



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DETERMINACION DE ANTICUERPOS Anti-Ro y Anti-La
EN RATONES CD1 et/et Y SU RELACION CON EL ESTUDIO
HISTOPATOLOGICO EN GLANDULAS LAGRIMALES
Y SUBMAXILARES

T E S I S

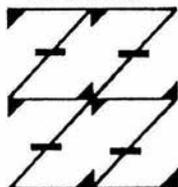
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A ;

CECILIA MARQUEZ PLAZA

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

DIRECTOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA.

ASESOR: M.C. MAURILIO FLORES PIMENTEL

MÉXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este es un viaje perpendicular
a la región donde pocos se aventuran;
Ya estoy pues en esta ruta en que confluyen
aspiraciones y temores
victorias y derrotas
virtudes y defectos.
Así en este viaje supe lo que soy;
ni izquierda ni derecha,
hacia atrás mirar de vez en cuando
pero nunca claudicar
que de adentro ha de brotar el albatros
que anuncia al navegante extraviado
en mar revuelto;
Próximo esta el puerto.

MAGS 04

DEDICATORIAS

A mi madre:

La mejor amiga que tengo, por su amor, comprensión, apoyo incondicional por alentarme a seguir adelante pero sobretodo por darme la vida, este logro es para ti MAMI.

A Miguel Ángel García:

Por compartir conmigo tu sabiduría, por la gran ayuda que me brindaste durante toda la carrera sin ti esto no hubiera sido posible gracias por ser mi ángel y mi conciencia.

A mi familia:

A mis hermanos Guadalupe, José de Jesús, Estela, Gerardo, Rosalía, Patricia, Leticia, Luis por que de ellos tuve el ejemplo de superación y por hacer suyos mis triunfos y fracasos.

A mis sobrinos Marilyne, Yazmín, Miguel Ángel, gracias por todo su apoyo.

A César A. Fuentes:

La finalización de este trabajo es la culminación de una de mis metas, gracias por ayudarme a lograrlo ,con tu cariño y alegría aun en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis:

Dr. Rubén Marroquín Segura

Por ser mi guía para lograr este sueño, por su apoyo, paciencia y sobretodo por estar siempre que lo necesite.

A mi asesor de tesis:

M.C. Maurilio Flores Pimentel

Por sus consejos y apoyo para la realización de este trabajo

A mis sinodales:

QBP. Gustavo Miranda Contreras, QFB. Francisco Javier Parada García, M C. Ricardo Calvillo Esparza. Por toda su atención y sugerencias, que enriquecieron el presente trabajo.

A mis amigos:

Eduardo C, Alejandra C, Gonzalo G por que de alguna u otra manera siempre estuvieron conmigo

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de inmunología L-313 de las FES Zaragoza Campus II, de la UNAM; bajo la dirección del Dr. Rubén Marroquín S .

ABREVIATURAS

- AR:** Artritis reumatoide
- gr:** gramos
- HLA:** complejo mayor de histocompatibilidad
- Ig:** Inmunoglobulinas
- Igsubde:** índice glandular submaxilar derecho
- Igsubizq:** índice glandular submaxilar izquierdo
- Iglagder:** índice glandular lagrimal derecho
- Iglagdizq:** índice glandular lagrimal izquierdo
- Igtsub:** índice glandular total submaxilar
- Igtlag:** índice glandular total lagrimal
- KDa:** kilodaltons
- LES:** Lupus eritematoso sistémico
- Lgi:** glándula lagrimal izquierda
- Lgd:** glándula lagrimal derecha
- MCTD:** Enfermedad mixta del tejido conectivo
- ug:** microgramo
- uL:** microlitro
- mg:** miligramo
- mL.:** mililitro
- nm:** nanometro
- PBS:** Buffer de fosfatos
- SS:** síndrome de Sjögren
- Sci :** Esclerodermia
- Smi:** glándula submaxilar izquierda
- Smd:** glándula submaxilar derecha
-

INDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
2 SINDROME DE SJÖGREN	1
2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	1
2.2 CARACTERISTICAS GENERALES.	3
2.3 ETIOPATOGENIA	8
2.4 EPIDEMIOLOGIA	9
2.5 PERFIL DE ANTICUERPOS	10
2.6 DIAGNÓSTICO	14
2.7 PRUEBAS ESPECIALES	15
2.8 TRATAMIENTOS	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3.1 OBJETIVOS	21
3.2 HIPÓTESIS	21
4. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	22
TIPO DE ESTUDIO	22
GRUPO DE ESTUDIO	22
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	22
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	22
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	22
5. MATERIAL	24
6. MÉTODO	27
6.1 BIOPSIA DE GLÁNDULAS	27
6.2 DETERMINACION DE ANTI-SSB/Ro	29
6.3 DETERMINACION DE ANTI-SSA/La	30

7. RESULTADOS	32
7.1 RESULTADOS ESTADÍSTICOS	47
7.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS	53
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
9. CONCLUSIONES	59
10. ANEXO	60
I TÉCNICA DE ELISA	60
II METODOS HISTOPATOLÓGICOS	64
III PREPARACIÓN DE REACTIVOS	67
11. GLOSARIO	69
12. REFERENCIAS	71

1. - INTRODUCCION

Las enfermedades autoinmunes no órgano-específicas, también llamadas sistémicas, se caracterizan por la presencia de auto-anticuerpos circulantes que pueden ser patogénicos o no y que están dirigidos contra antígenos presentes en todo el cuerpo, no siendo específico en un órgano en particular. La presencia de uno o más auto-anticuerpos circulantes contra autoantígenos nucleares (ANAs) es la característica de las enfermedades reumáticas sistémicas. Este grupo de enfermedades no presenta manifestaciones clínicas homogéneas, sino graduaciones en la variedad y severidad de los multisistemas involucrados. En este grupo se encuentran el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR), la esclerodermia (Scl), la enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD) y el síndrome de Sjögren (SS), objeto de la presente tesis.

2. - EL SÍNDROME DE SJÖGREN

2.1- ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La historia del síndrome de Sjögren comienza en 1882 en un congreso llevado a cabo en Heidelberg (Alemania) donde el Dr. T. Leber presentó tres casos de pacientes con queratitis y sequedad de boca. Seis años después, el médico cirujano Dr. J.Von Mikulicz-Radecki, presentó a la sociedad médica de Königsberg el caso de un paciente de 42 años con hinchazón bilateral de las glándulas lagrimales y salivales. Por este motivo se denominó inicialmente esta patología como enfermedad de Mikulicz.

Poco tiempo después, el Dr. WB Hadden también presentó a la sociedad médica de Londres a una paciente de 65 años que desde hacía varios meses padecía de sequedad bucal y lagrimal que se incrementaba gradualmente, por lo que desde entonces introdujo el término xerostomía.

En 1933 el oftalmólogo sueco, Henrik Sjögren publicó su tesis en la que describía un síndrome que afectaba a 19 pacientes posmenopáusicas caracterizado por sequedad lagrimal y bucal. Sjögren encontró que 13 mujeres del total de este grupo sufrían de artritis crónica acompañada de sequedad de ojos y boca. [1] En su monografía, el Dr. Sjögren concluye sobre las bases de una amplia investigación clínica y anatopatológica, que este síndrome es consecuencia de una patología sistémica generalizada. En 1943 la tesis del Dr. Sjögren fue traducida al inglés por un oftalmólogo australiano lo que provocó una amplificación del interés de esta patología en diversos campos de la medicina, y ahora se le reconoce como una enfermedad autoinmune e inflamatoria crónica. Desde ese momento, los médicos de todo el mundo han puesto atención al encontrar pacientes con esta combinación de síntomas y la han llamado Síndrome de Sjögren (SS). En las décadas de los 50 y 60 se publicaron diferentes trabajos clínicos al respecto. En la década siguiente se documentaron diferencias clínicas y de laboratorio en pacientes que eran portadores o no de artritis reumatoide. Estos dos grupos se diferencian por su perfil de autoanticuerpos y sus marcadores genéticos. Con base en estas comprobaciones, Block et al y posteriormente otros autores, propusieron subdividir a este síndrome en primario; que es aquel en que los síntomas están presentes sin signos de enfermedades conectivas que lo acompañen; y secundario, cuando los ojos y la boca seca aparecen acompañado por una enfermedad del tejido conectivo, por ejemplo: AR, esclerodermia, LES, etc.

