar gigante é observada em pacientes usuários de lentes de contato (Allansmith e Ross, 1988), e também em pacientes com prótese ocular, suturas expostas em contato com a conjuntiva, além de corpos estranhos e nódulos (Greiner, 1988).

Os prováveis fatores responsáveis pela conjuntivite papilar gigante são os traumas mecânicos e as reações de hipersensibilidade. Pesquisas recentes sugerem que se trate de uma reação de hipersensibilidade tardia, com um provável componente de IgE (McGill et al., 1998). Não se conseguiu estabelecer uma relação entre a inflamação conjuntival e a reação ao material da lente de contato.

Vários autores estimam que, entre 1 a 5% dos usuários de lentes de contato gás permeável, e entre 10 a 15% dos que usam lentes de contato de polimetilmetacrilato, tenham conjuntivite papilar gigante (Korb et al., 1980). Um estudo prospectivo realizado com 200 usuários de lentes de contato rígidas revelou uma prevalência de conjuntivite papilar gigante em 10,5% (Korb et al., 1980). Ademais, estudos epidemiológicos têm demonstrado que a conjuntivite papilar gigante em usuários de lentes de contato é quase que exclusivamente bilateral, aparecendo em média após 31 meses do início do uso (Hart et al., 1989).

Na fase inicial da conjuntivite papilar gigante, os pacientes referem leve prurido ao remover as lentes, bem como um aumento da secreção mucosa ao acordar. A visão borrada só aparece horas após o uso das lentes de contato, pelos depósitos inflamatórios que se formam (Allansmith e Ross, 1988), excesso de muco e movimento da lente ao piscar. Nesta fase, as papilas tornam-se mais elevadas, com um generalizado espessamento da conjuntiva (Friedlaender, 1993). Com o avanço da doença, a conjuntiva se torna mais opaca, devido à infiltração celular por eosinófilos e outras células inflamatórias (Friedlaender, 1993).

Na fase avançada da conjuntivite papilar gigante, a superfície da conjuntiva pode ulcerar. Essas ulcerações são mais freqüentes no limbo superior, com probabilidade de aumentar de tamanho e atingir a região central da córnea, sendo acompanhadas, algumas vezes, por neovascularização corneana periférica (Allansmith e Ross, 1988). Alguns pacientes, além disso, também podem apresentar nódulos de Horner-Trantas (Meisler et al., 1980).

1.3.5. Conjuntivites de contato

Nos últimos anos, o uso indiscriminado de antibióticos, antivirais e antiinflamatórios tópicos têm aumentado a incidência de reações alérgicas de contato (Friedlaender, 1988).

Existem várias medicações usadas em oftalmologia que provocam reações alérgicas (Friedlaender, 1991), como o cloranfenicol, anestésicos, preservativos, midriáticos (atropina), além de soluções de limpeza e conservação das lentes de contato (Friedlaender, 1991).

A conjuntivite alérgica de contato, ao contrário dos outros tipos de alergia, gera uma reação alérgica retardada ou reação de hipersensibilidade tipo IV, que é mediada por linfócitos (Friedlaender, 1993).

A conjuntivite alérgica de contato, na sua fase aguda, apresenta pálpebras inflamadas, com prurido e edema. Estes sintomas, geralmente, manifestam-se com 24 a 48 horas depois do contato com o alérgeno (Friedlaender, 1986). Na fase crônica, as pálpebras apresentam eczema, formação de crostas e liquenificação (Friedlaender, 1988). Podem também ocorrer erosões corneanas que, por sua vez, permitem a evolução para opacificações corneanas (Friedlaender, 1991).

A conjuntiva normalmente encontra-se hiperemiada e edemaciada, com hipertrofia papilar no tarso superior, acompanhada por vasodilatação, quemose e secreção mucosa (Friedlaender, 1988).

Belfort Jr e colaboradores, em 2000, analisando 134 pacientes com conjuntivite alérgica, mostraram que 46% dos pacientes tinham o diagnóstico de ceratoconjuntivite vernal, 40% com ceratoconjuntivite atópica e 8% com conjuntivite alérgica perene. Em seis pacientes do grupo estudado não foi possível obter o diagnóstico.

1.4 Histopatologia

Os raspados conjuntivais e as citologias das lágrimas realizadas após uma conjuntivite alérgica mostram um aumento significativo de neutrófilos e eosinófilos (Abelson e Schaefer, 1993).

Histologicamente, em modelos animais, mais de 70% dos mastócitos encontram-se degranulados, as células caliciformes não sofrem alterações, e ocorre um aumento do número de neutrófilos na fase inicial do processo (Allansmith e Abelson, 1983). A infiltração de eosinófilos ocorre de uma a seis horas após o desafio, enquanto nos neutrófilos, dá-se após 6 horas, retornando ao nível basal após 24 horas (Trocme et al., 1993). Os mastócitos voltam a se regranular após um período de 24 horas, mas são necessários até sete dias para apresentarem uma resposta normal. Macroscopicamente, os olhos podem ter uma aparência normal, apesar da degranulação dos mastócitos e do edema intersticial microscópico (Allansmith et al., 1989).

A fase tardia da reação alérgica é uma constelação de sintomas que sucede após a fase imediata, que dura até duas horas. Essa reação é acompanhada por sensação de corpo estranho, prurido ocular e hiperemia conjuntival, os quais estão associados com o recrutamento de células inflamatórias presentes no fluido lacrimal. A fase tardia da reação tem um pico de ação entre quatro e oito horas na pele, olho, pulmão e nariz (Abelson et al., 1990), reduz sua ação, e se resolve em 24 a 48 horas.

A fase tardia do processo alérgico é dose-dependente, e está relacionada diretamente ao número de células inflamatórias presentes no filme lacrimal. A presença delas é acompanhada pela dos mediadores, como a histamina, leucotrienos e mediadores dos eosinófilos (Bonini et al., 1989).

1.5 Resposta Imune na Alergia Ocular

A atopia é uma condição patológica caracterizada por um aumento na habilidade dos linfócitos B em formar anticorpos IgE para certos grupos de antígenos que podem ativar o sistema imune após inalação, ingestão, ou contato com a superfície corporal, seja na pele ou em uma mucosa (Romagnani, 1994). Esta condição tem um forte componente genético: uma criança tem 50% de chance de desenvolver alergias se a sua mãe for alérgica, e 25% se o pai for alérgico. Entretanto, também é associada com fatores do meio ambiente, sendo o mais importante deles a exposição precoce aos antígenos alergizantes (alérgenos).

Aproximadamente 20% da população apresenta doenças alérgicas, como rinite, asma alérgica, dermatite atópica, conjuntivite alérgica, alergia alimentar, urticária e angioedema. É muito difícil precisar a incidência e a prevalência das conjuntivites alérgicas, pois existem problemas tanto de conceituação quanto de diagnóstico. No Japão, a prevalência estimada é de cerca de 20% da população (Yasuda et al., 1999) e de 25%, nos Estados Unidos (Meltzer, 1988).

As conjuntivites alérgicas geralmente associam-se a outras doenças alérgicas e, devido às suas altas prevalências, geram altos custos para a sociedade. Nos Estados Unidos da América, em 1996 somente, os gastos médicos diretos com as rinoconjuntivites alérgicas foram de aproximadamente 5,9 bilhões de dólares. Deste total, os serviços ambulatoriais custaram 3,7 bilhões, a medicação para os pacientes, 1,5 bilhões e os serviços hospitalares, 700 milhões (Ray et al., 1999).

As conjuntivites alérgicas compreendem um espectro muito variado de doenças. Apesar de os mecanismos imunopatogênicos da conjuntivite alérgica serem multifatoriais, todos os tipos de conjuntivite alérgica compartilham os mecanismos de hipersensibilidade do tipo 1 de Gell e Coombs (vide Tabela A). Este tipo de reação imunológica inicia-se pela produção e secreção de IgE Específica para o alérgeno sensibilizante pelos linfócitos B. A IgE secretada liga-se aos mastócitos e basófilos através de um receptor de alta afinidade para a cadeia pesada da IgE (FcεRI).

O início de uma resposta alérgica ocorre quando um alérgeno, para o qual o indivíduo já está sensibilizado, isto é, para o qual já tenha ocorrido produção de IgE, entra em contato com mastócitos que possuem IgE Específica para tal alérgeno em sua superfície. Se este alérgeno possuir epitopos suficientes para levar a ligação cruzada de várias moléculas de IgE na superfície do mastócito, isto levará a ativação do citoesqueleto desta célula, com a conseqüente liberação no meio extracelular de substâncias contidas em grânulos pré-formados que existem no interior destas células. Dentre estas substâncias destacam-se a histamina, que mediará a maior parte dos eventos vasoativos associados com as hipersensibilidades do tipo I, os leucotrienos e uma gama de substâncias quimiotáticas que irão atrair para o sítio da resposta alérgica células como eosinófilos. Os eosinófilos iniciam sua migração, entre 6 e 12 horas após o contato com o alérgeno, e serão responsáveis pela fase tardia da resposta alérgica (vide abaixo). Há ainda um segundo receptor para IgE (FcεRII, ou CD23) que pode ser encontrado nos linfócitos e em outras células hematopoiéticas. Este receptor é de baixa afinidade, quando comparado ao Fcε RI.

O CD23 tem grande importância nas respostas alérgicas, pois compete pela IgE com o receptor de alta afinidade na sua forma aderida à superfície de células, e, portanto, funciona como um agente de diminuição destas respostas. Contudo, na sua forma solúvel, ele funciona como um degranulador de mastócitos, ao associar-se com a IgE que já se encontra ligada aos mastócitos.

Nos seres humanos existem dois subtipos de mastócitos, os quais se distinguem pelas proteases neutras que contêm. O subtipo MCt (Mastócito de Mucosa) contém somente uma única protease neutra, a triptase, enquanto o subtipo MCtc (Mastócito de Tecido Conectivo) apresenta tanto triptase quanto quimase. E, apesar de ambos os subtipos de mastócitos se desenvolverem a partir do CD34 (precursor monocelular), o subtipo MCt é dependente da presença de linfócitos T, predominantes nas superfícies mucosas, e que estão em maior número nas doenças alérgicas. O subtipo MCtc aparece independente das células T, porém o seu desenvolvimento requer fatores de crescimento como a Interleucina-3 e o GM-CSF (fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos) (Levi-Schaffer et al., 1991).

Tabela A: Tipos de hipersensibilidade, mecanismos envolvidos e exemplos de manifestações clínicas

Tipo de reação de Hipersensibilidade	Mecanismo envolvido	Exemplos de manifestações clínicas
Tipo I Hipersensibilidade Imediata	IgE, mastócitos e basófilos	Alergia
Tipo II Mediada por Anticorpos	IgM, IgG contra tecidos ou antígenos de superfície	Úlcera de Mooren, Pênfigo, Doença de Graves
Tipo III Mediada por imuno-complexos	Imunocomplexos circulantes que se depositam em tecidos	Lupus, Poliarterite nodosa, Síndrome de Stevens-Jonson
Tipo IV Mediada por células T	Células CD ₄ Células CD ₈	Dermatite de contato, Rejeição em transplante de córnea, Ceratite intersticial

É conveniente notar que os processos inflamatórios na conjuntiva são mais complexos do que se supunha. Vários trabalhos mostram as diferentes populações celulares na conjuntiva de pacientes com alergia ocular, através dos métodos de hibridização *in situ* e imunohistoquímica (Metz et al., 1996). Há um infiltrado multicelular composto por linfócitos, plasmócitos, mastócitos, macrófagos, eosinófilos e até por basófilos e neutrófilos (Trocme et al., 1992).

Mastócitos e basófilos são as células mais importantes envolvidas na fase aguda da resposta alérgica. Ambas as células contêm histamina e podem produzir leucotrienos e quininas. Mas os basófilos diferem dos mastócitos pela sua capacidade de gerar prostaglandina D₂ e triptase (MacGlashan Jr et al., 1983).

Os basófilos agem principalmente nas reações de hipersensibilidade tardia. As infiltrações dos basófilos, sejam no estroma ou no epitélio corneano, foram observadas em várias amostras de pacientes com conjuntivite vernal (Collin e Allansmith, 1977). Sugeriu-se, inclusive, que a conjuntivite vernal, pelo menos em parte, seja uma manifestação de hipersensibilidade tardia dos basófilos.

Os mastócitos participam de uma grande gama de processos imunológicos, incluindo a produção de várias citocinas. O processo de degranulação dos mastócitos libera histamina, proteases e outros produtos (Tabbara, 1999). Os mastócitos participam também da síntese do fator ativador de plaquetas (importante agente quimiotático para eosinófilos) e leucotrienos. Nos processos inflamatórios agudos, os mastócitos induzem ainda o afluxo de neutrófilos e eosinófilos para dentro da conjuntiva.

Existem aproximadamente 50 milhões de mastócitos no olho e em seus tecidos anexos (Allansmith e Baird, 1981). Mas a maioria das estruturas intra-oculares é destituída destas células (como, por exemplo, cristalino, íris e retina). A córnea é uma estrutura que não tem vasos sanguíneos e células imunes. Os tecidos que circundam a córnea, entretanto, são ricos em vasos sanguíneos e elementos do sistema imune, incluindo os mastócitos. Logo, o sistema de defesa da córnea é dependente dos seus tecidos vizinhos (Power e Neves, 1996).

Nos camundongos, 94% dos mastócitos das estruturas oculares encontram-se nas pálpebras e na conjuntiva. Os seres humanos possuem uma densidade de mastócitos na conjuntiva de 5000 células por mm^3 , tendo a conjuntiva limbar um número maior de células do que a conjuntiva bulbar (Allansmith e Ross, 1988).

Os mastócitos encontram-se em repouso na conjuntiva normal de seres humanos e de camundongos. Estas células se localizam primariamente na lâmina própria da conjuntiva humana em pacientes normais, enquanto nos casos de doença alérgica, podem também ser encontradas em outras áreas (Smelser e Silver, 1963).

Os mastócitos são em grande parte responsáveis pela sintomatologia das conjuntivites sazonais, por conta da importância da histamina nestes processos. Recentes estudos histoquímicos mostraram um aumento significativo no número de mastócitos conjuntivais neste tipo de conjuntivite, existindo uma correlação entre os sintomas dos pacientes e o número de mastócitos presentes (Anderson et al., 1997). Irani e colaboradores (1990) encontraram, ainda, um aumento no número de mastócitos no epitélio conjuntival de pacientes com ceratoconjuntivite vernal (Bonini e Bonini, 1993).

Os linfócitos T são importantes na produção de alterações inflamatórias nos pacientes com conjuntivite alérgica crônica, principalmente através da produção de citocinas, além de atuarem diretamente nos receptores e na adesão das moléculas.

As células T desempenham um importante papel na resposta alérgica, particularmente nas reações de hipersensibilidade tipo I e IV. Na reação de hipersensibilidade tipo IV, o antígeno é apresentado às células T pelas células apresentadoras, como as células de Langherhans. Assim, certas células T são sensibilizadas por um antígeno específico. Subseqüentemente à exposição, as linfocinas produzidas recrutam macrófagos, que têm uma importante atuação na resposta de hipersensibilidade tardia (24 Horas após a exposição).

O epitélio conjuntival humano apresenta populações de células CD₄ e CD₈, principalmente na região subepitelial (Metz et al., 1996). Nas conjuntivites sazonais, o número de linfócitos praticamente não sofre alteração. Entretanto, nas conjuntivites atópica, vernal e papilar gigante, ocorre um aumento na população de células CD₄, mas o número de células CD₈ não aumenta, com uma mistura de infiltrados celulares contendo mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos. Na população de CD₄ aumentada, 90% das células são células T de memória (Metz et al., 1996). Na conjuntivite atópica, as células T são recrutadas das células T-memória específicas da circulação, enquanto nas conjuntivites papilar gigante e vernal, as células T são produzidas localmente.

Os linfócitos CD4 podem ser classificados como células T auxiliaadoras (Th), Th₁ e Th₂, dependendo da citocina produzida. As células Th₁ secretam interleucina (IL)-2 e interferon (IFN)-gama e linfoxina. As células Th₂ secretam IL-4, IL-5 e IL-10. Outras citocinas como a IL-1, IL-12 e IL-18, são secretadas por outros tipos celulares e participam no processo de diferenciação das células precursoras das células Th₁ e Th₂ (Shevach, 1999).

