



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

38

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

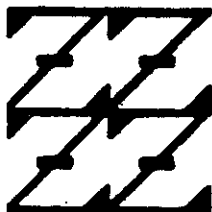
HALLAZGOS CLÍNICOS ASOCIADOS
AL SÍNDROME DE SJÖGREN EN EL RATÓN
HIPOTÍMICO ALOPÉSICO CD1 et/et.

290822

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:

LARA HERNÁNDEZ, MA. DE LOS ANGELES

DIRECTOR: DR. RUBEN MARROQUÍN SEGURA
ASESOR: MC. RICARDO CALVILLO ESPARZA



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

MÉXICO D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis:

Dr. Rubén Marroquín Segura

Por ser el faro que guía con sabiduría el sendero de algunos como yo, que necesitan el consejo del maestro.

A mi asesor de tesis:

M.C. Ricardo Calvillo Esparza

La amistad es el bálsamo, consuelo y satisfacción; gracias por tu generosa ayuda para la realización de este trabajo.

A mi sinodal:

Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera

Por la atención que brinda a mis palabras y a estos hechos.

A mi sinodal:

Q.F.B. José Luis Alfredo Mora Guevara

Por la sabiduría con que alienta a seguir sin desfallecer, por sus palabras llenas de cordialidad y afecto de amigo.

A mi sinodal:

M.C. Maurilio Flores Pimentel

Porque compartimos la magia de los momentos prácticos de la teoría.

Daniel Atilano López

Por compartir conmigo el mundo fascinante de la investigación.

Saúl Cortés Suárez

Para triunfar se necesita valor, es indudable que esta palabra puede convertirse en el mejor consejo para cualquiera que este emprendiendo algo o combatiendo para llegar a un fin, así "Valor, Valor".

Claudia Fabiola Martínez Rodríguez

Porque con tu empeño y alegría me ayudaste a vencer cualquier limitación.

Horacio Soriano Mora

El hombre que se ha realizado a sí mismo, es como la ballena de la inspiración apenas si deja estela.

A mi hija:

Xchel Yaquin Martínez Lara

Puede ser que sueñe muchos sueños, no obstante siempre estoy despierta pensando en ti. En el fuego sagrado de mi constante recuerdo de ti el cual arde en el altar de mi alma, contemplaré tu rostro con los ojos siempre vigilantes de amor.^{P.Y}

A mis padres:

Ma. de Jesús Hernández Villavicencio

Arturo Rivera Pérez

La finalización de este trabajo es la culminación de una de mis metas, y no puede ser de otra manera mas que un reflejo de su apoyo y amor incondicional.

A mis hermanos:

J. Cristina Lara Hernández, Laura Lara Hernández, Rocio Rivera Hernández, Arturo Rivera Hernández, Ulises Rivera Hernández.

A todos ustedes que son parte importante de mi mundo, mi agradecimiento eterno.

HALLAZGOS CLINICOS ASOCIADOS AL SÍNDROME DE SJÖGREN EN EL RATON HIPOTIMICO ALOPÉSICO CD1 et/et

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología L-313, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Campo II bajo la dirección del Dr. **Rubén Marroquín Segura**; con apoyo de **DGAPA, PAPIIT INM. 218197**. En colaboración del Laboratorio de Histología, del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, bajo la Dirección del Técnico Laboratorista **Saúl Cortés Suárez** y el Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, bajo la dirección de M.V.Z. **Daniel Atilano López**.

INDICE

	PAG.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEORICO	3
3.1. Historia	3
3.2. Generalidades	4
3.3. Epidemiología	4
3.4. Etiopatogenia	5
3.4.1. Factores externos	5
3.4.2. Factores internos	6
3.4.3. Respuesta inmune alterada y perpetuada	6
3.5. Clínica	10
3.6. Afectación glandular	10
3.7. Afectación extraglandular	12
3.8. Exploraciones complementarias	15
3.9. Diagnóstico	18
3.9.1. Electroforesis de proteínas	21
3.9.2. ELISA para anticuerpos anti-cardiolipina (ACA)	24
3.9.3. Métodos histológicos	27
3.10. Diagnóstico diferencial	30
3.11. Modelo Animal	32
4. OBJETIVOS	36
5. HIPÓTESIS	37
6. JUSTIFICACIÓN	38
7. MATERIAL	39
8. METODOS	42

INDICE

	PAG.
8.1. Electroforesis de proteínas	43
8.2. Factor Reumatoide	43
8.3. Estudio histológico	43
8.4. Técnica de ELISA para anticuerpos anti-cardiolipina (ACA)	44
8.5. Analisis Estadístico	44
9. RESULTADOS	46
10. DISCUSION DE RESULTADOS	68
11. CONCLUSIONES	71
12. RECOMENDACIONES	72
13. REFERENCIAS	73

RESUMEN

El síndrome de Sjögren, es una enfermedad de etiología desconocida, caracterizada clínicamente por xerostomía y queratoconjuntivitis seca. El propósito del presente trabajo fue reportar los hallazgos encontrados en el ratón hipotímico alopésico CD1 et/et, como un modelo de la enfermedad autoinmune del síndrome de Sjögren primario. El ratón CD1 et/et, mutante de la cepa CD1, desarrolla espontáneamente lesiones macroscópicas de ojo que van desde ojo sano hasta la pérdida total del mismo. Se encontró mediante ELISA, anticuerpos antifosfolípidos de los isotipos IgA, IgG e IgM; y mediante Electroforesis se mostró aumentada la alfa globulina en el ratón CD1 et/et, comparados con los ratones CD1 y CD1 et/+. El Factor Reunatoide por aglutinación pasiva usando IgG heteróloga, no mostró diferencia dentro de los grupos. En el estudio histopatológico se encontraron cambios en las glándulas salivales y lagrimales de los ratones et/et, revelando que éstas muestran cambios en áreas periductales y perivasculares, que van desde la clase I a la IV, llegando hasta la destrucción general de la glándula, las células involucradas fueron: mononucleares, plasmáticas y linfocitos. Además, se observaron cambios degenerativos en las células secretorias. Estos hallazgos proveen la evidencia de que el ratón CD1 et/et es un modelo del síndrome de Sjögren primario.

INTRODUCCION

El síndrome de Sjögren es una inflamación crónica autoinmune en la cual las glándulas salivales y lagrimales sufren una destrucción progresiva por infiltración de linfocitos y células plasmáticas y en consecuencia una disminución de la producción de saliva y lagrimas; en forma primaria, se le llama a menudo síndrome seco, implicando tanto a la xerostomia como a la queratoconjuntivitis seca, mientras que la forma secundaria incluye, la presencia de enfermedad conectiva tisular, usualmente artritis reumatoide o bien síndrome de Sjögren secundario (SS) a Artritis Reumatoide (AR) o síndromes relacionado entre el síndrome de Sjögren (SS) y otras enfermedades autoinmunes. Este trastorno es caracterizado por aumento en la actividad de la inmunidad celular y humoral dada su predilección por el sexo femenino con una incidencia en el 90% con una edad comprometida de entre 35 y 60 años. Las principales alteraciones que se presentan en modelos de animales, que se asocian al síndrome de Sjögren a nivel inmunohistoquímico, sólo se han descrito en casos aislados. El propósito del presente trabajo es mostrar la serie de anomalías ocurridas espontáneamente en el ratón CD1 *et/et* (cepa mutante de la CD1 que se produce en el bioterio de la FES Zaragoza). Se estudiaron tres grupos de animales que incluyen a la cepa CD1 (eutélica), CD1 *et/+* (portadora del gen de hipotímia) y CD1 *et/et* (ratón hipotímico), los ratones a estudiar son de ambos sexos, con una edad que va de las 15 a 68 semanas de nacidos, realizándole los siguientes ensayos: Factor Reumatoide por aglutinación pasiva usando IgG heteróloga; Electroforesis en acetato de celulosa; presencia de anticuerpos antifosfolípido por ELISA a los isotipos IgA, IgM e IgG, hallazgos histopatológicos de la glándula lagrimal y salival de acuerdo a los criterios de Fox R.I.²⁴ Con los resultados del presente trabajo se pretende utilizar el modelo animal para posteriores trabajos con el fin de conocer la etiopatogenia de la enfermedad y así poder probar fármacos e inmunoestimulantes.

3.1 Historia

Los antecedentes del síndrome de Sjögren (SS) se remontan hasta 1892 cuando Johann von Mikulicz Radecki describió a un paciente con crecimiento bilateral de las glándulas salivales y lagrimales.¹ El examen con microscopía demostró la existencia de atrofia del parenquima acinar e infiltrado difuso por linfocitos; con el tiempo fueron identificados nuevos casos con crecimiento de las glándulas salivales debido a infiltrado por células linfoides, que se denominaron como "Enfermedad de Mikulicz"; la mayoría de estos casos se asociaron a patologías que en la actualidad se identifican como tuberculosis, sarcoidosis, linfoma e infecciones por piógenos que pueden afectar los conductos salivales; otros se vincularon con alteraciones autoinmunes como la existencia de hiperglobulinemia o de autoanticuerpos; con el transcurso del tiempo el término "Enfermedad de Mikulicz" resultó ser difuso, carente de significado diagnóstico y terapéutico.²⁴

Es hasta el año de 1933 cuando Herick Sjögren describió la asociación de queratoconjuntivitis sicca, sequedad de boca (xerostomía) y Artritis Reumatoide (AR); considerando esta asociación de síntomas (síntomas sicca) como SS,² Morgan y Castleman en 1953 demostraron que el tipo de infiltrado encontrado en el SS y el descrito en la "Enfermedad de Mickulicz" eran similares.³

Bloch y colaboradores propusieron subdividir al SS en primario y secundario;⁴ el SS secundario incluye a los pacientes con síntomas sicca asociados con una enfermedad en particular (AR, Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Esclerodermia o Dematomiositis), mientras que el SS primario (SSp) no muestra asociación con ninguna otra enfermedad, su sustrato fisiopatológico implica la infiltración linfocitaria crónica de las glándulas salivales y lagrimales mediada por mecanismos relacionados con la autoinmunidad.; con frecuencia el SSP puede tener manifestaciones extraglandulares no específicas como neumonitis, nefritis intersticial y tiroiditis.⁵

3.2 Generalidades

El síndrome de Sjögren primario (SSP) es una enfermedad autoinmune con sustrato inmunopatológico caracterizado por aumento en la actividad de la inmunidad celular y humoral, que determina el depósito de complejos inmunes a nivel multisistémico;⁶ es una enfermedad inflamatoria crónica de patogenia inmunológica, cuya característica clínica fundamental es la sequedad ocular y orofaríngea (síndrome seco); esta se produce por la destrucción progresiva de las glándulas salivales y lagrimales por un infiltrado linfoplasmocitario. La enfermedad, como proceso sistémico, puede afectar también al resto del sistema exocrino y a diversos órganos extraglandulares, lo que ha llevado a algunos autores a distinguir una forma glandular y otra extraglandular; clínicamente, el SS se clasifica en primario cuando se presenta de forma aislada y secundario cuando se asocia a otras enfermedades autoinmunes como la AR, LES, la Polimiositis y la Esclerodermia.

En el caso de la AR, el diagnóstico de esta entidad habitualmente precede en varios años al diagnóstico de SS y la manifestación principal de esta última suele ser queratoconjuntivitis seca, siendo muy infrecuente la afectación de otros órganos glandulares y extraglandulares; por el contrario, en el caso de asociación a otras enfermedades sistémicas, el SS tiene un comportamiento similar al SS primario, por lo que recientemente se ha propuesto otra clasificación: a) SS primario, b) síndromes de solapamiento entre SS y otras enfermedades autoinmunes, y c) SS secundario a AR.⁷

3.3 Epidemiología

El SS afecta fundamentalmente a mujeres (relación 9/1) en edad media de la vida (35-60 años);⁸ la frecuencia de la enfermedad en la población general no se conoce con exactitud; la diferencia de criterios diagnósticos modifican los resultados de las investigaciones epidemiológicas y muchos pacientes con procesos leves no se diagnostican; los familiares de estos pacientes tienen mayor predisposición a padecer de enfermedades autoinmunes como el propio SS o el LES. El SS afecta a todas las razas y su distribución geográfica es

universal; existe acuerdo general en que el SS secundario aparece en el 30% o más de los pacientes con AR, en el 10% de los pacientes con LES y en el 1% de los pacientes con esclerodermia.

3.4 Etiopatogenia

La etiología del SS es desconocida, pero en los últimos años la información de que se dispone ha aumentado de forma notable y permite aventurar algunas hipótesis; actualmente se piensa que el SS es consecuencia de: **a)** la interacción de algún factor ambiental con factores constitucionales, determinados genéticamente, **b)** esto provoca una respuesta inmune alterada que se perpetúa por diversos mecanismos, y que produce los fenómenos autoinmunes del SS, **c)** con la consiguiente destrucción del tejido afectado.

3.4.1 Factores externos

Se considera que el factor ambiental etiológico más importante son los virus; en algunos casos, la enfermedad comienza coincidiendo con una infección vírica aguda y en otros con la reactivación de un proceso vírico latente; se han implicado al virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, herpes virus humano tipo 6, virus C de la hepatitis y a los retrovirus en la patogenia del SS, pero los datos de que se dispone no son concluyentes.⁷⁻¹⁶ En varios pacientes con SS se han detectado partículas retrovíricas de tipo A (que tienen importante parecido con las partículas del virus de la inmunodeficiencia humana)¹⁵ y, en algunos estudios, aproximadamente el 30% de estos enfermos tienen anticuerpos contra la glucoproteína p24 de la cápside vírica del HIV, mientras que en la población general esto ocurre sólo en el 1-4%; se ha observado también la presencia del gen tax del HTLV1 en glándulas salivales menores de pacientes con SS, en ratones transgénicos portadores de este gen presentan una exocrinopatía autoinmune que semeja al SS;¹⁸ además, se ha descrito un proceso similar al SS en la infección por HTLV-1 y en la del VIH; últimamente

se está llamando la alteración sobre la aparición de síndrome seco en pacientes con virus C de la hepatitis y en diversos trabajos se ha puesto de manifiesto que la infección crónica por este agente puede dar lugar a alteraciones en la gammagrafía salival y en la biopsia de glándula salival menor indistinguibles de las que se producen en el SS.¹⁶

3.4.2 Factores internos

Los factores constitucionales más relevantes son las hormonas y el complejo mayor de histocompatibilidad; la mayor prevalencia del SS en mujeres sugiere que algún factor hormonal desempeña un papel patogénico; las hormonas sexuales son capaces de regular diversas funciones inmunes, de forma general se puede sugerir que los andrógenos son inmunosupresores naturales mientras que los estrógenos son inmunoestimulantes; a pesar de ello, el SS no parece mejorar en la menopausia, y la terapia hormonal sustitutiva no produce exacerbaciones de la enfermedad.⁷ Todo ello sugiere que el predominio en la mujer no se explica únicamente por los niveles de estrógenos; se ha descrito la asociación del SS primario con los antígenos B8, DR2, DR3, DR5, DQ1, DQ2 y DRw53 del sistema HLA, mientras que el SS secundario se ha asociado al DR4 (en el contexto de AR); en diversos estudios se ha comprobado la expresión de antígenos del grupo HLA-DR, tanto en el acino como en el epitelio de las glándulas salivales.

3.4.3 Respuesta inmune alterada y perpetuada

Entre los mecanismos implicados en la respuesta inmune alterada de estos pacientes se ha propuesto tres líneas principales: anomalías en la regulación linfocitaria periférica y en la selección del repertorio de células T, alteraciones en la proliferación de células B y, finalmente, la expresión de autoantígenos.⁷

18, 19

Para algunos autores, en la patogénesis del SS parece ser relevante la existencia de errores en la selección tímica de clones de células T potencialmente autorreactivas; otro aspecto potencialmente implicado en la patogenia del SS es el relacionado con el control periférico de los linfocitos T autorreactivos; existe evidencia de que células T autorreactivas pueden progresar hacia la anergia o apoptosis al reconocer en ciertas circunstancias a los antígenos propios en la superficie celular.

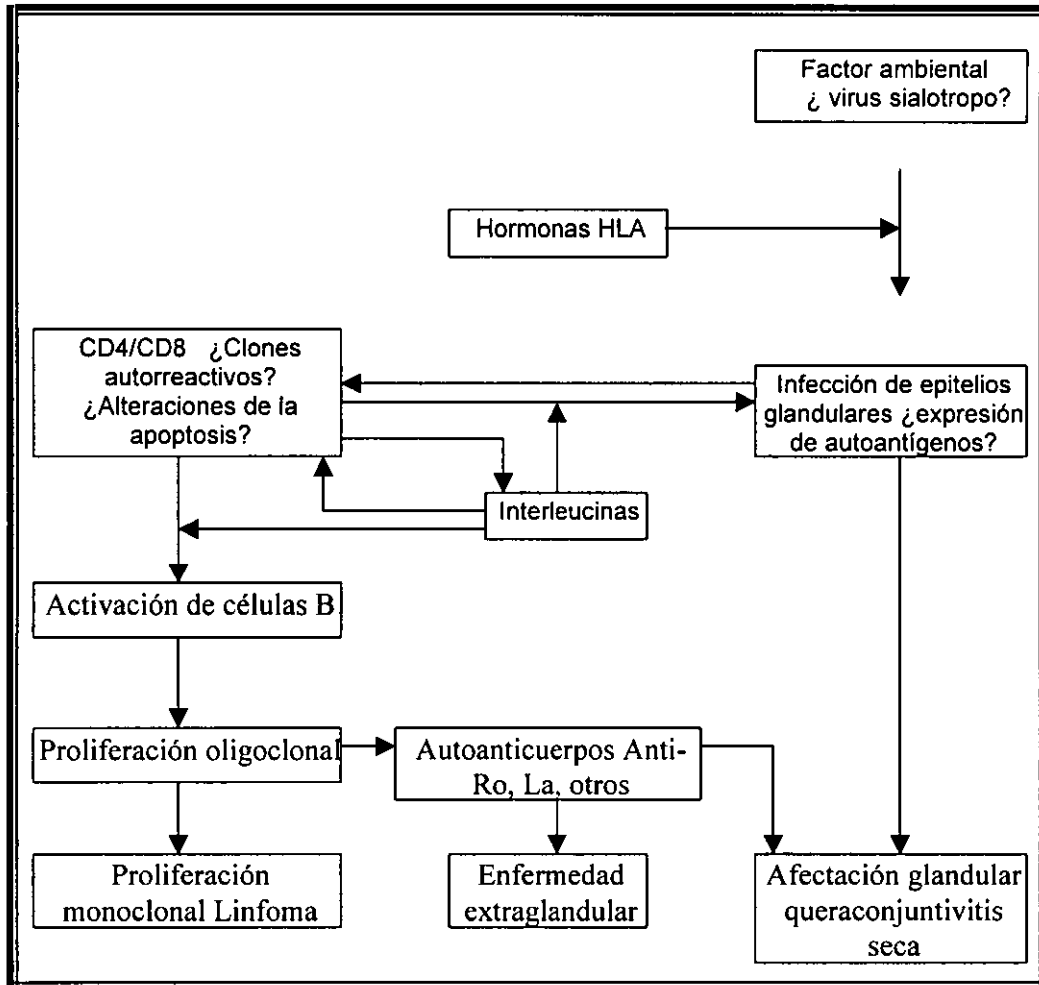
En los lugares de infiltración glandular y tisular en general se produce acumulación de linfocitos, la mayoría son linfocitos T CD4+ entre 45-50% y en menor cantidad linfocitos T CD8+ en un 10-20%. Los linfocitos T secretan diversas citosinas que regulan y mantienen la respuesta inmune, estas moléculas modulan la activación y proliferación de otras poblaciones linfocitarias, así como la expresión de antígenos de clase II del sistema HLA en las células parenquimatosas del órgano afectado. Algunos trabajos sugieren que el interferón- γ (IFN- γ) es una citosina relevante en la patogénesis del SS. Se ha encontrado tanto en los conductos excretores, como en el infiltrado linfocitario y en los vasos sanguíneos de biopsias de glándula salival de pacientes con SS, existiendo una fuerte correlación con la expresión de DR y la distribución del infiltrado linfocitario; todos estos datos apoyan la hipótesis de que el IFN- γ , segregado por los linfocitos que infiltran el tejido glandular, se une a receptores de las células epiteliales y de esto resulta un aumento de la expresión de antígenos de clase II del sistema HLA con la consiguiente facilitación de la interacción con linfocitos T CD4+. También se encuentra elevada la producción de interleucina-2 (IL-2) en las muestras de secreción salival, mientras que en la sangre periférica esta disminuida. El factor transformador de crecimiento- β (TGF- β), según estudios recientes, puede tener cierto efecto protector contra la aparición del SS en animales sanos; en seres humanos se ha observado una correlación inversa entre la presencia del TGF- β y del grado de afectación de las glándulas salivares. En general, el estudio de las interleucinas en los pacientes con SS pone de manifiesto el aumento de la producción de IFN- γ e IL-2 y disminución de TGF- β , interleucina-3, interleucina-4 e interleucina-5; este perfil es característico de las denominadas respuestas "Th1" lo que apoya la hipótesis de que en el tejido inflamado se está

produciendo presentación de antígenos y como consecuencia de ello se provoca una respuesta específica de células T.