2.2- CARACTERÍSTICAS GENERALES

El síndrome de Sjögren (SS) es una afección inflamatoria crónica secundaria a una alteración del sistema inmunológico, que tiene como característica la infiltración linfocitaria. Si bien se trata de un desorden sistémico (de todo el organismo), las articulaciones y músculos son afectados pero preferentemente las glándulas de secreción externa (sobre todo lagrimales, salivales, nasales),.

La inflamación y consecuente destrucción de estas estructuras se traduce clínicamente en síntomas derivados del déficit secretorio (sequedad de los tejidos)[2,3]. Esta enfermedad también puede afectar otras glándulas, tales como las que están localizadas en el estómago, páncreas, e intestinos, y puede causar sequedad en otras partes del cuerpo que necesitan secreciones y humedad, como la nariz, garganta, vías respiratorias y la piel.

El aumento de la glándula salival se produce entre un 30 y 50% de los pacientes con SS, observándose generalmente difuso, no doloroso y de consistencia firme, siendo estas alteraciones más perceptibles en las parótidas. Como se mencionó antes, el síndrome de Sjögren se puede clasificar en dos formas esenciales:

1-Síndrome de Sjögren primario: definido por la queratoconjuntivitis sicca y xerostomía en ausencia de otro cuadro.

2-Síndrome de Sjögren secundario: cuando están presentes una xerostomía y/o xerofthalmia en el contexto de una enfermedad autoinmune bien definida, especialmente aquellas que afectan al tejido conectivo como: conectivitis mixta, esclerosis, vasculitis, crioglobulinemia mixta, púrpura hipergammaglobulinémica, hepatitis crónica, tiroiditis de Hashimoto, LES, AR etc.[4]

Esta enfermedad se observa predominantemente en el sexo femenino, ya que el 90% de los individuos con este síntoma son mujeres, cuya edad promedio es 50 años, aunque se han presentado casos en niños [5]. Aproximadamente en el 50% de las personas afectadas la enfermedad se presenta como una patología primaria (SS primario), mientras que en el resto se observa en relación con artritis reumatoide u otra enfermedad del tejido conjuntivo.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la sequedad ocular (xeroftalmia 94%) y orofaríngea (xerostomía 96%), que suele manifestarse de manera insidiosa[2]. En el SS ya sea primario o secundario, el componente acuoso es el que se altera primero, dando lugar a una sensación subjetiva de sequedad ocular y orofaríngea.

Debido a que la película lagrimal esta compuesta en un 90% de agua y es el componente principal de la saliva, en la que se encuentran disueltas enzimas y electrolitos, todo ello secretado por el componente epitelial, así como una pequeña proporción de moco producido por el acino glandular. Esto refleja que probablemente es el epitelio el que primeramente se ve afectado por el infiltrado inflamatorio. El mecanismo por el cual se reduce la secreción salival y lagrimal es objeto de cierto debate; la creencia previa de que el fallo glandular es debido simplemente a la infiltración inflamatoria, parece ser incorrecta, al menos en parte, pues 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 relacionadas con la edad.

El grado de daño epitelial no siempre se corresponde con la alteración de flujo salival y la estimulación con fármacos, como la pilocarpina que a menudo restaura el flujo salival normal en pacientes con importante sequedad oral [7].

Estas observaciones han llevado a algunos autores a sugerir que el infiltrado mononuclear puede inhibir la función exocrina mediante la liberación de sustancias con efectos antisecretores, o por otras interacciones con la célula epitelial que no suponen la destrucción de la misma. La influencia del sistema nervioso puede ser otro mecanismo importante ya que la glándula salival está ricamente innervada, así mismo el sistema parasimpático está fundamentalmente implicado en la secreción acuosa y el simpático en la secreción mucinosa.

En la biopsia de la glándula salival menor de pacientes con SS se ha observado una importante destrucción de fibras nerviosas, lo que sugiere que un descenso del estímulo neurogénico puede contribuir a la disfunción glandular [27, 28].

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 ó sicca).

La sequedad oral conlleva a la necesidad de ingerir con mayor frecuencia, líquidos para mejorar la deglución de los alimentos. Dicha sequedad puede acompañarse de otros síntomas como disfagia o alteraciones en el sentido del gusto. La exploración más detallada de la boca puede conducir a observar ausencia de líquido en el receso sublingual y atrofia de las papilas de la lengua.

Un tercio de los pacientes, fundamentalmente en el estadio del SS primario, desarrollan 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 destrucción de los conductos excretores: la queilitis angular, candidiasis crónica eritematosa de lengua y las caries dentales son complicaciones relativamente frecuentes [7].

La biopsia de glándula salival menor suele mostrar un infiltrado linfocitario, destrucción del epitelio glandular y grados variables de fibrosis [8]. En algunos pacientes es posible observar parte de la glándula bien conservada, por lo general la insuficiencia salival 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.

La enfermedad sistémica en el SS puede atravesar por etapas con síntomas generales como astenia, adinamia o febrícula-fiebre persistente o con las manifestaciones específicas producidas al comprometer diferentes órganos. Existe afectación articular en aproximadamente el 50% de los pacientes, que la presentan, por lo general, en forma de artralgias y menos frecuente, como poliartritis no erosiva de curso crónico, afectando grandes y pequeñas articulaciones de forma bilateral y en ocasiones se produce artropatía de Jaccoud. Se observa afectación renal en el 30 a 40% de los casos, lo habitual es que se produzca neuropatía intersticial moderada que se expresa por alteraciones tubulares (acidosis tubulorenal, diabetes insípida, Síndrome de Fanconi) y que rara vez evoluciona a insuficiencia renal terminal [10, 11].

La glomerulonefritis es poco común y se asocia con crioglobulinemia y lleva a plantear la posibilidad de padecer LES.

La afección de aparato respiratorio es muy común pero en pocas ocasiones es relevante. La desecación del árbol traqueobronquial da lugar a una tos persistente que se ha descrito como una obstrucción de la vía aérea pequeña, acompañada de inflamación linfocitaria peribronqueal. El lavado bronqueoalveolar ha mostrado una alta frecuencia de alveolitis linfocitaria, que suele ser asintomático 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. La disfagia es el síntoma gastrointestinal más frecuente, probablemente debida a la xerostomía.

La enfermedad puede afectar el páncreas y ocasionar hiposecreción pancreática e hipoclorhidea, gastritis atrófica o trastornos de absorción, pero suelen ser asintomática y solo 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%)[4]. En el caso de la primera, los paciente 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 del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) similares al SS secundario y a la AR.

Los efectos del SS sobre el sistema nervioso central (SNC) son motivo de controversia, si bien en algunos trabajos parece que se ha llegado a diagnosticar en el 20% de los casos y en otros estudios no se ha confirmado este hecho.

2.3- ETIOPATOGENIA

Dentro de los factores externos mas importantes se encuentran los virus, ya que en algunos casos la enfermedad comienza en conjunto con una infección vírica y en otros con la reactivación de un proceso vírico latente. Se ha implicado al virus Epstein-Barr, al citomegalovirus, al herpes virus humano tipo 6, al virus C de la hepatitis y los retrovirus, pero no hay datos contundentes que avalen tales afirmaciones [12, 40-43].

Se ha detectado partículas retrovíricas de tipo A y anticuerpos contra glucoproteína p24 de la cápside vírica de HIV en aproximadamente. 30% de los enfermos, mientras que en la población general el porcentaje es de 1-4%. Los factores internos constitucionales más relevantes son las hormonas y el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA). La mayor prevalencia de SS en mujeres sugiere que algún factor hormonal realiza un papel patogénico, las hormonas sexuales son capaces de regular diversas funciones inmunes, a pesar de esto el SS no parece mejorar en la menopausia y la terapia hormonal sustitutiva no produce exacerbaciones de la enfermedad[40].. 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, DQ1, DQ2, DRw52 del HLA. Mientras que el secundario se asocia con el DR4 [13].

Los estudios de tipificación de HLA sugieren una predisposición genética para el desarrollo de dicha enfermedad. Con frecuencia la HLA-B8, HLA-DR3, HLA-DR2 y más notablemente HLA-DRw52, que están aumentada en el síndrome primario[14]. Se presentan dos tipos principales de alteraciones inmunorreguladoras; la primera de ellas es una actividad anómala del sistema inmunitario celular, manifestada por una intensa infiltración inflamatoria por células monoclonales, que se observa en las glándulas salivales, compuestas predominantemente por linfocitos T activados y también se puede detectar linfocitos B activados. Estos infiltrados son los responsables de muchas de las manifestaciones clínicas de síndrome de Sjögren [15].