A importância funcional das citocinas é exemplificada pela IL-4, um importante mediador da resposta alérgica, que induz a transformação das células B de IgM para IgE produtoras. Este processo promove o crescimento das células T, principalmente das células T auxiliaadoras (Th₂), o que é essencial para a resposta alérgica, e é obrigatória para expressão do gene IL-4 no cromossomo 5, o qual inclui a IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13 (Uchio et al., 2000).

Há uma correlação entre o número de linfócitos T e os efeitos celulares nos olhos com conjuntivite alérgica, os quais sugerem um envolvimento da IL-4 e IL-5 (ambos secretados pelos linfócitos Th2) (Kim et al., 1999a).

Os linfócitos Th2 clonados do epitélio conjuntival de pacientes com conjuntivite vernal também ativam a liberação de IgE. Essas células produzem IL-3 e IL-4, que não só regulam a síntese de IgE humana, mas também ativam e modulam as funções dos mastócitos e eosinófilos.

A síntese de IgE ocorre por colaboração entre as células Th2 e as células B (Vercelli e Geha, 1991). As células Th2 atuam sobre as células B com, no mínimo, dois sinais; um, por meio da IL-4, e outro, representado pela interação física entre as células T e B, ocorrendo entre as moléculas CD40L (expressa na célula Th ativada) e CD40 (expressa na célula B). Assim, as células Th2, por intermédio da IL-4 e da interação CD40L/CD40, acabam por induzir a célula B à síntese de IgE (Gauchat et al., 1992).

A variação das citocinas provenientes das células T CD₄ humanas assemelha-se com as encontradas em camundongos (Mosmann e Coffman, 1989), com células Th1 (secretando IL-2, IFN- γ e IL-12) e células Th2 (secretando IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13). A maioria dos clones de células humanas produz uma mistura de linfocinas com um perfil similar aos clones Th0 dos camundongos (Paliard et al., 1988).

A produção de diferentes citocinas pelo pelas células T (Th), conforme explicado anteriormente, tem um efeito regulador da natureza da resposta alérgica. Em camundongos, fatores como o IFN- γ , promovem a diferenciação do Th precursor em células Th1, tanto *in vitro* quanto em modelos de

Leishmania in vivo (Shevach, 1999). A IL-4, por outro lado, induz a diferenciação em Th2 (Romagnani, 1992a). Nos últimos anos, resultados semelhantes foram obtidos usando cultura de células humanas mononucleares obtidas do sangue periférico com derivados de proteínas purificadas ou alérgenos: a presença de IL-4 pode diferenciar células Th1 em Th0 ou até em Th2. Em contraste, adição de IFN- γ anti-IL-4 induz as células T alérgeno-específicas em Th0 ou Th1, ao invés de Th2 (Maggi et al., 1991; Romagnani, 1992b). Alguns autores acreditam que a citocina determine o fenótipo específico subsequente da resposta imune (Romagnani, 1995).

Romagnani e colaboradores (1991) mostraram que os clones de células T provenientes de pacientes com conjuntivite vernal apresentavam um aumento na produção de IL-4 e diminuição da produção de IFN- γ , quando comparados com os controles. Essas células T oriundas da conjuntivite vernal têm uma maior capacidade de ajudar na síntese do complexo célulaB-IgE do que a célula T da corrente sanguínea periférica do mesmo paciente (Maggi et al., 1991).

Um grande número de fatores pode influenciar na diferenciação das células T, como a natureza e quantidade de antígenos, tipo de célula apresentadora de antígeno, citocinas, e por último, mas não menos importante, a herança genética do hospedeiro.

Os neutrófilos ainda não possuem um papel bem definido na patogênese das doenças alérgicas oculares. Vários estudos, tanto em animais quanto em humanos, constataram um significativo aumento de neutrófilos nas fases aguda e tardia da conjuntivite alérgica (Trocme et al., 1988). E apesar

das alterações celulares ocorrerem em ambas as fases, só foi demonstrada uma correlação entre os eventos clínicos e histopatológicos na fase aguda. Provavelmente, os neutrófilos contribuem na fisiopatologia da fase tardia através da produção de mediadores pré-inflamatórios (Calonge et al., 1990).

Os neutrófilos têm um substancial aumento em seu número em outros pacientes alérgicos, como na asma aguda, quando desempenham um importante papel na patogênese desta.

Evidências sugerem que tanto eosinófilos quanto neutrófilos contribuem para a asma (Wenzel et al., 1997), existindo uma correlação entre o número de neutrófilos e as altas concentrações de IL-8 em pacientes asmáticos (Jatakanon et al., 1999). Esse fato sugere que a IL-8 possa estar associada com o recrutamento e ativação dos neutrófilos (Ribeiro et al., 1991).

A presença de fatores quimiotáticos para neutrófilos encontrada nas lágrimas de pacientes com conjuntivite papilar gigante pode sugerir uma ligação (pelo menos em animais) entre os neutrófilos e essas alterações conjuntivais (Elgebaly et al., 1991).

Todas as doenças alérgicas apresentam algum grau de degranulação dos mastócitos, os quais têm um importante papel no recrutamento dos neutrófilos. Na conjuntivite papilar gigante, os neutrófilos são recrutados primariamente pelo trauma e secundariamente pelos mastócitos. E, em pacientes com ceratoconjuntivite vernal, foi constatado um pequeno número de neutrófilos infiltrados na conjuntiva quando comparados com os controles normais (Elgebaly et al., 1991).

Assim, pode-se sugerir que os neutrófilos participem ativamente na alergia ocular. Futuros trabalhos, porém, são necessários para determinar sua real função nesse processo inflamatório.

Os eosinófilos desempenham uma importante função na patogênese das conjuntivites alérgicas, aparecendo em grande número nos casos de alergia ocular. Antigamente, acreditava-se que eram simples células efetoras, porém os eosinófilos também podem produzir citocinas. Várias proteínas são encontradas nos grânulos dos eosinófilos, como as proteínas básicas maiores (MBP), as proteínas catiônicas eosinofílicas (ECP), a peroxidase eosinofílica (EPO) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) (Trocme e Aldave, 1994; Montan e Hage-Hamsten, 1996).

As ECP e MBP induzem a degranulação dos mastócitos, e também exercem efeito citotóxico (Montan e Hage-Hamsten, 1996), bem como a EPO que, na presença de H_2O_2 , tem efeito citotóxico e induz o acúmulo de neutrófilos no local da lesão. Os níveis de eosinófilos e ECP são similares tanto na reação IgE mediada, quanto na reação IgE não mediada, nos casos de conjuntivite vernal – um indicador da característica dos mediadores eosinofílicos nesta doença (Bonini e Bonini, 1993).

Tanto os eosinófilos quanto os mastócitos contêm citocinas multifatoriais que podem aumentar a angiogênese, fibrose e hiperplasia tecidual (principalmente do limbo). As proteínas eosinofílicas são tóxicas para o epitélio corneano e podem provocar ceratite superficial e ulceração de córnea em escudo (Tabbara, 1999).

Os eosinófilos são células predominantemente ativadas durante a fase tardia de reação no olho. A produção e ativação dessas células são controladas pelas células Th2 que também regulam a síntese de IgE. A IL-5 age com um fator ativador e produtor de eosinófilos (Macleod et al., 1997). A IL-4 atua sobre as células endoteliais, fazendo com que essas expressem fatores quimiotáticos específicos para eosinófilos. Uma vez atraídos em grandes quantidades, os eosinófilos atuam como células efetoras com liberação de mediadores inflamatórios, provocando lesão tecidual.

A presença de eosinófilos na conjuntiva pode ser considerada um indicador de conjuntivites alérgicas. A proteína catiônica eosinofílica (ECP), um produto tóxico secretado pelos eosinófilos em atividade, pode servir como um marcador da atividade dos eosinofílica.

Moléculas de adesão de ICAM-1, E-selectina e VCAM-1 são moléculas expressas nas células endoteliais da microvasculatura com a função de fixar leucócitos circulantes nas áreas de inflamação (Bacon et al., 1998; Oh et al., 1999). Essas moléculas de adesão agem tanto na ativação dos eosinófilos quanto na sua migração para o epitélio conjuntival.

A expressão da adesão molecular pode ser modificada por variáveis extracelulares e intracelulares como as citocinas, proteínas da matriz extracelular e infecções virais.

Existe uma significativa correlação entre a expressão do ICAM-1 no epitélio conjuntival com os níveis de ECP encontrados na lágrima. Esse resultado sugere que as células epiteliais da conjuntiva possam sintetizar moléculas de adesão, as quais estão envolvidas na interação com os

eosinófilos durante a inflamação alérgica. A expressão da superfície celular do ICAM-1 é maior na resposta imune, inflamação e ativação mediada pelos eosinófilos (Oh et al., 1999).

As moléculas ICAM-1 aparecem também localizadas nas camadas basais e intermediárias das células do epitélio corneano de pacientes com conjuntivite ocular alérgica crônica, como a ceratoconjuntivite vernal (Gill et al., 1997). A expressão do ICAM-1 no epitélio conjuntival ocorre precocemente (30 minutos após uma estimulação específica). Tempo igual ao da formação do infiltrado inflamatório (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos) (Ciprandi et al., 1993).

O VCAM-1, além de agir no recrutamento de eosinófilos, atua também no recrutamento de células T (Elices et al., 1990). Há também uma correlação entre os níveis de expressão de ICAM e E-selectina, e o grau de infiltração granulocítica e linfocitária (Bezerra, 2000).

Assim, o nível de moléculas de adesão e de seus fatores reguladores são responsáveis pela infiltração das células inflamatórias e colaboram para perpetuar a inflamação nas formas crônicas das doenças oculares alérgicas (Bacon et al., 1998).

As conjuntivites alérgicas, apesar de serem consideradas como doenças de bom prognóstico, podem ter complicações com diferentes graus de morbidade. Bonini e colaboradores (2000), analisando 195 pacientes com ceratoconjuntivite vernal, constataram que 6% dos pacientes tinham cicatrizações corneanas e 2% apresentaram glaucoma induzido por corticóides.

O prejuízo que as conjuntivites alérgicas acarretam tanto para os pacientes quanto aos sistemas de saúde, quer sejam públicos ou privados, justifica os investimentos despendidos para sua compreensão, diagnóstico e futuros tratamentos.

1.6 Modelos Experimentais

Os modelos animais são extremamente importantes para o estudo da fisiopatogenia das doenças humanas. Na conjuntivite alérgica, os modelos experimentais existentes podem variar quanto ao animal utilizado, o alérgeno sensibilizante e a via de sensibilização, entre outros fatores. Existem modelos da doença ocular alérgica em ratos (Allansmith et al., 1989; Trocme et al., 1986), cobaias (Merayo-Llives et al., 1995) e coelhos (Stenback et al., 1992), além dos desenvolvidos em camundongos. Na provocação conjuntival dos animais acima descritos, ou utilizou-se o composto 48/80, que é um degranulador direto dos mastócitos, ou alérgenos como o pólen de ambrosia, ou a ovoalbumina.

Revisamos três modelos de camundongos existentes na literatura. Enquanto em 1996, Li e colaboradores induziram conjuntivite nos animais por meio da aplicação ocular do composto 48/80, Merayo-Llives e colaboradores, em 1996, e Magone e colaboradores, em 1998, utilizaram pólen de Ambrosia. Nessas duas últimas pesquisas, a cepa de camundongo utilizada foi a SWR/J, sendo a sensibilização feita por via tópica e subcutânea, respectivamente.

Escolhemos o camundongo como modelo para indução de conjuntivite alérgica pela facilidade de obtenção e manuseio desses animais, além de existir uma maior quantidade de reagentes para o estudo imunológico em camundongos do que em relação a outros animais. Estudando duas linhagens (C57Bl/6 e BALB/c), avaliaram-se de que maneira fatores genéticos podem interferir na resposta atópica (Rose et al., 1995). Como alérgeno imunizante utilizamos o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* que, conjuntamente com a *Blomia tropicalis*, são os principais agentes etiológicos da conjuntivite alérgica em nosso meio (Negreiros e Filardi, 1975; Rosário Filho, 1992; Giavina-Bianchi Jr et al., 1996). Embora a sensibilização por via tópica simule mais precisamente o que ocorre na doença humana, optamos pela imunização por via subcutânea, que possibilita o estudo de marcadores sistêmicos do processo alérgico, como a produção de anticorpos e a proliferação de linfócitos T sensibilizados. Todos estes fatores levaram à escolha dos camundongos como modelo de doença crônica para avaliação das manifestações clínicas e laboratoriais da conjuntivite alérgica crônica.

2. OBJETIVOS

Desenvolver um modelo murino prático, reprodutível e simulador da doença humana que possibilite o estudo dos mecanismos fisiopatológicos da conjuntivite alérgica crônica e de intervenções que possam vir a modulá-la, visando entender não só o processo patológico ocular, mas também os distúrbios imunológicos causados pela exposição crônica a aeroalérgenos.

Estudar como a resposta alérgica crônica pode ser influenciada pela dose de alérgeno utilizada na imunização e pelas características genéticas do animal imunizado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os camundongos foram imunizados com extrato do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, no intuito de sensibilizar esses animais e posteriormente induzir conjuntivite alérgica através de provocação ocular. Os camundongos foram imunizados no dia 0 e desafiados no dia 10. Vinte minutos após a aplicação ocular do extrato, fez-se a análise clínica, e vinte e quatro horas depois se obteve material para a análise laboratorial (cronograma).

3.1 Animais

Camundongos de ambos os sexos, entre 6 e 12 semanas de vida das linhagens C57Bl/6 e BALB/c foram estudados. Os animais foram obtidos e mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, em condições padronizadas, livre de patógenos específicos e com alimentação padrão *ad libitum*.

3.2 Preparação da Solução para Imunização e Provocação

O extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) foi doado pela IPI-ASAC (Farmácia Imunológica Internacional do Brasil). O material obtido, liofilizado e mantido em geladeira a 4°C, foi pesado e diluído em salina tamponada com fosfato para uma concentração de 4,18 mg/ml no dia da imunização. Após a diluição, retirou-se dessa solução inicial o volume necessário para que os camundongos recebessem 5 µg ou 500 µg do alérgeno. Para efetuar a imunização intraperitoneal (i.p.), a solução de Dpt foi emulsificada em igual volume de hidróxido de alumínio (vide Tabela B).

3.3 Imunização e Provocação dos Animais

Camundongos do grupo-controle receberam apenas uma injeção contendo 100 µl de hidróxido de alumínio e os outros quatro grupos de animais (dois de BALB/c e dois de C57Bl/6) receberam uma das soluções de imunização, respectivamente com 5 ou 500 µg de alérgeno. As soluções foram administradas por via i.p., com seringas de insulina, usando uma agulha “gauge” 23. Quinze dias após a sensibilização, os animais dos grupos experimentais receberam a mesma dose de Dpt emulsificado em hidróxido de alumínio pela via subcutânea na base da cauda e nas duas coxas. Animais controle receberam nos mesmos sítios a injeção de apenas hidróxido de alumínio. A cada quinze dias após esta última injeção, todos os animais, incluindo os controles, sofreram um desafio com duas gotas da solução de 4,18 mg/ml de Dpt aplicadas em cada olho. Este desafio foi repetido entre 3 a 7 vezes, sempre com um intervalo de, pelo menos, 15 dias entre os desafios com intuito de induzir a doença crônica nos animais (Tabela B).

Tabela B: Solução de imunização dos camundongos

Solução de Imunização	Volume da Solução Inicial	Volume de Al(OH) ³	Volume de Salina	Volume Final	Quantidade de Alérgeno
1	1,2 µl	100 µl	118,8 µl	220 µl	5 µg
3	120 µl	100 µl	---	220 µl	500 µg

3.4 Avaliação Clínica e Histopatológica

Vinte minutos após cada desafio, os camundongos foram examinados para constatar clinicamente a ocorrência ou não de reação conjuntival ao desafio alergênico. Observaram-se quatro sinais clínicos:

1. Edema de conjuntiva
2. Hiperemia de conjuntiva
3. Edema de pálpebra
4. Lacrimejamento ou secreção ocular.

Utilizamos uma graduação de 0 a 3 cruzes para cada sinal, adaptando-se uma tabela de gradação desenvolvida por Ballas e colaboradores, em 1993 (Tabela C). Portanto, cada animal recebeu uma gradação clínica total de 0 a 12 cruzes, proporcional à intensidade da conjuntivite. As gradações finais foram incorporadas e analisadas em conjunto com a gradação histopatológico (vide Tabela C).