La hiperactividad inmunitaria en los tejidos lesionados suele acompañarse, sin embargo, de linfopenia en el 50% de los casos con una marcada reducción de células T CD8+ y un aumento relativo de células B; aproximadamente el 10-20% del infiltrado glandular son linfocitos B, fundamentalmente en forma de células plasmáticas que producen IgA e IgG. Esto parece ser consecuencia de que las células B maduran rápidamente hacia plasmáticas, probablemente por la interacción con linfocitos T en las áreas de inflamación; la activación de los linfocitos B es una característica típica del SS, recientemente se ha considerado que esta activación policlonal de los linfocitos B es una consecuencia inespecífica de la alteración en la regulación del funcionamiento linfocitario, pero actualmente esta idea está siendo sustituida por la hipótesis de que dicha activación está dirigida por determinados antígenos. Se ha postulado que la activación de linfocitos B empieza siendo policlonal y localizada en los tejidos glandulares, posteriormente pasa a ser oligoclonal-monoclonal apareciendo enfermedad sistémica, y finalmente es preferentemente monoclonal, apareciendo transformación maligna.

Los autoanticuerpos característicos del SS son los denominados anti-Ro y anti-La (también referidos como anti-SSA y anti-SSB respectivamente); diversos hechos apoyan el posible papel patogénico de anti-Ro y anti-La, estos autoanticuerpos están fuertemente asociados a las formas severas de SS y con manifestaciones clínicas más precoces. Asimismo, los pacientes con SS desarrollan con cierta frecuencia enfermedad por inmunocomplejos (vasculitis, glomerulonefritis) o crioglobulinemia. Además, estas partículas proteicas (proteínas Ro y La) tienen importantes analogías en la secuencia de aminoácidos con diversas proteínas víricas, fundamentalmente de retrovirus, también implicadas en el procesamiento del ARN vírico; esto ha dado lugar a varias hipótesis patogénicas; una posibilidad es la existencia de mimetismo molecular que induzca una reactividad cruzada antigénica, otra es que algunas ribonucleoproteínas, al unirse al ARN vírico, se comporten como autoantígenos; recientemente se ha demostrado que, en el SS, se produce translocación de antígenos nucleares a la superficie celular, entre los que incluyen Ro y La. Esto podría proporcionar un mecanismo para la expresión

de autoantígenos y contribuir a la patogénesis de la respuesta inmune que destruiría las glándulas exocrinas. En el esquema 1 se representa esquemáticamente la sucesión hipotética de hechos implicados en la patogenia del SS.²⁰



Esquema. 1 Patogenia del síndrome de Sjögren

3.5 Clínica

El SS suele ser un proceso de espectro clínico amplio, desde cuadros asintomáticos no diagnosticados durante años, hasta situaciones graves con afectación sistémica que pueden acabar con la vida del paciente; en la mayoría de los pacientes, el SS se desarrolla lentamente, de tal forma que el diagnóstico no suele establecerse hasta después de ocho a diez años desde que se iniciaron los síntomas; el SS primario se acompaña con más frecuencia de afectación extraglandular, mientras que el secundario suele limitarse a las mucosas, siendo más prominentes los síntomas de la enfermedad asociada. No existe relación entre la gravedad de la afectación glandular y la extraglandular.

3.6 Afectación glandular

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la sequedad ocular (xerofalmia) y orofaríngea (xerostomía) que suelen manifestarse de manera insidiosa.

La película lagrimal esta compuesta por tres capas: una externa constituida por fosfolípidos secretados por las glándulas de Meibomio, una media que supone el 90% del grosor total que contiene fundamentalmente agua, además de moléculas con actividad antimicrobiana como lisocima, lactoferrina e inmunoglobulinas y, por último, la capa más interna, que es mucoide, secretada por las células de Goblet de la conjuntiva; el componente principal de la saliva es también el agua, en la que se encuentran disueltas enzimas y electrolitos, todo ello secretado por el componente epitelial y una pequeña proporción de moco producido por el acino glandular; en ambos casos es el componente acuoso el que primero se altera en el SS, dando lugar a una sensación subjetiva de sequedad ocular y orofaríngea; esto probablemente refleja que el epitelio ductal es el que más precozmente se afecta por el infiltrado inflamatorio. El mecanismo por el que se reduce la secreción lagrimal y salival es objeto de cierto debate; la creencia previa de que el fallo glandular era debido simplemente a la infiltración inflamatoria parece ser incorrecta, al menos

en parte; de hecho, la atrofia acinar, la hiperplasia ductal y la dilatación de las glándulas salivales, son consideradas actualmente como alteraciones poco específicas y probablemente más en relación con la edad.⁷ El grado de daño epitelial no siempre corresponde con la alteración del flujo salival y la estimulación con fármacos, como la policarpina, a menudo restaura el flujo salivar normal en pacientes que presentaban importante sequedad oral; estas observaciones han hecho sugerir a algunos autores que el infiltrado mononuclear puede inhibir la función exocrina mediante la liberación de sustancias con efectos antiseoretos o por otras interacciones con la célula epitelial que no supongan la destrucción de la misma. La influencia del sistema nervioso puede ser otro mecanismo importante; la glándula salival esta ricamente innervada, el sistema parasimpático parece fundamentalmente implicado en la secreción acuosa y el simpático en la mucinosa; en biopsias de la glándula salival menor de pacientes con SS se ha observado una importante destrucción de fibras nerviosas productoras de polipéptidos intestinal vasoactivo, lo que sugiere que un descenso del estímulo neurogénico puede contribuir a la disfunción glandular.

La sequedad ocular suele ser descrita como "sensación de arenilla intraocular", "ardor ocular" o "fatiga visual", pudiendo acompañarse de otras manifestaciones, como disminución de agudeza visual y dolor ocular; la exploración puede revelar, dependiendo de la severidad, una conjuntiva deslustrada e hiperémica con filamentos mucosos, pérdida del contenido líquido en el saco conjuntival inferior y ulceraciones corneales (queratoconjuntivitis seca). La sequedad ocular puede objetivarse mediante la prueba de Schimer (positiva cuando la humidificación es menor o igual a 8 mm después de 5 min); en la tinción con fluoresceína pone de manifiesto las zonas dañadas del epitelio corneal y en la tinción con Rosa de Bengala es, probablemente, más sensible, dado que tiñe también las zonas de epitelio desvitalizado aun sin erosionar; la conjuntivitis infecciosa, fundamentalmente por *Staphylococcus aureus*, y la blefaritis pueden complicar el cuadro.

La sequedad oral provoca la ingestión frecuente de líquidos para mejorar la deglución de los alimentos y puede acompañarse de otros síntomas, como disfagia o alteraciones en el sentido del gusto; a la exploración suele observarse ausencia de líquido en el receso sublingual y atrofia de las papilas

de la lengua; un tercio de los pacientes, fundamentalmente en el SS primario, desarrolla tumefacción parotídea, por lo general bilateral, no dolorosa, y de consistencia firme, pueden presentarse episodios agudos, similares a una parotiditis aguda que a veces se debe a la obstrucción de los conductos excretores; la queilitis angular, candidiasis crónica eritematosa de la lengua y la caries dental son complicaciones relativamente frecuentes. La deficiencia funcional salivar puede cuantificarse mediante técnicas normalizadas de sialometría (menos de 5 mL por glándula a los 10 min) o por gammagrafía isotónica; la biopsia de glándula salival menor suele mostrar un infiltrado linfocitario, destrucción del epitelio glandular y grados variables de fibrosis, en algunos pacientes es posible observar parte de la glándula bien conservada, por lo que, en estos casos, la insuficiencia salivar se atribuye a la destrucción del estímulo neurógeno necesario para su funcionamiento. La sequedad de mucosas puede extenderse a otras localizaciones, dando lugar a epistaxis, otitis o dispareunia; la afectación pancreática puede causar hiposecreción pancreática e hipoclorhidria, la sequedad cutánea también es frecuente.

3.7 Afectación extraglandular

La enfermedad sistémica en el SS puede cursar con síntomas generales como hipoastenia, hipoadinamia o febrícula-fiebre persistente, o con las manifestaciones específicas producidas por el compromiso de diferentes órganos, existe afectación articular en aproximadamente el 50% de los pacientes, artralgias y más infrecuente como poliartritis no erosiva, de curso crónico o recidivante, afectando grandes y pequeñas articulaciones, de forma bilateral, en ocasiones se produce artropatía de Jaccoud, en algunos pacientes puede ser difícil hacer la distinción con el inicio de una AR acompañada de SS secundario.

Se observa afectación renal en el 30-40% de los casos, lo habitual es que se produzca nefropatía intersticial moderada, que se expresa por alteraciones tubulares (acidosis tubulorrenal, diabetes insípida, síndrome de Fanconi) y que rara vez evoluciona a insuficiencia renal terminal; la glomerulonefritis es

infrecuente, se asocia a crioglobulinemia y obliga a plantear la posibilidad de LES.

La afección del aparato respiratorio es frecuente, pero en pocas ocasiones es clínicamente relevante; la desecación del árbol traqueobronquial da lugar a tos persistente, se ha descrito obstrucción de la vía aérea pequeña, acompañada de inflamación linfocitaria peribronquial; el lavado bronqueoalveolar ha mostrado una alta frecuencia de alveolitis linfocitaria, que suele ser asintomática y sin traducción radiológica, aunque algunos de estos casos desarrollan posteriormente neuritis intersticial que puede progresar a fibrosis pulmonar. La infiltración linfomatosa del parénquima pulmonar puede ser difícil de distinguir de la neuritis intersticial, aunque su patrón radiológico suele ser diferente (nódulos) y se acompaña de adenopatías mediastínicas. El derrame pleural es casi exclusivo del SS secundario a AR; la elevada incidencia de infecciones respiratorias descritas previamente parece haber disminuido en la actualidad, debido a la menor utilización de tratamientos inmunosupresores.

La disfagia es el síntoma gastrointestinal más frecuente, probablemente debida a xerostomía, aunque se ha descrito también alteraciones de la motilidad esofágica; pueden producirse otras alteraciones, como aclorhidria, gastritis atrófica, hiposecreción pancreática o trastornos de absorción, pero suelen ser sintomáticas y sólo evidenciables mediante pruebas diagnósticas; la pancreatitis aguda o crónica es rara, pero la hiperamilasemia asintomática puede presentarse hasta en un 25%, existe una clara asociación del SS con la cirrosis biliar primaria y con la hepatitis crónica activa (25-33%), el 50% de los pacientes con cirrosis biliar primaria presentan sequedad ocular y faríngea. La mayoría de los casos en los que coexisten estas enfermedades siguen un curso clínico y presentan una asociación con antígenos HLA similares al SS secundario a AR.

La afectación del sistema nervioso central (SNC) es motivo de controversia, si bien en algunos trabajos parece más frecuente de lo que se ha considerado hasta ahora, llegando a diagnosticarse en el 20% de los casos, otros estudios no han confirmado este hecho; la resonancia magnética es la técnica más sensible para detectar estas alteraciones. La expresión clínica es muy variada e incluye deficiencias focales, convulsiones, movimientos anormales,

enfermedad de Parkinson, meningitis aséptica, en ocasiones recurrentes, alteraciones cognitivas, alteraciones psiquiátricas, demencia, mielitis transversa, mielitis crónica progresiva, enfermedad de motoneurona, algunos pacientes presentan un cuadro similar a la esclerosis múltiple, aunque no del todo conocido, el mecanismo patogénico parece ser una vasculitis que afecta predominantemente a los vasos de pequeño calibre del lecho vascular cerebral; la afectación del SNC se asocia a anticuerpos anti-Ro y a una vasculitis de otros órganos; la polineuropatía periférica sensitiva o sensitivomotora probablemente es más frecuente que la afectación del SNC; la mononeuritis y la neuropatía craneal (como la afectación del nervio trigémino o del óptico), únicas o múltiples, no son infrecuentes y tienen el mismo mecanismo patogénico. Ocasionalmente el SS puede comenzar con mialgias y debilidad muscular proximal similar a una polimiositis, pero las enzimas musculares suelen estar en el rango sérico normal o ligeramente elevado.

El 5-10% de los pacientes desarrolla vasculitis por lo general en forma de lesiones cutáneas purpúricas o urticariales en las extremidades inferiores, pero también pueden producirse formas sistémicas graves; se han identificado dos tipos de vasculitis en el SS, según el tipo de infiltrado linfocitario: la de tipo mononuclear, que suele cursar como una vasculitis por hipersensibilidad, y la de tipo neutrofílico que suele acompañarse de hipergammaglobulinemia, títulos altos del factor reumatoide, crioglobulinemia, anticuerpos anti-Ro e hipocomplementemia; algunos autores incluyen un tercer tipo que correspondería a casos de endarteritis obliterante en pacientes con SS y una larga historia de vasculitis.

Cerca del 30% de los pacientes presenta fenómeno de Raynaud; habitualmente precede a las manifestaciones oculofaríngeas durante años y se asocia a mayor frecuencia de poliartrosis. Aunque hasta el 50% de los casos presentan anticuerpos antitiroideos, sólo el 5% presenta enfermedad autoinmune de esta glándula similar a la tiroiditis de Hashimoto, y la hipofunción tiroidea es rara.

En el 5-10% de los casos se desarrolla un síndrome linfoproliferativo peculiar, que suele manifestarse por linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, tumefacción parotídea o infiltración de otros órganos, como pulmón, piel tracto gastrointestinal o médula ósea; estos casos suelen seguir un curso prolongado

e indolente y no tienen criterios histológicos de malignidad por lo que se les ha denominado pseudolinfomas; no obstante, el 10% de estos enfermos desarrollan linfoma maligno. La disminución o desaparición de los autoanticuerpos, de los valores séricos de IgM o de otras inmunoglobulinas, la hipocomplementemia persistente y el aumento de beta2 microglobulinemia, suele sugerir transformación maligna.

Se observa un aumento de incidencia de linfomas en los pacientes con SS, aunque la magnitud real de este problema es objeto de debate, la mayoría son de estirpe B, manteniendo la capacidad de síntesis de inmunoglobulinas, aunque la apariencia morfológica es variable, desde casos altamente indiferenciados a otros bien diferenciados; algunos se acompañan de gammapatía monoclonal IgM, IgG, IgA o de cadenas ligeras; en Occidente, el tipo IgM-k es el más frecuente.

3.8 Exploraciones complementarias

La alteración de laboratorio más característica es la aparición de diversos **Autoanticuerpos**,²⁰ el Dr. Joseph J. Bunim es uno de los primeros en reconocer el amplio espectro de autoanticuerpos presentes en los pacientes con síndrome de Sjögren; estos fallos son confirmados por Bloch y colaboradores en 1965 y Whaley y colaboradores en 1973.²³ Los más frecuentes son:

La mayoría de los autoanticuerpos más comunes encontrados en el síndrome de Sjögren es el **factor reumatoide**,²⁰ son inmunoglobulinas con especificidad para el fragmento Fc de la IgG⁵⁵ está presente en niveles altos (60-70%)²⁰ con o sin artritis reumatoide y este es reactivo contra ambos tipos de inmunoglobulinas ya sea de humanos o IgG de conejo.

Las tres principales clases de **inmunoglobulinas** pueden ser elevadas en el síndrome de Sjögren; siendo la fracción IgG es la mas elevada, IgA e IgM aparecen solo poco elevados. Debido a que en el síndrome de Sjögren ante todo se implica a la superficie mucosa, este es tal vez sorprendente que los niveles de IgA son los menos afectados, la IgA secretoria puede ser elevada en el suero, pero la IgA secretoria es solo una pequeña parte de la IgA total en

suero y además han mostrado ser elevados en muchas otras enfermedades crónicas. Los niveles de IgM e IgG salivales son elevados en los pacientes con síndrome de Sjögren y son relacionadas con el grado de compromiso de la glándula salival.

En la separación de proteínas en un campo eléctrico, los niveles de **gammaglobulina** son altos; la crioglobulinemia es la complicación del síndrome de Sjögren, estas también están presentes en vasos de linfomas y mielomas múltiple; las crioglobulinas son inmunoglobulinas compuestas de aminoácidos y carbohidratos; los niveles de β^2 -microglobulinas son elevadas en la orina, suero, y saliva de pacientes con síndrome de Sjögren, la elevación de las β^2 -microglobulinas en suero puede ser muy útil para pronosticar una recaída de la característica clínica del síndrome de Sjögren, mientras que cuando bajan las β^2 -microglobulinas indica un mejoramiento clínico, los niveles de β^2 -microglobulinas salivales pueden ser usados para predecir el compromiso de la glándula salival con altos niveles refleja la extensa infiltración de células mononucleares.²³

Los **anticuerpos antifosfolípidos (AFL)**, incluyen varios tipos como los que se descubrieron inicialmente en las enfermedades infecciosas; además, se conocen ahora otros AFL como son los reactivos contra cardiolipina o los denominados anticoagulante de lupus; estos AFL pueden ser isotipo IgG, IgM o IgA, la mayor relevancia actualmente se confiere al isotipo IgG.

Los **anticuerpos antinucleares (ANA)** estos anticuerpos van dirigidos contra constituyentes nucleares, de ordinario en la nucleoproteína; están presentes en una proporción 50-90% y los anticuerpos contra antígenos nucleares ribonucleicos como Ro (SSA) en un 40-50%, y La (SSB) en un 50%, estos últimos aparecen fundamentalmente en el SS primario, siendo menos frecuentes en la forma secundaria, los **anti-La (SSB)** son los más específicos ya que son raros en otras enfermedades autoinmunes, excepto en el LES, en el que pueden aparecer en el 10% de los casos; los anticuerpos anti-Ro (SSA) son más frecuentes pero pueden aparecer también en otras enfermedades autoinmunes como el LES (hasta en el 40%) o el lupus cutáneo subagudo. Los anti-RANA se han descrito fundamentalmente en el SS secundario a AR. También es frecuente la aparición de anticuerpos organoespecíficos, como los

antitiroideos, anti-célula parietal gástrica, antimitocondriales, anti-músculo liso o anti-glándula salival. Como consecuencia de la hiperactividad de los linfocitos B, es frecuente encontrar **hipergammaglobulinemia policlonal** (50-80%), elevación de los niveles de IgM, inmunocomplejos circulantes, crioglobulinemia y gammapatía monoclonal.