El segundo trastorno inmunorregulador es una alteración oligoclonal de células B, el exceso de la actividad de estas células se manifiesta por hipergammaglobulinemia policlonal, elevación de los niveles de inmunocomplejos circulantes y producción de SSA(anti-Ro) y de SSB (anti-La), aunque no se ha aclarado el significado clínico exacto de estos y otros marcadores, la mayoría de los pacientes con manifestaciones graves han resultado positivos para SSA[16]. Su estrecha vinculación con enfermedades autoinmunes ha permitido un estudio profundo sobre la naturaleza e identidad de las moléculas involucradas.

2.4- EPIDEMIOLOGIA

El Dr. H Sjögren describió al SS como una enfermedad rara con una prevalencia de 0.05%. En 1971, el Dr. M.A. Sheam estimó la prevalencia del SS primario y secundario entre 0.2 y 0.44%. Existen sin embargo evidencias crecientes de que la prevalencia del SS supera a la de la artritis reumatoide, que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial.

En las décadas de los 70 y 80 los estudios llevados a cabo en poblaciones geriátricas mostraron una prevalencia que oscila en un rango del 2 al 4.8%.

Un estudio sueco que evaluó la prevalencia del SS en personas de 52 a 72 años determinó que la misma alcanza el 2.7% y una reciente publicación china registró una prevalencia del 0.8%. Puede concluirse que el SS parece ser un desorden común que tiene una amplia distribución mundial. En el caso del SS secundario, aproximadamente un 30 % de los pacientes también padece artritis reumatoide, un 10% lupus y un 20% sufre esclerodermia.

2.5- PERFIL DE AUTO-ANTICUERPOS

La alteración de laboratorio más características es la aparición de diversos auto-anticuerpos. El auto-anticuerpos comúnmente encontrado en SS es el factor reumatoide, que presenta títulos altos con o sin artritis reumatoide. Las tres principales clases de inmunoglobulinas (Igs) pueden ser elevadas en el SS, encontrándose mayor elevación en la fracción IgG.; mientras que la IgA, IgM aparecen muy poco elevadas. Debido a que en SS ante todo se implica a la superficie mucosa, es sorprendente que los niveles de IgA sean los menos afectados.

La IgA secretora puede ser elevada en el suero pero esta es una pequeña fracción de la IgA total, además se ha demostrado que se encuentra elevado en muchas enfermedades crónicas.

Los niveles de IgM e IgG salivales son elevados en los pacientes con SS y son relacionadas con el grado de compromiso con la glándula salival. Sin embargo, los que se encuentran sumamente altos son los niveles de gamma globulina; la crioglobulinemia es la complicación del SS. La crioglobulinas son inmunoglobulinas compuestas de aminoácidos y carbohidratos, así por ejemplo, los niveles de β^2 -microglobulinas son elevados en la orina, suero y saliva de pacientes con SS [9]. Entonces la elevación de las β^2 -microglobulinas en suero puede ser útil para pronosticar una recaída de la característica clínica del SS, mientras que cuando bajan las β^2 -microglobulinas indican un mejoramiento clínico. Los niveles de β^2 -microglobulinas salivales pueden ser usados para predecir el compromiso de la glándula salival, los altos niveles reflejan la extensa infiltración de células mononucleares.[34]

Existe una gran variedad de autoantígenos involucrados en reconocimiento de los autoanticuerpos relacionados con las enfermedades autoinmunes sistémicas ente ellas se encuentran las partículas ribonucleoproteicas (RNP) altamente conservadas como SSA/Ro, SSB/La y nRNP.

Los anticuerpos antinucleares en suero que más frecuentemente se observan en los pacientes con SS son: el anticuerpos SS-B/La, el cual está relacionado con la forma primaria de la enfermedad en un 60-70% de los casos debido a que son los más específicos por ser raros en otras enfermedades autoinmunes; en la forma secundaria, cuando se relaciona con LES en el 70 al 80% de los pacientes, se detecta el anticuerpo SS-A/Ro, sin embargo se considera que este es específico para el SS cuando esta presente también el anticuerpo SS-B/La.

ANTI-SSA/Ro

Clark y Col, en 1969 descubrieron por primera vez el antígeno SSA/Ro en un paciente con LES. Estudios posteriores, utilizando sueros de pacientes con SS, revelaron que los mismos eran capaces de precipitar tres antígenos diferentes, que fueron designados como A, B y C y con el prefijo SS, indicando que están involucrados en SS.

Años mas tarde Alsbaugh y Maddison demostraron que el Ro y SS-A eran el mismo antígeno y que no eran específicos del SS, ya que se encuentran en los sueros de pacientes con LES, aunque en menor frecuencia.

Estos autoanticuerpos reconocen partículas ribonucleicas pequeñas, cuyo componente proteico varía entre 50 y 150 kD. El elemento proteínico contenido en estos complejos inicialmente se reportó que tenía un tamaño de 60kD que se asocia a pequeños ARN de 83–112 nucleótidos. Recientemente se detectaron proteínas con un tamaño de 52kD en estos complejos[18].

Cuando se utilizan eritrocitos, como fuente antigénica, los sueros de pacientes reconocen dos proteínas de peso molecular de 54kD o 60kD antigénicamente diferentes, ya que se han encontrado sueros capaces de reconocer a una y no a otra proteína [16]. La disociación de la respuesta inmune hacia distintas proteínas de Ro sugiere la posibilidad de diferentes procesos autoinmunes.

ANTI -SSB/La

Los autoanticuerpos SS-B reconocen a una proteína nuclear de 48kD (SS-B) que actúa como cofactor para la ARN polimerasa III. El antígeno está asociado también con todas las RNA transcritos por ARN polimerasa III, incluyendo tARNs, ARNs, 5S ribosomal, ARNs viral codificado para ARN polimerasa II del huésped, incluyendo el virus del Epstein-Barr 1 y 2. La detección de la presencia de los anticuerpos SS-B en los sueros de pacientes con SS primario es muy variado y oscila entre el 40 y 96%.

Algunos complejos de SS-A/Ro RNP contienen la proteína de SS-B/La [19]. Recientemente se ha encontrado que se produce una dramática acumulación de SS-B/La en las membranas celulares de las glándulas salivales y conjuntivas de pacientes con SS [20]. Esta observación conduce a la hipótesis de que la expresión superficial de antígenos normalmente crípticos pueden ser inducidos por factores tales como una infección viral, la cual, junto con la expresión antigénica HLA clase II, puede servir como estímulo para la producción de respuestas autoinmunes específicas de SS. El hallazgo de anticuerpos antagonistas de SS-A/Ro (con polipéptidos de 60 kDa en 42 a 88 % de los casos y de 52 kDa en 35 a 87 % de los casos) y SS-B/La-48 (en 46 a 77 % de los casos) en suero de pacientes con SS, ha sido considerados como un parámetro de diagnóstico en el criterio de California y de manera preliminar en el criterio Europeo. Sin embargo, el diagnóstico con estos reactivos no es definitivo debido a que estos anticuerpos también se han encontrado en pacientes con otras enfermedades autoinmunes[21].

En este trabajo se realizó la determinación de Anti-Ro y Anti-La utilizando una placa de diagnóstico comercial. Esto con el fin de averiguar si los valores determinados con este método son proporcionales al daño que presentan las glándulas salivales y lagrimales en ratones.

2.6- DIAGNOSTICO

Depende de la valoración del conjunto de manifestaciones clínicas, datos de laboratorio y resultado de las exploraciones complementarias ya que ninguna valoración aislada proporciona un diagnóstico certero. Para delimitar y hacer una clasificación con un margen aceptable de confianza se ha convenido en acumular los datos según los criterios de San Diego (1986), que a continuación se describen [33]

A- Síndrome de Sjögren primario.

- Signos y síntomas de sequedad ocular.

Prueba de Schirmer positiva.

Tinción positiva con rosa de bengala.

- Signos y síntomas de sequedad oral.

Biopsia de glándula salival menor anormal (más de 2 focos linfocitarios)

-
- Presencia de trastornos inmunitarios

Factor reumatoide elevado (>1/320)

Anticuerpos anti-nucleares con título alto (>1/320)

Auto-anticuerpos específicos anti-SS-A y/o anti-SS-B

B- Síndrome de Sjögren secundario

- Signos y síntomas característicos del SS primario definidos en el punto 1
- Datos clínicos suficientes para el diagnóstico de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, linfoma preexistente, infección por VIH, virus de la hepatitis B o C, fibromialgia primaria, otras causas conocidas de neuropatía autónoma y otras causas de queratitis seca o crecimiento de glándulas salivales.