Tabela C: Gradação clínica dos camundongos após a imunização

Sinal Clínico	Ausente 0 +	Leve 1 +	Moderado 2 +	Grave 3 +
Edema de Conjuntiva (Quemose)	Ausente	Leve, áreas focais	Moderado; Nítido	Grave
Hiperemia de Conjuntiva	Ausente	Leve, mas facilmente detectável	Moderada; Nítida	Grave; Difusa
Edema de Pálpebra	Ausente	Leve, mas facilmente detectável	Moderado; Nítido	Grave; Impossibilidade de abertura ocular
Lacrimejamento e Secreção	Ausente	Presença de Filamentos ou Placas de muco	Moderado; Nítido	Grave

O exame histopatológico dos espécimes foi realizado por uma oftalmologista com treinamento em patologia ocular de forma mascarada. Os olhos dos camundongos foram enucleados com a conjuntiva intacta, fixados por 30 minutos em glutaraldeído a 4% e depois transferidos para formaldeído a 4%, onde permaneceram por pelo menos 24 horas. Após a secção dos mesmos, foi feita uma embebição em parafina, através do plano ventral na região central. Retiraram-se 5 cortes de 4 a 6 µm de espessura de cada córnea e conjuntiva, e usando os corantes Giemsa, ácido periódico de Schiff e hematoxilina e eosina, foi avaliado o infiltrado inflamatório, presença de degenerações (perda de tipos celulares, fibrose), presença de ulcerações e afinamento do limbo.

3.5 Avaliação Laboratorial

Vinte e quatro horas após o desafio, os camundongos, já anestesiados, com uma combinação de rompum/ketamina (50 e 30 mg/ml, respectivamente), foram submetidos à punção cardíaca para obtenção de sangue. Posteriormente, ainda sob o efeito da anestesia, os animais foram sacrificados com CO₂ produzido em uma câmara de gelo seco. Foi realizada a dissecação dos linfonodos ilíacos e paraaórticos, e a enucleação dos olhos. O plasma obtido pela punção cardíaca foi utilizado para a dosagem das imunoglobulinas IgE e IgG Totais e Específicas para Dpt. As células obtidas dos linfonodos foram usadas para a realização dos testes de proliferação linfocitária específicas para Dpt e os controles apropriados, com dosagem das citocinas no sobrenadante de cultura. Os espécimes enucleados para

realização do estudo anatomopatológico da conjuntiva e córnea foram processados como descrito acima, colocados em lâminas para avaliação microscópica e enviados para análise.

3.5.1 Detecção de anticorpos IgE e IgG Totais e Específicas para Dpt.

A determinação dos níveis de anticorpos IgE e IgG totais e específicos para Dpt foi realizada pelo método de ELISA. Utilizaram-se placas de microtitulação de 96 poços, às quais se fixaram anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongos anti-IgE ou anti-IgG (de acordo com o teste a ser realizado), na concentração de 1,5 µg/ml (anti-IgE da Pharmingen, La Jolla, CA, EUA), e 1,0 µg/ml anti-IgG1 da Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EUA). As placas foram bloqueadas com solução salina tamponada com fosfato, contendo 0,5% de albumina sérica bovina ao pH 7,4. Posteriormente, acrescentaram-se as amostras de soro e os controles padronizados, deixando as placas incubarem durante toda a noite. Anticorpos monoclonais anti-IgE (Pharmingen) e anti-IgG (Southern Biotech) conjugados com peroxidase de raiz forte (HRPO) foram usados na revelação. As concentrações totais de IgE e IgG foram estimadas por comparação com curvas padronizadas, construídas pela adição de anticorpos policlonais estandarizados tipo IgE (Pharmingen) e IgG (Southern Biotech) aos poços descritos anteriormente.

Na detecção de IgE Específica contra Dpt, placas contendo anticorpos anti-IgE de camundongo foram bloqueadas com albumina sérica bovina e incubadas por 12 horas a 4°C com os soros ou padrões de IgE (Pharmingen).

Após três lavagens com solução tamponada, contendo Tween (conservante) 2,0 a 2,5%, acrescentou-se aos poços extrato de Dpt (4,18 mg/ml) biotinilado. A biotinação do preparado de Dpt foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (*Kit* NHS-SS-Biotin, Pierce, ILLINOIS, EUA). Após nova incubação por 12 horas a 4°C, os poços foram lavados e receberam estreptavidina conjugada (Southern Biotech).

Para a detecção de IgG Específica contra Dpt, os soros foram adicionados a placas cobertas com extrato de Dpt a 5 mg/ml. Antes da adição dos soros, estes foram absorvidos por três vezes em placas contendo anti-IgM e IgA, para remoção desses anticorpos. Após a incubação noturna, os poços foram lavados e adicionamos anticorpos anti-IgG de camundongos conjugados com HRPO. Os resultados obtidos foram comparados com amostras com padrões de IgG murino.

Em todos os experimentos, após o término das reações e a adição de o-fenildiamina (Sigma Chemical Co.), para revelação, e H₂SO₄ para estancar a reação enzimática. As placas foram “lidas” em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, CA, EUA), a 490 nm como comprimento de onda. Os resultados foram analisados por meio do *software* SoftmaxPro™ para computadores Apple.

3.5.2 Experimento de proliferação de linfócitos específicos para Dpt

Uma solução de células obtida dos linfonodos drenantes dos sítios das imunizações subcutâneas foi cultivada em microplacas sob o estímulo do extrato de Dpt a 30 mg/ml, sem receber estímulo (controle negativo), ou estimuladas com o mitógeno Concanvalina A (ConA) a 2,5 mg/ml (controle

positivo). Mantendo-se uma concentração de 3×10^6 células/ml, com um volume final por poço de 0,2 ml, em meio DMEM, suplementado com 25 mM de tampão HEPES, 2mM de L-glutamina, 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol e HL-1 (Hycor Biomedical Inc., Irvine, CA, EUA). As células foram cultivadas por 90 horas, sendo que, durante as últimas 16 horas, estas foram “pulsadas” com timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) ($0,5 \mu\text{Ci}/10 \mu\text{l/poço}$). A incorporação de radioatividade foi medida em cpm por técnica padronizada de cintilação líquida por um contador de cintilação beta (Wallac Inc., Turku, Finland). Os experimentos foram todos realizados em triplicata. Pela comparação da proliferação das células estimuladas com Dpt e das células-controle calculou-se o índice de estimulação, dividindo-se a média das três culturas estimuladas com antígeno pela média das três culturas de células não estimuladas. Considerou-se positivo um índice maior ou igual a três.

3.5.3 Detecção das citocinas produzidas pelos linfócitos estimulados em cultura

Nas culturas de linfócitos para dosagens de citocinas no sobrenadante, utilizou-se um meio com pequenas diferenças em relação ao meio descrito acima: meio DMEM, suplementado com 25 mM de tampão HEPES, 2 mM de L-glutamina, 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml de sulfato de gentamicina e 0,5% de soro fresco de camundongo (Hycor Biomedical Inc., Irvine, CA). O sobrenadante foi colhido após 48 horas do início da cultura, e os níveis de citocinas foram medidos pelo método de ELISA. Nessa dosagem usaram-se pares de anticorpos, e as concentrações em pg/ml calculadas por comparação com curvas-padrões estabelecidas com citocinas recombinantes (Pharmingen, La Jolla, CA, EUA).

3.6 Análise estatística

Para compararmos possíveis diferenças entre as dosagens para cada variável previamente definida tanto do grupo BALB/c quanto do grupo C57Bl/6, usamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

O nível de rejeição para hipótese de nulidade foi fixado sempre em um valor menor ou igual a 0,05% (5%), considerando-se, em alguns casos, testes monocaudais.

Quando a análise estatística resultou significativa colocamos um asterisco (*) para este resultado; no caso contrário, usamos N.S. (não significativa).

As médias da maioria dos parâmetros medidos foram calculadas e apresentadas a título de informação.

A análise estatística dos resultados de observação histológica necessitou do cálculo de desvio-padrão pelos índices variáveis de leitura encontrados, para o qual usou-se teste paramétrico do Qui-quadrado.

4. RESULTADOS

4.1 Gradação Clínica e Histopatológica

Utilizando-se como alérgeno um extrato comercial de *Dermathophagoides pteronyssinus* (Dpt), conseguiu-se induzir conjuntivite alérgica crônica nos camundongos de duas linhagens isogênicas (BALB/c e C57Bl/6) com diferentes conhecimentos genéticos. A dose ideal para sensibilização foi de 5 µg para a linhagem C57Bl/6 e de 500 µg para os da linhagem BALB/c (Tabela 2).

A análise estatística dos dados revelou que, nos camundongos da linhagem C57Bl/6, a gradação da doença foi significativa apenas quando considerado o teste monocaudal, enquanto nos da linhagem BALB/c o teste bicaudal se mostrou estatisticamente significativo.

Os animais não imunizados não mostraram alterações na gradação clínica e histopatológica, não havendo necessidade de cálculos estatísticos (Tabela 1B).

Tabela 1A: Tabela descritiva das médias das gradações clínicas e histopatológicas da conjuntivite alérgica crônica induzida nos camundongos

Grupo	BALB/c 5 µg	BALB/c 500 µg	C57Bl/6 5 µg	C57Bl/6 500 µg
N	10	10	10	10
Média	0,7	3,8	2,4	1,5

Tabela 1B: Tabela descritiva das médias das gradações clínicas e histopatológicas da conjuntivite alérgica crônica nos camundongos não sensibilizados com Dpt

Grupo	BALB/c	C57Bl/6
N	0	0
Média	0	0

Tabela 2: Gradações clínicas e histopatológicas da conjuntivite alérgica crônica induzida nos camundongos

	Gradação C57Bl/6	Gradação BALB/c
Z calculado	-1,699*	-3,854*
Asymp. Sig. (bicaudal)	0,89	0,003

*= $p < 0,05$ – em comparação com animais que sofreram apenas a provocação antigênica na conjuntiva, mas que não foram imunizados com o extrato de Dpt.

4.2 Dosagem de IgE Total e Específica

Sabe-se que a Imunoglobulina E (IgE) é a principal responsável pela resposta antígeno-específica nas reações de hipersensibilidade do tipo I, como as conjuntivites alérgicas, por exemplo. Conseqüentemente, realizamos a dosagem desta classe de anticorpos, a qual revelou que a IgE Total e a IgE Específica para Dpt, apresentavam maiores concentrações nos camundongos BALB/c imunizados com 500 µg em relação aos imunizados com 5 µg, sendo essa diferença estaticamente significativa. De outra forma, nos camundongos C57Bl/6, também ocorreram diferenças estaticamente significantes tanto para IgE Total quanto para IgE Específica, só que, nesse caso, as maiores concentrações foram observadas nos camundongos que receberam 5 µg de Dpt.

Comparando os animais das duas linhagens, nota-se que as maiores médias das concentrações sanguíneas médias de IgE Total e de IgE Específica foram detectadas nos camundongos BALB/c na concentração mais alta de imunógeno usada (500 µg). Entretanto, este quadro se inverte na menor concentração de Dpt (Tabela 3). Sendo que as diferenças em ambas as concentrações de antígeno alcançaram significância estatística (Tabela 4).

Tabela 3: Tabela descritiva das médias das variáveis IgE Total e Específica

Grupo	BALB/c 5µg	BALB/c 500µg	C57Bl/6 5µg	C57Bl/6 500µg
N IgE Específica	10	10	10	10
Média IgE Específica	380,9	821,7	610,2	182,6
N IgE Total	10	10	10	10
Média IgE Total	319,3	3207,7	1606,2	359,9

Tabela 4: Dosagem das variáveis IgE Total e Específica

	IgE BALB/c	IgE Total BALB/c	IgE Específica C57Bl/6	IgE Específica C57Bl/6
Z calculado	-2,117*	-3,780*	-3,099*	-3,780*
Asymp. Sig. (bicaudal)	0,034	0,000	0,002	0,000

*= p < 0,05

4.3 Proliferação de Linfócitos Específica para Dpt

A presença de células T alérgeno-específicas é um marcador fundamental das hipersensibilidades do tipo I. Em nosso modelo houve proliferação de linfócitos estatisticamente significativa nos camundongos imunizados com Dpt quando comparamos os grupos que receberam 5 µg e 500 µg nos camundongos BALB/c (Tabelas 5 e 6). É preciso notar que não ocorreu uma diferença significativa neste parâmetro imunológico nos dois grupos imunizados da linhagem C57Bl/6 (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5: Tabela descritiva das médias da Proliferação Linfocítica Específica para Dpt

Grupo	BALB/c 5µg	BALB/c 500µg	C57Bl/6 5µg	C57Bl/6 500µg
N	10	10	10	10
Média	9,1	5,7	4,6	3,6

Tabela 6: Proliferação Linfocítica Específica para Dpt

	Prol. DPT BALB/c	Prol. DPT C57Bl/6
Z calculado	-2,655*	-1,328 ^{N.S}
Asymp. Sig. (bicaudal)	0,008	0,184

*= p < 0, 05

4.4 Dosagem de IgG Total e Específica

As dosagens das concentrações sanguíneas de IgG Específica foram estatisticamente significantes para os grupos que foram imunizados com 5 µg e 500 µg, tanto para os camundongos da linhagem BALB/c quanto para os camundongos da linhagem C57Bl/6.

Nesse caso, porém, os camundongos da linhagem C57Bl/6 que apresentaram os maiores valores de IgG Específica foram aqueles que receberam as maiores concentrações de Dpt. O contrário ocorreu com os camundongos da linhagem BALB/c, nos quais os maiores valores apareceram com as menores concentrações (Tabelas 7 e 8).

Em relação às dosagens de IgG Total, estas não se mostraram estatisticamente significantes para as duas linhagens de camundongos estudadas (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7: Tabela descritiva das médias variáveis IgG Total e Específica

Grupo	BALB/c 5µg	BALB/c 500µg	C57Bl/6 5µg	C57Bl/6 500µg
N IgG Específica	10	10	10	10
Média IgG Específica	3.681,0	1.818,9	2.161,3	6.971,2
N IgG Total	10	10	10	10
Média IgG Total	319,3	3.207,7	507.026,6	492.528,1

Tabela 8: Dosagem das variáveis IgG Total e Específica

	IgG Específica BALB/c	IgG Total BALB/c	IgG Específica C57Bl/6	IgG Específica C57Bl/6
Z calculado	-2,948*	-0,378 ^{N.S}	-3,780*	-1,587 ^{N.S}
Asymp. Sig. (bicaudal)	0,003	0,705	0,000	0,112

*= $p < 0,05$

4.5 Citocinas produzidas pelos linfócitos aos estímulos com Dpt

Verificou-se, nos estudos da IL-5, IL-8 e IL-13, uma relação inversamente proporcional na linhagem C57Bl/6, com maior produção dessas citocinas nos camundongos sensibilizados com a menor dose de Dpt (5 µg), enquanto o inverso foi constatado na linhagem BALB/c, com maior produção nos animais imunizados com 500 µg (Tabelas 9,10,11,12,13 e 14).

Os níveis de IL-4 e IL-10 mostraram uma diferença significativa no animais da linhagem BALB/c, nos quais as maiores concentrações apareceram nos animais imunizados com 500 µg. Nos camundongos imunizados da linhagem C57Bl/6, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre aqueles que foram sensibilizados com 5 µg e 500 µg (Tabelas 15,16,17 e 18).

Na análise das concentrações de IFN-γ, observou-se que, nos animais sensibilizados da linhagem C57Bl/6, aqueles que receberam as menores quantidades de antígeno foram os que tiveram as maiores concentrações de IFN-γ. Nos camundongos BALB/c, o fenômeno foi o inverso, mas nesse caso, só se considerou a diferença estaticamente significativa entre os animais sensibilizados com 5 µg e 500 µg, quando o teste foi considerado monocaudal (Tabelas 19 e 20).