En el **estudio hematológico** se puede observar leucopenia, anemia, trombocitosis y aumento de velocidad de sedimentación eritrocitaria; la afectación renal da lugar a acidosis tubulorrenal, diabetes insípida o síndrome de Fanconí.

La **sialometría** mide el flujo salivar, con y sin estimulación; sin embargo, éste depende de muchos factores como edad, sexo, tipo de ingesta y momento de día; además, existe importante variedad interindividual, por lo que suele ser de poco valor para el diagnóstico del SS.

La **sialografía** es un método radiográfico que permite observar cambios anatómicos en el sistema ductal, habitualmente se realiza con contrastes oleosos; es una técnica molesta y en diversos estudios se ha comprobado que es poco útil por su baja especificidad y sensibilidad; sin embargo, en un trabajo reciente realizado con contrastes solubles en agua en un grupo de 84 pacientes con SS primario y secundario, se encontró que la sialografía fue tan sensible y específica como la biopsia de glándula salival menor. Asimismo, la hipergammaglobulinemia, los anticuerpos anti-Ro (SSA), las manifestaciones extraglandulares y la tumefacción parotídea presentaron una importante correlación, tanto los hallazgos sialográficos como con los histológicos; esta técnica se realiza mediante la canalización del conducto de Stenon y la aplicación del material de contraste liposoluble, posteriormente se toman radiografías antero-posterior, lateral, oblicuas y postvaciamiento, valorándose la presencia de: 1) Sialectasias: dilataciones anormales de los conductos intraglandulares; 2) Atrofia: disminución en el número y diámetro de los conductos salivares y 3) Retención del medio de contraste: cualquier medio de contraste que sea visto dentro de la glándula parótida, cinco minutos después de absorber jugo de limón, es considerado como retención anormal del medio de contraste.²⁸

La **gammagrafía parotídea** proporciona una evaluación funcional global del sistema salival; se realiza mediante la administración intravenosa de

pertecnecato de Tecnecio 99 y se mide la velocidad y la densidad de captación del isótopo en el sistema salival, así como el tiempo en que tarda en aparecer en la boca, durante un periodo de observación de 60 minutos tras la inyección; en pacientes con SS, la captación y la excreción está retrasada o ausente, la disminución de captación del isótopo y de su excreción a la boca correlaciona con la disminución del flujo salival y el grado de infiltración linfocitaria. Es un método con alta sensibilidad, pero con poca especificidad para el diagnóstico del SS.

La **Biopsia de glándula salivar menor** se realiza mediante biopsia de labio, habitualmente la mucosa del inferior, es una técnica sencilla que consiste en identificar un cúmulo de glándulas salivales menores y realizar una pequeña incisión con bisturí, tras la cual se procede a su extracción. El cuadro histopatológico característico del SS consiste en la infiltración tisular por agregados de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, sustituyendo en grado variable al tejido glandular y afectando a la mayoría de las glándulas contenidas en el material de la biopsia; en los focos de infiltración linfocitaria de mayor tamaño pueden llegar a verse centros germinales pero la presencia de islotes mioepiteliales, característicos de la sialoadenitis linfocítica crónica, son muy infrecuentes. La biopsia debe contener al menos cuatro lóbulos glandulares, en los que se debe hacer una graduación en términos de número de **focos de infiltración linfocitaria** por área de 4mm^2 ; un foco linfocitario está constituido por **50 linfocitos** o más; la presencia de dos o más focos por área se considera diagnóstica, en términos anatomopatológicos; grados menores de infiltración se consideran como sugestivos; se considera que la biopsia del labio tiene una sensibilidad del 82% y una especificidad del 86%.²⁰

3.9 Diagnóstico

El diagnóstico del SS depende de la valoración del conjunto de manifestaciones clínicas y resultados de las exploraciones complementarias, ya que ninguna de ellas, de forma aislada, proporciona un diagnóstico de certeza; ello ha llevado a la elaboración de criterios para su diagnóstico que permitan

además homogeneizar el manejo de pacientes, tanto en la práctica diaria como en la investigación clínica; aunque ninguna de las propuestas se ha aceptado de forma universal, los criterios más utilizados en Europa y América,²⁰ son los criterios que derivan de los publicados previamente por el mismo grupo en el Simposium de San Diego en 1986 (Tabla 1), y se reproducen debido a que se han realizado diversas adaptaciones a saber: a) cambia la denominación de "propuesta de criterios de diagnósticos para el síndrome de Sjögren" por la de "criterios de San Diego para el síndrome de Sjögren"; b) se modifica la estructuración, considerando las categorías diagnósticas principales de síndrome de Sjögren primario y secundario; c) se realizan modificaciones mínimas a algunas variables, como la prueba de Schirmer, títulos de autoanticuerpos, etc. d) se omite en las exclusiones, las cuales quedan de la siguiente manera "sarcoidosis, linfoma preexistente, VIH, virus de la hepatitis B o C, fibromialgia primaria y otras causas conocidas de neuropatía autónoma, queratitis sicca y crecimiento de glándulas salivales".²¹ Como en otras enfermedades autoinmunes, estos criterios deben ser individualizados en cada paciente y no aplicarse de manera rígida; habitualmente, el diagnóstico está bien establecido cuando un paciente presenta todas las alteraciones incluidas en los dos primeros puntos de la tabla 2 y al menos una de las del tercer punto ("SS definido"); sin embargo, es frecuente encontrar pacientes con manifestaciones del SS que no cumplen con todos los criterios ("SS posible o probable"), en cuyo caso es importante realizar evaluaciones periódicas. Recientemente se han aplicado técnicas de inmunohistoquímica a las biopsias de glándula salival menor, observándose que la presencia de células plasmáticas productoras de IgM en una cantidad superior al 10%, o de secretoras de IgA en un porcentaje inferior al 70%, tiene una sensibilidad cercana al 90% y una especificidad del 60-90% para el diagnóstico de SS, con del grado de infiltración linfocitaria.²⁰

En general, en la práctica clínica, ante un paciente que presenta síntomas de sequedad ocular y faríngea se debe realizar una historia y examen físico adecuados en busca de afectación extraglandular o enfermedad asociada, posteriormente, un planteamiento diagnóstico adecuado sería, probablemente, demostrar afectación ocular mediante una prueba de Schirmer y otra de Rosa de Bengala, comprobar hipofunción salivar mediante gammagrafía parotídea o

biopsia de labio puede obviarse o reservarse para casos dudosos o pacientes que se van a incluir en un estudio.

SS primario

1. Síntomas y signos de sequedad ocular.
 - Prueba de Schirmer positiva (menor de 9mm a los 5 minutos).
 - Tinción positiva en la prueba con rosa de Bengala o fluoresceína que demuestre afectación corneal (queratoconjuntivitis seca).

2. Síntomas y signos objetivos de sequedad oral.
 - Disminución de flujo de saliva usando copas de Lashley u otro método.
 - Biopsia de glándula salivar menor anormal (más de 2 focos linfocitarios por área).
 - Presencia de trastornos autoinmunitarios (uno o más).
 - Factor reumatoide elevado ($> 1/320$).
 - AAN a título alto ($> 1/320$).
 - Anticuerpos anti-SSA o anti-SSB.

SS secundario

Signos y síntomas característicos del SS primario definidos en el punto 1, más datos clínicos suficientes para el diagnóstico de AR, LES, polimiositis o esclerodermia.

Exclusiones

Se debe excluir los pacientes con sarcoidosis, linfoma preexistente, infección por VIH y otras causas de queratitis seca o crecimiento de glándulas salivales.

Tabla 1. Criterios de San Diego para el síndrome de Sjögren según fox RI²¹

Un peculiar grupo de pacientes es el de personas ancianas con sequedad ocular y faríngea, estos síntomas son bastante frecuentes en la edad

avanzada, llegando a afectar el 25% de la población mayor de 70 años; en la mayoría de los casos es consecuencia de una atrofia de las glándulas salivales relacionada con la edad, sin otras manifestaciones de enfermedad autoinmune, sin embargo, algunos de estos pacientes tienen títulos bajos de AAN, lo que puede llegar a cierto grado de confusión. En general, salvo que existan otros datos que lo sugieran, estos pacientes no deben ser diagnosticados de SS.

3.9.1. Electroforesis

FUNDAMENTO

El término de electroforesis se puede definir como una técnica en la cual una partícula cargada se hace desplazar a través de un medio aplicando un campo eléctrico; las velocidades de migración son función de la densidad de carga, por lo que se podrán separar unas partículas de otras con arreglo a esta propiedad. A su vez, la densidad de carga de la partícula será función de una serie de parámetros que marcan las condiciones experimentales de la electroforesis: pH, fuerza iónica, gradientes de voltaje, interacciones con el soporte, etc.

En su aplicación práctica, el proceso de electroforesis consta de las siguientes fases:

Selección o preparación de las muestras: El análisis se lleva a cabo mediante electroforesis sobre diferentes líquidos biológicos (**suero**, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.), la muestra a emplear y el tratamiento al que pueda ser sometida dependen de los compuestos que pretendemos analizar.

Selección y preparación del soporte: Actualmente los procesos electroforéticos se llevan a cabo sobre soportes de los cuales se obtiene un mapa en el cual se puede visualizar las distintas fracciones separadas, los principales soportes son de dos tipos:

No restrictivos: las partículas colocadas sobre ellos se separan únicamente en función de su carga eléctrica, y pueden moverse libremente en los mismos;

los principales soportes de este tipo son: Papel, **Acetato de celulosa**, y Agarosa.

Acetato de celulosa: se consigue por reacción entre los grupos hidroxilo de celulosa y anhídrido acético, las tiras de acetato de celulosa están formadas por fibras de este compuesto, que engloban aire entre ellas; cuando se van a usar, la tira se sumerge en el tampón, y estos espacios de aire son sustituidos por tampón, que será el encargado de transportar la corriente a través de ella. Tiene como ventajas su fácil manejo, buena reproducibilidad, fácil lectura, económico y rapidez de ejecución.

Restrictivos: el soporte ejerce algún tipo de resistencia al desplazamiento de proteínas de la muestra; la intensidad de esta resistencia vendrá determinada por el tamaño del poro del gel, y por el tamaño y características de la macromoléculas que deben desplazarse sobre el mismo, los principales soportes de este tipo son: Geles de almidón, y Geles de poliacrilamida. Su ventaja general es que se consigue una mejor separación.

Aplicación de la muestra. La muestra se puede aplicar en el soporte mediante distintas técnicas:

Aplicación sobre la superficie, dejando que penetre (Ej. **Suero sobre acetato de celulosa** en la electroforesis de proteínas).

Aplicación sobre orificios o ranuras sobre geles, incluir la muestra en el gel en el proceso de polimerización.

La ejecución del proceso electroforético requiere una instrumentación consistente en:

Fuente de alimentación, su función es aportar energía eléctrica para que pueda llevar a cabo el proceso.

La **cubeta** consiste en una cámara que contiene los electrodos de carga opuesta, situados en dos receptáculos que se conectan por un puente salino cuya función es permitir el paso de la corriente, este puente es el mismo medio de soporte, impregnado de tampón y en contacto con los receptáculos, a través del cual pasará la corriente, provocando la migración de las partículas en función de la carga eléctrica que posean.

Revelado: este tiene por objeto la localización, para su posterior evaluación, de las distintas fracciones en que ha sido separada la muestra, esto se consigue mediante la **tinción** de los componentes que se desean visualizar, el

colorante empleado dependerá del compuesto que tratemos de localizar. Tabla No. 2, una vez sumergido el medio de transporte en el colorante, se debe eliminar el exceso de éste, lo que se consigue mediante lavados con soluciones adecuadas.

Sustancia	Colorante
Proteína	Ponceau S
	Negro Amido
Lipoproteínas	Azul Brillante de Coomasie
	Negro Sudán B
Glucoproteínas	Azul brillante de Coomasie
Enzimas	
• Deshidrogenasas	PAS (Acido peryódico-Schiff)
• Esterasas	NADH (fluorescencia)
• Fosfatasa	Esteres de β -Naftol
	α -Naftilfosfato

Tabla No. 2 Colorantes más utilizados.⁴⁹

Lectura y evaluación: el informe de una separación electroforética se suele dar como **porcentaje de cada fracción** respecto a la concentración total de las sustancias analizadas. Esta información se puede obtener de dos formas:

Elusión: cada zona se recorta y se eluye en un disolvente adecuado al colorante con que se tiñeron los productos de estudio. Se obtiene así una solución coloreada que se cuantifica espectrofotométricamente.

Densitometría: consiste en la lectura directa de la tira que presenta las zonas separadas mediante un fotodensitómetro en el que se selecciona una longitud de onda que será la que corresponda al color de las fracciones a leer, y se hace pasar un haz de luz de esta longitud de onda a través de la tira, y a lo largo de ésta; el haz de luz irá encontrándose con las fracciones sucesivas, que absorberán la luz en función de su densidad de color; el detector recibe el haz de luz, registrando la intensidad de la luz transmitida a través de cada banda, la intensidad de luz recibida por el detector será menor cuando más densa sea la banda por la que pasó el haz de luz, de esta forma el aparato es capaz de

fabricar una gráfica de registro del recorrido del haz de luz; en el registro resultante, cada banda aparece como un pico, cuya altura depende de la densidad de color de la banda; su anchura en la base depende del ancho de la banda leída.

3.9.2. ELISA (LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

El inmunoensayo enzimático conocido como ELISA del inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay, fue descrito en 1971 por Engvall y Perlmann en Suecia, este fue utilizado para la cuantificación de antígenos y posteriormente para la titulación de anticuerpos, se basa en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y en la sensibilidad del sistema indicador, en este método se utilizan anticuerpos conjugados a una enzima, el anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras la enzima es capaz de una reacción oxido-reducción, en la cual el sustrato se transforma en un producto colorido. En este sistema el antígeno o el anticuerpo se absorben a una fase sólida insoluble (microplacas de poliestireno, o bien membranas de nitrocelulosa).

Existen diversas variantes del ELISA, como son los métodos directos, indirectos, sándwich y competitivo; estos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos, a excepción del método indirecto con el que se detectan anticuerpos.

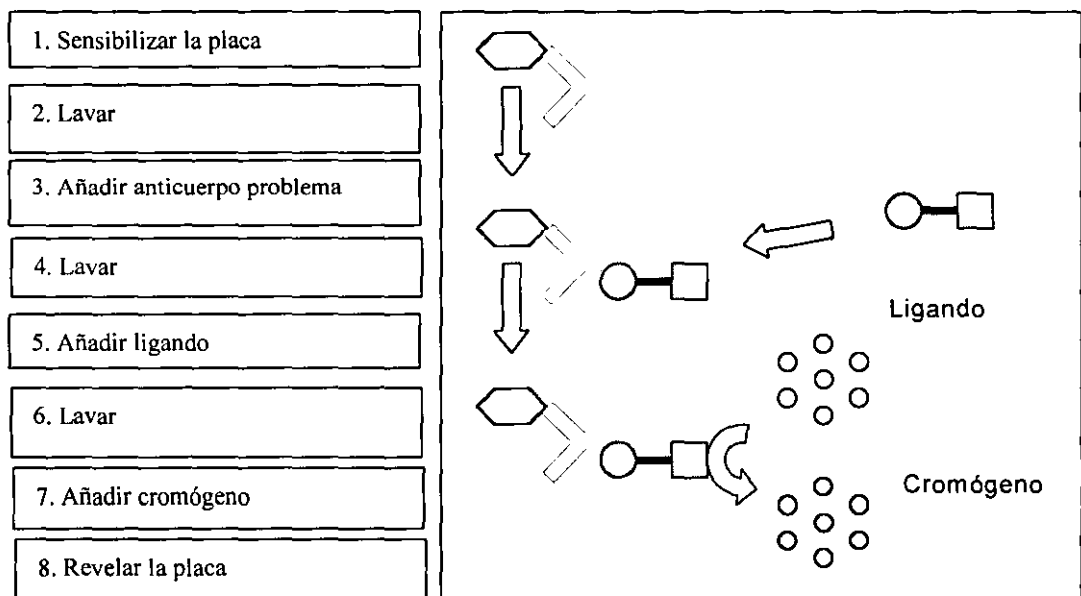
En los **métodos directos**, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva unida la enzima; en cambio en los **métodos indirectos** se usan para medir la concentración de anticuerpos en muestras de fluidos biológicos; el antígeno inmovilizado reacciona con el anticuerpo de la muestra y posteriormente reacciona con un segundo anticuerpo unido a la enzima (esquema 2).

En los **métodos competitivos** se puede usar como un conjugado antígeno-enzima o un anticuerpo-enzima, cuando el conjugado es anticuerpo-enzima el antígeno específico se absorbe física o covalentemente a una fase sólida después el conjugado es incubado en

presencia de un anticuerpo estándar o la muestra a ser analizada y competirán por los sitios de unión del antígeno inmovilizado.

En esta técnica la concentración de los productos del sustrato son inversamente proporcionales a la concentración del estándar o del antígeno de la muestra; se aplica a una gran variedad de sustancias como IgG, gonadotropina coriónica y ATP.

En los **métodos no competitivos** o ELISA sándwich, el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con el antígeno que se ha unido al primer anticuerpo, absorbido a una fase sólida; el o los componentes que no reaccionan se eliminan con los lavados; por último se agrega el sustrato de la enzima y un cromógeno y se mide la intensidad de color desarrollado, el cual es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo.⁵⁰



Esquema 2. Análisis de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) Indirecto

Características de los elementos que se usan en la técnica de ELISA.

Fase sólida:

Se utilizan placas de poliestireno, las cuales se pueden irradiar con luz UV (durante 1 hora aproximadamente) con ello aumentando su adhesividad, tubos de polivinilo, policarbonato, partículas de agarosa y poliacrilamida y placas plásticas microtituladoras.

La inmovilización del antígeno o anticuerpo en la fase sólida es por enlace covalente o por absorción continua de interacciones no covalentes, altas concentraciones del antígeno o anticuerpo reducen los enlaces no específicos y mejora los específicos.

Se debe determinar la concentración óptima de revestimiento para cada ensayo.

Etapas de lavado. Se debe realizar con una solución buffer de fosfatos salino-Tween 20 (PBS-Tween 20), después de revestir la fase sólida; esta fase es importante ya que se pueden quedar residuos de material que reaccionen y alteren los resultados.

Muestra a ensayar. Algunas muestras contienen sustancias de PM elevado, que pueden pegarse de manera inespecífica a la fase sólida. Este problema se puede reducir si la muestra se diluye en PBS conteniendo agente detergente.

Antígeno. Para cada ensayo es necesario determinar la concentración óptima del antígeno, la cual se establece por titulación en "tablero de ajedrez".

Conjugado. Para la obtención del conjugado se debe considerar lo siguiente:

- Preparación de inmunoglobulina
- Tipo de inmunoglobulina
- Especie de animal usado en la inmunización (conejo, oveja u otro).
- **Tipo de enzima:**
- Ésta debe ser económica, de alto grado de pureza, elevada actividad específica, estable al almacenamiento, soluble y no dar enlace cruzado.

Las enzimas más empleadas en el ELISA son la peroxidasa de rábano (PR), la fosfatasa alcalina (FA) y la β -D-galactosidasa (BG), debido a su estabilidad y reproducibilidad de resultados.