2.7- PRUEBAS ESPECÍFICAS.

a) PRUEBA DE SCHIRMER :

Ayuda a determinar el grado de sequedad de los ojos. Se introducen dos pequeñas piezas de papel, una en cada ojo, dejándolas durante 5 minutos. Posteriormente se retira el papel y se miden los milímetros que ha mojado la secreción lagrimal de sus ojos.

b) POR EXAMEN CON LÁMPARA DE HENDIDURA:

Es un método más ajustado de ver la sequedad de los ojos. Se pone una gota de un colorante en el ojo y examina el ojo con una lámpara especial. El colorante teñirá aquellas áreas secas o erosionadas de los ojos. Este examen lo efectúa un oftalmólogo.

c) GAMMAGRAFÍA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES:

Consiste en la administración de un contraste por la vena que se acumula en las glándulas salivales. Una glándula enferma elimina y secreta el contraste de forma mucho más lenta quedando esto reflejado en una radiografía especial.

d) SIALOMETRÍA:

Procedimiento que se utiliza para medir el flujo salival. Los valores normales a tener en cuenta son en reposo menor de 0,1 mL/min y en la saliva estimulada menor a 0,7 mL/min aproximadamente.

e) SIALOGRAFÍA:

Método invasivo que se emplea para su realización la introducción de un material de contraste en los conductos excretores de las glándulas salivales, donde encontramos rasgos no específicos. Observamos sialectasias, imágenes multiformes que demuestran la destrucción del sistema parenquimatoso glandular con extravasación. También se puede producir un enlentecimiento en la eliminación del líquido de contraste durante semanas o meses.

f) ESCINTIGRAFÍA:

Es un método no invasivo que valora las zonas no funcionales. El trazador utilizado es el Tc, que permite visualizar las glándulas salivales y su mecanismo excretor. Las anomalías frecuentemente observadas son asimetría entre las dos glándulas parótidas y su retardo en la eliminación.

g) BIOPSIA DE GLÁNDULAS SALIVALES MENORES:

Es un método sencillo que consiste en: colocar la anestesia infiltrativa local en el labio inferior, se realiza una incisión pequeña y horizontal sobre la mucosa labial, entre la línea media del labio y la comisura, las glándulas salivales menores son diseccionadas liberándolas de la facia. 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 las biopsias; 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 4mm^2 , un foco linfocitario esta constituido por 50 linfocitos o mas la presencia de mas dos focos por área se considera diagnóstica en términos anatomopatológico, grados menores de infiltración se consideran como sugestivos. la biopsia de labio tiene una sensibilidad de 82% y una especificidad del 86%. [32]

h) HISTOPATOLOGÍA:

Encontramos focos de infiltración linfoidea, con atrofia acinar e hipertrofia del epitelio ductal, con obstrucción gradual de la luz y desarrollo de islotes de células epiteliales formadas a partir del epitelio ductal proliferante. Se pueden definir diversos grados inflamatorios dependiendo del grado de severidad. Se considera positiva cuando se observa 1foco/4mm² de tejido glandular constituido por 50 o más linfocitos.

i) ANÁLISIS DE RUTINA:

- Anemia normocrómica ó hipocrómica (en el 25% de los casos).
- Leucopenia (en el 30% de los casos).
- Aumento de la eritrosedimentación.
- Eosinofilia.
- Trombosis o trombocitopenia apreciable (cuando se encuentra asociado a la AR o LES).
- Alteraciones inmunológicas.
- Hipergamaglobulinemia.
- Ac. antiducto salival, SS-A, SS-B, SS-C y AAN.
- Factor reumatoide positivo.

2.8- TRATAMIENTO

A) MEDIDAS SINTOMÁTICAS

1- Bucales: Se debe insistir a los sujetos que mantengan una higiene bucal perfecta, con uso regular de pasta dental fluorada, lavados bucales y evaluaciones dentales regulares, los sorbos frecuentes de agua y el uso de goma de mascar sin azúcar. La pilocarpina es útil algunas veces en los casos que no responden a las medidas conservadoras. Muchos individuos encuentran que es de ayuda la preparación de saliva artificial en aerosol, un humedecedor para disminuir la xerostomía nocturna para el tratamiento de la candidiasis bucal se recomiendan los trociscos de nistatina.

2- Oculares: Las lágrimas artificiales alivian los síntomas oculares y protegen contra las complicaciones de los ojos. La terapéutica para complicaciones oculares refractarias incluye mucolíticos, oclusión puntiforme.

3- Otras: la resequedad de la piel se puede tratar con cremas o aceites humectantes, la resequedad vaginal y nasal se alivia frecuentemente mediante lubricantes estériles, miscibles en agua.

B) MEDIDAS SISTEMICAS

Los antiinflamatorios no esteroide son de utilidad en el tratamiento de la artritis no erosiva, los corticosteroides o inmunosupresores pueden ser útiles en la terapéutica de personas con enfermedad grave o que ponga en peligro la vida como linfoma, macroglobulinemia o infiltración linfocítica masiva en órganos vitales.

3- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la mayoría de los pacientes con síndrome de Sjögren se observan anticuerpos anti-La (SS-B) y anti-Ro (SS-A) que van produciendo un infiltrado que es una característica inmunitaria de la enfermedad. Es necesario contar con un modelo animal de éste síndrome, para entender mejor la patogenia de la enfermedad. Por ello se desarrolla un estudio en ratones CD1 et/et, cuyas glándulas mostraron, en análisis previos un infiltrado semejante al presentado en las glándulas de los enfermos del síndrome de Sjögren. Nuestro interés es observar si el aumento en dichos niveles puede asociarse a la destrucción de las glándulas salivales y lagrimales, con la finalidad de utilizar estos antígenos como marcadores para predecir el daño ocasionado en la glándula, sin necesidad de realizar una biopsia.

3.1- OBJETIVOS

- a)- Determinar los niveles de anti-Ro y anti-La en sueros de ratones machos y hembras et/et, et/+ y +/+.
- b)- Realizar estudios histopatológicos en glándulas lagrimales y submaxilares en las tres cepas de ratones.
- c)- Relacionar los niveles de anti-Ro y anti-La, y determinar el daño presentado en las glándulas salivales y submaxilares.

3.2- HIPOTESIS.

A mayor título de anti-Ro y anti-La, mayor será el daño encontrado en las glándulas lagrimales y submaxilares.

4. - DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO

Comparativo, transversal, observacional y prospectivo.

GRUPO DE ESTUDIO.

98 ratones *et/et*, 16 ratones *et/+* y 20 ratones *+/+*

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Ratones hembras y machos de 18 a 68 semanas de las cepas *+/+*, *et/+* y *et/et*.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Ratones del estudio que presenten infecciones, tumoraciones.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

Se eliminarán aquellos animales que no tengan completos sus datos.

MODELO ANIMAL

El modelo animal que se utilizará es un ratón hipotímico alopécico derivado por una mutación espontánea de la cepa albina CD1 como resultado de un gen recesivo autosómico simple, [22,23] surgida en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Los animales son obtenidos al aparear machos y hembras *et/+* o bien machos *et/et* y hembras *et/+*.

A este ratón se le llamó CD1 *et/et*, el símbolo "et" se a adaptado 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*, se presenta una estructura parecida a un nódulo linfático en lugar de timo y el peso de ésta estructura es más bajo que el peso del timo de las hembras eutímicas CD1*et/+*[24,25].

Las glándulas de algunas hembras *et/et* desarrollan una exocrinopatía que se asemeja al síndrome de Sjögren[26] Los críos *CD1et/et* se separan de sus hermanos con pelo se diferencian al nacer por la ausencia de vibrisas (*vibrissae*), se crecen por separado y se mantienen bajo condiciones convencionales del bioterio, con libre acceso al alimento, agua y a temperatura de 21 –24°C.