Tabela 9: Tabela descritiva das médias da produção de IL-5 na cultura de células

Grupo	BALB/c 5µg	BALB/c 500µg	C57Bl/6 5µg	C57Bl/6 500µg
N	8	9	10	10
Média	517,5	1.134,4	1.139,4	206,8

Tabela 10: Produção de IL-5 na cultura de células

	IL-5 BALB/c	IL-5 C57Bl/6
Z calculado	-3,272*	-3,781*
Asymp. Sig. (bicaudal)	0,001	0,000

*= $p < 0,05$

Tabela 11: Tabela descritiva das médias da produção de IL-8 na cultura de células

Grupo	BALB/c 5µg	BALB/c 500µg	C57Bl/6 5µg	C57Bl/6 500µg
N	9	10	9	10
Média	428,2	146,5	315,4	215,1

Tabela 12: Produção de IL-8 na cultura de células

	IL-8 BALB/c	IL-8 C57Bl/6
Z calculado	-3,674*	-3,146*
Asymp. Sig. (bicaudal)	0,000	0,002

*= $p < 0,05$

Tabela 13: Tabela descritiva das médias da produção de IL-13 na cultura de células

Grupo	BALB/c 5µg	BALB/c 500µg	C57Bl/6 5µg	C57Bl/6 500µg
N	10	10	10	10
Média	129,5	253,3	101,4	26,4

Tabela 14: Produção de IL-13 na cultura de células

	IL-13 BALB/c	IL-13 C57Bl/6
Z calculado	-3,556*	-3,780*
Asymp. Sig. (bicaudal)	0,000	0,000

*= $p < 0,05$

Tabela 15: Tabela descritiva das médias da produção de IL-4 na cultura de células

Grupo	BALB/c 5µg	BALB/c 500µg	C57Bl/6 5µg	C57Bl/6 500µg
N	10	10	10	9
Média	345,7	524,9	223,5	174,4

Tabela 16: Produção de IL-4 na cultura de células

	IL-4 BALB/c	IL-4 C57Bl/6
Z calculado	-3,024*	-0,817 ^{N.S}
Asymp. Sig. (bicaudal)	0,002	0,414

*= p < 0, 05

Tabela 17: Tabela descritiva das médias da produção de IL-10 na cultura de células

Grupo	BALB/c 5µg	BALB/c 500µg	C57Bl/6 5µg	C57Bl/6 500µg
N	5	5	5	5
Média	995,0	162,6	356,8	289,0

Tabela 18: Produção de IL-10 na cultura de células

	IL-10 BALB/c	IL-10 C57Bl/6
Z calculado	-2,611*	-0,104 ^{N.S}
Asymp. Sig. (bicaudal)	0,009	0,917

*= p < 0, 05

Tabela 19: Tabela descritiva das médias da produção de IFN- γ na cultura de células

Grupo	BALB/c 5 μ g	BALB/c 500 μ g	C57Bl/6 5 μ g	C57Bl/6 500 μ g
N	10	10	10	10
Média	52,0	200,3	248,9	476,5

Tabela 20: Produção de IFN- γ na cultura de células

	IFN- γ BALB/c	IFN- γ C57Bl/6
Z calculado	-1,814*	-3,780*
Asymp. Sig. (bicaudal)	0,70	0,000

*= p < 0, 05

4.6 Alterações anatomopatológicas na conjuntivite alérgica crônica

No estudo anatomopatológico, os camundongos submetidos à provocação crônica apresentaram: hiperemia e edema conjuntivais, edema de pálpebra e secreção ocular. Contudo, à medida que as sensibilizações continuavam, foi observado um aumento do processo inflamatório descrito

anteriormente nos camundongos, bem como outros envolvimento corneanos e conjuntivais: afilamento corneano, infiltrado linfocítico corneano e conjuntival, degeneração da conjuntiva e úlceras de córnea.

Analisando o material retirado da córnea e da conjuntiva dos camundongos, evidenciou-se que as patologias corneanas e conjuntivais observadas ocorriam predominantemente nos camundongos da linhagem BALB/c que receberam as maiores concentrações de antígeno (500 µg) e nos camundongos da linhagem C57Bl/6 que receberam as menores concentrações do antígeno (5 µg).

Nas outras variáveis (afilamento corneano, infiltração linfocitária na córnea, infiltração linfocitária na conjuntiva, úlcera) não há necessidade de cálculo por comparar grupos em que ocorreram alterações com grupos nos quais a alteração foi nula, não se justificando, portanto, a realização de testes estatísticos para se comprovar as diferenças significantes entre os grupos avaliados. Apenas na avaliação da degeneração conjuntival dos camundongos da linhagem C57Bl/6, observou-se uma diferença entre os dois grupos que receberam as diferentes doses de antígeno. Logo, houve a necessidade de cálculo dessa diferença pelo Teste do Qui-quadrado, quando se obteve uma diferença estatisticamente significativa. Na avaliação da degeneração conjuntival dos camundongos da linhagem BALB/c, as diferenças entre os dois grupos, conforme explicado acima, também não necessita de análise por método estatístico, pois um dos grupos teve um número de ocorrências igual a zero.

Tabela 21: Alterações anatomopatológicas na conjuntivite alérgica crônica

Grupo	Afilamento corneano	Infiltração linfocitária na córnea	Infiltração linfocitária na conjuntiva	Degeneração da conjuntiva	Úlcera
BALB/c 500µg	15/100	28/100	15/100	30/100	54/100
C57Bl/6 500µg	0/100	0/100	0/100	3/100	0/100
BALB/c 5µg	0/100	0/100	0/100	0/100	0/100
C57Bl/6 5µg	27/100	39/100	21/100	56/100	61/100

Tabela 22: Degenerações conjuntivais na conjuntivite alérgica crônica na linhagem C57Bl/6

	C57Bl/6
X ² calculado (Yates)	65,008*
	p<0,0001

*= p < 0,05

A figura 1 apresenta um exemplo da infiltração linfocitária encontrada na córnea dos camundongos cronicamente estimulados com antígenos do *Dermathophagoides pteronyssinus* (seta). A figura mostra ainda a formação de uma lesão descamativa do epitélio da córnea e uma degeneração subjacente do tecido corneano na região que correspondia à área onde se observou a formação de uma úlcera neste animal. Observa-se também a formação de dois pseudo-folículos linfóides com infiltração de somente um tipo de linfócito, provavelmente T. É interessante notar que este tipo de lesão foi observada apenas nos camundongos da linhagem C57Bl/6.

Figura 1. Coloração de hematoxilina e eosina, aumento de 100 x. Intensa infiltração linfocitária, desepitelização da córnea, deposição de material fibroso nas áreas adjacentes à desepitelização. Podemos observar também a formação de um pseudofolículo linfóide.

Outra alteração observada nestes camundongos foi o aparecimento de neovasos sob o epitélio da córnea. A figura 2 ilustra esta circunstância (seta). Também podemos observar que há uma alteração significativa da distribuição epitelial. Em adição a isso, há uma distorção da distribuição de fibras na camada que recobre a câmara anterior. A formação de neovasos foi vista quase que exclusivamente em camundongos da linhagem BALB/c.

Figura 2- Coloração de hematoxilina e eosina, aumento de 400 x. Formação de neovasos caracterizados pelo endotélio baixo observados em vasos de magnitude moderada.

Uma outra lesão característica da estimulação crônica dos animais com antígenos do ácaro foi o afilamento da conjuntiva limbar (Figura 3). Este tipo de alteração histológica esteve presente em um grande número de camundongos de ambas as linhagens estudadas.

Figura 3. O painel da esquerda mostra a região limbar da conjuntiva de um camundongo normal. O painel da direita mostra o afilamento e modificação da celularidade decorrente da conjuntivite crônica induzida nestes camundongos pelo contato com o Dpt (seta).

As alterações clínicas caracterizadas por prurido, lacrimejamento, exsudação de líquido rico em proteínas, quemose e edema bipalpebral foram observadas em ambas as linhagens de animais estudados. Na Figura 4 apresentamos uma fotografia representativa do que ocorre com camundongos C57Bl/6, entretanto, os mesmos sinais foram observados em camundongos BALB/c. O painel A mostra o olho de um animal normal, enquanto os painéis B e C mostram o resultado da provocação com Dpt através da instilação ocular dos alérgenos em animais que haviam sido imunizados sistemicamente com este antígeno. O Painel B mostra o resultado após uma provocação e o painel C, o resultado após 6 provocações.

Figura 4. Sinais clínicos de ceratoconjuntivite. Painel A, camundongo normal. Painel B, fase aguda da ceratoconjuntivite com opacidade corneana e lacrimejamento (seta branca). Painel C, camundongo com ceratoconjuntivite crônica, a seta branca aponta para o edema palpebral inferior, a seta azul para a quemose conjuntival e a seta amarela para a presença de secreção opaca contendo proteínas.

As alterações na celularidade da conjuntiva foram comuns em ambas as linhagens de camundongos estudadas. Na figura 5 abaixo apresentamos uma conjuntiva normal (painel da esquerda) de um camundongo não imunizado. No painel da direita, observamos o aumento de celularidade e desorganização da anatomia normal, achados freqüentes nos animais com doença crônica. Aqui é importante notar que estes achados também foram encontrados nos animais com ceratoconjuntivite aguda.

Figura 5. Painel A, anatomia normal da conjuntiva. Painel B, lesões observadas em animais com ceratoconjuntivite crônica. A seta amarela aponta para desestruturação do epitélio, com aumento do número de células na camada externa (seta branca).

5. DISCUSSÃO

A alergia ocular abrange um amplo espectro de doenças oftalmológicas, podendo envolver a córnea e a conjuntiva e produzir, conseqüentemente, redução na acuidade visual (ceratoconjuntivite vernal e, especialmente, a ceratoconjuntivite atópica). A conjuntivite sazonal, apesar de ser a forma mais freqüente da conjuntivite alérgica, ainda não é totalmente compreendida. Entretanto, as formas crônicas de alergia ocular são pouco compreendidas e subseqüentemente pouco controláveis.

Nos últimos anos, houve um grande esforço em elucidar mais claramente a etiopatogenia da inflamação alérgica, baseada principalmente na compreensão do papel dos linfócitos T, mastócitos e eosinófilos e das citocinas secretadas.

Os modelos animais são essenciais para a melhor compreensão da etiopatogenia das doenças humanas, servindo também de ferramenta no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas e no aperfeiçoamento das existentes. Existe uma alta prevalência das doenças oculares alérgicas, estimando-se que 20% da população apresentem algum tipo de alergia ocular (Friedlaender, 1993). Os efeitos colaterais provocados por drogas como os esteróides tópicos são algumas das razões pelas quais o desenvolvimento de modelos animais é importante, outro motivo seria o de permitir os estudos de mecanismos fisiopatológicos da doença alérgica. Nosso grupo está empenhado neste tipo de trabalho desde 1998, quando foi desenvolvido um modelo de conjuntivite alérgica a pólen (Magone et al., 1998). Em 2004, descrevemos um modelo de conjuntivite alérgica aguda induzida por antígenos de ácaro (Giavina-Bianchi et al., 2004). Na presente

tese nós buscamos modificar este modelo e transformá-lo em um modelo de ceratoconjuntivite crônica, por meio da manutenção da inflamação com provocações periódicas de alérgeno instilado diretamente sobre o olho em duas linhagens susceptíveis de camundongos.

Os animais mais freqüentemente usados como modelos experimentais de alergia ocular são ratos (Iso et al., 1980), cobaias (Ovary et al., 1963) e, mais recentemente, camundongos (Magone et al., 2000). Os estudos em ratos foram praticamente abandonados devido à presença de sua estrutura conjuntival peculiar, uma barreira forte e espessa, na qual os antígenos de alto peso molecular não podem penetrar (Kahn et al., 1990). As cobaias são ainda muito usadas por terem uma conjuntiva similar à humana. E, apesar de possuírem olhos grandes o bastante para permitir uma adequada avaliação dos sinais clínicos de alergia, apresentam reações imunológicas muito específicas para sua espécie. Infelizmente, a escassez de reagentes de laboratório para o estudo da resposta imune nestes animais dificulta os estudos dos mecanismos imunológicos envolvidos no desencadeamento e manutenção do processo alérgico. Os camundongos não foram utilizados como modelos de conjuntivite alérgica até 1996 (Merayo-Llones et al., 1996), apesar de serem os animais de escolha para estudar a maior parte das doenças de cunho imunológico. Os camundongos oferecem, como vantagem, uma grande variedade de reagentes imunológicos disponíveis comercialmente, além da possibilidade de se poder manipular seu sistema imune para gerar espécimes geneticamente predispostos aos fatores de alergia, sem contar o fato de serem animais baratos e de manutenção

relativamente simples. Já a principal desvantagem do modelo de alergia ocular em camundongo deve-se ao tamanho diminuto de seus olhos, o que dificulta a avaliação clínica, bem como estudos de topografia e biomicroscopia ocular, pela falta de aparelhos adaptados para este fim, além, é claro, de ausência de parâmetros bem definidos de normalidade nestes animais.

A grande maioria dos modelos experimentais disponíveis são de conjuntivite alérgica aguda, sejam induzidos por antígenos classicamente descritos como alergizantes como os pólenes (Magone et al., 1998), por antígenos comuns (Khatami et al., 1984), ou por complexos químicos que levam à degranulação de mastócitos (Allansmith et al., 1989). Até o presente momento, não existem modelos crônicos de alergia ocular descritos detalhadamente na literatura científica. Em geral, os modelos são caracterizados por um cronograma comum, com uma primeira dose do antígeno, seguido de uma segunda dose alguns dias após (normalmente entre 7 a 15 dias) (Calonge et al., 2003). Entretanto, esses experimentos são mais eficientes para a compreensão da fase tardia das reações de hipersensibilidade do tipo I no olho do que propriamente para o estudo das alergias crônicas. Os animais de experimentação oferecem também a possibilidade de uma análise histológica das conjuntivas, córneas e pálpebras em tempos diferentes, o que permite estudar a evolução da patologia alérgica. Os modelos animais são também úteis no estudo da imunogênese da lesão na córnea e conjuntiva e servem para a compreensão e testes de novas terapêuticas para a alergia ocular (Freitas et al., 2000).

Em contraste com o modelo relativamente mais simples de degranulação mastocitária seguida pela infiltração eosinofílica dos casos de alergia ocular aguda, a fase crônica da ceratoconjuntivite alérgica é constituída por uma série de eventos imunológicos complexos que passam pela interação celular entre linfócitos T, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, células do endotélio vascular da córnea e conjuntiva. Essas células interagem com mediadores solúveis diversos como citocinas e derivados da via do ácido aracdônico, e também com moléculas de superfície nos tipos celulares envolvidos, como integrinas e selectinas. Esta rede de conexões resulta num processo inflamatório de longa duração, o qual pode provocar ativação dos fibroblastos, proliferação e cicatrização tecidual (Bonini et al., 1999).

Neste estudo, obtivemos com sucesso um modelo crônico para ceratoconjuntivite alérgica, utilizando camundongos das linhagens C57Bl/6 e BALB/c, previamente caracterizados como sensíveis ao desenvolvimento de ceratoconjuntivite aguda pelo *Dematophagoides pteronyssinus* (Giavina-Bianchi et al., 2004). O modelo murino de conjuntivite alérgica apresenta semelhanças com os descritos na literatura para conjuntivite aguda e possui a vantagem de poder utilizar-se de um dos principais alérgenos das doenças alérgicas brasileiras (*Dermatophagoide pteronyssinus*). Soma-se a isso o fato de possibilitar a avaliação da reação alérgica crônica, após uma exposição antigênica repetida.