Método de acoplamiento o conjugación:

Estos métodos se basan en la reacción entre los grupos amino presentes en el anticuerpo y los grupos carbohidrato de la enzima con ayuda de un reactivo bifuncional, como glutaraldehído, benzoquinona.

Sustrato: Los sustratos que se emplean para la enzima PR son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser reducidos dan productos incoloros, por lo que se acompañan de cromógenos, los cuales al ser oxidados en la reacción enzimática desarrollan color; debe ser barato, soluble y de fácil uso; los más frecuentemente empleados son: orto-fenilendiamina (OPD), diaminobencidina (DAB) y orto-dianisidina entre otros, estos continúan en forma soluble después de ser oxidados.

Los sustratos empleados para la FA son el para-nitrofenil fosfato, que produce color al ser degradado por la enzima a temperaturas mayores a 30° C y el 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato que se puede emplear en las pruebas de ELISA en tubo o DOT ELISA.

Los sustratos empleados para la BG son el para-nitrofenil-beta-D-galactósido y el 4-metil-umbeliferil-beta-D-galactósido.

El ELISA tiene aplicaciones muy variadas, lo cual lo hace muy versátil el diagnóstico de enfermedades infecciosas, virales o parasitarias, cuantificación de hormonas, haptenos, determinación de anticuerpos isotipo específicos, titulación de anticuerpos, etc.⁵¹

3.9.3. Métodos Histológicos

Los tejidos y las células para examen microscópico, se conservan por medio de una fijación cuidadosa para reducir las alteraciones de la morfología in Vitro. El procesamiento del tejido termina con su inclusión en un material que facilite su corte; existen varias técnicas de inclusión, la mas usada es la parafina; la fijación del tejido tiene como finalidad protegerlo del ataque bacteriano, evitar la autolisis, distorsiones y retracciones, además de preparar las diversas estructuras para sus posteriores tratamientos.

FUNDAMENTO DE LA TINCIÓN

La tinción es una manera de mejorar la imagen del tejido, la reacción con células y tejidos varía mucho, algunos colorantes son muy selectivos para ciertos componentes celulares o tisulares, la hematoxilina (H) y eosina (E) son inespecíficos y se usan frecuentemente en histología; en este caso el colorante básico es la hematoxilina se aplica primero, seguido del ácido que es la eosina, la hematoxilina se extrae de una fuente natural que al combinarlo con un mordente como el alumbre presenta un color púrpura azul bastante intenso imprimiendo un color morado azulado a los elementos celulares ácidos, mientras que la eosina es el colorante sintético, que confiere un color rosado a rojo a los componentes que no captan mucho la hematoxilina esta colorea en tonalidad de rosa a rojo a los componentes básicos.

Las propiedades colorantes que diferencian elementos celulares y tisulares permiten una identificación sencilla y son una manera práctica de conocer sus propiedades bioquímicas en células y tejidos.

Obtención de la muestra. Los tejidos deberán separarse en el menor tiempo posible para que sean minimizados los cambios autolíticos.

Fijación. En la fijación química se aplican diferentes agentes a las muestras histológicas con el propósito de detener la autólisis post mortem, estos agentes desnaturalizan las proteínas e inactivan las enzimas que originan los cambios autolíticos. Los fijadores usados con mayor frecuencia son el formaldehído, glutaraldehído, paraformaldehído, alcohol etílico, ácido acético, ácido pícrico, dicromato de potasio, cloruro mercúrico y los ácidos crómico y ósmico; uno de los fijadores más comunes es la solución de **formalina amortiguada neutra al 10%**; la acción de los fijadores: 1) impide la autólisis post mortem, 2) endurece los tejidos para facilitar su corte, 3) mejora el efecto de los colorantes por su acción mordente, 4) estabiliza los componentes estructurales, para conservarlos lo más parecido a las condiciones in vivo, y 5) como efecto antiséptico que protege a las personas que trabajan con él; la proporción ideal de volumen de fijador respecto al volumen del tejido es de 30:1.

Deshidratación y aclaramiento. Primero deberá extraerse el 75% del agua del tejido para esto se conocen muchos deshidratantes (**alcohol etílico**, butírico, dioxano, isopropanol), las muestras se someten a concentraciones crecientes hasta la deshidratación total, su uso obliga que las muestras se procesen después con aclaradores, entre los mas importantes estan el xileno, tolueno y benceno, su efecto de aclaramiento y transparentación. En general, los deshidratantes y los agentes de inclusión no son micibles entre sí; por otra parte, los aclaradores son micibles con los deshidratantes y con los de inclusión, de modo que los aclaradores reemplazan al deshidratante y la sustancia de inclusión sustituye a su vez al aclarador.

Inclusión. Los tejidos una vez aclarados, se colocan en soluciones de concentración creciente de parafina, estos agentes de inclusión deben mantenerse durante todo el proceso a temperatura de derretimiento (50 a 68°C); una vez embebidas se colocan en moldes donde se vierte mas parafina y se dejan cuajar.

Microtomia. Cuando la parafina esta dura, se sacan los bloques del molde y se recortan para exponere el tejido embebido; se montan en un microtomo donde se obtienen rebanadas finas de la muestra; que tienen cierta tendencia a pegarse en una banda continua, de modo que el borde posterior de una sección se adhiere al interior de la siguiente; las bandas obtenidas se hacen flotar en agua tibia, lo que ejerce un efecto de planchado y pueden entonces recogerse perfectamente extendidas en un portaobjetos, estos se colocan en una plancha tibia para que se adhiera mejor el corte al cristal.

Tinción y montaje. Casi todos los colorantes usados en histología son solubles en agua o alcohol, la parafina debe eliminarse antes, para lo cual se desarrolla todo el ciclo a la inversa, de modo que las secciones se aclaran para eliminar el agente de inclusión y posteriormente se pasan por concentraciones decrecientes de alcohol para permitir su hidratación; así quedan listas las laminillas para su tinción y una vez mas se deshidratan, aclaran y se montan.⁵²⁻⁵⁴

3.10 Diagnóstico diferencial

Debido a lo extenso del conocimiento alcanzado en esta área, es necesario destacar que las manifestaciones ordinarias del síndrome de Sjögren pueden observarse en una gran variedad de padecimientos, mencionados en la tabla 3, y con los cuales el clínico siempre estará obligado a realizar el diagnóstico diferencial que incluye otras causas de sequedad ocular y faríngea o de tumefacción parotídea.²¹.

1. Situaciones y padecimientos que cursan con crecimiento de las glándulas salivales

➤ Unilateral

- Neoplasias: adenoma, carcinoma, linfoma etc.
- Infecciones bacterianas
- Sialoadenitis crónica
- Parotiditis posquirúrgica
- Traumatismos
- Obstrucción de conductos por litiasis, moco, etc.
- Compresión extrínseca de la parótida por linfadenopatías
- Otras infecciones: tuberculosis, actinomicosis, etc.

➤ Bilateral

- Infección vírica: paramyxovirus, citomegalovirus, coxackie A, Epstein-Barr,
- Influenza, VIH, virus ECHO, virus de la meningitis linfocítica, parotiditis
- Enfermedades granulomatosas: sarcoidosis, tuberculosis, lepra
- Parotiditis recurrente de la infancia
- Diversas: diabetes mellitus, cirrosis hepática, acromegalia, disfunción gonadal,
- hiperlipidemia, alcoholismo, bulimia, pancreatitis crónica, hiperlipoproteinemia,
- hipersensibilidad al yodo, desnutrición, anorexia, etc.

2. Situaciones y padecimientos que causan sequedad ocular-faríngea

- Fármacos: antidepresivos, neurolépticos, anticolinérgicos
 - Deshidratación
 - Diabetes mellitus
 - Radiación, traumatismo o cirugía de cabeza y cuello
 - Malformaciones congénitas
 - Psicogénicas
 - Edad avanzada
 - Fibrosis quística
 - Enfermedad injerto contra huésped
-
- **Situaciones y padecimientos que cursen con sequedad de las conjuntivas**
 - Blefaritis crónica
 - Síndrome de: Riely-Day, Stevens-Johnson
 - Pterigión
 - Alacrimia congénita
 - Hiposecreción paralítica
 - Hipoavitaminosis A
 - Penfigoide ocular
 - Necrosis epidérmica tóxica
 - Quemaduras: por radiación, por químicos, por exposición
 - Irregularidades epiteliales

Tabla 3. Diagnóstico diferencial del síndrome de Sjögren con patologías que cursan con manifestaciones semejantes²¹

La sarcoidosis puede semejar el SS, pero en este caso la biopsia de glándula salival menor revela granulomas no caseificantes y los autoanticuerpos están ausentes. Los pacientes con infección por VHI (virus de inmunodeficiencia humana) pueden desarrollar infiltración linfocitaria difusa de las glándulas salivales y presentar sequedad ocular y faríngea, pero estos casos son fácilmente identificables mediante serología y por la ausencia de autoanticuerpos. Además, el infiltrado inflamatorio está compuesto predominantemente por linfocitos T CD8+ y células B. La infección crónica por

virus C de la hepatitis puede dar lugar a síndrome seco con gammagrafía salivar alterada y biopsia de la glándula salival menor distinguible del SS, por lo que deberá descartarse siempre infección por este virus. En los casos en que las manifestaciones extraglandulares sean más prominentes, el diagnóstico diferencial dependerá del órgano afectado, en ocasiones puede ser difícil diferenciar un SS de otras enfermedades sistémicas como LES, por lo que muchos de estos enfermos acaban encuadrándose en el grupo de los síndromes de solapamiento SS/enfermedad sistémica

3.11 Modelo animal

La primera publicación relacionada con el ratón desnudo se realizó en el año de 1962 por J.H. Isaacson, B.M. Cattanch y N.A. Grist, este último envió dichos ratones y otros normales para su estudio al instituto de genética animal de Edimburgo, Escosia; en este instituto el Dr. S.P. Flanagan realizó cruzas y más tarde en el año de 1966 reportó las siguientes características para el ratón desnudo: ausencia de pelo, baja fertilidad, inmunodeficiencia, tamaño reducido, atimia, además de un período de vida corto con presentación de un 100% de mortalidad a la edad de 25 semanas y una mortalidad infantil hasta del 45% en las dos primeras semanas de vida; asimismo demostró por los datos de segregación, que el fenómeno de debe a una solo gen autosomal recesivo que el denomino nude (desnudo) y cuyo símbolo genético es nu, también reportó que los ratones normales son heterocigotos para el gen responsable de la ausencia de pelo.^{46, 47}

En 1968 E.M. Pantelouris describió que los ratones homocigóticos recesivos para el gen un (nu/nu) carecen de timo, mientras que los hermanos de camada homocigóticos dominantes (+/+) y heterocigóticos (nu/+) presentan timo normal; asimismo describió la presencia de una marcada leucopenia en los ratones atímicos (815-3380 leucocitos/ μ L), mientras que sus hermanos fenotípicamente normales presentan niveles altos y otros con niveles intermedios, estos últimos fueron considerados como heterocigotos (nu/+).⁴⁸

A partir del reporte de Pantelouris se inicio una ola de investigaciones, que llevaron a la utilización del ratón desnudo para usos experimentales en diferentes disciplinas; el ratón atímico ha sido cruzado con otros ratones portadores de defectos inmunológicos aumentando el número de variantes de ratones con variaciones.^{46, 47}

En el ratón desnudo la actividad de las células B parecen no estar alterada; Sprent y Miller estudiaron la circulación y el tiempo de vida media de los linfocitos torácicos y encontraron que la función de los linfocitos B fue de un 97%. La disgenesia del timo produce una falta de maduración de las células T que lleva a un estado de inmunosupresión de estos animales. Con respecto a la síntesis de anticuerpos, se ha reportado en esta cepa que el contenido total de inmunoglobulinas presentes en su suero es comparable con el de ratones normales, no obstante algunas clases de inmunoglobulinas se encuentran desbalanceadas.⁴⁸

De este modo se ha encontrado que los niveles de IgM se encuentran algunas veces por arriba de los valores normales, para el caso de otras inmunoglobulinas, los niveles encontrados han sido inferiores, como en la IgA y de las subclases IgG1 e IgG2a; estas observaciones hacen pensar a algunos investigadores que la relación de anticuerpos IgM/IgG1 distingue la respuesta inmune humoral de esos ratones.⁴⁸

Algunos investigadores han determinado que en el ratón *et/et* existe un retardo en la aparición de la pubertad, esto no ocurre en la cepa *et/+*, aunque su fertilidad es semejante, los animales *et/et* presentan un ciclo estrogénico irregular quizá debido a su hipotímia. Según estudios realizados parece tener relación el bajo peso de las gónadas y próstata que modifica los niveles de gonadotropinas y hormonas sexuales que son descritos también en el ratón *nu/nu* esto denota la importancia del timo en la regulación del sistema reproductivo de esos animales. En el ratón *nu/nu* se presentan las mismas características fenotípicas que en el ratón *et/et*, solo se diferencian de que este último es hipotímico según estudios realizados, además se reporta que cuando estos ratones son nacidos y mantenidos en condiciones de libertad, el tiempo de supervivencia se incrementa y pueden alcanzar hasta 2 años de edad.

Un número de modelos animales son propuestos a medida que surgen nuevas investigaciones sobre etiología y patogenia de la enfermedad.²⁹⁻³⁷ La mayor

parte de estos son considerados como directamente relacionados con el SS, aunque cada uno de estos parecen reflejar una parte de la patogénesis más bien representan un modelo exacto de un conjunto de procesos de enfermedades. En los últimos años, el estudio de la etiopatogenisis puede ser la llave para la comprensión de las enfermedades autoinmunes en general. Los modelos animales generalmente usados para el estudio del síndrome de Sjögren se mencionan en la tabla 4. Una evaluación histopatológica de la glándula salival de varias razas de ratones han indicado que la región I-A segmento de la región MHC, no se requiere para la infiltración linfocítica de la glándula salival.³⁸

A pesar de la disponibilidad de varios modelos de ratón existentes para el estudio de autoinmunidad, el modelo animal que en este estudio se utilizará, es un ratón hipotímico alopésico derivado por una mutación espontánea de la cepa albina CD1, como un resultado de un gen recesivo autosómico simple, surgida en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM; los animales son obtenidos al aparear machos y hembras *et/+*, o bien machos y hembras *et/et*. A este ratón se le llamo CD1 *et/et*, el símbolo "et" se ha adoptado para referir a la forma mutante y se encontró que los ratones machos de esta cepa, presentan un timo rudimentario el cual es aproximadamente la mitad del peso que presentan los animales eutímicos CD1 *et/+*, mientras que en las hembras CD1 *et/et*, presentan una estructura parecida a un nódulo linfático en lugar del timo y el peso de esta estructura es mas bajo que el peso del timo de las hembras eutímicas CD1 *et/+*. Los críos CD1 *et/et* se separan de sus hermanos con pelo, de los cuales se diferencian al nacer por la ausencia de vibrisas (*vibrissae*), creciendo por separado, estos ratones se mantuvieron bajo condiciones convencionales de bioterio, con libre acceso al alimento y agua.²⁶ Este ratón mutante tiene las siguientes características: desnudo, fertilidad baja, mortalidad alta, vida corta, hipotímico y su promedio de vida son de 2 años y es común que los animales desarrollan espontáneamente todo el cuadro clínico de una uveorretinitis espontánea crónica a anticuerpos contra antígeno S de retina, tiene un número mayor de CD3 con relación al ratón eutímico (CD1), tiene una elevada susceptibilidad a la infección con *Tripanosoma cruzi* y *Plasmodium chabaudi*.²⁷

Raza: Manifestaciones

- **New Zealand blancos:** Infiltraciones en las glándulas salivales y lagrimales por células plasmáticas y linfocitos, anemia hemolítica autoinmune, glomerulonefritis membranosa, hiperplasia linfoide.
- **New Zealand negros/ New Zealand blancos:** Infiltraciones en las glándulas salivales y lagrimales por células plasmáticas y linfocitos (células T CD4+), LES.
- **MRL-lpr/lpr** homocigoto para el gen de linfoproliferación: enfermedad linfoproliferativa autoinmune con característica de LES y AR, uveítis y conjuntivitis, sialoadenitis con infiltraciones inflamatorias de células T CD4+.
- **MRL -+/-** (con falta del gen lpr): ligero comienzo- atraso de enfermedad autoinmune, sialoadenitis (infiltrados de CD4+ y CD8+), infiltración de la glándula lagrimal.
- **Nonobese diabetic mouse(NOD):** diabetes mellitus insulino-dependientes, Inflamación en las glándulas salivales y lagrimales.
- **Miniature poodles:** Queratoconjuntivitis seca, xerostomia, caries dental.
- **HTLV-1 tax transgénico:** neurofibromas, infiltrados linfocíticos y proliferación de células epiteliales en glándulas salivales y lagrimales.
- **HTLV-1 tax transgénico:** histologicamente similar a AR.
- **TGF- β 1 knock-out mice:** mezcla multifocal inflamatoria de células infiltrantes en muchos órganos incluyendo la glándula salival.
- **Graft-versus-host disease mouse:** infiltración linfocítica en glándulas salivales, enfermedad autoinmune.
- **Murine leukemia virus-infected mice (MAIDS):** infiltraciones linfocíticas periductales de las glándulas salival y lagrimal, hígado, riñón, pulmón y páncreas.

Tabla 4. Modelos animales del síndrome de Sjögren.²⁵

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar varios parámetros inmunológicos e histopatológicos asociados al síndrome de Sjögren en el ratón hipotímico alopecico CD1 et/et.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Realizar estudios histopatológicos en glándulas submaxilares y lagrimales.
2. Determinar la presencia de Factor Reumatoide por aglutinación pasiva usando IgG heterologa.
3. Determinar anticuerpos antifosfolípidos por ELISA.
4. Realizar electroforesis de suero en acetato de celulosa.

HIPOTESIS

Debido a los hallazgos de alteraciones en ojos (uveitis) y de las glándulas en el ratón hipotímico CD1 et / et, se cree que estos animales presentan un proceso autoinmune similar al observado en el síndrome de Sjögren en humano.

JUSTIFICACION

El síndrome de Sjögren está clasificado como una enfermedad autoinmune que tiene una prevalencia importante en México. El ratón CD1 et/et tiene las características de desarrollar este síndrome, por lo que consideramos importante realizar su caracterización ya que podría usarse como un modelo animal, donde se entendería mejor la patogenia de la enfermedad y la posibilidad de evaluar diferentes tratamientos con fármacos.