5. - MATERIAL

REACTIVOS

PRODUCTOS	MARCA
Ácido cítrico $H_3C_6H_5O.H_2O$	Técnica química
Agua desionizada	Hycel
Agua destilada	Hycel
Albúmina de huevo	J.B.Baker
Bicarbonato de sodio	Técnica química
Carbonato de sodio	J.B. Baker
Cloruro de sodio NaCL	Técnica química
Cloruro de potasio KCL	Técnica química
Fosfato de potasio K_2HPO_4	J.B.Beker
Fosfato de sodio NaH_2PO_4	J.B.Baker
Gelatina U.S.P.	J.B.Baker
o-fenilendiamina (ODP) $C_6H_8N_2$	Sigma
Peroxido de Hidrógeno H_2O_2	
Twen 20	Hycel de México
Leche descremada	

EQUIPOS

PRODUCTO	MARCA
Lector de ELISA	Awareness Technology Inc
Lámpara UV	Cole-Palmer Instrument Compay
Balanza analítica	Mattler H 80
Incubadora	RIOSSA
Agitador Vortex-Genie	Scientific industries NC
Centrífuga	Solbat
Refrigerador	Phillips 127volts-VA

MATERIAL

Placas de poliestireno de alta adherencia Nunc.
Micropipetas
Pipetas tipo Eppendorf
Puntas para pipetas
Equipo de microdissección
Matraz volumétrico 1000mL
Vasos de precipitados 150 y 500mL
Papel aluminio
Papel absorbente
Probetas graduadas 50mL, 100mL, 200mL
Tubos de ensayo 12x875, 13x100,

MATERIAL BIOLÓGICO

CEPA	RATONES	NUMERO DE RATONES
1	CD1	20
2	CD1 et/+	16
3	CD1 et/et	98

6. -METODO

Se estudiaron 134 ratones machos y hembras de varias edades(20CD1,16CD1et/+, 98 CD et/et) antes del sacrificio de los ratones se observaron las lesiones visibles y se clasificarán como: 1)Ratón sano, 2)Ratón con ojo inflamado, 3)Ratón con cataratas, 4)Ratón ojo perdido. Se registró la edad, sexo, peso, y una vez anotadas las características de cada una de las cepas se anestesiaron los animales en cámara de éter y se procedió a colectar la sangre por incisión axilar, seguida de su sacrificio (figura 1). La sangre se dejó coagular, se obtuvo el suero, en el que se realizó la medición de anti-Ro y anti-La.



FIGURA 1. Incisión axilar

6.1 BIOPSIA DE GLANDULAS

Las glándulas salivales submaxilares (gsub) y lagrimales (glag) izquierda y derecha (izq, der) para el análisis histopatológico son extirpadas de los ratones CD1, CD et/+, CD1 et/et se pesan y con estos datos se calcula el índice glandular (Ig), según la siguiente formula

$$I_{g_x} = \frac{P_g}{P_a} \times 10000$$

Donde

P_g = Peso de la glándula

P_a = Peso del animal

x = izquierdo, derecho o total

Las glándulas se almacenan independientemente en una solución de formalina al 10% de PBS para su preservación. Después de la fijación, el tejido es deshidratado en series de grados de soluciones de etanol e incluido en parafina, las secciones son cortados en 5µm usando un micrótopo rotatorio después se tiñe con hematoxilina y eosina (H-E), las secciones de tejidos son evaluadas usando un microscopio óptico

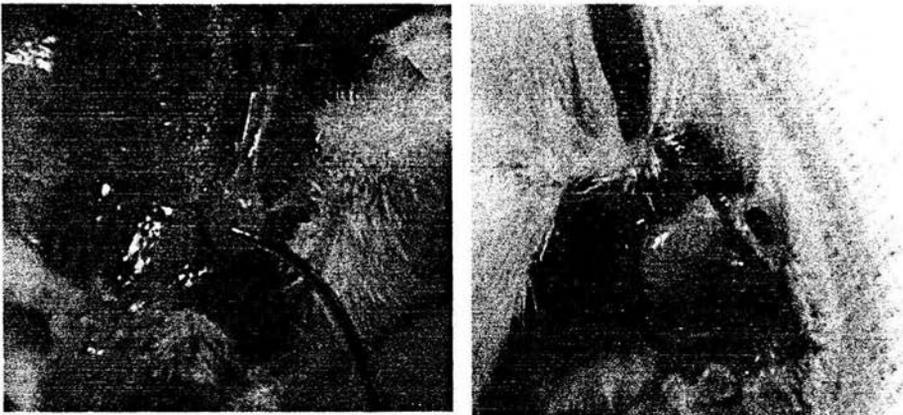


FIGURA 2 a) Glándula submaxilar, b) Glándula lagrimal

6.2 DETERMINACION DE ANTI-SSB/Ro

Se utilizó un inmunoensayo enzimático de fase sólida, utilizado para la determinación de autoanticuerpos antagonista directos SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, RNP/Sm, Scl-70, So-1, centrómeros (CENP-B), fosfoproteínas ribosomales(RPP), Marca Dia Sorin.

PROCEDIMIENTO

1-Todos los reactivos y el suero se equilibran a temperatura ambiente 18-25°C, se almacenan a una temperatura de 2-8°C. La placa se equilibró a temperatura ambiente en su empaque para proteger las paredes de posible condensación.

2-Diluir el suero 1:50 con PBS.

3-Colocar 100uL de especímenes de prueba diluidos en los pozos. Tratando de realizar esta operación antes de los 5 min.

4- Incubar los pozos por 30 a 35 min a 37°C.

5-Eliminar el contenido de los pozos por decantación o aspiración con un aparato de vacío .

6-Llenar todos los pozos con PBS-Tween agitando y decantando, repitiendo dos veces mas para un total de tres lavados. Remover todo el líquido residual de los pozos por inversión y colocar el plato sobre papel absorbente.

7-Colocar inmediatamente 100uL de conjugado enzimático en todos los pozos, completando esta operación en 5 min.

8- Incubar de 30 a 35 min a 37°C.

9-Decantar el conjugado enzimático de los pozos y lavar con PBS-Tween como se describió en el paso No 6.

10.-Inmediatamente agregar 100uL de cromógeno en todos los pozos. Incubar a 37°C por 15min, manteniendo lejos de la luz.

11.-Agregar 50uL de solución de stop en todos los pozos y en el mismo orden y a la misma velocidad que como se hizo en el caso del cromógeno y mezclar por agitación suave de la placa. Hecho esto el color deberá de cambiar a amarillo.

12.- Medir la absorbancia de cada pozo. Los valores de absorbancia debe ser medidos en los siguientes 30 min, posteriores a que se completo el ensayo.

6.3 DETERMINACION DE ANTI-SSA/La

PROCEDIMIENTO

1-Todos los reactivos y el suero se equilibran a temperatura ambiente 18-25°C, se almacenan a una temperatura de 2-8°C. La placa se equilibro a temperatura ambiente en su empaque para proteger las paredes de posible condensación.

2-Diluir el suero 1:50 con PBS.

3-Colocar 100uL de especimenes de prueba diluidos en los pozos. Tratando de realizar esta operación antes de los 5 min. y usando una muestra de diluyente para calibrar a cero.

4-Incubar los pozos por 30 a 35min a 37°C.

5-Eliminar el contenido de los pozos por decantación o aspiración con un aparato de vacío.

6.-Llenar todos los pozos con PBS-Tween agitando y decantando, repitiendo dos veces mas para un total de tres lavados. Remover todo el liquido residual de los pozos por inversión y colocar el plato sobre papel absorbente.

-
- 7- Colocar inmediatamente 100uL de conjugado enzimático en todos los pozos, completando esta operación en 5 min.
 - 8- Incubar de 30 a 35 min a 37°C.
 - 9-Decantar el conjugado enzimático de los pozos y lavar con PBS-Tween como se describió en el paso No 6.
 - 10.-Inmediatamente agregar 100uL de cromógeno en todos los pozos. Incubar a 37°C por 15min, manteniendo lejos de la luz.
 - 11.-Agregar 50uL de solución de stop en todos los pozos y en el mismo orden y a la misma velocidad que como se hizo en el caso del cromógeno y mezclar por agitación suave de la placa, el color deberá de cambiar a amarillo.
 - 12.- Medir la absorbancia de cada pozo los valores de absorbancia debe ser medidos en los siguientes 30 min, posteriores a que se completo el ensayo.

7. -RESULTADOS

Se estudiaron 134 ratones distribuidos en 3 cepas, cuyas características físicas y datos glándulares se indican en las tablas 1, 2, 3.