Utilizamos essas duas linhagens isogênicas de camundongos, uma vez que elas apresentam perfis imunológicos distintos, permitindo, assim, a melhor dissecação do papel da resposta imune na patologia alérgica. Os camundongos BALB/c têm perfil basal tipo Th2 de resposta imune, com alta

produção de IL-4, IL-5, IL-8, IL-10 e IL-13. Enquanto os camundongos da linhagem C57Bl/6 apresentam uma resposta mais Th1, com produção de IFN- γ . Essa diferença é extremamente relevante, devido à heterogeneidade das células CD4⁺ efetores, que podem ser subdivididos em dois subtipos principais: as células Th1, que são importantes na ativação de macrófagos e na indução da imunidade celular, e as células Th2 que são responsáveis pelas doenças alérgicas como resultado da produção exagerada de citocinas. As células Th2, após reconhecerem o alérgeno, produzem citocinas, principalmente IL-4, IL-5, IL10 e IL-13, que vão induzir uma resposta caracterizada pela síntese de IgE, ativação de células B2, crescimento e proliferação de mastócitos, acúmulo de eosinófilos e aumento na produção de muco (Bonini et al., 2003). Logo, as células Th2 representariam uma resposta inadequada aos antígenos ambientais, amplificariam e prolongariam a inflamação alérgica (Umetsu e DeKruyff, 1997). Desta forma, seria de se esperar que apenas os camundongos BALB/c desenvolvessem ceratoconjuntivite alérgica. Entretanto, observamos que ambas as linhagens desenvolvem doença, o que indica que qualquer indivíduo pode responder com a produção de IgE para um antígeno desde que as condições “ideais” para este indivíduo sejam encontradas.

Existem diferenças nas expressões das citocinas provenientes das células T nas diferentes enfermidades alérgicas crônicas oculares. Como exemplo, normalmente ocorre uma grande produção de IL-4 e IL-5 pelas células T conjuntivais na conjuntivite papilar gigante, seguindo um padrão Th2. Nos casos de ceratoconjuntivite atópica, as células T conjuntivais apresentam um padrão diferente, com uma menor produção de IL-4 e IL-5 e

uma maior produção de IFN- γ , na qual pode existir uma mistura de células Th1 e Th2 com uma provável predominância de Th1 (Metz et al., 1997; Calder et al., 1999). Essa diferença nos padrões das citocinas ajuda a explicar as diversas manifestações das conjuntivites alérgicas.

As citocinas podem ser usadas como marcadores do processo inflamatório alérgico. E nesses casos, a possibilidade de medir múltiplas citocinas, combinados com os efeitos dessas nas várias células conjuntivais (mastócitos, células epiteliais e fibroblastos), bem como nas células corneanas (principalmente na camada epitelial), facilitaria, então, uma melhor avaliação do processo específico da inflamação alérgica (Cook, 2004).

O quadro inflamatório que foi constatado nos olhos dos camundongos sensibilizados é resultado de uma resposta imune específica, já que apenas animais imunizados apresentaram doença ocular (Tabela 1B).

O alérgeno, antes de ser absorvido pela conjuntiva, pode ser apresentado ao sistema imune na mucosa própria, no linfonodo de drenagem, ou mais raramente na circulação sanguínea e, assim, ter sua apresentação no baço. Segundo o trabalho de Leonardi e colaboradores (1993a), a conjuntiva pode ser o único órgão-alvo sensibilizado em pacientes alérgicos, com ausência de manifestações sistêmicas. Porém, na prática clínica, o alérgeno entra em contato com o organismo por diversas vias (mucosas respiratórias, conjuntivas, mucosa digestiva, pele lesada). Estas condições não foram observadas neste estudo, pois efetuamos apenas o desafio alergênico na conjuntiva nestes animais, e, portanto, não sabemos se a sensibilização sistêmica seria também efetiva para induzir, por exemplo, broncoespasmo.

Normalmente, a rota eleita para imunização ativa é sistêmica (intravenosa, intraperitoneal, intramuscular) e, menos freqüentemente, outras rotas, como a intradérmica, intravítrea ou tópica têm sido usadas (Khatami et al., 1985).

No estudo realizado, optou-se pela via subcutânea e intraperitoneal de sensibilização sistêmica, juntamente com a via tópica para o desafio, o que assegura uma resposta imune sistêmica e local, facilitando o estudo da fisiopatogenia da reação alérgica (Figuras 4A, 4B, 4C e Tabelas 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 mostrando proliferação linfocítica, citocinas e anticorpos específicos). Caso contrário, seria necessária a realização de experimentos na própria conjuntiva e nas estruturas a ela relacionadas, como na lágrima e nos linfonodos de drenagem dos olhos.

Por intermédio da indução da reação alérgica, avaliaram-se os primeiros sinais clínicos das conjuntivites alérgicas (hiperemia e quemose conjuntival). Estes sinais clínicos também puderam ser analisados segundo escalas standardizadas, como as usadas no presente estudo, proporcionando uma melhor graduação e entendimento dos sintomas oculares (Abelson e Loeffler, 2003).

Clinicamente, observou-se que os camundongos esfregavam os olhos (até cerca de dez minutos após o contato com o antígeno) e apresentavam hiperemia conjuntival, secreção ocular e edema palpebral e conjuntival, os quais correspondem à fase imediata do processo alérgico, semelhante ao descrito no ser humano (Friedlaender, 1993). Histologicamente, esta reação é compatível com a degranulação dos

mastócitos, na qual o pico de ação ocorre após três horas da sensibilização. Esta reação mimetiza a doença humana, sendo englobada na reação de hipersensibilidade tipo I (Giavina-Bianchi et al., 2004).

Os linfócitos T desempenham um importante papel no processo de sensibilização e regulação da alergia ocular. Um grande número de fatores pode influenciar na direção da diferenciação das células T em Th1 ou Th2. Entre eles podemos citar a natureza e a quantidade de antígenos, o tipo de célula apresentadora de antígeno, hormônios, citocinas e o conhecimento genético do hospedeiro (Romagnani, 1992b). As características genéticas podem definir até qual é dose ideal de antígeno para desencadear a resposta alérgica. A quantidade de antígeno estimulante pode iniciar o processo alérgico, ou se for excessiva, até bloquear a resposta patológica (Bianchi Junior, 2001).

A afinidade com que o reconhecimento antigênico acontece influencia a determinação do padrão da resposta imune. Tal afinidade é função dos padrões que interagem na formação do complexo tri-molecular: complexo de histocompatibilidade principal (MHC), antígeno e o receptor da célula T (TCR). Apresentações com alta afinidade tendem a desencadear respostas imunes Th1, enquanto interações entre a célula apresentadora de antígeno e o linfócito T com baixa afinidade desencadeariam respostas imunes com perfil Th2. Portanto, uma resposta imune pode variar de linhagem para linhagem, mantendo-se o mesmo antígeno sensibilizante, ou de antígeno para antígeno, mantendo-se a mesma linhagem imunizada.

Nesta tese demonstramos que os camundongos da linhagem BALB/c, que foram imunizados com 500 µg de Dpt, apresentaram conjuntivite alérgica mais grave que os controles segundo os critérios clínicos adotados no estudo. Nos camundongos da linhagem C57Bl/6, a diferença entre os grupos imunizados foi menor. Convém observar que, contrário ao que era esperado pelo padrão de resposta basal destes animais, a resposta alérgica de menor intensidade ocorreu nos camundongos da linhagem BALB/c, se comparados com os camundongos C57Bl/6. Esta observação, juntamente com a necessidade de uma maior dose ideal de sensibilização (500 µg), caracteriza a existência de um limiar desencadeante da resposta alérgica diferente em indivíduos diferentes.

Em seres humanos, existe um conceito estabelecido de limiar para algumas respostas alérgicas. Classicamente o Der p 1 (um dos principais antígenos do *Dermatophagoides pteronyssinus*), em níveis iguais ou superiores a 2 µg/g de pó, representam um fator de risco para o desenvolvimento de alergia respiratória em indivíduos predispostos (Bjorgsten et al., 1996).

Conjuntamente ao quadro ocular, houve respostas imunes sistêmicas caracterizadas laboratorialmente pela produção de IgG, IgE e citocinas (Tabelas 4,8,10,12,14,16,18,20). As diferenças nos parâmetros laboratoriais observados entre os camundongos sensibilizados e os controles foram estatisticamente significantes, semelhantes aos encontrados por Magone e colaboradores (1998) comprovando que o sistema imune dos camundongos reconhece o alérgeno e monta uma resposta humoral contra o Dpt.

Vários autores já mostraram que a população de células T pode determinar o tipo de imunoglobulina produzida em seres humanos (Romagnani, 1992a, b). Acredita-se que as células efetoras do tipo Th2 presentes em pacientes atópicos, estimulem as células B a produzir IgE específica, enquanto as células CD4+ de pacientes sem atopia exibem um padrão Th1 em resposta aos mesmos antígenos, com produção de IgG, mas não de IgE. Conquanto esta dicotomia esteja clara em animais de experimentação, ela ainda não está plenamente estabelecida em pacientes (Allen e Maizels, 1998).

A determinação dos níveis de IgE Total e Específica é usada normalmente para dar suporte laboratorial ao diagnóstico clínico de alergia. Esta evidência é descrita também em numerosos trabalhos, podendo a IgE estar aumentada tanto no plasma como na lágrima antígeno dos indivíduos afetados por conjuntivite alérgica (Aalders-Deenstra et al., 1985).

Os níveis séricos de IgE Específica e Total encontrados nos camundongos imunizados com diferentes doses de antígenos do *Dermatophagoides pteronyssinus*, seguiram a direção esperada, com uma produção maior de IgE pelos camundongos BALB/c em relação aos da linhagem C57Bl/6. Os camundongos da linhagem BALB/c com maiores concentrações de IgE foram aqueles imunizados com as maiores quantidades de antígeno; o inverso ocorreu para os camundongos C57Bl/6. É interessante, que as manifestações clínicas de doença foram mais proeminentes nos camundongos C57Bl/6, imunizados com a menor dose de Dpt do que nos camundongos BALB/c imunizados com a maior concentração de Dpt, numa correlação inversa entre o título de IgE Total ou

Específica e a gravidade da resposta alérgica. Este aparente paradoxo pode ser explicado de uma vez que a IgE que é importante para a indução de sinais clínicos de alergia é aquela que está ligada aos mastócitos e essa não foi medida por nós. Sendo assim, é possível que os níveis de IgE livre (no soro) não espelhem o de IgE ligada ao seu receptor de alta afinidade na superfície celular de mastócitos. Isto ocorre em alguns pacientes que apresentam uma dicotomia entre o teste de RAST (Teste do anticorpo IgE alérgeno-específico), que reflete a IgE antígeno específica livre, e o teste de punctura da pele, que reflete a IgE Específica na membrana de mastócitos.

Na avaliação específica dos níveis séricos de IgE Total, os camundongos BALB/c que receberam 5 µg de Dpt tiveram concentrações menores que os da linhagem C57Bl/6 (Tabela 4). Esse dado contrasta com o normalmente encontrado em outros trabalhos, nos quais os níveis de IgE total dos camundongos BALB/c é sempre superior aos dos camundongos C57Bl/6 (Galli e Lantz, 1999). Uma justificativa para este fato seria que os camundongos BALB/c submetidos à imunização crônica desenvolveram uma reação do tipo Th1, semelhante à dos camundongos C57Bl/6, e que a exposição antígeno-específica poderia alterar um importante fator imunológico, como a síntese de IgE, em camundongos potencialmente selecionados para apresentar outra forma de reação imune. É importante ressaltar que a obtenção das linhagens BALB/c e C57Bl/6 não foi direcionada para respostas específicas como, por exemplo, as linhagens Biozzi (Biozzi et al., 1970). Assim, o aparecimento de padrão específico de resposta imune foi um produto secundário e aleatório dos cruzamentos realizados para obter os animais isogênicos de cada linhagem.

Na análise das concentrações de IgG Específica, nota-se que as dosagens séricas de IgG Específica seguem um caminho contrário ao das dosagens de IgE Específica. Nesse caso, os camundongos BALB/c, com as maiores concentrações de IgG Específica, foram aqueles que receberam as menores quantidades de antígeno, enquanto nos camundongos da linhagem C57Bl/6 ocorreu o inverso (Tabela 8).

Essa discordância entre as dosagens das IgE e IgG Específicas sugere que a presença de subclasses de IgG pode ser considerada como indicador de proteção contra o desenvolvimento de sinais clínicos de hipersensibilidade do tipo I, confirmando as impressões de muitos alergistas clínicos. Pode também sugerir que indivíduos diferentes, aqui representados pelas diferentes linhagens de camundongos, terão limiares diferentes para as doses de exposição ao alérgeno no que diz respeito ao aparecimento de IgG Específica, o que pode ter implicações no desenho das imunoterapias para doenças alérgicas.

Contudo, as reações mediadas pelas IgE e IgG não são sempre mutuamente exclusivas. Por exemplo, anticorpos IgG Específicos podem participar de uma reação imunológica por meio da ativação de proteínas do sistema complemento, e desse modo, levar a uma alteração na permeabilidade vascular através da liberação de substâncias vasoativas pelos mastócitos e basófilos (Johnson et al., 1975). Evidencia-se que uma subclasse da IgG (IgG4) pode, em alguns casos de conjuntivite alérgica, até mimetizar a ação da IgE (Galli e Lantz, 1999).

Quando avaliadas as concentrações de IgG Total, porém, observa-se que não há diferenças estaticamente significantes nas concentrações de 5 µg e 500 µg para ambas as linhagens estudadas (Tabela 8). Uma explicação para esse fato pode ser o de que durante o experimento não houve uma estimulação forte o suficiente para os camundongos produzirem uma resposta imunológica crônica e, assim, atingir o patamar de uma produção aumentada das várias subclasses de anticorpos IgG. Ainda é pouco conhecida a regulação da resposta das subclasses de IgG frente a um antígeno específico como o Dpt. Nos camundongos, sabe-se que a IL-4 estimula a produção de IgG₁, mas não de toda a IgG₁, uma vez que animais deficientes (nocaute) para este gene apresentam IgG₁ em níveis iguais à metade do normal. Da mesma forma, o IFN-γ inibe a resposta IgG₁ e ativa a produção de IgG_{2a}. Assim, a concentração de IgG Total seria afetada por uma interação entre as citocinas (Jenmalm et al., 1999), além de um estímulo antigênico adequado para uma boa resposta imunológica.

Em nosso modelo, observamos a proliferação de linfócitos em resposta a antígenos do ácaro nos camundongos BALB/c, imunizados com Dpt, encontrando os maiores índices de proliferação nos camundongos que receberam 5 µg (Tabela 6). Nos dois grupos imunizados da cepa C57Bl/6 não ocorreu uma diferença significativa neste parâmetro imunológico, mas em ambos pôde-se observar proliferação linfocitária frente a esses alérgenos (Tabela 6).

Nas respostas alérgicas agudas, a infiltração e proliferação linfocitária nos órgãos-alvo da patologia incluem principalmente células Th2.

Desta forma, uma vez que os camundongos BALB/c parecem produzir preferencialmente células efectoras do tipo Th2, isto poderia explicar a diferença significativa nos camundongos BALB/c (padrão Th2) com conjuntivite (imunizados com 500 µg de Dpt), versus aqueles sem conjuntivite (imunizados com 5 µg). Como os camundongos C57Bl/6 comportam-se de maneira inversa, isto também explicaria a ausência dessa diferença nos dois grupos de camundongos desta linhagem. Entretanto, restaria esclarecer por que os camundongos C57Bl/6 com e sem conjuntivite alérgica apresentam padrões de proliferação linfocitária Dpt-específicas semelhantes. Isto só pode ser explicado pelo fato de que populações diferentes de linfócitos estejam proliferando nas duas condições. Isto é, nos camundongos imunizados com 5 µg, observamos linfócitos Th2, conforme comprovado pelo padrão de produção de citocinas (Tabelas 10, 12, 14, 16,18) e, nos camundongos imunizados com 500 ug, os linfócitos que reagem contra o Dpt apresentam um padrão “não Th2” (Tabela 6). O padrão apresentado é similar ao encontrado em pacientes com ceratoconjuntivite primaveril, na qual ocorre infiltração conjuntival por células mononucleares, sendo a maioria constituída por células T auxiliaadoras CD4 (El-Asrar et al., 2002). Mas, por se tratar de uma manifestação mais preponderante da fase aguda da doença (hipersensibilidades do tipo I), a proliferação linfocítica pode ter uma maior relevância como padrão imunológico na fase aguda do que na fase crônica da alergia ocular.