MATERIAL

LISTA DE REACTIVOS

Nombre	Fórmula	Proveedor
Acido cítrico	$H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$	JT. Baker
Alcohol Etilico absoluto al 96%	CH_3CH_2OH	JT. Baker
Albúmina sérica bovina (BSA)		JT. Baker
Acido Acético	$(CH_3CO)_2O$	Merk
Carbonato de sodio anhidro	Na_2CO_3	JT. Baker
Citrato de sodio	$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	Técnica Química
Cloruro de potasio	KCl	Técnica Química
Cloruro de sodio	NaCl	JT. Baker
Colorante Ponceau S		Gelman Sciences, Inc.
Eosina		Merk
Folin & Ciocalteu's (Agente de fenol)		SIGMA
Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	Merk
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado	$NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$	JT. Baker
Fosfato de sodio monobásico	NaH_2PO_4	JT. Baker
Hematoxilina		SIGMA
Hidróxido de sodio al 0.1N	NaOH	Merk
Metanol	CH_3OH	JT. Baker
Membrana de Acetato de Celulosa		Gelman Sciences, Inc.
O-fenilendiamina (OPD)	$C_6H_8N_2$	SIGMA
Parafina		
Peróxido de hidrógeno al 30%	H_2O_2	Productos Químicos Monterrey
Resina		
Sulfato de Amonio	$(NH_4)_2SO_4$	JT. Baker
Sulfato cúprico	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	JT. Baker
Suero de Bovino Adulto (ABS)		
Tartrato de sodio y potasio	$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$	Merk
Tween 20		Hycel de México
Xilol	$C_6H_4(CH_3)_2$	Hycel de México

LISTA DE SOLUCIONES

Nombre
Buffer Salina Fosfato (PBS)
Buffer Salina Fosfato Tween (PBS-Tween)
Buffer Carbonato Bicarbonato (pH 9.6)
Buffer para electroforesis (Electra HR)
Formalina al 10% en PBS
Regulador de Glicina Salina a pH 8.2

EQUIPO

Nombre	Descripción
Agitador de placas de microtitulación.	Bellco Glass Inc
Agitador vortex genie.	Scientific Industries Inc
Aplicador de muestras	Gelman Sciences, Inc
Balanza analítica.	Mettler H 80
Balanza Granataria	Ohaus
Baño María	Lab-Line
Centrifuga Diamon	IEC Division
Centrifuga	Solbat
Centrifuga	Becman Mod. TJ-6
Congelador -20°C	Fisher Scientific Isothermp Laboratory Mod. 3486
Cámara para electroforesis	Gelman Sciences, Inc. Model 51157
Espectrofotómetro para ELISA	Dynatech MR 250
Espectrofotómetro Spectronic 20.	Bausch & Lomb
Estufa	Riossa
Histoquinette	Leica TP 1010
Incubadora.	Riossa EC.
Lámpara de Luz UV	Cole-Parmer Instrument Company
Microscopio	Zeizz
Microscopio para fotografía	Olympus CHS
Refrigerador.	Philips 127 volts-VA
Potenciómetro digital	Cole Palmer Ep500/15468
Placa de calentamiento	Thermolyne
Ultracentrifuga	Eppendorf 5415c

MATERIAL

Material	Proveedor
Cámaras para tren de tinción	PYREX
Micropipeta de 20-100 μ L	Transferpette
Micropipeta de 200-1000 μ L	Transferpette
Vidrios para electroforesis	Owl Scientifics, Inc.
Separadores para electroforesis	BIO-RAD
Membrana de acetato de celulosa	Beckman microzone plus
Moldes porta-tejidos	
Moldes de inclusión o embebedor de parafina	
Placas de Poliestireno de alta adherencia	Disposable Sterile Plates Corning 25801
Sistema de Destilación	PYREX
Tubos Eppendof	Becton, Dickinson

CONJUGADOS

Conjugado	Proveedor
Chivo Anti ratón-peroxidasa de rábano picante anti IgG	Sigma Chemical Compani, USA
Chivo Anti-ratón-peroxidasa de rábano picante anti IgM	Sigma Chemical Compani, USA
Chivo Anti-ratón-peroxidasa de rábano picante anti IgA	Sigma Chemical Compani, USA

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepa	Casos
➤ Ratones CD1	➤ 20
➤ Ratones CD1 et/+	➤ 16
➤ Ratones CD1 et/et	➤ 164

M E T O D O S

PARTE EXPERIMENTAL

Los ratones se mantuvieron bajo condiciones convencionales de bioterio, con acceso al alimento y agua, temperatura de 21-24 °C, hasta el momento en el que fueron sacrificados; los animales **Cd1 et/et** se obtuvieron cruzando machos **Cd1 et/et** con hembras **Cd1 et/+**; los críos **Cd1 et/et** se separan de sus hermanos con pelo, de los cuales se diferencian al nacer por la ausencia de vibrisas (vibrissae), creciendo por separado.

Se estudiaron 200 ratones machos y hembras de varias edades; antes del sacrificio de los ratones **CD1**, **CD1 et/+** y **CD1 et/et** se observaron las lesiones visibles y se clasificaron como: 1) Ratón sano; 2) Ratón con ojo inflamado; 3) Ratón con cataratas y 4) Ratón con ojo perdido; además de cualquier otra observación (nódulos que se observaron en el pecho de dos ratones); en cada cepa se registró la edad, peso y sexo. Una vez anotadas las características de cada una de las cepas se anestesiaron a los ratones en cámara de éter y se colectó la sangre por incisión axilar seguida de su sacrificio para la extirpación de las glándulas salivales (submaxilares) y lagrimales de los ratones **CD1**, **CD1 et/+** y **CD1 et/et**, tomándose el peso de cada una de estas glándulas para sacar el índice glabular total de lagrimal (IGTL) y submaxilar(IGTS), estas glándulas fueron almacenadas independientemente en una solución de formalina hasta su utilización. La sangre se dejó coagular se separó y centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 min para obtener suero, en el que se realizó la determinación de proteínas séricas por **electroforesis** y **factor reumatoide** en suero fresco, con el resto de suero se realizaron alícuotas de 40 µL en tubos Eppendorf para la realización de las ELISAS; a cada ratón y a cada suero se le asignó un número progresivo.

8.1 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

La electroforesis de proteínas se realizó con sueros frescos sin congelar; los sueros se corrieron con un regulador de tris-barbital- sodium barbital pH 8.6 y una fuerza iónica de 0.05μ en membranas de acetato de celulosa en cámara Gelman; el corrimiento se realizó durante 20 min a 200 volts, las tiras se tiñeron con rojo de Ponceau S; una vez que se quitó el exceso de colorante con una solución de ácido acético al 5% se secaron y se leen en un densitómetro a una longitud de onda de 510 nm ⁴⁰.

8.2 FACTOR REUMATOIDE

A 0.95 mL de regulador de glicina salina a pH 8.2 se le añadió 0.05 mL de cada uno de los sueros frescos sin congelar de los ratones de CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et (dilución 1:20), en uno de los anillos de la placa depositar 0.05 mL de suero diluido; añadir a cada uno de los anillos 1 gota del latex-anti factor reumatoide previamente resuspendido, mezclando la placa manualmente durante 2 min; después de este tiempo se realizo la lectura.

8.3 ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las glándulas salivares y lagrimales para el análisis histopatológico son extirpadas de los ratones de CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et y puestos en formalina al 10% en PBS para su preservación. Después de la fijación, el tejido es deshidratado en series de grados de soluciones de etanol y empotrado en parafina, las secciones son cortadas en 5 μ m usando un micrótopo rotatorio, después se tiñe con hematoxilina y eosina. Las secciones de tejidos son evaluadas usando un microscopio.

8.4 TÉCNICA DE ELISA PARA ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA (ACA)

Para la técnica de ELISA se usaron placas de poliestireno de alta adherencia y se irradiaron con luz UV durante 30 min a 30 cm para aumentar la adhesividad según el método descrito por Boudet,³⁹ se estandarizo la técnica de ELISA para el sistema anticuerpos anti-cardiolipina siguiendo el procedimiento de Galli M et al,⁴³ usando sueros que por observación de la electroforesis de proteínas se encontraba una hipergamaglobulinemia, siguiendo un sistema de ajedrez según Rabin et al;⁴¹ las placas de microtitulación fueron pegadas con cardiolipina (se encontró que a 30 µg/mL fue la concentración adecuada para el antígeno de cardiolipina en etanol por pozo); después de la evaporación del solvente seguido por lavados con PBS las uniones de los sitios no específicos son bloqueados con Albúmina sérica bovina al 10% en PBS por 1 hr, las muestras fueron diluidas 1:25 en suero bovino al 10% en PBS y subsecuentemente aplicadas a los pozos, con una dilución de trabajo de 1:1000 del conjugado de chivo anti ratón- peroxidasa de rábano picante anti IgA, anti Ig M y anti Ig G; la densidad óptica fue medida a 410nm.

8.5 ANALISIS ESTADISTICO

Todos los trabajos experimentales requieren ser procesados, de tal manera que el investigador pueda interpretarlos con facilidad, obteniendo de ellos el mayor provecho posible; los análisis estadísticos exigen que los resultados sean organizados, resumidos y transformados hasta el punto en que el investigador ha obtenido la mayor información; la información de los resultados obtenidos, puede resumirse mediante el cálculo de medidas estadísticas.

Los resultados obtenidos fueron procesados con un paquete estadístico SPSS para WINDOWS, por lo que a continuación se mencionan los fundamentos matemáticos en los que se apoya dicho paquete estadístico para el análisis de resultados.

La estadística **no-paramétrica** es conveniente si no se conoce la distribución de la población, por ejemplo, en la investigación exploratoria. Más aún, otra ventaja es que, por lo general, los cálculos necesarios son más sencillos. Los métodos no-paramétricos pueden ser usados para datos de tipo cualitativo, ya sean ordinales o jerarquizados ó nominales, así como también para datos cuantitativos. La prueba H de **Kruskal-Wallis** o análisis de varianza por rangos considera la magnitud de cada observación con relación a las otras observaciones y los pasos a seguir son:

- Las observaciones n_1, n_2, \dots, n_k de las k muestras se combinan en una sola muestra de tamaño $n = n_1 + n_2 + \dots + n_k$ y se arreglan en orden de magnitud (considerando su identidad dentro de cada muestra) desde la más pequeña a la mas grande. Las observaciones son, entonces reemplazadas por sus rangos del 1 al n. Si dos o más observaciones tienen el mismo valor (están empatadas) se les asigna la media aritmética de los rangos correspondientes a las observaciones empatadas.
- Se suman los rangos correspondientes a las observaciones de cada muestra por separado, dando origen a K sumas.
- Se calcula el estadígrafo de prueba H por la fórmula:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

donde: k = es el número de nuestras o tratamientos.

n_i = es el número de observaciones en la muestra i.

n = es el número de nuestras o tratamientos.

R_i = es la suma de rangos en la muestra i.

- Cuando hay tres muestras con 5 ó menos observaciones cada una, la significación de H se determina usando la tabla A-15. Cuando hay mas de 5 observaciones en cada muestra ó más de tres muestras se debe que H está distribuida aproximadamente como X^2 con k-1 grados de libertad.⁴⁴

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS ENCONTRADAS EN OJO DE RATÓN CD1, CD1 ET/+ Y CD1 ET/ET

Los ratones bajo estudio son mutantes del ratón CD1 mostrado en la foto 1. Ducho ratón CD1 presenta características fenotípicas iguales a la del ratón CD1 et/+ por lo que no se muestra una foto de este último ratón. El espectro de lesiones oculares espontáneas macroscópicas que se presentan en los ratones CD1 et/et se clasificó de acuerdo a lo observado como sigue: 1) Ratón sano (foto 2); 2) Ratón con ojo inflamado (foto 3); 3) Ratón con cataratas (foto 4) y 4) Ratón con ojo perdido (foto 5).

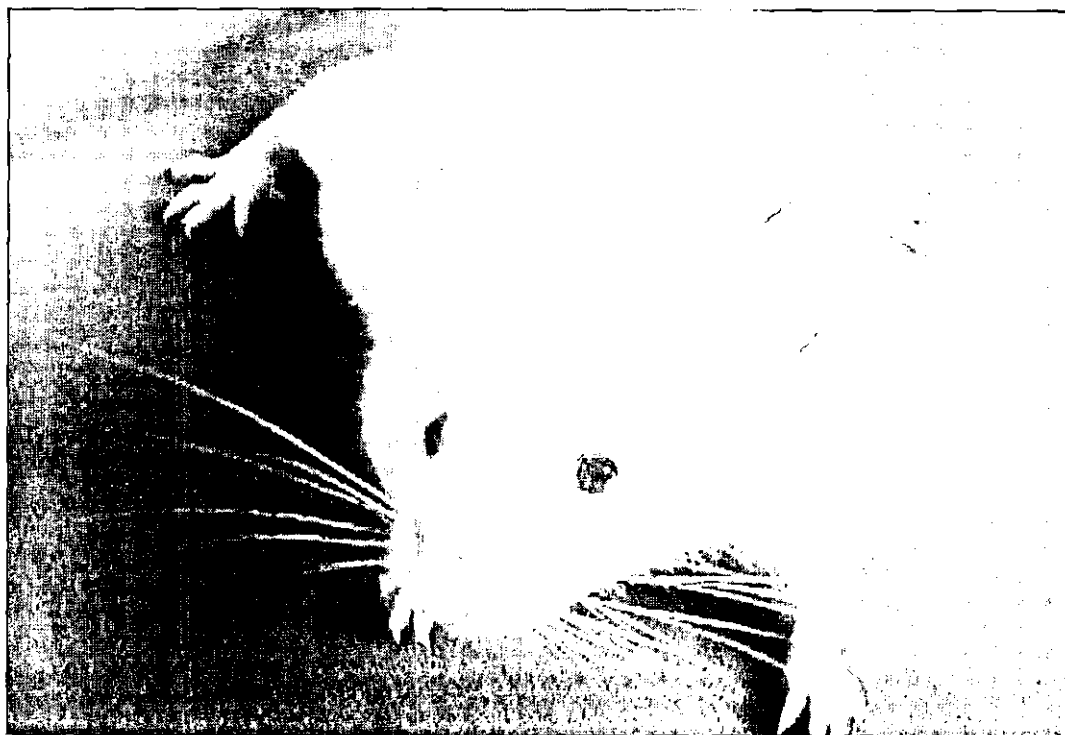


Foto. 1. Ratón eutímico CD1.



Foto 2. Ratón hipotímico CD1 *et/et* con ojos normales.



Foto 3. Ratón hipotímico CD1 *et/et* con ojos inflamados.

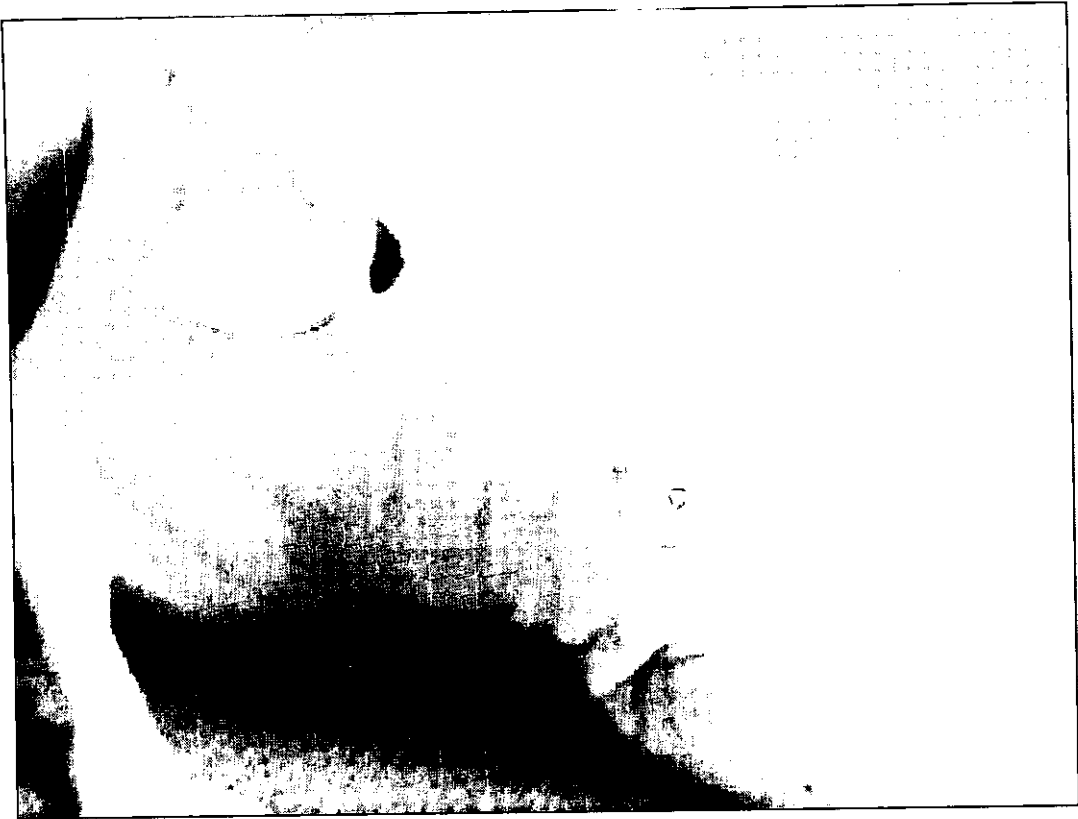


Foto 4. Ratón hipotímico CD1 et/et con catarata.



Foto 5. Ratón hipotímico CD1 et/et con pérdida de ojo.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

En la electroforesis en acetato de celulosa se separaron las proteínas del suero en las fracciones que pudieron identificarse como albúmina, alfa globulinas, beta globulinas y gamma globulinas. En la siguiente tabla se muestra la correlación de cada una de las fracciones.

Correlación de las fracciones de proteínas de los sueros de ratones por cepa de Subpoblaciones CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et por Kruskal-Wallis.

Cepa	Rangos			
	Albúmina	Alfa	Beta	Gamma
CD1	28.71	37.29	30.43	57.07
CD1 et/+	54.13	25.97	33.73	26.80
CD1 et/et	33.88	40.86	39.54	37.95
Significancia	.0030	.0614	.4308	.0085

Prueba de Regresión Múltiple de Tukey-HSD para las fracciones de proteínas séricas por cepa.

CEPA	ALBUM	SIG	ALFA	SIG	BETA	SIG	GAMMA	SIG
CD1	53.7871		10.1343		24.1986		11.3829	*
et/+	59.5787	*	8.8993		24.8587		5.8040	
et/et	53.7771		11.5454	*	25.9358		7.7938	

* El grupo de portadores es diferente al grupo eutímico e hipotímico al comparar la albumina, no existe diferencia entre CD1 y CD1 et/et, cuando se compara alfa globulinas el ratón hipotímico es diferente de la cepa eutímica y portadora, no existe diferencia entre CD1 y CD1 et/+; y en la gammaglobulina el ratón eutímico es diferente, no existe diferencia entre CD1 et/+ y CD1 et/et. No existe diferencia significativa entre los grupos en la determinación de beta globulinas.

En la Foto 6 se observa un patrón electroforético donde se muestra en el carril 1 la fracción gamma normal, el en carril 2 la fracción gamma moderada, en carril 3 la fracción gamma alta y en el carril 4 un aumento en la región gamma en un suero de ratón CD1 et/et.

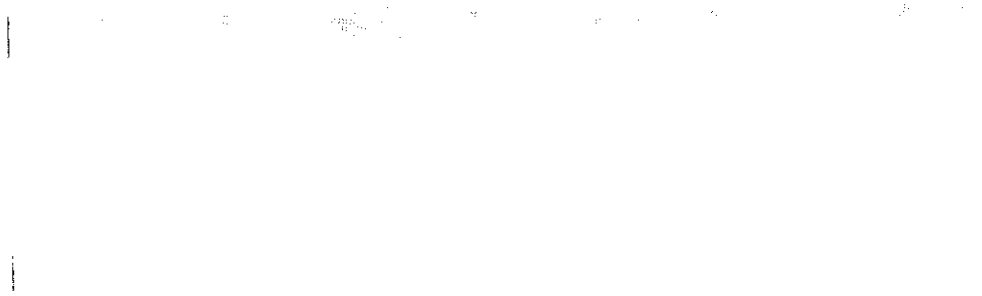


Foto 6. Proteínas Plasmáticas en Ratón CD1 et/et

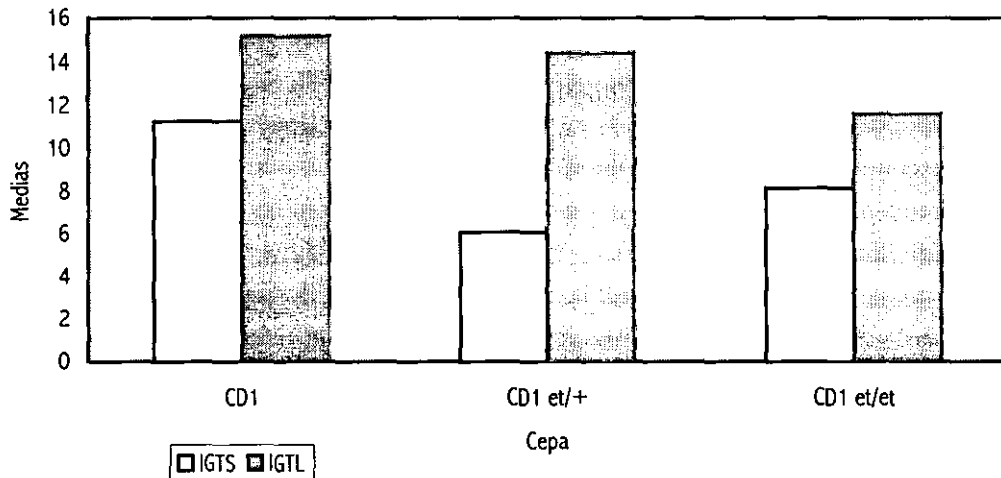
Descripción de Subpoblaciones CD1, CD1 ET/+ y CD1 ET/ET por SPSS para MS WINDOWS

Cuando se compararon las poblaciones de ratones CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et se encontró lo siguiente:

Medias y Desviación estándar del índice glandular total lagrimal (IGTL) y submaxilar (IGTS) por cepa.