TABLA 1. Características físicas y datos glándulares de los ratones CD1 (cepa 1)

No	CEPA	EDAD SEMANAS	SEXO	PESO (gr)	LESION	Smi (gr)	Smd (gr)	gli (gr)	gld (gr)
81	1	18	1	47	0	0.0164	0.0088	0.0736	0.034
82	1	18	1	39.5	0	0.0393	0.0145	0.024	0.0215
83	1	18	1	34.5	0	0.0307	0.018	0.0335	0.0281
84	1	18	1	32	0	0.0564	0.0347	0.0128	0.0219
85	1	18	1	39	0	0.0268	0.0232	0.0353	0.0336
86	1	18	1	39.5	0	0.0178	0.0202	0.0243	0.04
87	1	18	1	41	0	0.01	0.0132	0.0282	0.0275
88	1	18	1	40	0	0.0182	0.0276	0.0266	0.0271
89	1	18	1	31.5	0	0.0113	0.0127	0.015	0.0146
90	1	18	1	43.5	0	0.0145	0.0128	0.0285	0.02
91	1	18	2	50	0	0.0282	0.0193	0.0341	0.04
92	1	18	2	45	0	0.0126	0.0173	0.0283	0.0357
93	1	18	2	45.5	0	0.0189	0.0228	0.027	0.03
94	1	18	2	42.5	0	0.0223	0.0223	0.0345	0.0236
95	1	18	2	42.5	0	0.0305	0.0311	0.0192	0.0397
96	1	18	2	46	0	0.0183	0.036	0.0318	0.0384
97	1	18	2	48.5	0	0.03	0.0186	0.045	0.0387
98	1	18	2	40.5	0	0.0261	0.0224	0.0361	0.034
99	1	18	2	48.5	0	0.0237	0.0266	0.0524	0.0431
100	1	18	2	49.5	0	0.0396	0.0386	0.0478	0.053

TABLA 2 Características físicas y datos glandulares de los ratones CD1eI/+ marcados como cepa 2

NO	CEPA	EDAD SEMANAS	SEXO	PESO (gr)	LESION	Smi (gr)	Smd (gr)	. gli (gr)	gld (gr)
65	2	40	2	50.5	2	0.0068	0.0147	0.0652	0.0659
66	2	40	2	51.5	0	0.0138	0.0154	0.0437	0.0532
67	2	40	2	50	0	0.0092	0.0066	0.0623	0.0756
68	2	40	2	40	0	0.0072	0.0039	0.025	0.0263
69	2	40	2	38	0	0.0119	0.0128	0.0215	0.0256
70	2	40	2	38.5	0	0.0053	0.0069	0.038	0.0373
71	2	40	2	42.5	0	0.0078	0.0148	0.0387	0.0349
72	2	40	2	46.5	0	0.0061	0.0047	0.0348	0.037
73	2	40	1	46.5	0	0.0229	0.0248	0.0322	0.0222
74	2	40	1	38.5	0	0.0072	0.0085	0.0157	0.0225
75	2	40	1	40	0	0.0141	0.0171	0.023	0.0191
76	2	40	1	40	0	0.0189	0.0299	0.0149	0.0168
77	2	40	1	40.5	0	0.0136	0.0274	0.02	0.0209
78	2	40	1	40.5	0	0.0225	0.0101	0.0156	0.0194
79	2	40	1	51	0	0.007	0.0103	0.0178	0.033
80	2	40	1	38	0	0.0198	0.0118	0.0225	0.0249

TABLA 3. Características físicas y datos glandulares de los ratones CD1 et/et marcados como cepa 3

NO	CEPA	EDAD SEMANAS	SEXO	PESO (gr)	LESION	Sm (gr)	Smd (gr)	.gli (gr)	gld (gr)
1	3	68	1	35.5	0	0.0024	0.0022	0.0056	0.0086
2	3	68	1	32.5	1	0.0076	0.0075	0.0112	0.0091
3	3	68	1	35.5	1	0.0122	0.0111	0.0084	0.0105
4	3	68	1	31	0	0.0112	0.0113	0.0098	0.0042
5	3	68	1	34.5	1	0.0133	0.0133		0.012
6	3	68	1	33.5	0	0.0288	0.009	0.0043	0.0087
7	3	68	1	33.5	1	0.0028	0.004	0.0057	0.0074
8	3	68	1	33	2	0.0039	0.0079	0.0011	0.0071
9	3	27	1	32	0	0.0203	0.0211	0.0074	0.007
10	3	27	1	33.5	0	0.0067	0.0106	0.0092	0.0105
11	3	27	1	30.5	2	0.0181	0.0215	0.0083	0.0079
12	3	27	1	27.5	3	0.007	0.0098	0.0048	0.0065
13	3	27	1	34.5	3	0.0172	0.0172	0.0045	0.0053
14	3	27	1	35.5	1	0.0059	0.0057	0.0087	0.0073
15	3	27	1	37	3	0.0179	0.0058	0.0081	0.0088
16	3	27	1	31	0	0.0061	0.0071	0.0032	0.0052
17	3	27	2	38.5	1	0.0128	0.0167	0.0173	0.0157
18	3	27	2	36	3	0.0072	0.007	0.0168	0.0183
19	3	27	2	43	0	0.012	0.0119	0.0196	0.0199
20	3	27	2	38	0	0.0068	0.012	0.0166	0.0198
21	3	27	2	37	0	0.0073	0.0062	0.0323	0.0288
22	3	27	2	43	0	0.0144	0.0131	0.0268	0.0233
23	3	27	2	44	1	0.0159	0.0147	0.0264	0.0286

24	3	27	2	35.5	2	0.0086	0.0065	0.0018	0.0183
25	3	25	2	42	0	0.0122	0.0104	0.0186	0.0248
26	3	25	2	39.5	0	0.0146	0.0179	0.0246	0.023
27	3	25	2	40	1	0.0335	0.0265	0.0167	0.0188
28	3	25	2	37	1	0.0131	0.0186	0.0175	0.0178
29	3	25	2	42.5	3	0.0086	0.0085	0.0181	0.0218
30	3	25	2	37	0	0.0072	0.0094	0.0181	0.0196
31	3	25	2	39	3	0.0095	0.0104	0.0168	0.0141
32	3	25	2	40.5	2	0.0088	0.0088	0.019	0.02
34	3	39	1	27.5	2	0.0128	0.0168	0.01	0.0122
35	3	39	1	35	2	0.0262	0.0135	0.0188	0.0171
36	3	39	1	36.5	3	0.0102	0.009	0.01	0.0246
37	3	39	1	37	3	0.0163	0.0086	0.0161	0.0173
39	3	39	1	39.5	1	0.0175	0.0185	0.0128	0.0073
40	3	39	1	34	3	0.0113	0.0173	0.02	0.0165
41	3	35	1	37	0	0.0095	0.0167	0.0222	0.02
42	3	35	1	32	1	0.0111	0.0133	0.018	0.0141
43	3	35	1	33.5	0	0.01	0.0104	0.0145	0.0151
44	3	35	1	40.5	0	0.0146	0.0147	0.0204	0.0156
45	3	35	1	33	1	0.0147	0.0139	0.0147	0.0159
46	3	35	1	36.5	0	0.024	0.0327	0.0182	0.0196
47	3	35	1	30	1	0.0046	0.0091	0.02	0.0228
48	3	35	1	32.5	0	0.0168	0.0348	0.0131	0.018
49	3	26	2	39	0	0.0105	0.0134	0.0353	0.0363
50	3	26	2	41	3	0.0113	0.0209	0.0353	0.0351
51	3	26	2	35.5	0	0.0129	0.0101	0.021	0.0221
52	3	26	2	39	0	0.01	0.0126	0.0374	0.038
53	3	26	2	42.5	0	0.0151	0.0106	0.0417	0.0415
54	3	26	2	39	1	0.0135	0.019	0.0409	0.0397