Observando o sobrenadante da cultura de linfócitos dos camundongos que apresentaram conjuntivite alérgica, constatou-se a

secreção de citocinas pertencentes ao padrão de resposta imune Th2: IL-4, IL-5, IL-13, sendo a classe IgE intensificada pelas IL-4 ou IL-13 e suprimida pelo interferon- γ (IFN- γ).

As diferenças entre as produções dessas citocinas pelos animais sensibilizados e pelos controles foram estatisticamente significantes.

Os camundongos da cepa BALB/c, imunizados com 500 μ g de Dpt, foram os que produziram maiores níveis de IL-4, IL-5 e IL-13.

Já em relação aos camundongos C57Bl/6, os que apresentaram maior produção de IL-5, IL-13 foram os imunizados com 5 μ g de Dpt. Esses achados apresentam correspondência com a gravidade do quadro de conjuntivite alérgica encontrados nos camundongos das duas linhagens (C57Bl/6 e BALB/c). Porém, a dosagem de IL-4 não foi estatisticamente significativa nos camundongos C57Bl/6, contrastando, assim, com os valores obtidos nos camundongos Balb/c, e com os encontrados na literatura (Fujishima et al., 1995).

Uma explicação para o fato, seria o que talvez possa ser chamado de “força de apresentação”. Apresentações “fortes” desviariam para um padrão Th1 de resposta imunológica, ao passo que as apresentações “fracas” provocariam uma resposta de padrão Th2 (Rizzo et al., 1991). Como nessas doenças a IL-4 tem um papel fundamental na diferenciação do Linfócito em Th2 e na capacidade induzir os linfócitos B a produzir IgE (Romagnani, 1992a), os camundongos da cepa C57Bl/6 podem ter uma resposta imunológica nos padrões Th1 e Th2, culminando numa menor secreção de IL-4.

No trabalho de Uchio e colaboradores (2000), foi observada uma significativa correlação entre os níveis de IL-4 e a severidade do quadro de alergia ocular, fato esse que também foi constatado no presente trabalho. Foi sugestivo notar que houve uma discrepância inesperada e nunca antes descrita na literatura entre a produção de IL-4 e IL-13. Enquanto a produção de IL-13 seguiu o padrão esperado de níveis estatisticamente maiores nos animais com manifestação clínica de alergia, os dados para IL-4 não mostraram estas diferenças, apesar de haver uma tendência neste sentido. A força do teste empregado sugere que mesmo um aumento no número de animais analisados não revelaria diferenças estatisticamente significantes. Essa diferença pode se dar por que: I) Neste modelo, a participação da IL-4 na doença crônica não é tão importante quanto na doença aguda (Blanchi Júnior, 2001); II) A medida foi realizada em um tempo em que a produção desta citocina não era de pico, e, portanto as diferenças observadas são menores notadas *in vivo* no momento de produção máxima.

Recentemente, houve um grande interesse na IL-10 como uma citocina que inibe as reações alérgicas, induz a uma tolerância nas células T e previne a inflamação. Nesta tese observou-se que as dosagens de IL-10 foram maiores nos animais da linhagem BALB/c em que a imunização foi de 5 µg de Dpt (Tabela 18). Já nos camundongos C57Bl/6 não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 18). As dosagens de IL-10 nas duas linhagens de camundongos foram similares àquelas encontradas nas dosagens de IL-4 nos 2 grupos de animais estudados. O trabalho de Schmidt - Weber e colaboradores (1999) sugere

que a IL-4 aumentaria a secreção de IL-10. Assim, podemos especular que a secreção de IL-4 pelos linfócitos T auxiliares poderia contribuir para a regulação da resposta imune dos camundongos através do aumento da secreção de IL-10, e que talvez essa seja afetada por um balanço da resposta imunológica do próprio sistema imunológico. Pode-se especular também que a IL-10 seja mais importante no controle de reações alérgicas naqueles indivíduos que tendem a montar respostas do tipo Th2, e que ela seja mais importante no controle da resposta inflamatória celular nos indivíduos com uma resposta predominantemente Th1. Esta hipótese daria respaldo a observações clínicas em pacientes submetidos à imunoterapia com alérgenos, nas quais a importância da presença de IL-10 varia de estudo para estudo, e dentro de um mesmo estudo varia entre os indivíduos (Nanda et al., 2004; Francis et al., 2003; Keskin et al., 1999).

A IL-8, no espaço extracelular do epitélio conjuntival, tem um importante papel no recrutamento de neutrófilos e possivelmente de eosinófilos e destaca-se na patogênese das lesões corneanas nas conjuntivites alérgicas severas (Miyoshi et al., 2001). As dosagens de IL-8 tiveram maiores concentrações nas duas linhagens de camundongos nos quais a imunização foi de 5 µg de Dpt, o que é inversamente proporcional à dose de sensibilização (Tabela 12). Esse dado permite especular que uma dose excessiva de alérgenos na imunização produziria um bloqueio nesta resposta inflamatória alérgica em alguns indivíduos.

A secreção de IFN-γ, que é uma citocina inibitória do padrão Th2, apresentou-se em maiores concentrações nos camundongos C57Bl/6, nos

animais sensibilizados com 500 µg. Esse fato ocorre pelo perfil Th1 de resposta desta citocina, que é um fator da fase tardia dos processos alérgicos, e pode ser importante na prevenção da cronificação da alergia ocular (Magone et al., 2000). Porém, nos camundongos BALB/c, foi constatada uma diferença estatisticamente significativa apenas quando adotada uma avaliação monocaudal nas secreções de IFN-γ, com as maiores concentrações nos camundongos que receberam 500 µg. Essa diferença encontrada entre os camundongos das duas linhagens foi também constatada entre os ratos Lewis e Brown Norway (Fukushima et al., 2003). Logo, as diferenças encontradas entre as linhagens BALB/c e C57I/6 podem ser atribuídas às dominâncias sistêmicas Th1/Th2 destas, as quais são influenciadas pelo padrão genético diferente dessas duas linhagens de camundongos. As células precursoras podem assumir o fenótipo Th1 ou Th2, estimando-se que entre 10 e 20% das células efetoras em uma resposta antígeno-específica apresentem um destes padrões. Há também um conjunto de células com padrão de produção de citocinas intermediárias que secretam tanto IL-4 e IFN-γ, como também IL-5 e IL-6 entre outras (Gajewski et al., 1989), e que podem atuar também no processo modulador da resposta imune, podendo determinar o tipo dominante de resposta a um dado antígeno. O balanço entre essas diferentes células T poderia justificar o padrão Th1 mais típico das linhagens C57BI/6, ao contrário do padrão Th2 dos camundongos BALB/c. E, ainda não se pode descartar a existência de algum mecanismo regulatório no sítio inflamatório da conjuntiva, dado que o olho é um órgão imunoprivilegiado.

Juntamente com a análise laboratorial realizou-se uma avaliação clínica e histopatológica em que se constatou que os camundongos submetidos à provocação conjuntival crônica apresentaram: hiperemia e edema de conjuntiva, edema de pálpebra e secreção ocular. No experimento para indução da ceratoconjuntivite alérgica crônica, além dos sinais já descritos, verificou-se ulceração da córnea em um número importante de animais (Tabela 21 e Figura 1).

Nos lâminas dos cortes histológicos de conjuntiva e córnea estudados observou-se nitidamente uma infiltração linfocitária na córnea e da conjuntiva nos camundongos das linhagens BALB/c e C57Bl/6 que receberam 500 µg e 5 µg, respectivamente. Desse modo, a infiltração linfocítica encontrada na córnea e na conjuntiva, acompanha o padrão de acumulação de linfócitos T, dentre os quais se podem destacar os linfócitos T auxiliares. Essa infiltração de linfócitos está relacionada com a produção de interleucinas, como as IL-4 e IL-5, e ao estímulo à síntese de IgE, modulando, assim, as mudanças oculares e confirmando o quadro da doença alérgica ocular crônica (Maggi et al., 1991). A razão para esta infiltração celular na conjuntiva e na córnea ainda não está clara até o presente momento. Uma possibilidade seria a de que essas células representariam uma resposta local à estimulação antigênica, pressupondo-se que há apresentação local do alérgeno na conjuntiva e na córnea.

O epitélio corneano intacto é um dos mais importantes fatores de manutenção da superfície ocular. Os defeitos no epitélio corneano geralmente se resolvem sem complicações através da proliferação das

células epiteliais (Prabhasawat et al., 2001). Porém, durante nosso estudo, houve uma interferência no processo de reparação, levando à formação de um defeito epitelial persistente, o qual evolui provocando o surgimento de afinamentos e úlceras de córnea (Figuras 1 e 3).

As ulcerações corneanas e as degenerações conjuntivais observadas nos materiais retirados dos olhos dos camundongos imunizados estão diretamente relacionadas com o padrão da infiltração linfocitária e seguem o mesmo perfil (Th2 para a cepa BALB/c e Th1 para a cepa C57Bl/6) descrito anteriormente para as duas linhagens de camundongos estudadas.

A infiltração eosinofílica está diretamente relacionada com a presença das úlceras de córnea e degenerações conjuntivais e é influenciada pela ação da citocinas. As IL-4 e IL-5 estão diretamente envolvidas na infiltração dos eosinófilos na conjuntiva, que, por sua vez, é uma importante fonte produtora de IL-8. Por outro lado, o IFN- γ atuaria na infiltração dos macrófagos (Fukushima, 2004). Nesta tese não realizamos marcação específica para eosinófilos, mas a análise das lâminas coradas com hematoxilina e eosina revelou uma presença discreta destas células na conjuntiva. Isto vai ao encontro de outros dados experimentais de alergia em camundongo que sugerem que a presença de eosinófilos é menor que a observada em humanos (Kumar e Foster, 2002; Lee et al., 2001).

A eosinofilia conjuntival pode também ser considerada um indicador da conjuntivite alérgica. Nesses últimos anos houve uma melhor compreensão da atuação dos eosinófilos nos processos inflamatórios das alergias oculares. Estes avanços evidenciaram os principais agentes liberados pelos eosinófilos, em que se destacam a proteína básica maior e a

proteína catiônica eosinofílica, as quais induziriam a degranulação dos mastócitos e teriam efeitos citotóxicos (Trocme et al., 1997). Essas substâncias possuem efeito tóxico no epitélio corneano e contribuem para a ceratopatia epitelial e para a formação das úlceras corneanas. As lesões conjuntivais e os danos corneanos, os quais podem ocorrer nas formas mais severas de alergia ocular crônica alérgica, são mediadas em grande parte pelos eosinófilos, atraídos o local do processo inflamatório por vários fatores, dentre eles a IL-5, que mostrou no atual trabalho, níveis mais altos. Em nossos estudos encontramos índices elevados de IL- 5 (Tabela 10), mas, como discutido anteriormente, os eosinófilos não estavam presentes em grandes números. É possível que o fato de estudarmos a histologia da conjuntiva e córnea somente na fase crônica da doença justifique a pequena presença destas células, que parecem mais importantes na fase aguda da resposta alérgica (Doherty, 2004).

As alterações oculares acima descritas constataam a interação complexa das ações conjuntas dos mastócitos, eosinófilos, linfócitos e citocinas liberadas, e os processos deletérios que podem induzir na córnea e na conjuntiva dos camundongos.

Na avaliação histopatológica também foi encontrado, num número pequeno de animais, um aspecto compatível com afilamento corneano, confirmado pela paquimetria (vide Apêndices). Nesse caso, seria a primeira descrição na literatura, após uma imunização com Dpt em modelos murinos, da presença de um quadro histológico com características similares as de um ceratocone. Infelizmente, os dados de paquimetria não puderam ser validados, uma vez que os valores normais de espessura da córnea não

estão estabelecidos nestas duas linhagens de camundongos, e a adaptação feita no aparelho de uso em humanos para o uso em camundongos não foi reconhecida pelo fabricante do equipamento, razão pela qual estes dados não estão incluídos no corpo da tese.

O ceratocone pode ser definido como uma distrofia corneana associada com um afinamento estromal, cicatrizes corneanas, protusão corneana e um astigmatismo miópico irregular (Kennedy et al., 1986). A patofisiologia da doença ainda é desconhecida, mas o ceratocone tem sido relacionado com o esfregar crônico dos olhos, problemas de adaptação das lentes de contato, doenças atópicas, traumas oculares, doenças vasculares do colágeno, retinopatia pigmentar, Síndrome de Marfan e Síndrome de Down, Síndrome de Ehlers-Danlos e amaurose de Leber (Rehany e Rumelt, 1995).

A associação entre atopia e ceratocone tem sido descrita desde o início do século 20, em vários estudos. Desde então, vários trabalhos conflitantes foram publicados. Porém, nos últimos anos, existe um consenso na literatura a esse respeito. O fato pôde ser evidenciado em inúmeros trabalhos como no de Rahi e colaboradores (1977), um longo estudo-controle, onde se constatou uma associação positiva entre atopia e ceratocone.

Muitos autores creditam ao ato de esfregar os olhos o mais importante fator de risco para o ceratocone. Gritz e McDonnel (1988) realizaram um seguimento prospectivo de um paciente que desenvolveu ceratocone após um período de 11 meses, tendo, como único fator de risco, as massagens oculares.

O afinamento estromal observado no modelo murino foi similar aos encontrados na literatura quando foram usados os coelhos como modelo (Kim et al., 1999a, b). Este afinamento, observado no modelo coelho, segundo o trabalho de Kim e colaboradores, pode ser uma evidência para uma associação entre a lesão crônica do epitélio corneano e o afinamento estromal encontrado em humanos.

Vários fatores estão relacionados com essa alteração. Já foi demonstrado o desaparecimento de ceratócitos após uma lesão do epitélio corneano por apoptose (programa de morte celular). Acredita-se que a apoptose possa ter um importante papel na organização tecidual. Um desbalanço da homeostase normal entre a proliferação e a apoptose dos ceratócitos poderia estar relacionada à patogênese do afinamento corneano.

Estudos anteriores indicaram que a interleucina -1 pode direta (Wilson et al., 1996) ou indiretamente (Mohan et al., 1997) acionar o gatilho para a apoptose dos fibroblastos corneanos. Essa observação pode sugerir uma susceptibilidade genética dos ceratócitos às citocinas, quando ocorre lesão epitelial em pacientes com ceratocone. Normalmente se associa o conceito de apoptose ao de um processo controlador usado para eliminar células mortas com mínima ação de enzimas degradativas e outros componentes que possam causar danos a células e tecidos circunjacentes (Wyllie et al., 1980). Mas é possível, que a apoptose possa se tornar imperfeita, desencadeando uma anormal degradação enzimática ou outras ações bioquímicas.

Os fibroblastos corneanos constituem o principal componente do estroma corneano. Esses fibroblastos contribuem para manutenção da

estrutura normal do estroma corneano, não somente através da síntese e degradação do colágeno estromal, mas também pela secreção de substâncias bioativas (Fukuda et al., 2002a). Porém, os fibroblastos não constituem uma população homogênea de células. Eles se manifestam de maneiras distintas, dependendo do local do corpo e do estímulo local (Schmitt-Graff et al., 1994). A regulação da síntese de citocinas pelos fibroblastos também depende do tecido do qual as células são provenientes. Foi demonstrado que fibroblastos da derme e da córnea, e não nos fibroblastos pulmonares, existe uma seletiva atração química para células Th2, em resposta a uma estimulação das citocinas (Kumagai et al., 2000), sugerindo que os fibroblastos presentes em órgãos diferentes possam ter respostas alérgicas igualmente diferentes.

Em 1988, foram identificados receptores para IL-4 (Monroe et al., 1988) e, sob certas condições, a derme de murinos e os fibroblastos pulmonares apresentaram proliferação na presença de IL-4. Identificou-se uma alta afinidade da IL-4 aos receptores presentes em culturas de fibroblastos corneanos (Doucet et al., 2000). Alguns autores detectaram uma elevação dos níveis dos procolágenos tipo I e III e da fibronectina em células tratadas com IL-4 (Postlethwaite et al., 1992). Por outro lado, o IFN- γ inibiria a produção de colágeno, prevenindo, desse modo, a progressão da reparação de um tecido normal e sua regeneração para uma condição de fibrose patológica (Sempowski et al., 1996). Outra ação do IFN- γ seria sua contribuição na inibição da infiltração de eosinófilos na córnea (Fukuda et al., 2002b).