Cepa	Casos	Desviación		Media	
		STD IGTL	STD IGTS	IGTL	IGTS
Entre población	134	5.2506	3.9439	12.5142	8.3701
CEPA 1=CD1	20	3.4932	5.0425	15.1850	11.2700
CEPA 2 = et/+	16	5.9511	3.0532	14.4438	6.0937
CEPA 3 = et/et	98	5.2059	3.5026	11.6541	8.1500
200 Total de Casos					
Casos perdidos = 66 el 33.0%					

Gráfica comparativa de medias de índice glandular total de submaxilar y lagrimal por cepa

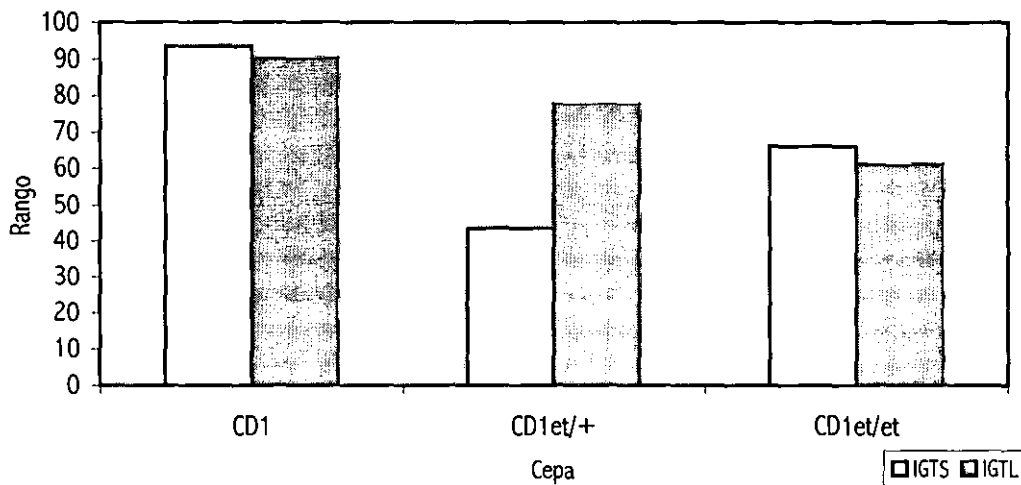


Correlación del índice glandular total del lagrimal (IGTL) y submaxilar (IGTS) por cepa de subpoblaciones CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et por Kruskal-Wallis.

Cepa	Casos	Rango de IGTL	Rango de IGTS
1 CD1	20	90.28	93.63
2 CD1 et/+	16	77.75	43.59
3 CD1 et/et	98	61.18	66.07
Significancia		.0050	.0005
134 Total de Casos			

Existe una diferencia significativa en el índice glandular de submaxilar y lagrimal por cepa entre los ratones CD1 et/et, CD1 et/+ y los CD1 con una ($P < 0.05$) por Kruskal-Wallis.

Gráfica comparativa del índice glandular total de submaxilar y lagrimal por cepa



Al aplicar la Prueba de Regresión Múltiple de Tukey-HSD con un nivel de significancia de **0.050** se obtuvo lo siguiente:

Prueba de **Regresión Múltiple de Tukey-HSD** para el índice glandular total de submaxilar y lagrimal por cepa.

Cepa	Media del IGTL	Diferencia significativa	Media del IGTS	Diferencia significativa
CD1	15.1850	*	11.2700	**
CD1 et/+	14.4438		6.0937	
CD1 et/et	11.6541		8.1500	

* En la comparación de IGTL el grupo eutímico es diferente al grupo de portadores e hipotímico, no existiendo diferencia entre CD1 et/+ y CD1 et/et.

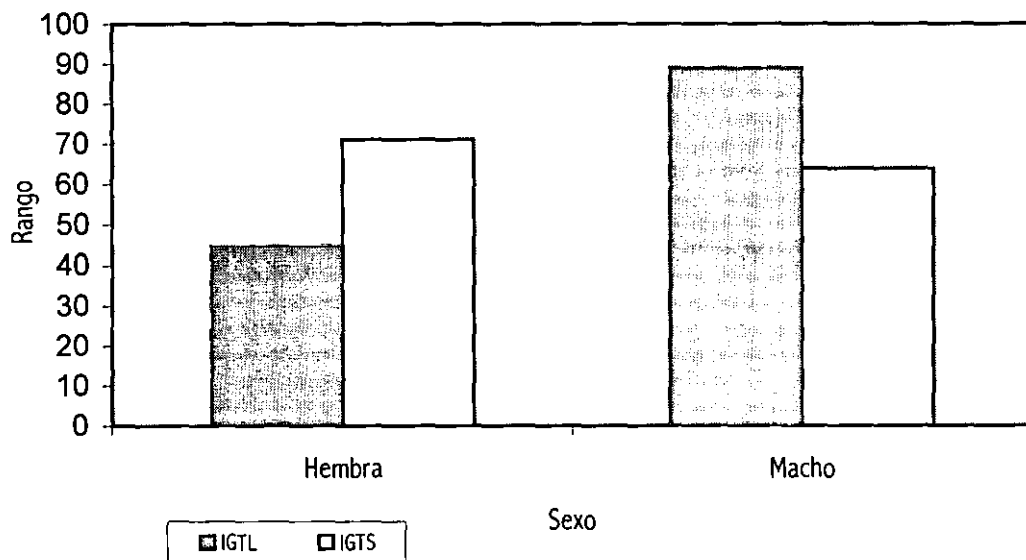
** Se encuentra que existe una diferencia significativa entre la cepa CD1 y las cepas CD1 et/+ y CD1 et/et, mientras que entre las cepas CD1 et/+ y CD1 et/et no existe tal diferencia.

Correlación del índice glandular total del lagrimal (IGTL) y submaxilar (IGTS) por sexo de subpoblaciones CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et por Kruskal-Wallis

Casos	Sexo	Rango de IGTL	Rango de IGTS
65	1 = HEMBRA	44.63	71.18
69	2 = MACHO	89.04	64.03
Significancia		.0000	.2863
134 Total de Casos			

Existe una diferencia significativa en el índice glandular de lagrimal por sexo entre los ratones CD1 et/et, CD1 et/+ y los CD1 con una ($P < 0.05$), mientras que en el índice glandular de submaxilar no existe diferencia significativa por Kruskal-Wallis.

Gráfica comparativa del índice glandular total de submaxilar y lagrimal por sexo



En la prueba de Regresión Múltiple de Tukey-HSD para el índice glandular total de submaxilar y lagrimal por sexo no es significativa.

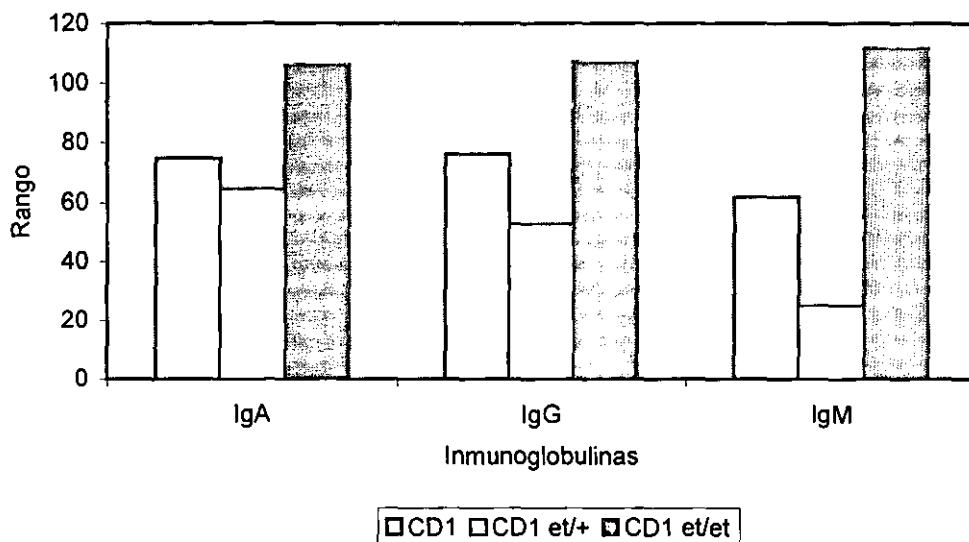
Se determinó mediante la técnica de **ELISA** inmunoglobulinas contra los diferentes isotipos **IgA**, **IgM** e **IgG** encontrándose lo siguiente:

Correlación de **IgA**, **IgG** e **IgM** por ELISA para los sueros de ratones por cepa de subpoblaciones **CD1**, **CD1 et/+** y **CD1 et/et** por **Kruskal-Wallis**.

Casos	Cepa	Rangos		
		IgA	IgG	IgM
20	1 CD1	74.55	75.88	61.75
16	2 et/+	64.47	52.59	24.78
162	3 et/et	106.04	107.05	111.54
Significancia		.0015	.0002	.0000
198 Total de Casos				

Existe una diferencia significativa en la determinación de inmunoglobulinas por cepa entre los ratones **CD1 et/et**, **CD1 et/+** y los **CD1** con una ($P < 0.05$).

Gráfica comparativa de inmunoglobulinas por cepa



Prueba de Regresión Múltiple de Tukey-HSD para IgA, IgG e IgM por cepa.

Cepa	Media de IgA	Dif.	Media de IgG	Dif.	Media de IgM	Dif.
CD1			0.1655		0.0461	
CD1et/+			0.1107		0.0149	
CD1et/et			0.2622	*	0.0893	**

* En la comparación de IgG el grupo hipotímico es diferente al grupo de portadores y eutímico.

** Se encuentra que existe una diferencia significativa entre la cepa CD1 et/et y las cepas CD1 et/+ y CD1, mientras que entre las cepas CD1 et/+ y CD1 no existe tal diferencia.

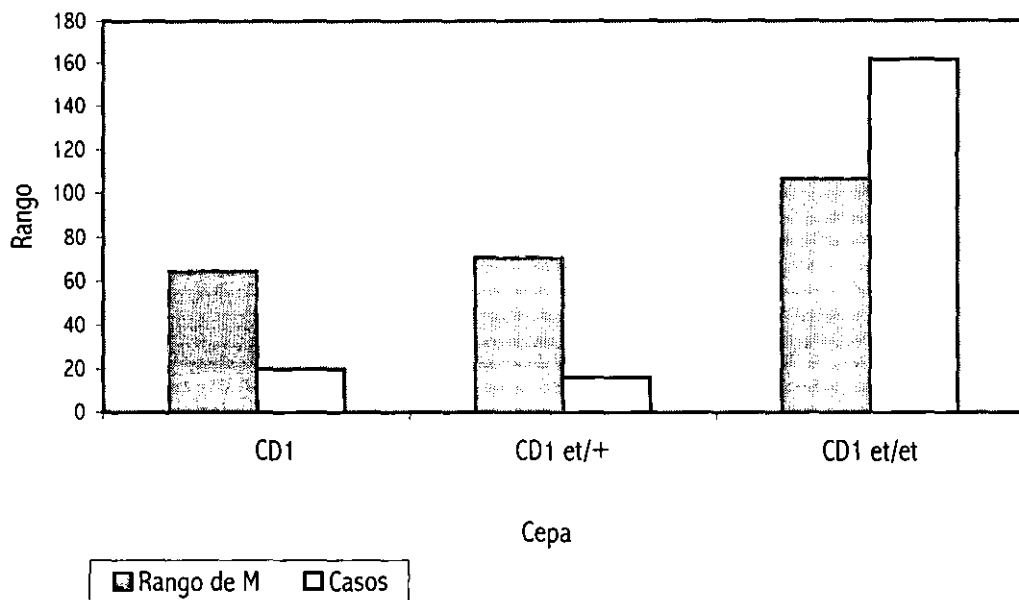
Para IgA no existe diferencia significativa cuando se analiza mediante la prueba de Tukey-HSD.

Correlación del grado de lesión presente en los ratones por cepa de subpoblaciones CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et por Kruskal-Wallis.

Rango	Casos
64.50	20 CEPA = 1 CD1
70.66	16 CEPA = 2 et/+
106.67	162 CEPA = 3 et/et
Significancia	.0001
198 Total de Casos	

Existe una diferencia significativa en el grado de lesión por cepa entre los ratones CD1 et/et, CD1 et/+ y los CD1 con una ($P < 0.05$).

Gráfica comparativa del grado de lesión por cepa



Prueba de **Regresión Múltiple de Tukey-HSD** para el grado de lesión por cepa.

Cepa	Medias	Diferencia Significativa
CD1	0.0000	
CD1 et/+	0.1250	
CD1 et/et	0.8580	**

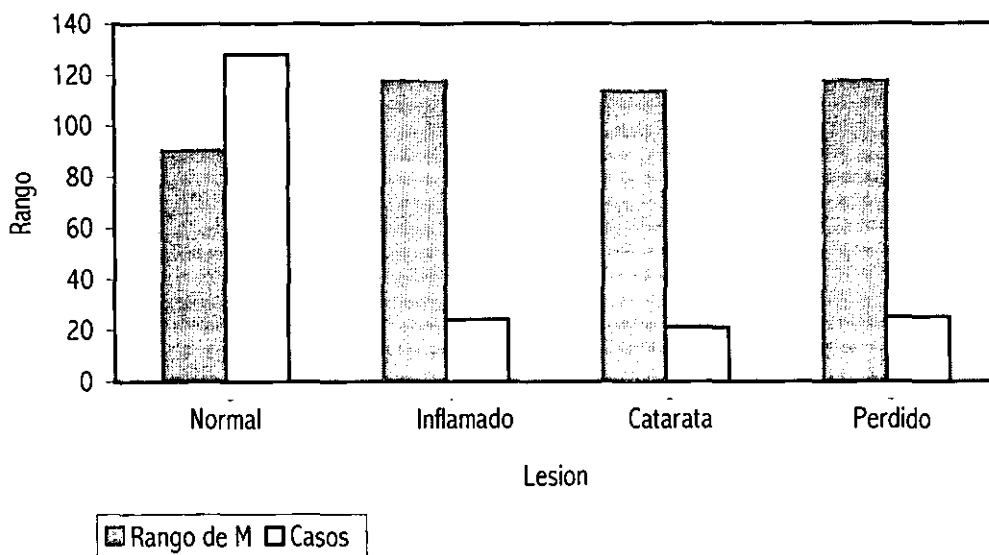
** Existe una diferencia significativa entre la cepa CD1 et/et y las cepas CD1 et/+ y CD1, mientras que entre las cepas CD1 et/+ y CD1 no existe tal diferencia.

Correlación de la cepa por lesiones presente de subpoblaciones **CD1**, **CD1 et/+** y **CD1 et/et** por **Kruskal-Wallis**.

Rangos	Casos	Lesiones
90.35	128	0 sano
117.50	24	1 inflamados
113.26	21	2 catarata
117.50	25	3 perdidos
Significancia	.0001	
198 Total de Casos		

Existe una diferencia significativa de la cepa por lesiones entre los ratones CD1 et/et, CD1 et/+ y los CD1 con una ($P < 0.05$) por **Kruskal-Wallis**.

Gráfica comparativa de cepa por lesiones



Prueba de **Regresión Múltiple de Tukey-HSD** para cepa por el grado de lesión.

Lesiones	Medias	Diferencia Significativa
0 Sano	2.5703	
1 Inflamado	2.9524	*
2 Catarata	3.0000	*
3 Perdido	3.0000	*

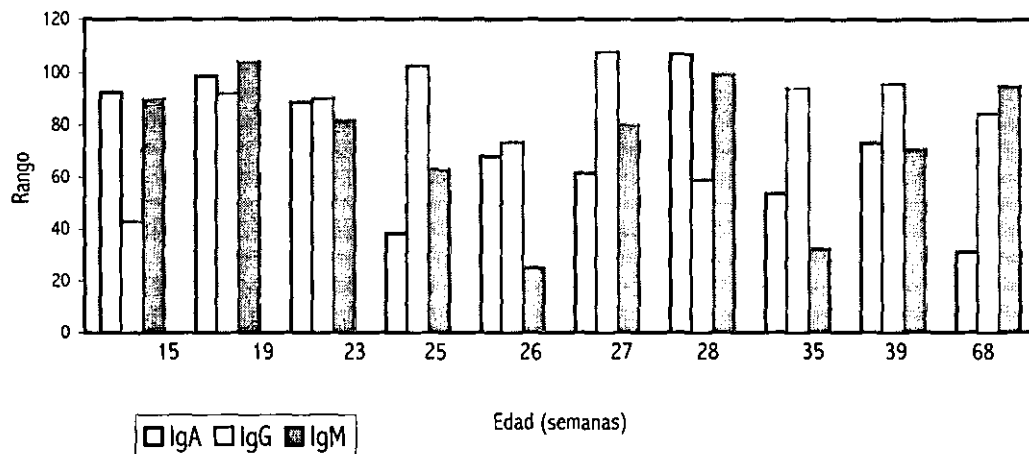
* En la comparación observa que existe diferencia significativa entre el grado de lesión 1,2 y 3 con respecto a los sanos.

DESCRIPCIÓN DE LA SUBPOBLACION CD1 ET/ET

Correlación de IgA, IgG e IgM por edad (semanas) del ratón CD1 et/et por Kruskal-Wallis.