55	3	26	2	41	0	0.0089	0.0107	0.0291	0.0355
56	3	26	2	38	0	0.01	0.01	0.0274	0.0211
57	3	26	2	33	0	0.0232	0.018	0.0313	0.03
58		26	2	44	0	0.0278	0.0283	0.0449	0.047
59	3	26	2	45	3	0.0153	0.0083	0.0476	0.0387
60	3	26	2	27.5	0	0.0107	0.0163	0.0166	0.0167
61	3	26	2	32	0	0.0134	0.0085	0.0224	0.0259
62	3	26	2	37.5	1	0.0136	0.0152	0.0312	0.0387
63	3	26	2	37	0	0.0163	0.017	0.0337	0.0388
64	3	26	2	40	2	0.0119	0.013	0.0488	0.0475
106		23	2	45.5	3	0.0119	0.0122	0.0315	0.0262
107	3	23	2	40	2	0.0083	0.0083	0.0376	0.0364
109	3	23	2	39	3	0.015	0.0137	0.0369	0.04
110	3	23	2	36	2	0.016	0.0158	0.0345	0.0313
111	3	23	2	39	3	0.0228	0.0179	0.0304	0.0313
112	3	23	2	36	3	0.0234	0.0261	0.0444	0.0391
114	3	23	2	36.5	3	0.0165	0.0144	0.0333	0.0331
115	3	23	2	31.5	2	0.008	0.017	0.0264	0.0272
116	3	23	2	43	2	0.0232	0.011	0.0391	0.0419
117	3	23	2	39	3	0.0084	0.0102	0.0309	0.0315
123	3	19	1	35	2	0.0271	0.0269	0.0189	0.0268
125	3	19	1	34.5	2	0.0204	0.0126	0.01	0.0184
127	3	19	1	30	2	0.0169	0.0186	0.014	0.0145
129	3	19	1	32	3	0.0182	0.0144	0.0234	0.0211
131	3	19	1	37.5	2	0.0155	0.0137	0.0272	0.0216
132	3	19	1	32.5	3	0.0152	0.0256	0.0107	0.0127
134	3	19	1	33.5	1	0.0202	0.0133	0.0294	0.0225
137	3	19	1	30.5	3	0.0248	0.0377	0.0203	0.0227
138	3	19	1	36.5	1	0.0078	0.0077	0.0432	0.0269

139	3	19	1	35	1	0.0122	0.0116	0.0187	0.0032
146	3	19	2	41	3	0.0285	0.021	0.0205	0.0257
147	3	19	2	31	2	0.024	0.0158	0.0302	0.0292
148	3	19	2	35	2	0.0133	0.0157	0.0316	0.0294
153	3	19	2	45	3	0.0223	0.0364	0.0337	0.0254
158	3	19	2	44	2	0.0352	0.0268	0.0325	0.0304
159	3	19	2	41	1	0.0217	0.0277	0.0305	0.0228
160	3	19	2	39.5	1	0.022	0.0336	0.03	0.0297
163	3	28	1	32	3	0.0138	0.0202	0.0122	0.0117
164	3	28	1	37	2	0.0125	0.0109	0.0165	0.0136
167	3	28	1	36.5	1	0.0093	0.0136	0.015	0.0146
172	3	28	1	32	1	0.0131	0.0098	0.0171	0.0159
175	3	28	1	39.5	1	0.0174	0.0173	0.0214	0.0204
184	3	15	2	36.5	1	0.0143	0.0267	0.0261	0.0284
186	3	15	2	28	2	0.0148	0.0122	0.0131	0.0147
191	3	15	1	38	3	0.0151	0.0181	0.014	0.0126
193	3	15	1	33.5	3	0.0094	0.0125	0.0159	0.0184

Sexo= 1-macho , 2- hembras

Tipo de lesión: 0= sin lesión, 1= ojo inflamado, 2= ojo c/catarata, 3= ojo perdido.

Smi= glándula submaxilar izquierdo.

Smd= glándula submaxilar derecho.

Lgi= glándula lagrimal izquierdo.

Lgd= glándula lagrimal derecha.

Una vez obtenidos los datos anteriores, se calculó el índice de glándulas submaxilares

(I_{gsub}) y lagrimales (I_{glag}) para las tres cepa utilizando la formula 1

TABLA 4 Valores de índice glandulares de ratones CD1 (cepa 1)

No	CEPA	EDAD	SEXO	LESION	Igsubde	Igsubizq	Iglagde	Iglagizq	Igtsub	Igtlag
81	1	18	1	0	1.9	3.5	7.2	15.7	5.4	22.9
82	1	18	1	0	3.7	9.9	5.4	6.1	13.6	11.5
83	1	18	1	0	5.2	8.9	8.1	9.7	14.1	17.9
84	1	18	1	0	10.8	17.6	6.8	4	28.5	10.8
85	1	18	1	0	5.9	6.9	8.6	9.1	12.8	17.7
86	1	18	1	0	5.1	4.5	10.1	6.2	9.6	16.3
87	1	18	1	0	3.2	2.4	6.7	6.9	5.7	13.6
88	1	18	1	0	6.9	4.6	6.8	6.7	11.5	13.4
89	1	18	1	0	4	3.6	4.6	4.8	7.6	9.4
90	1	18	1	0	2.9	3.3	4.6	6.6	6.3	11.1
91	1	18	2	0	3.9	5.8	8	6.8	9.5	14.8
92	1	18	2	0	3.8	2.8	7.9	6.3	6.6	14.2
93	1	18	2	0	5	4.2	6.6	5.9	9.2	12.5
94	1	18	2	0	5.2	5.2	5.6	8.1	10.5	13.7
95	1	18	2	0	7.3	7.2	9.3	4.5	14.5	13.9
96	1	18	2	0	7.8	4	8.3	6.9	11.8	15.3
97	1	18	2	0	3.8	6.2	8	9.3	10	17.3
98	1	18	2	0	5.5	6.4	8.4	8.9	12	17.3
99	1	18	2	0	5.5	4.9	8.9	10.8	10.4	19.7
100	1	18	2	0	7.8	8	10.7	9.7	15.8	20.4

Igsubde = Índice glandular submaxilar derecho

Igsubizq = Índice glandular submaxilar izquierdo

Iglagde = Índice glandular lagrimal derecho

Iglagizq = Índice glandular lagrimal izquierdo

Igtsub = Índice total glandular submaxilar

Igtlag = Índice total glandular lagrimal

TABLA 5 Valores de índices glandulares de ratones CDI et/ (cepa 2)

No	CEPA	EDAD	SEXO	LESION	Igsubde	Igsubizq	Iglagde	Iglagizq	Igtsub	Igtlag
65	2	40	2	2	2.9	1.3	13	12.9	4.3	26
66	2	40	2	0	3	2.7	10.4	8.6	5.7	18.8
67	2	40	2	0	1.3	1.8	15.1	12.5	3.2	27.6
68	2	40	2	0	1	1.8	6.6	6.3	2.8	12.8
69	2	40	2	0	3.4	3.1	6.7	5.7	6.5	12.4
70	2	40	2	0	1.8	1.4	9.7	9.9	3.2	19.6
71	2	40	2	0	3.5	1.8	8.2	9.1	5.3	17.3
72	2	40	2	0	1	1.3	8	7.5	2.3	15.4
73	2	40	1	0	5.3	4.9	4.8	6.9	10.3	11.7
74	2	40	1	0	2.2	1.9	5.8	4.1	4.1	9.9
75	2	40	1	0	4.3	3.5	4.8	5.8	7.8	10.5
76	2	40	1	0	7.5	4.7	4.2	3.7	12.2	7.9
77	2	40	1	0	6.8	3.4	5.2	4.9	10.1	10.1
78	2	40	1	0	2.5	5.6	4.8	3.9	8	8.6
79	2	40	1	0	2	1.4	6.5	3.5	3.4	10
80	2	40	1	0	3.1	5.2	6.6	5.9	8.3	12.5

TABLA 6 Valores de índices glandulares de ratones CD1 et/et (cepa 3)

No	CEPA	EDAD	SEXO	LESION	lgsubde	lgsubizq	lglagde	lglagizq	lgsub	igt lag
1	3	68	1	0	0.6	0.7	2.4	1.6	1.3	4
2	3	68	1	1	2.3	2.3	2.8	3.4	4.6	6.2
3	3	68	1	1	3.1	3.4	3	2.4	6.6	5.3
4	3	68	1	0	3.6	3.6	1.4	3.2	7.3	4.5
5	3	68	1	1	3.9	3.9	3.5	2.7	7.7	6.2
6	3	68	1	0	2.7	8.6	2.6	1.3	11.3	3.9
7	3	68	1	1	1.2	0.8	2.2	1.7	2	3.9
8	3	68	1	2	2.4	1.2	2.2	0.3	3.6	2.5
9	3	27	1	0	6.6	6.3	2.2	2.3	12.9	4.5
10	3	27	1	0	3.2	2	3.1	2.7	5.2	7.9
11	3	27	1	2	7	5.9	2.6	2.7	13	5.3
12	3	27	1	3	3.6	2.5	2.4	1.7	6.1	4.1
13	3	27	1	3	5	5	1.5	1.3	10	2.8
14	3	27	1	1	1.6	1.7	2.1	2.5	3.3	4.5
15	3	27	1	3	1.6	4.8	2.4	2.2	6.4	4.6
16	3	27	1	0	2.3	2	1.7	1	4.3	2.7
17	3	27	2	1	4.3	3.3	4.1	4.5	7.7	8.6
18	3	27	2	3	1.9	2	5.1	4.7	3.9	9.8
19	3	27	2	0	2.8	2.8	4.6	4.6	5.6	9.2
20	3	27	2	0	3.2	1.8	5.2	4.4	4.9	9.6
21	3	27	2	0	1.7	2	7.8	8.7	3.6	16.5
22	3	27	2	0	3	3.3	5.4	6.2	6.4	11.7