Os fibroblastos conjuntivais humanos também apresentam um envolvimento característico nas conjuntivites alérgicas crônicas mediadas pelas células Th2, como os que aparecem nas ceratoconjuntivites vernal e atópica. Descobriram que as papilas gigantes e a fibrose subepitelial são resultado não só da infiltração celular, mas também da deposição de colágeno (Leonardi et al., 2003). Esse processo ocorreria tanto pela ação da histamina que pode aumentar a produção de colágeno quanto pela interação entre as interleucinas 4 e 13 e o IFN- γ . Assim, o balanço entre as células Th1 e Th2 pode estar envolvido na produção e distribuição do colágeno na conjuntiva. Outros fatores de crescimento produzidos por células presentes na conjuntiva (mastócitos, células epiteliais e células endoteliais) e por células inflamatórias (macrófagos e eosinófilos) podem contribuir na formação de papilas e fibrose, atuando também, dessa forma, na evolução da conjuntivite alérgica crônica (Leonardi et al., 2000).

Estes fatos sugerem um papel relevante das interleucinas e do interferon- γ nos fibroblastos, ceratócitos e colágeno. Acreditamos que a interação destas possa ser de suma importância na patogênese do afilamento corneano e em outras alterações conjuntivais e corneanas que podem ocorrer na conjuntivite alérgica crônica.

Provavelmente, a atopia vá desencadear uma série de alterações imunológicas e levar à apoptose de diversos tipos celulares culminando com a manifestação do afilamento nas córneas dos camundongos. Mas ainda não podemos afirmar que estes mesmos fatores teriam ação semelhante em olhos humanos.

Vários estudos têm usado a maior compreensão da fisiopatogenia da alergia ocular crônica para melhorar a capacidade disponível de terapêutica. Os mais recentes modelos experimentais estão demonstrando que a inibição das células Th2 e a secreção de suas citocinas podem se tornar um importante arsenal terapêutico, inibindo a inflamação alérgica crônica na superfície ocular (Calonge et al., 2003). Embora não fiquem evidentes as razões pelas quais as células T possuam diferentes tendências na produção das diferentes citocinas, essa estratégia auxilia na melhor compreensão da regulação da produção dessas substâncias, contribuindo para o esclarecimento da patogênese dos diferentes tipos de alergias oculares crônicas.

De fato, a presença do aumento no nível sérico de IgE, IgG e citocinas encontrados em nosso estudo sugere que o processo é sistêmico, e não apenas uma doença localizada.

Os modelos experimentais têm tentado mimetizar o quadro alérgico ocular humano. Muitas vezes, contudo, eles se limitam ao seu significado clínico. Entretanto, no atual trabalho, a indução da conjuntivite alérgica crônica experimental pôde estudar melhor os mecanismos imunológicos e suas correlações clínicas, permitindo que, dessa forma, ao aprimorar o conhecimento sobre a patogênese das conjuntivites alérgicas crônicas, possibilite-se o desenvolvimento de novas terapêuticas para essas moléstias oculares.

Aqui, nós apresentamos um modelo animal reprodutível e simples de conjuntivite alérgica crônica, utilizando um alérgeno relevante para a doença em seres humanos e, desta forma, munindo pesquisadores com uma ferramenta para o estudo da fisiopatologia da conjuntivite alérgica crônica e suas co-morbididades e também para o teste de alternativas terapêuticas para esta doença.

6. CONCLUSÕES

---

1. Desenvolveu-se com sucesso um modelo murino para conjuntivite alérgica crônica pela exposição crônica aos antígenos do *Dermatophagoides pteronyssinus* que apresentou características clínicas e imunológicas reprodutíveis e similares à doença humana.
2. Demonstrou-se que os fatores genéticos dos animais estudados determinam a dose ideal de antígeno para desencadear reações alérgicas.
3. Demonstrou-se a associação entre a conjuntivite alérgica crônica e a produção de citocinas.

7. REFERÊNCIAS

Aalders-Deenstra V, Kok PT, Bruynzeel PL. Measurement of total IgE antibody levels in lacrimal fluid of patients suffering from atopic and non-atopic eye disorders. Evidence for local IgE production in atopic eye disorders? *Br J Ophthalmol*. 1985;69(5):380-4.

Abelson MB, Chambers WA, Smith L.A. Conjunctival allergen challenge. A clinical approach to studying allergic conjunctivitis. *Arch Ophthalmol*. 1990;108(1):84-8.

Abelson MB, Loeffler O. Conjunctival allergen challenge: Models in the investigation of ocular allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2003;3(4):363-8.

Abelson MB, Schaefer K. Conjunctivitis allergic origin: immunologic mechanisms and current approaches to therapy. *Surv Ophthalmol*. 1993;38(suppl):115-32.

Allansmith MR, Abelson MB: Ocular Allergies, In Smoling G, Thoft RA (Eds): *The Cornea: Scientific Foundations and Clinical Practice*. Boston: Little Brown;1983. p.241-3.

Allansmith MR, Baird RS. Percentage of degranulated mast cells in vernal conjunctivitis and giant papillary conjunctivitis associated with contact lens wear. *Am J Ophthalmol*. 1981;91(1):71-5.

Allansmith MR, Baird RS, Ross RN, Barney NP, Bloch KJ. Ocular anaphylaxis induced in the rat by topical application of compound 48/80.

Dose response and time course study. *Acta Ophthalmol Suppl.*

1989;192:145-53.

Allansmith MR, Ross RN. Ocular allergy. *Clinical Allergy.* 1988;18(1):1-13.

Allen JE, Maizels RM. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma?

Immunol Today. 1998;19(1):49-53.

Anderson DF, MacLeod JDA, Baddeley SM, Bacon AS, McGill JI, Holgate

ST, Roche WR. Seasonal allergic conjunctivitis is accompanied by increase

mast cell number in the absence of leukocyte infiltration. *Clin Exp Allergy.*

1997;27(9):1060-6.

Archila EA, Archilla MAA, Milanés L. Conjuntivitis primaveral del altiplano

ecuatorial: conjuntivitis actínica proliferativa. *Arch Chil Oftalmol.* 1987;44:21-5.

Bacon AS, McGill JI, Anderson DF, Baddeley S, Lightman SL, Holgate ST.

Adhesion molecules and relationship to leukocyte levels in allergic eye

disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(2):322-30.

Ballas Z, Blumenthal M, Tinkelman DG, Kriz R, Rupp G. Clinical evaluation

of ketorolac tromethamine 0.5% ophthalmic solution for the treatment of

seasonal allergic conjunctivitis. *Surv Ophthalmol.* 1993;38(Suppl1):141-8.

Belfort Jr R, Marbeck P, Hsu CC, Freitas D. Epidemiological study of 134

subjects with allergic conjunctivitis. *Acta Ophthalmol Scand Suppl.*

2000;78(230):38-40.

Bezerra HL. *Avaliação da resposta terapêutica nas alergias oculares através da citologia [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 2000.

Bianchi Júnior PCG. *Desenvolvimento de um modelo animal de conjuntivite alérgica: importância de fatores genéticos e da concentração de alérgenos na resposta imune [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

Biozzi G, Asofsky R, Lieberman R, Stiffel C, Mouton D, Benacerraf B. Serum concentrations and allotypes of immunoglobulins in two lines of mice genetically selected for "high" or "low" antibody synthesis. *J Exp Med*. 1970;132(4):752-64.

Bjorgsten B, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Munir AKM. Low level to house dust mite stimulate T cell response during early childhood independent of atopy. *Clin Exp Allergy*. 1996;26(7):775-9.

Bloch-Michel E, Audoin-Berault J, Diebold J, Herman D, Dry J, Campinchi R. A study in immunofluorescence of the plasma cell in allergic conjunctivitis, in particular of the cells forming immunoglobulin E (IgE). *Arch Ophthalmol (Paris)*. 1977;37(2):89-100.

Bonini S, Lambiase A, Juhas T, Bonini S. Allergic conjunctivitis. *Dev Ophthalmol*. 1999;30:54-61.

Bonini S, Bonini S. Ig-E and non-IgE mechanisms in ocular allergy. *Ann Allergy*. 1993;71(3):296-9.

Bonini S, Bonini S, Berruto A, Tomassini M, Carlesimo S, Bucci MG, Balsamo F. Conjunctival provocation test as a model for the study of allergy and inflammation in humans. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989;88(1-2):144-8.

Bonini S, Bonini S, Lambiase A, Marchi S, Pasqualetti P, Zuccaro O, Rama P, Magrini L, Juhas T, Bucci MG. Vernal keratoconjunctivitis revisited. A case of 195 patients with long-term follow up. *Ophthalmology*. 2000;107(6):1157-1163.

Bonini S, Lambiase A, Sacchetti M, Bonini S. Cytokines in Ocular Allergy. *International Ophthalmology Clinics. Recent Trends in Ocular Allergy*. 2003;43(1):27-32.

Bostock J. Case of periodical affection of the eyes and chest. *Med Chris Trans*. 1819;10:161-4.

Braude LS, Chandler JW. Atopic cornea disease. *Int Ophthalmol Clin*. 1984;24(2):145-56.

Brunzini R. Conjuntivopatias alérgicas: diagnóstico diferencial. *Arch Argent Alergia Immunol Clin*. 1994;25:XIX-XI.

Buckley RJ. Vernal keratoconjunctivitis. *Int Ophthalmol Clin*. 1988;28(4):303-8.

Buckley RJ. Allergic eye disease: a clinical challenge. *Clin Exp Allergy*. 1998;28(suppl 6):39-43.

Calder VL, Jolly G, Hingorani M, Adamson P, Leonardi A, Secchi AG, Buckley RJ, Lightman. Cytokine production and mRNA expression by conjunctiva T-cell lines in chronic allergic eye disease. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(9):1155-7.

Calonge M, Briggs RM, Levene RB, Saiga T, Bloch KJ, Allansmith MR. Early and late phases of ocular anaphylaxis in actively immunized guinea pigs.

Acta Ophthalmol (Copenh). 1990;68(4):470-6.

Calonge M, Siemasko KF, Stern ME. Animal models of ocular allergy and their clinical correlations. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2003;3(4):345-51.

Cameron JA. Shields ulcers and plaques of the cornea in vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology*. 1995;102(6):985-93.

Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce G, Villagio B, Bagnasco M, Canonica GW. Allergic subjects Express intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1 or CD54) on epithelial cells of conjunctiva after allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;91(3):783-92.

Cocoa AF, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol*. 1923;8:163-82.

Colby K, Dohlman C. Vernal keratoconjunctivitis. *Int Ophthalmol Clin*. 1996;36(1):15-20.

Collin HB, Allansmith MR. Basophils in vernal conjunctivitis in humans: an electron microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977;16(9):858-64.

Cook EB. Tear cytokines in acute and chronic ocular allergic inflammation. *Curr Opinion Allergy Clin Immunol*. 2004;4(5):441-5.

Copeman PNM. Eczema and keratoconus. *Br Med J*. 1965;2:977-80.

Donshik PC. Allergic conjunctivitis. *Int Ophthalmol Clin*. 1988;28(4):294-302.

Donshik PC, Ehlers WH. Ocular Allergy: Clinical Immunologic Diseases. In: Smolin, G.; Thoft, RA. *The Cornea*. Boston: Little, Brown and Company; 1994.p.347-64.

Doherty DE. The pathophysiology of airway dysfunction. *Am J Med*. 2004;117 Suppl 12A:11S-23S.

Doucet C, Jasmin C, Azzarone A. Unusual interleukin-4 and -13 signaling in human normal and tumor lung fibroblasts. *Oncogene*. 2000;19(51):5898-905.

Ehlers WH, Donshik PC. Allergic ocular disorders: a spectrum of diseases. *CLAO J*. 1992;18(2):117-24.

EL-Asrar AM, Struyf S, AL-Kharashi SA, Missotten L, Van Damme J, Geboes K. Expression of T lymphocyte chemoattractants and activation markers in vernal keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(10):1175-80.

Elgebaly AS, Donshik PC, Rahhal F, Williams W. Neutrophil chemotactic factors in the tears of giant papillary conjunctivitis patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(1):208-13.

Elices MJ, Osborn L, Takeda Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*. 1990;60(4):577-84.

- Foster CS, Calonge M. Atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology*. 1990;97(8):992-1000.
- Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(6):1255-61.
- Freitas D, Belfort Jr R. Conjunctivites. *Arq Bras Oftalmol*. 1992;55:196-205.
- Freitas D, Sato EH, Rizzo L. T Lymphocytes. In: Abelson MA. *Allergic Diseases of the Eye*. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 2000. p.28-32.
- Friedlaender MH. Allergic Disorders of the Peripheral Cornea. *Int Ophthalmol Clin*. 1986;26(4):69-75.
- Friedlaender MH. Contact allergy and toxicity in the eye. *Int Ophthalmol Clin*. 1988;28(4):317-20.
- Friedlaender MH. Current concepts in ocular allergy. *Ann Allergy*. 1991;67(1):5-10.
- Friedlaender MH. Conjunctivitis of allergic origin; clinical presentation and differential diagnosis. *Surv Ophthalmol*. 1993;38(suppl):105-14.
- Fujishima H, Takeuchi T, Shinozaki N, Saito I, Tsubota K. Measurement of IL-4 in tears of patients with seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Immunol*. 1995;102(2):395-8.

- Fukuda K, Fujitsu Y, Kumagai N, Nishida T. Characterization of the interleukin-4 receptor complex in human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(1):183-8.
- Fukuda K, Yamada N, Fujitsu Y, Kumagai N, Nishida T. Inhibition of eotaxin expression in human corneal fibroblasts by interferon-gamma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;129(2):138-44.
- Fukushima A. Roles of cytokines in the development of severe allergic conjunctival diseases: analyses using animal models. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2004;108(11):682-9.
- Fukushima A, Ozaki A, Fukata K, Ueno H. Differential expression and signalling of IFN-gamma in the conjunctiva between Lewis and Brown Norway rats. *Microbiol Immunol*. 2003;47(10):785-96.
- Gajewski TF, Joyce J, Fitch FW. Antiproliferative effect of IFN- γ in immune regulation. III. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN- γ . *J Immunol*. 1989;143(1):15-22.
- Galli SJ, Lantz CS. Allergy. In: Paul WE. *Fundamental Immunology*. Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. p.1127-74.
- Garritty JA, Liesegang TJ. Ocular complications of atopic dermatitis. *Can J Ophthalmol*. 1984;19(1):21-4.

- Gauchat JF, Gascan H, De Waal Malefyt R, De Vries JE. Regulation of germ-line e transcription and induction of e switching in cloned EBV-transformed and malignant human B cell lines by cytokines and CD4+ T cells. *J Immunol*. 1992;148(7):2291-9.
- Giavina-Bianchi Jr PF, Fidalgo S, Duarte AJS. Hipersensibilidade dos pacientes com asma e rinite na cidade de São Paulo. *Arch Argent Alergia Immunol Clin*. 1996;27(1):12-6.
- Giavina-Bianchi P, Kalil J, Rizzo LV.. Desenvolvimento de um modelo animal de conjuntivite alérgica *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2004;27(4):176-84.
- Gill KS, Yannariello-Brown J, Patel J, Nakajima N, Rajaraman S, Trocme SD. ICAM-1 expression in corneal epithelium of a patient with vernal keratoconjunctivitis: case report. *Cornea*. 1997;16(1):107-11.
- Greiner JV. Papillary conjunctivitis induced by an epithelialized cornea foreign body. *Ophthalmologica*. 1988;196(2):82-6.
- Greiner JV, Peace DG, Baird RS, Allansmith MR. Effects of eye rubbing on the conjunctiva as a model of ocular inflammation. *Am J Ophthalmol*. 1985;100(1):45-50.
- Gritz DC, McDonnell PJ. Keratoconus and ocular massage. *Am J Ophthalmol*. 1988;106(6):757-8.
- Grove AS. Pálpebras e sistema lacrimal. In: Pavan-Langston D. *Manual de oftalmologia – Diagnóstico e Tratamento*. 2ª Edição. Rio de Janeiro: MEDSI; 1988. p.51-60.