Edad	Casos	Rangos		
		IgA	IgG	IgM
15	20	92.43	42.83	89.82
19	40	98.72	91.74	104.2
23	20	88.60	89.88	81.65
25	8	38.50	102.4	63.00
26	16	68.00	73.13	25.00
27	16	61.41	107.7	80.00
28	20	107.0	58.63	99.40
35	8	53.63	93.69	32.13
39	6	73.00	95.33	70.33
68	8	31.00	84.13	94.44
Significancia		.0000	.0006	.0000
162 Total de Casos				

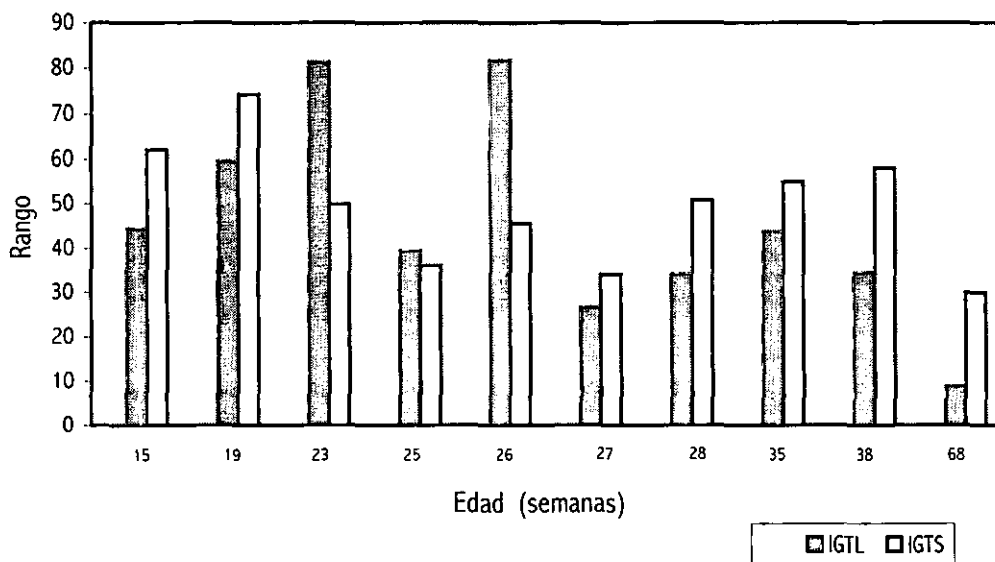
Gráfica comparativa de inmunoglobulinas en el ratón CD1 et/et



Correlación del índice glandular total de lagrimal (IGTL) y submaxilar (IGTS) por edad (semanas) del ratón CD1 et/et por Kruskal-Wallis.

Edad	Casos	IGTL	IGTS
15	4	44.38	62.13
19	17	59.59	74.26
23	10	81.35	49.90
25	8	39.44	36.00
26	16	81.75	45.53
27	16	26.63	34.06
28	5	34.00	50.80
35	8	43.75	54.94
39	6	34.33	57.92
68	8	8.94	29.81
Significancia		.0000	.0028
98 Total de Casos			

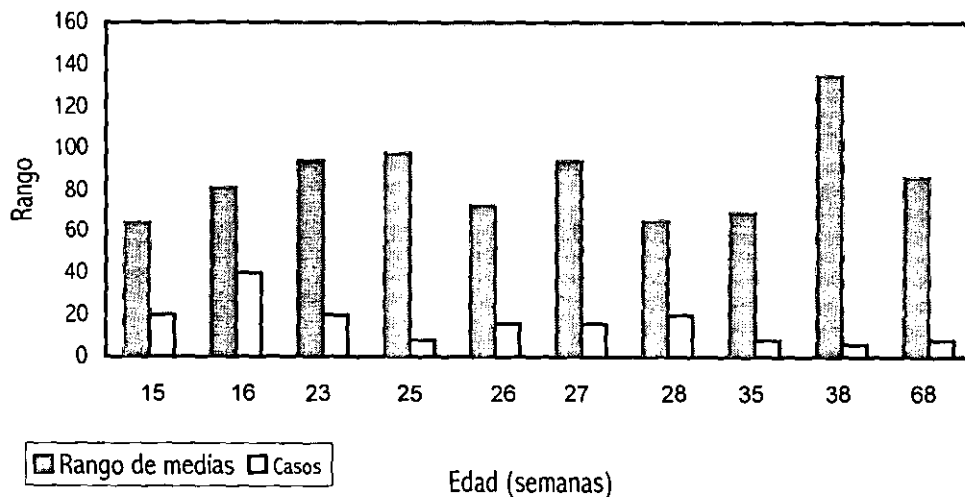
Gráfica comparativa del índice glandular total de submaxilar y lagrimal por edad de ratones CD1 et/et



Correlación de lesiones presentadas en los ratones CD1 et/et por edad (semanas) del ratón CD1 et/et por Kruskal-Wallis

Edad	Casos	Rango de medias
15	20	64.25
19	40	81.28
23	20	94.00
25	8	97.44
26	16	72.22
27	16	93.78
28	20	64.95
35	8	68.94
39	6	135.1
68	8	86.31
Significancia		.0085
162 TOTAL de CASOS		

Gráfica comparativa de lesiones presentadas en el ratón CD1 et/et por edad



HISTOPATOLOGIA

La histopatología de las glándulas salivales y lagrimales son evaluadas por el uso del criterio de clasificación de Fox, R. I.²⁴ con los siguientes rangos de clasificación: clase I (glándula salival normal con pocos linfocitos), clase II (infiltración linfocitaria diseminada que contiene < 1 foco / 4mm^2)(foto 9) , clase III (es definida como 1 foco / 4mm^2) y clase IV (≥ 2 focos linfocitarios / 4mm^2) (fotos 10-15); en donde un foco es definido como un racimo de por lo menos 50 linfocitos; las fotografías obtenidas fueron teñidas con hematoxilina y eosina.

La glándula salival y lagrimal de los ratones Cd1 et/et presentan cambios notables a partir de la semana 15 de edad y de progresión severa con la edad.

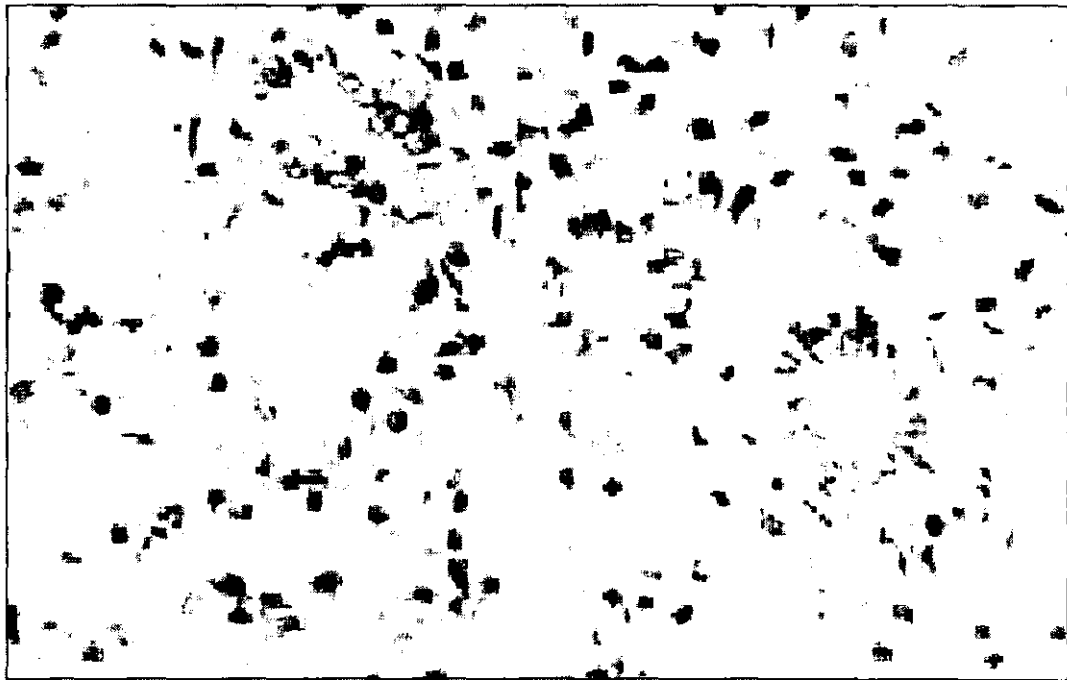


Foto 7. Glándula submaxilar a 40 X. Ratón CD1 et/+ macho de 40 semanas de edad. Aquí se observan los conductos interlobulares, conductos salivales y la estructura acinar definida.



Foto 8. Glándula lagrimal de ratón CD1 et/+ macho de 40 semanas de edad a 40X es normal en el examen histopatológico. Se observan tanto el tejido conectivo como los acinos bien definidos.

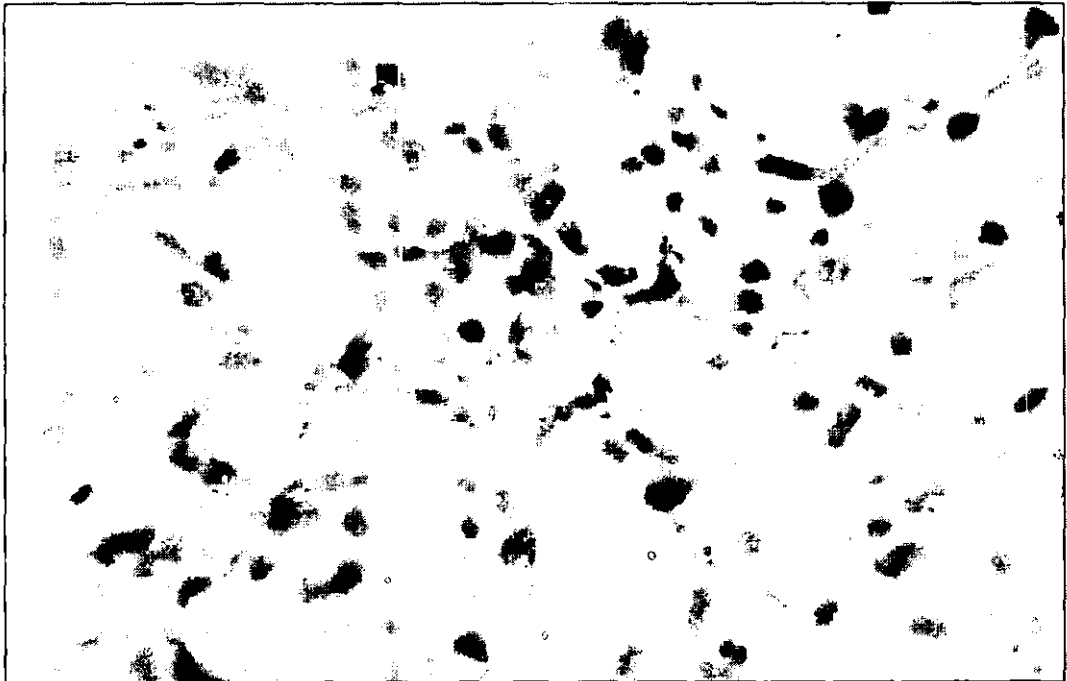


Foto 9. Glándula lagrimal a 40 X. Pequeña área de infiltración, con presencia de células plasmáticas. Ratón CD 1et/et hembra de 23 semanas de edad.

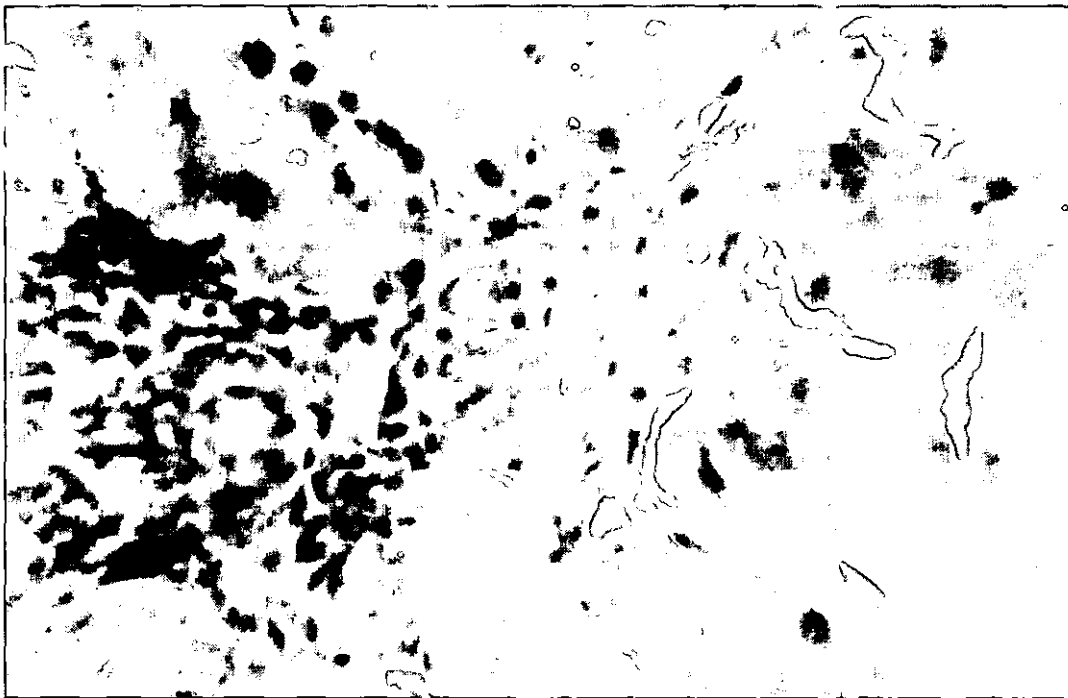
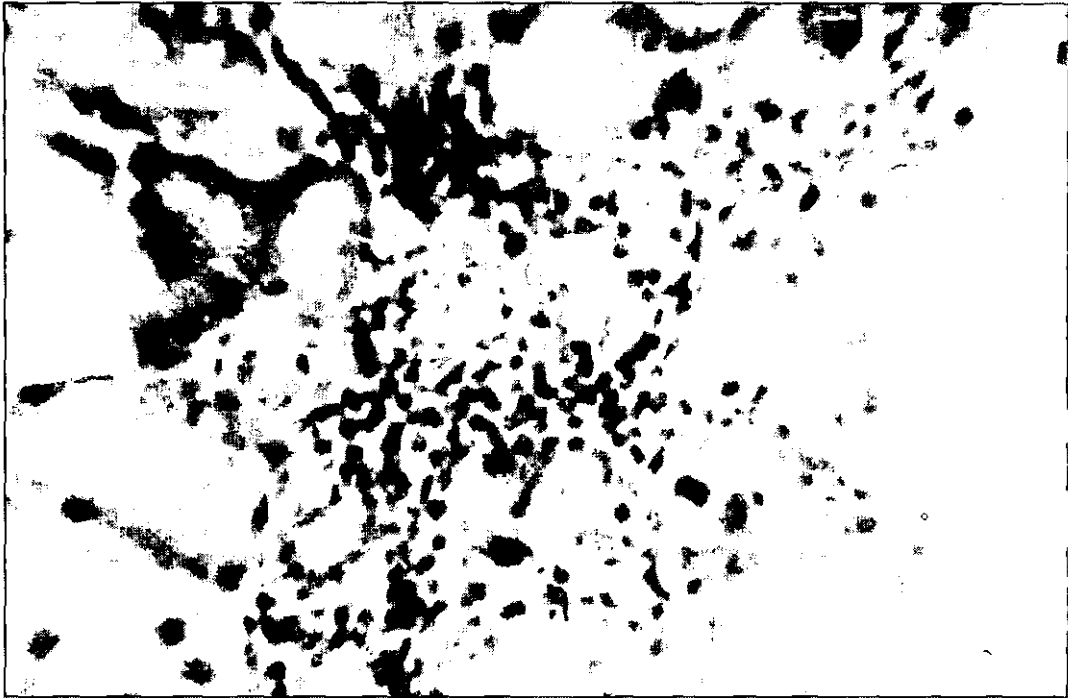


Foto 10 (arriba). Glándula submaxilar a 40 X. Ratón CD1 *et/et* hembra de 22 semanas de edad. Foto 11 (abajo). Glándula lagrimal a 40x. Ratón CD1 *et/et* hembra de 68 semanas. Apariencia histológica de glándula submaxilar en ratones CD1 *et/et* donde se observan focos linfocitarios con presencia de fibrosis.

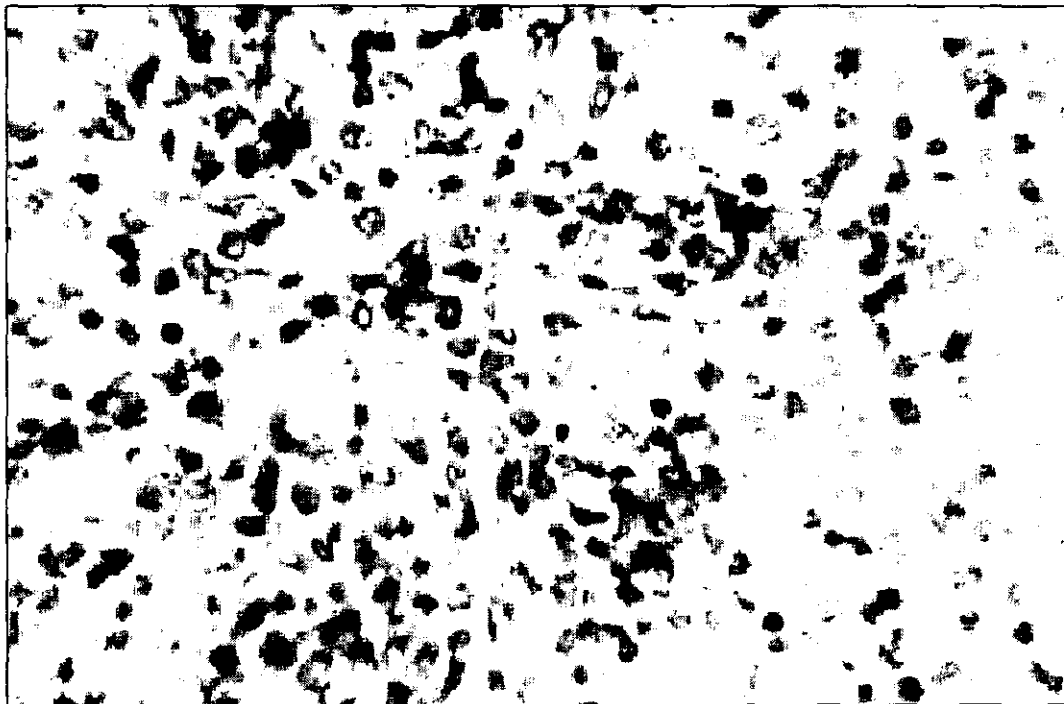
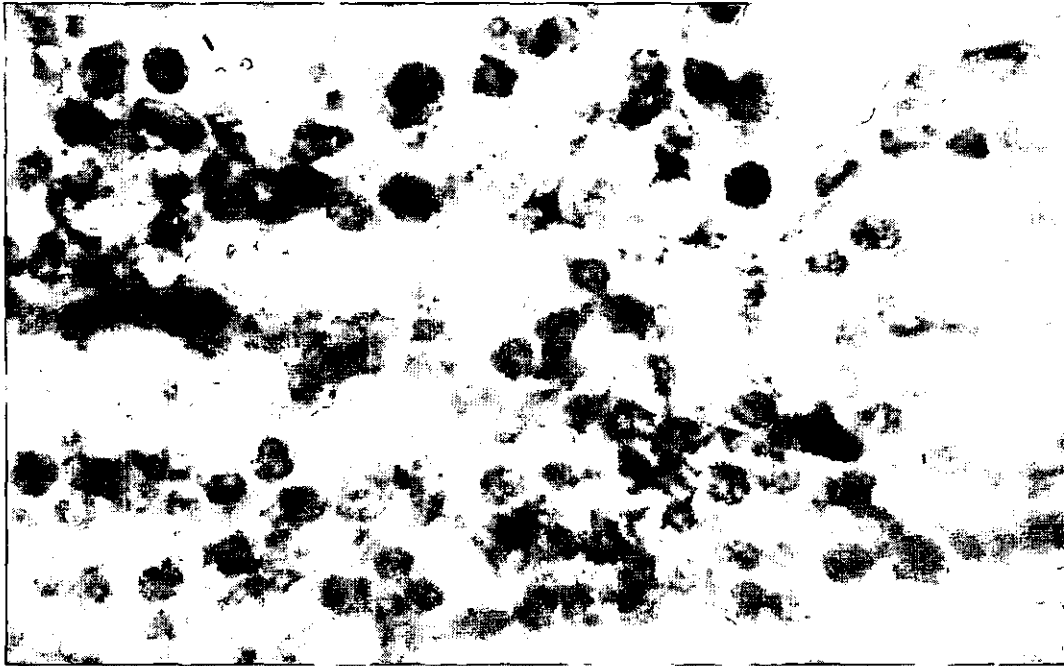


Foto. 12 (arriba). Glándula submaxilar a 100 X. Foto. 13 (abajo). Glándula lagrimal a 40 X. Ratón hembra de 27 semanas de edad. Aquí la arquitectura lobular de la glándula apenas puede ser reconocida. Además se observa áreas de atrofia, fibrosis e infiltración. Las lesiones son caracterizadas por infiltraciones de células mononucleares, células plasmáticas y linfocitos. También se observa remplazamiento del tejido por infiltrado linfocitario.

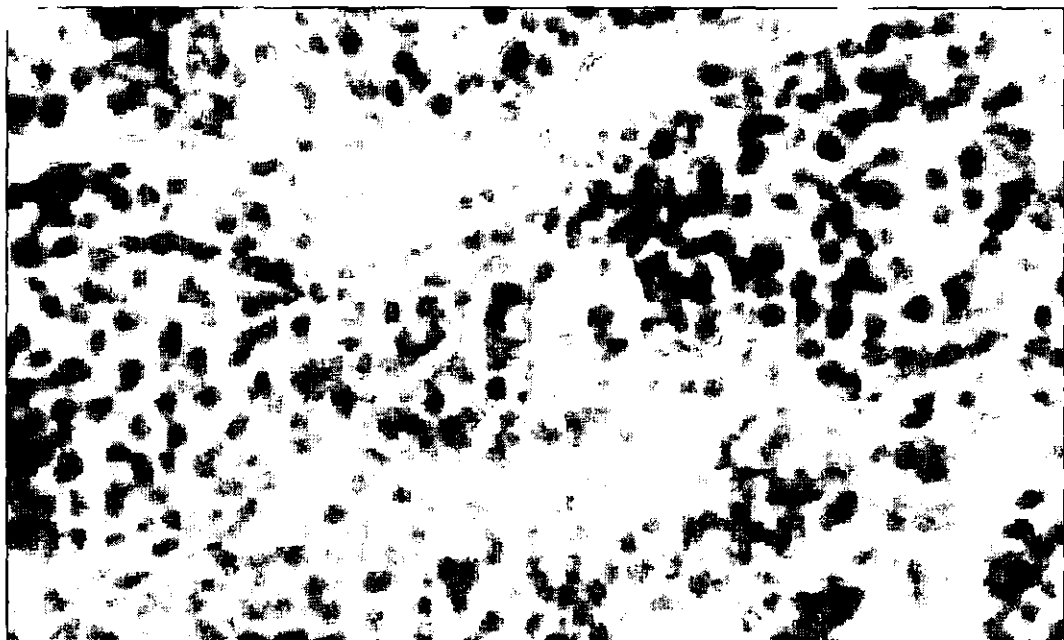


Foto 14 (arriba). Glándula lagrimal a 40 X. Ratón CD1 e/et hembra de 68 semanas de edad. Foto 15 (abajo). Glándula submaxilar a 10X. Ratón CD1 e/et hembra de 27 semanas de edad. Destrucción y sustitución del parénquima por infiltrado linfocitario significativo.

DISCUSION DE RESULTADOS

Se estableció la correlación entre todas las variables estudiadas, mediante un programa de análisis de varianza anova en el paquete estadístico SPSS⁴². Estableciendo un nivel de significancia de $P < 0.05$.

Aquí el método estándar de ELISA es modificado debido a que se requiere en la unión de anticuerpo anticardiolipina (ACA) a liposomas que contienen fosfolípidos con carga negativa, a partir de lo sugerido por Galli M et al,⁴⁵ quien observa que en la unión del anticuerpo antifosfolípido al fosfolípido inmovilizado se requiere la presencia de plasma, de este modo un complemento del plasma es necesario para obligar al anticuerpo anticardiolipina a inmovilizar a la cardiolipina, es la proteína llamada ACA-cofactor, y es requerida para la expresión de la actividad de ACA.

Se ha demostrado que en pacientes con síndrome de Sjögren la activación exagerada de las células-B y su transformación en células plasmáticas da como resultado mayor cantidad de productos humorales; principalmente inmunoglobulinas. Algunos de estos anticuerpos muestran propiedades de autorreactividad que asociados a su depuración disminuida por parte del sistema reticuloendotelial, puede conducir a que los complejos inmunes circulantes se depositen en el tejido glandular o extraglandular,⁶ así como se pudo observar en los ratones CD1 et / et la presencia en suero de múltiples autoanticuerpos circundantes de los isotipos IgA, IgG e IgM; haciendo un análisis de estas inmunoglobulinas por ELISA para los sueros de ratones contra cardiolipina por cepa de las subpoblaciones CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et por Kruskal-Wallis, se encontró que hay diferencia significativa entre las cepas, mientras que en la comparación mediante la prueba de regresión múltiple de Tukey-HSD se encuentra que en la cepa hipotímica, la respuesta de inmunoglobulinas IgG e IgM es mayor al grupo de portador y eutímico. Por otro lado, al hacer la comparación de medias de la inmunoglobulina IgA por cepa no hay diferencia significativa por la prueba de Tukey-HSD, lo que hace pensar que el híbrido con el hecho de poseer el gen se comporta de una

manera diferente, por lo tanto debe haber algo más en el ratón CD1 *et/et* para que se presente la enfermedad, aunque se han encontrado ratones *et/et* con cataratas. Cuando se comparan la respuesta de los ratones de la cepa CD1 *et/et* contra cardiolipina, con relación a la edad, se observa que las inmunoglobulinas IgA, IgG y IgM fluctúan a lo largo de las diferentes edades, este comportamiento se debe a la vida media de los anticuerpos o a que hay una regulación de la respuesta contra la cardiolipina del tipo idiotipo-antiidiotipo.

La principal característica del síndrome de Sjögren primario es una alteración de la respuesta inmune que se evidencia por un infiltrado linfocitario en las glándulas salivales y lagrimales, la proliferación linfoide de la glándula salival menor puede ser reactiva o evolucionar a una neoplasia. En los ratones hipotímicos alopésicos CD1 *et/et* se encontraron cambios histopatológicos en las glándulas salivales y lagrimales que son notablemente similares a los encontrados en los humanos; revelando que las glándulas contienen lesiones que presentan infiltraciones en áreas periductales y perivasculares por células mononucleares, células plasmáticas y linfocitos; estas lesiones en las glándulas de los ratones CD1 *et/et* que van desde infiltraciones de clase I-IV hasta la destrucción general de la glándula acompañada por acumulación de células mononucleares y cambios degenerativos en las células secretorias, observándose un desarreglo celular en los acinos de la glándula lagrimal además de la pérdida de los conductos interlobulares; dado que estos acinos son secretores de tipo seroso, la ausencia de estos conductos nos permite sugerir que la glándula presenta xerostomia y keratoconjunctivitis.²⁷ La severidad de la lesión autoinmune de la glándula en esta cepa hipotímica incrementa conforme avanza la edad.

Se observa también que existe mayor número de ratones con lesiones de ojos como son: inflamados, cataratas y pérdida total del ojo en la cepa CD1 *et/et* con una significancia de 0.0001, los cuales no se observan en las otras cepas. Al hacer la comparación del índice glandular total de lagrimal (IGTL) y de submaxilar (IGTS) se encuentra que existen glándulas más grandes en el ratón CD1, con respecto a las cepas hipotímica y portadora, esto nos hace pensar que el daño a glándulas submaxilares y lagrimales en los ratones CD1 *et/et*, se

evidencia, por el incremento de infiltrado linfocitario, el aumento de autoanticuerpos y los cambios histológicos observados.

La correlación que se realiza por medio de la prueba de Kruskal-Wallis se observa que existe diferencia significativa entre machos y hembras en el IGTL, esto nos puede indicar que el daño que hay en la glándula esta ligada a los factores constitutivos, uno de los más relevantes son las hormonas, de ahí la mayor prevalencia del SS en mujeres desempeñando un papel patogénico, ya que las hormonas sexuales del tipo de los estrógenos son inmunopotenciadores.

En la evaluación de la concentración de proteínas plasmáticas de los ratones CD1, CD1 *et/+* y CD1 *et/et*, se observó que el valor de la concentración de alfa globulina fue significativamente mayor en los ratones CD1 *et/et* con relación a los ratones CD1 y CD1 *et/+* al aplicar la prueba de Tukey-HSD ($P < 0.05$), un aumento en la región alfa globulinas en un suero suele presentarse en trastornos inflamatorios y degenerativos. No se mostró diferencia significativa en el resto de las proteínas separadas electroforéticamente entre los grupos estudiados.

CONCLUSIONES

La causa de las lesiones en las glándulas salival y lagrimal de humanos que caracterizan al SS son desconocidas, Igualmente obscura es la frecuencia de asociación de este síndrome con otros desordenes autoinmunes. Un modelo adecuado para el síndrome de Sjögren primario ocurre en los ratones CD1 et/et con desarrollo espontáneo de algunas de las características vistas en la enfermedad del humano; esta conclusión esta sustentada por los hallazgos tanto histopatológicos (infiltración linfocitaria grado 4, hasta la destrucción general de la glándula acompañada por acumulación de células mononucleares, células plasmáticas y linfocitos, cambios degenerativos en las células secretorias, observándose un desarreglo celular en los acinos de la glándula lagrimal y salival además de la perdida de los conductos interlobulares) así como la asociación de los desordenes autoinmunes (anticuerpos contra fosfolípidos de los isotipos IgA, IgM e IgG), además de la prevalencia en hembras que es evidenciada con el índice glandular total del lagrimal.

En la cuantificación de proteínas la concentración de la fracción alfa globulina los ratones CD1 et/et presentan una concentración significativamente mayor; mientras que en la prueba de factor reumatoide por aglutinación pasiva usando IgG heteróloga fue negativa, esta prueba es indicativa de una enfermedad reumática pero no específica de síndrome de Sjögren.

RECOMENDACIONES

Es conveniente además de los hallazgos encontrados en el presente estudio, se propone lo siguiente:

- Determinar la presencia de anticuerpos antinucleares anti-Ro y anti-La.
- Determinar factor reumatoide heterólogo (Rose Waaler).
- Determinar anticuerpos contra glándulas usando la técnica de inmunofluorescencia indirecta.
- Elucidar los mecanismos de la patogenia implicados en el síndrome de Sjögren.
- Evaluación de la Bromhexine, en este modelo como régimen de tratamiento para el síndrome de Sjögren en humanos.

REFERENCIAS

1. Mikulicz JH: Über eine eigenartige symmetrische Erkrankung der Tränen-und Mundspeicheldrüse. Beitr Chir-Fortschr Gewidment Theodor Billort, Stuttgart, 1892; 610-630.
2. Sjögren HS: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca (keratitis follicularis bei Hypofunktion der Tränen-drüsen). Acta Ophthalmol (Copenh) 1933; 2:1-151.
3. Morgan W, Castleman B: A clinicopathologic study of Mikulicz's disease. Am J Pathol 1953; 29: 471-503
4. Bloch K, Buchanan W, Whol M. Sjögren's syndrome. A clinical, pathological and serological study of 62 cases. Medicine 1965; 44: 187-231.
5. Fox RI, Howell FV, Bone RC, Michelson P: Primary Sjögren's syndrome: Clinical and Immunopathologic features. Semin Arthritis Rheum 1984; 14: 77-106.
6. Espindola ZN, Morales BJ, Witt GM, Romero CA, Vargas BJ. Hallazgos ecocardiográficos en el síndrome de Sjögren primario. Arch Inst Cardiol Mex 1997; 67(2): 114-125.
7. Price EJ, Venables PJW. The etiopathogenesis of Sjögren's syndrome. Sem Arthritis Rheum 1995; 25:117-133.
8. Drosos AA, Andonopoulos AP, Costopoulos JS et al. Prevalence of primary Sjögren's syndrome in an elderly population. Br J Rheumatol 1988; 27: 123-127.

9. Flescher E, Talal N: Do viruses contribute to the development of Sjögren's syndrome? *Am J Med* 1991; 90: 283-285.
10. Venables PJW. Sjögren's syndrome. En: Lachman PJ, Rosen FS, Waiport M, et al, eds. *Clinicals Aspects of Immunology*, Oxford: UK Blackwell Scientific Publishers, 1993;1.121-1.131.
11. Shillitoe EJ, Daniels TE, Whitcher JP, et al, Antibody to cytomegalovirus in patients with Sjögren's syndrome. As determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* 1982, 25:260-265.
12. Yamaoka K, Miyasaka N, Yamamoto K. Possible involvement of Epstein-Barr virus in polyclonal B cell activation in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1988; 31:1.014-1.021.
13. Biberfeld P, Petren AL, Eklund A, et al. Human herpesvirus-6 (HHV-6, HBLV) in sarcoidosis and lymphoproliferative disorders. *J Virol Methods* 1988; 21: 49-59.
14. Venables PJ, Baboonain C, Horsfall AC, Halliday D, Maini RN, Teo CG, et al. The response to Epstein-Barr virus infection in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 1989; 2: 439-448.
15. Garry RF, Fermin CD, Hart DJ, Alexander SS, Donehower LA, Luo-Zhang H. Detection of a human intracisternal A-type retroviral particle antigenically related to HIV. *Science* 1990; 250: 1.127-1.129.
16. Gambús G, Coll J, Campos J, Corominas J, Tomás S, Esteban J, et al. Sjögren's syndrome and hepatitis C virus: prevalence and immunohistochemical study on salivary glands. *Clin Rheum* 1995;14 (Sup 1): 47-48.

17. Talal N, Dauphine MJ, Dang H, Alexander SS, Hari DJ, Garry RF. Detection of serum antibodies to retroviral proteins in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 774-781.
18. Green JE, Hinrichs SH, Vogel J, Jay GL. Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature* 1989; 341: 72-74.
19. Fox RI. Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7: 409-416.
20. Arraz CJA, Perez GA, Zea MA, Alvarez-Mon SM. Síndrome de sjögren. *Medicine* 1997; 7(54):2437-2445.
21. Fox RI, Systemic diseases associated with dry eye. *International Ophthalmology Clinics*. 1994; 34: 71-87.
22. Ramos NF. Enfermedades reumáticas. Criterios y diagnóstico. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 1999: Tomo II: 203-222.
23. Adachi J. D. Buchanan W. W. Kean W. Sjögren Syndrome: Its Clinical Manifestations and Associations. *Arthritis etiology, diagnosis, management*; :465-486.
24. Fox RI, Robinson Ch A, Curd JG, Kozin F, Howell FV. Sjögren syndrome. Proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum*. 1986; 29(5): 577-585.
25. Price EJ, Venables PJW. The Etiopathogenesis of Sjögren's Syndrome. *Seminars in Arthritis Rheum*, 1995; 25(2)October: 117-133.
26. Rosas P; Castellanos P; Dominguez R. The existence of spontaneous hairless (nude) hypothyroid mutant mice from the CD1 strain, reared under conventional animal house conditions. *Med. Sci. Res*. 1987; 15: 553-554.
27. Marroquín S. Rubén. Tesis Doctoral. ENEB, IPN, 1996.

28. Blair GS. Salivary gland radiology. *Br Dent J*, 1976; 140: 15-21.
29. Horsfall A, Skarstein K, Jonsson R. Experimental models of Sjögren's syndrome, in Isenberg DA, Horsfall AC (eds): *Autoimmune Diseases: Focus on Sjögren's Syndrome*. Oxford, UK, BIOS Scientific, 1994: 67-88.
30. Hoffman RW, Alspaugh MA, Waggie KS, et al. Sjögren's syndrome in MRL/l and MRL/n mice. *Arthritis rheum*. 1984; 27: 157-165.
31. Asamoto H, Akazawa Y, Tashiro S, et al. Infiltration of lymphocytes in various organs of the NOD (non-obese-diabetic) mouse. *J Jpn Diabetes Soc*. 1984, 27:775-781
32. Quimby FW, Schwartz RS, Poskitt T, et al. A disorder of dogs resembling Sjögren's syndrome. *Clin Immunol Immunopathol*. 1979, 12: 471-476.
33. Pals S, Radaszkiewicz T, Roozendaal L, et al. Chronic progressive polyarteritis and other symptoms of collagen-vascular disease induced by graft-vs-host reaction. *J Immunol*. 1985, 134:1475-1482.
34. Suzuki K, Fujiwara M, Mizuochi T. Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome induced by a murine retrovirus: Implication for a new animal model, in Homma M, Sugai S, Tojo T, et al (eds). *Sjögren's syndrome: State of the Art*. Amsterdam The Netherlands, Kugler Publications, 1994: 171-173.
35. Iwakura Y, Tosu M, Yoshida E, et al. Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-I. *Science*. 1991, 253:1026-1028.
36. Shull M, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1993, 359: 693-699.

37. Kessler HS. A laboratory model for Sjögren's syndrome. *Am J Pathol.* 1968, 52: 671-685.
38. Robinson Ch P, Yamachika S, Bounous D I, et al. Anovel NOD-derived murine model of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1998, 41(1): 150-156.
39. Boudet F. UV-treated polystyrene microtiter for use in ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J. Immunol. Methods.* 1991; 142: 73-82.
40. Wilson K, Walter J. Principles. *Techniques of Practical Biochemistry.* 4^a ed. Cambridge University Press, UK, 1994:425-447).
41. Rabin B.S. Enzyme Lynked immunoassay. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* Rose NR et al (eds.) Fourth edition American Society for Microbiology. Washington D. C., 1993.
42. Quiroz G. Fournier L. *PC Pluss SPSS. Enfoque aplicado.* Mc Graw Hill. México, 1988.
43. Galli M, Comfurius P, Maassén C, et al, Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *The lancet*, june 1990, vol 335, p.p.1544-1547.
44. Marques de Cantu, Ma. J. *Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas.* Impreso en México, 1988. 1^a ed.
45. Galli M, Comfurius P, Maassén C, et al, Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *The lancet*, june 1990, vol 335, p.p.1544-1547.

46. Flanagan SP. Nude, A mew hairless gene with pleist effects in the mouse. Genet Res. 1996; 8-295.
47. Pantelouris E.M: Thymus rudiment of the athymic nude moude. Nature 1975; 256: 491-493.
48. Averbach R. Animal Models of Immunological Process Academic press Lond 1982: 138-141.
49. Prieto, M.S. Laboratorio Clínico Principios Generales. Interamericana, Mc Graw-Hill. España 1993: 395-412.
50. Rose N.R. Friedman J.L. Manual of Clinical Immunology. 3er. Edition Washington D.C. American Society for Microbiology, 1986:414-426,484-489 y 798-807.
51. Wisdom Erlan. Enzyme immunoassay. Clin Chemistry 1976; 22 (8): 1243.
52. William J. Banks. Histología Veterinaria Aplicada. Manual Moderno. México; 1986: 33-66.
53. William J. Bracha, Whood M. Linda. Color Atlas of Veterinary Histology. Lea & Febiger. Philadelphia, London. 1990: 2, 120-121 y 242.
54. Boya V.J. Atlas de Histología y Organografía Microscópica. Interamericana. España 1996: 262-263, 255-256.
55. Stites DP, Abba I T, Parslow TG. Inmunología básica y clínica. 8ª ed. México: El Manual Moderno, 1996: 489, 499,504,511-514, 788.