Hart DE, Schkolnick JA, Bernstein S, Wallach D, Gross DF. Contact lens induced giant papillary conjunctivitis: a retrospective study. *J Am Optom Assoc.* 1989;60(3):195-204.

Hogan MJ. Atopic keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol.* 1953;36(7):937-47.

Irani AM, Butrus SI, Tabara KF, Schwartz LB. Human conjunctival mast cells: distribution of MC_t and MC_{TC} cells in vernal keratoconjunctivitis and giant papillary conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;86(1):34-40.

Iso T, Nakajima N, Suda H. Passive anaphylaxis in rat conjunctiva and topical effects of antiallergic agents: hypersensitivity in conjunctiva and drug efficacy. *Ophthalmic Res.* 1980;12:9-15.

Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(5 Pt 1):1532-9.

Jenmalm MC, Bjorksten B, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Holt PG. Allergen-induced cytokine secretion in relation to atopic symptoms and immunoglobulin and immunoglobulin G subclass antibody responses. *Pediatr Allergy Immunol.* 1999;10(3):168-77.

Johnson AR, Hugli TE, Muller-Eberhard HJ. Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. *Immunology.* 1975;28(6):1067-71.

Kahn M, Barney NP, Briggs RM. Penetrating the conjunctiva barrier: The role of molecular weight. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31(2):258-61.

Kari O, Salo OP, Bjorksten F, Backman A. Allergic conjunctivitis, total and specific IgE in the tear fluid. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1985;63(1):97-9.

Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 1986;101(3):267-73.

Keskin G, Inal A, Ali Sari R, Sengul A, Sahin M, Turgay M, Kinikli G. Serun IFN-gamma and IL-10 levels before and after specific immunotherapy in patients with allergic rhinitis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1999;27(5):261-4.

Khatami M, Donnelly JJ, John T, Rockey JH. Vernal conjunctivitis: model studies in guinea pigs immunized topically with fluoresceinyl ovalbumin. *Arch Ophthalmol*. 1984;102(11):1683-8.

Khatami M, Donnelly JJ, Rockey JH. Induction and down-regulation of conjunctival type-I hypersensitivity reactions in guinea pigs sensitized topically with fluoresceinyl ovalbumin. *Ophtahmic Res*. 1985; 17(3):139-47.

Kim WJ, Helena MC, Mohan RR, Wilson SE. Changes in corneal morphology associated with chronic epithelial injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(1):35-42.

Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res*. 1999;69(5):475-81.

Korb DR, Allansmith MR, Greiner JV, Henriquez AS, Richmond PP, Finnemore VM. Prevalence of conjunctival changes in wearers of hard contact lenses. *Am J Ophthalmol*. 1980;90(3):336-41.

Kumagai N, Fukuda K, Nishida T. Synergistic effect of TNF-alpha and IL-4 on the expression of thymus- and activation-regulated chemokine in human corneal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279(1):1-5.

Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27(3):267-72.

Lee NA, Gelfand EW, Lee JJ. Pulmonary T cells and eosinophils: coconspirators or independent triggers of allergic respiratory pathology? *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(6):945-57.

Leonardi A, Brun P, Tavalato M, Abatangelo G, Plebani M, Secchi AG. Growth factors and collagen distribution in vernal keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(13):4175-81.

Leonardi A, Brun P, Tavalato M, Plebani M, Abatangelo G, Secchi AG. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Eur J Ophthalmol*. 2003;13(7):606-10.

Levi-Schaffer S, Segal V, Shalit M. Effects of interleukins on conjunctival tissue type mast cells co-cultured with fibroblasts. *Immunology*. 1991;72(2):174-80.

Li Q, Luyo D, Hikita N, Whitcup SM, Chan CC. Compound 48/80-induced conjunctivitis in the mouse: kinetics, susceptibility, and mechanism. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996;109(3):277-85.

MacGlashan Jr DW, Schleimer RP, Peters SP. Comparative studies of mast cells and basophils. *Fed Proc*. 1983;42:2504-9.

Macleod JD, Anderson DF, Baddeley SM, Holgate ST, McGill JI, Roche WR. Immunolocalization of cytokines to mast cells in normal and allergic conjunctiva. *Clin Exp Allergy*. 1997;27(11):1328-34.

Maggi E, Biswas P, Del Prete G, Parronchi P, Macchia D, Simonelli C, Emmi L, De Carli M, Tiri A, Ricci M. Accumulation of Th2-like helper t cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis. *J Immunol* 1991;146(4):1169-74.

Magone MT, Chan CC, Beck L. Systemic or mucosal administration of immunostimulatory DNA inhibits early and late phase of murine allergic conjunctivitis. *Eur J immunol*. 2000;30(7):1841-50.

Magone MT, Chan CC, Rizzo LV, Kozhich AT, Whitcup SM. A novel murine model of allergic conjunctivitis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;87(1):75-84.

McGill JI, Holgate ST, Church MK, Anderson DF, Bacon A. Allergic eye disease mechanisms. *Br J Ophthalmol*. 1998;82(10):1203-14.

Meisler DM, Zaret CR, Stock EL. Trantas dots and limbal inflammation associated with soft contact lens wear. *Am J Ophthalmol*. 1980;89(1):66-9.

Meltzer EO. Evaluating rhinitis: clinical, rhinomanometric, and cytologic assessment. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;82(5Pt2):900-8.

Merayo-Llodes J, Calonge M, Foster CS. Experimental model of allergic conjunctivitis to ragweed in guinea pig. *Curr Eye Res.* 1995;14(6):487-94.

Merayo-Llodes J, Zhao TZ, Dutt JE, Foster BA, Foster CS. A new murine model of allergic conjunctivitis and effectiveness of nedocromil sodium. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97(5):1129-40.

Metz DP, Bacon AS, Holgate S, Lightman SL. Phenotypic characterization of T cells infiltrating the conjunctiva in chronic allergic eye disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(3):686-96.

Metz DP, Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ, Lightman SL. T-cell cytokines in chronic allergic eye disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(6 Pt 1):817-24.

Miyoshi T, Fukagawa K, Shimmura S, Fujishima H, Takano Y, Takamura E, Tsubota K, Saito H, Oguchi Y. Interleukin-8 concentrations in conjunctival epithelium brush cytology samples correlate with neutrophil, eosinophil infiltration and cornea damage. *Cornea.* 2001;20(7):741-7.

Mohan RR, Liang Q, Kim WJ, Helena MC, Baerveldt F, Wilson SE. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res.* 1997;65(4):575-89.

Monroe JG, Haldar S, Prystowsky MB, Lammie P. Lymphokine regulation of inflammatory processes: interleukin-4 stimulates fibroblast proliferation. *Clin Immunol Immunopathol.* 1988;49(2):292-8.

Montan PG, Hage-Hamstem MV. Eosinophil cationic protein in tears in allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol*. 1996;80(6):556-60.

Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol*. 1989;46:111-47.

Nanda A, O'Connor M, Anand M, Dreskin SC, Zhang L, Hines B, Lane D, Wheat W, Routes JM, Sawyer R, Rosenwasser LJ, Nelson HS. Dose dependence and time course of the immunologic response to administration of standardized cat allergen extract. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(6):1339-44.

Navarro BER, Gotti MJW, Rosas MA, Novelo CP, Monge JJS, Castelanos A. Skin reactivity in allergic conjunctivitis. *Rev Alerg*. 1992;39(3):59-61.

Negreiros EB, Filardi C. Alergia ao pó de casa. Estudo comparativo entre os extratos totais de pó de casa, de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoide farinae*, em pacientes do Rio de Janeiro. *F Méd (BR)*. 1975;71:385-8.

Nomura K, Takamura E. tear IgE concentrations in allergic conjunctivitis. *Eye*. 1998;12(Pt2):296-8.

Oh JW, Shin JC, Jang SJ, Lee HB. Expression of ICAM-1 on conjunctival epithelium and ECP in tears and serum from children with allergic conjunctivitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999;82(6):579-85.

Ovary Z, Benacerraf B, Bloch KJ. Properties of guinea pigs 7s antibodies II. Identification of antibodies involved in passive cutaneous and systemic anaphylaxis. *J Exp Med*. 1963;117:951-64.

Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chretien I, Abrams J, de Vries J, Spitz H. Simultaneous production of IL-2, IL-4 and IFN γ by activated human CD4+ and CD+8 T cell clones. *J Immunol.* 1988;141(3):849-55.

Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghow R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1479-85.

Power WJ, Neves RA. Anatomia e Fisiologia da córnea. In: Belfort Jr R, Kara-José N. *Córnea Clínica – Cirúrgica*. São Paulo: Roca, 1996. p.3-15.

Power WJ, Tugal-Tutkun I, Foster CS. Long-term follow-up of patients with atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology.* 1998;105(4):637-42.

Prabhasawat P, Tesavibul N, Komolsuradei W. S Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(12):1455-63.

Rahi A, Davies P, Ruben M, Lobascher D, Menon J. Keratoconus and coexisting atopic disease. *Br J Ophthalmol.* 1977;61(12):761-4.

Ray NF, Baraniuk JN, Thamer M, Rinehart CS, Gersen PJ, Kaliner M, Josephs S, Pung YH. Direct expenditures for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis in 1996, including the contributions of related airway illness. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(3Pt1):401-7.

Rehany U, Rumelt S. Corneal hydrops associated with vernal conjunctivitis as a presenting sign of keratoconus in children. *Ophthalmology.* 1995;102(12):2046-9.

Reiss J, Abelson MB, George MA, Wedner HJ. Allergic Conjunctivitis. In: Pepose, J; Holland, GN; Wilhelmus, KR. *Ocular Infection & Immunity*. St Louis: Mosby; 1996.p.345-58.

Ribeiro RA, Flores CA, Cunha FQ, Ferreira SH. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunology*. 1991;73(4):472-7.

Rich LF, Hanifin JM. Ocular complications of atopic dermatitis and other eczemas. *Int Ophthalmol*. 1985;25(1):61-76.

Rizzo LV, Umetsu DT, DeKruyff RH. Differential regulation of antigen presentation in high and low-IgE responder mice. *Eur J Immunol*. 1991;21(7):1767-70.

Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;98(4):279-85.

Romagnani S. Induction of T_H1 and T_H2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunology Today*. 1992;13(10):379-81.

Romagnani S. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol*. 1994;6(6):838-46.

Romagnani S. Biology of human T_H1 and T_H2 cells. *J Clin Immunol*. 1995;15(3):121-9.

Romagnani S, Maggi E, Parronchi P, Maccia D, Piccini MP, Ricci M.

Increased numbers of Th2-like CD4⁺ T cells in target organs and in the allergen-specific repertoire of allergic patients. Possible role of IL-4 produced by non-T cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;94(1):133-6.

Rosário Filho NA. Sensibilización al ácaro *Blomia tropicalis* em pacientes con alergia respiratória. *Ver Alerg Mex.* 1992;39(5):96-100.

Rose ME, Hesketh P, Walekin D. Cytotoxic effects of natural killer cells have no significant role in controlling infection with intracellular protozoon *Eimeria vermiformis*. *Infect Immun.* 1995;63(9):3711-4.

Schiliapnik R, Kuster C, Charlin R, Bahamondes M, Monzalvett A, Eggers A. Estudio cooperativo: epidemiologia Departamento de Córnea Hospital Del Salvador (ECEDEC). *Arch Chil Oftalmol.* 1989;46:163-72.

Schmidt-Weber CB, Alexander SI, Henault LE, James L, Lichtman AH. IL-4 enhances IL-10 gene expression in murine Th2 cells in the absence of TCR engagement. *J Immunol.* 1999;162(1):238-44.

Schmitt-Graff A, Desmouliere A, Gabbiani G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch.* 1994;425(1):3-24.

Sempowski GD, Derdak S, Phipps RP. Interleukin-4 and interferon-gamma discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. *J Cell Physiol.* 1996;167(2):290-6.

Shevach EM. Organ-specific Autoimmunity. In: Paul WE. *Fundamental Immunology*. Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.

p.1089-125.

Sing G, Mathur JS. Atopic erythroderma: with bilateral cataract, unilateral keratoconus and iridocyclitis, and undescended testes. *Br J Ophthalmol*.

1968;52(1):61-3.

Smelser JA, Silver S. The distribution of mast cells in the normal eye: a method of study. *Exp Eye Res*. 1963;2:134-40.

Stenback H, Krootila K, Palkama A, Uusitalo H. Mast cells in the anterior uvea of the rabbit. Intraocular effects of compound 48/80 in the rabbit. *Exp*

Eye Res. 1992;54(2):247-52.

Tabbara KF. Ocular complications of vernal keratoconjunctivitis. *Can J Ophthalmol*. 1999;34(2):88-92.

Trocme SD, Aldave AJ. The eye and the eosinophil. *Surv Ophthalmol*. 1994; 39(3):241-52.

Trocme SD, Bonini ST, Barney NP, Bloch KJ, Allansmith MR. Late-phase reaction in topically induced ocular anaphylaxis in the rat. *Cur Eye Res*.

1988;7(5):437-43.

Trocme SD, Hallberg CK, Gill KS, Gleich GJ, Tying SK, Brysk MM. Effects of eosinophil granule proteins on human corneal epithelial cell viability and morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(3):593-9.

Trocme SD, Kephart GM, Bourne WM, Buckley RJ, Gleich GJ. Eosinophil granule major basic protein deposition in cornea ulcers associated with vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol*. 1993;115(5):640-3.

Trocme SD, Raizman MB, Bartley GB. Medical therapy for ocular allergy. *Mayo Clinic Proc*. 1992;67(6):557-65.

Trocme SD, Trocme MC, Bloch KJ, Allansmith MR. Topically induced ocular anaphylaxis in rats immunized with egg albumin. *Ophthalmic Res*. 1986;18(2):68-74.

Uchio E, Ono SY, Ikezawa Z, Ohno S. Tear levels of interferon- γ , interleukin (IL)-2, IL-4 and IL-5 in patients with vernal keratoconjunctivitis, atopic keratoconjunctivitis and allergic conjunctivitis. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(1):103-9.

Umetsu DT, DeKruyff RH. TH1 and TH2 CD4⁺ cells in human allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(1):1-6.

Vercelli D, Geha RS. Regulation of IgE synthesis in humans: a tale of two signals. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(3 Pt 1):285-95.

Verdaguer J. Ojo rojo. *Bol Hosp. San Juan de Dios*. 1992;39:16-20.

Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ.

Bronchoscopic evaluation of severe asthma: persistent inflation associated with high dose glucorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(3 Pt 1):737-43.

Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp eye Res.* 1996;62(4):325-7.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.

Yasuda M, Kato M, Nabe T, Nakata K, Cono S. An experimental Allergic conjunctivitis induced by topical and repetitive applications of Japanese cedar pollens in guinea pigs. *Inflamm Res.* 1999;48(6):325-36.

FONTES CONSULTADAS

Cambridge University. International Dictionary of English. Great Britain, Bath Press: Cambridge University Press; 1995.

Cunha AC, Freddi MJA, Cestana MF, Aragão MS, Cardoso SC, Vilhena V. Guia de apresentações de dissertações, teses e monografias. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology CD-ROM Edition. Philadelphia (Pennsylvania): Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

Paquimetria-Resultados

Tabela comparando as paquimetrias realizadas em olhos de camundongos BALB/c imunizados com Dpt (OD) com os olhos que não foram sensibilizados (OE)

Casos	Controles
209 OD	261 OE
191 OD	264 OE
205 OD	263 OE
188 OD	270 OE
191 OD	270 OE
216 OD	283 OE
192 OD	265 OE

Para essas aferições foi utilizado o Paquímetro DGH 40008 (DGH technology. Inc) cedido pelo Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Tabela comparando as paquimetrias realizadas em olhos de camundongos C57Bl/6 imunizados com Dpt (OD) com os olhos que não foram sensibilizados (OE)

<i>Casos</i>	<i>Controles</i>
199 OD	257 OE
192 OD	264 OE
210 OD	273 OE
192 OD	271 OE
197 OD	270 OE
213 OD	281 OE
192 OD	255 OE

Para essas aferições foi utilizado o Paquímetro DGH 40008 (DGH technology. Inc) cedido pelo Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paul