23	3	27	2	1	3.3	3.6	6.5	6	7	12.5
24	3	27	2	2	1.8	2.4	5.2	0.5	4.3	5.7
25	3	25	2	0	2.5	2.9	5.9	4.4	5.4	10.3
26	3	25	2	0	4.5	3.7	5.8	6.2	8.2	12.1
27	3	25	2	1	6.6	8.4	4.7	4.2	15	8.9
28	3	25	2	1	5	3.5	4.8	4.7	8.6	9.5
29	3	25	2	3	2	2	5.1	4.3	4	9.4
30	3	25	2	0	2.5	1.9	5.3	4.9	4.5	10.2
31	3	25	2	3	2.7	2.4	3.6	4.3	5.1	7.9
32	3	25	2	2	2.2	2.2	4.9	4.7	4.3	9.6
33	3	39	1	2	6.1	4.7	4.4	3.6	10.8	8.1
34	3	39	1	2	3.9	7.5	4.9	5.4	11.3	10.3
36	3	39	1	3	2.5	2.8	6.7	2.7	5.3	9.5
37	3	39	1	3	2.3	4.4	4.7	4.4	6.7	9
39	3	39	1	1	4.7	4.4	1.8	3.2	9.1	5.1
40	3	39	1	3	5.1	3.3	4.9	5.9	8.4	10.7
41	3	35	1	0	4.5	2.6	5.4	6	7.1	11.4
42	3	35	1	1	4.2	3.5	4.4	5.6	7.6	10
43	3	35	1	0	3.1	3	4.5	4.3	6.1	8.8
44	3	35	1	0	3.6	3.6	3.9	5	7.2	8.9
45	3	35	1	1	4.2	4.5	4.8	4.5	8.7	9.3
46	3	35	1	0	9	6.6	5.4	5	15.5	10.4
47	3	35	1	1	3	1.5	7.6	6.7	4.6	14.3
48	3	35	1	0	10.7	5.2	5.5	4	15.9	9.6
49	3	26	2	0	3.4	2.7	9.3	9.1	6.1	18.4
50	3	26	2	3	5.1	2.8	8.6	8.6	7.9	17.2
51	3	26	2	0	2.8	3.6	6.2	5.9	6.5	12.1
52	3	26	2	0	3.2	2.6	9.7	9.6	5.8	19.3
53	3	26	2	0	2.5	3.6	9.8	9.8	6	19.6

54	3	26	2	1	4.9	3.5	10.2	10.5	8.3	20.7
55	3	26	2	0	2.6	2.2	8.7	7.1	4.8	15.8
56	3	26	2	0	2.6	2.6	5.6	7.2	5.3	12.8
57	3	26	2	0	5.5	7	9.1	9.5	12.5	18.6
58	3	26	2	0	6.4	6.3	10.7	10.2	12.8	20.9
59	3	26	2	3	1.8	3.4	8.6	10.6	5.2	19.2
60	3	26	2	0	5.9	3.9	6.1	6	9.8	12.1
61	3	26	2	0	2.7	4.2	8.1	7	6.8	15.1
62	3	26	2	1	4.1	3.6	10.3	8.3	7.7	18.6
63	3	26	2	0	4.6	4.4	10.5	9.1	9	19.6
64	3	26	2	2	3.3	3	11.9	12.2	6.2	24.1
106	3	23	2	3	2.7	2.6	5.8	6.9	5.3	12.7
107	3	23	2	2	2.1	2.1	9.1	9.4	4.2	18.5
109	3	23	2	3	3.5	3.8	10.3	9.5	7.4	19.7
110	3	23	2	2	4.4	4.4	8.7	9.6	8.8	18.3
111	3	23	2	3	4.6	5.8	8	7.8	10.4	15.8
112	3	23	2	3	7.3	6.5	10.9	12.3	13.8	23.2
114	3	23	2	3	3.9	4.5	9.1	9.1	8.5	18.2
115	3	23	2	2	5.4	2.5	8.6	8.4	7.9	17
116	3	23	2	2	2.6	5.4	9.7	9.1	8	18.8
117	3	23	2	3	2.6	2.2	8.1	7.9	4.8	16
123	3	19	1	2	7.7	7.7	7.7	5.4	15.4	13.1
125	3	19	1	2	3.7	5.9	5.3	2.9	9.6	8.2
127	3	19	1	2	6.2	5.6	4.8	4.7	11.8	9.5
129	3	19	1	3	4.5	5.7	6.6	7.3	10.2	13.9
131	3	19	1	2	3.7	4.1	5.8	7.3	7.8	13
132	3	19	1	3	7.9	4.7	3.9	3.3	12.6	7.2
134	3	19	1	1	4	6	6.7	8.8	10	15.5
137	3	19	1	3	12.4	8.1	7.4	6.7	20.5	14.1

138	3	19	1	1	2.1	2.1	7.4	11.8	4.2	19.2
139	3	19	1	1	3.3	3.5	0.9	5.3	6.8	6.3
146	3	19	2	3	5.1	7	6.3	5	12.1	11.3
147	3	19	2	2	5.1	7.7	9.4	9.7	12.8	19.2
148	3	19	2	2	4.5	3.8	8.4	9	8.3	17.4
153	3	19	2	3	8.1	5	5.6	7.5	13	13.1
158	3	19	2	2	6.1	8	6.9	7.4	14.1	14.3
159	3	19	2	1	6.8	5.3	5.6	7.4	12	13
160	3	19	2	1	8.5	5.6	7.5	7.6	14.1	15.1
163	3	28	1	3	6.3	4.3	3.7	3.8	10.6	7.5
164	3	28	1	2	2.9	3.4	3.7	4.5	6.3	8.1
167	3	28	1	1	3.7	2.5	4	4.1	6.3	8.1
172	3	28	1	1	3.1	4.1	5	5.3	7.2	10.3
175	3	28	1	1	4.4	4.4	5.2	5.4	8.8	10.6
184	3	15	2	1	7.3	3.9	7.8	7.2	11.2	14.9
186	3	15	2	2	4.4	5.3	5.3	4.7	9.6	9.9
191	3	15	1	3	4.8	4	3.3	3.7	8.7	7
193	3	15	1	3	3.7	2.8	5.5	4.7	6.5	10.2

Para aquellos especímenes que presentaron los índices glandulares menores se determinaron los anticuerpos anti-Ro y anti-La tomando 10 ratones de la cepa 1, 10 de la cepa 2, y 38 de la cepa 3

TABLA No 7 Absorbancias obtenidas de anti-Ro y anti-La por la técnica de ELISA.

No	CEPA	EDAD	SEXO	LESION	IGTSUB	IGTLAG	ABS ANTI-Ro	ABS ANTI-La
1	3	68	1	0	1.3	4	0.111	.152
2	3	68	1	1	4.6	6.2	0.210	.284
3	3	68	1	1	6.6	5.3	0.086	.176
5	3	68	1	1	7.7	6.2	0.128	.168
6	3	68	1	0	11.3	3.9	0.107	.164
7	3	68	1	1	2	3.9	0.116	.270
8	3	68	1	2	3.6	2.5	0.15	.462
10	3	27	1	0	5.2	7.9	0.039	.178
11	3	27	1	2	13	5.3	0.091	.224
12	3	27	1	3	6.1	4.1	0.119	.395
13	3	27	1	3	10	2.8	0.064	.180
14	3	27	1	1	3.3	4.5	0.098	.327
15	3	27	1	3	6.4	4.6	0.105	.296
16	3	27	1	0	4.3	2.7	0.061	.335
17	3	27	2	1	7.7	8.6	0.078	.259
18	3	27	2	3	3.9	9.8	0.101	.322
19	3	27	2	0	5.6	9.2	0.086	.248
20	3	27	2	0	4.9	9.6	0.076	.180
21	3	27	2	0	3.6	16.5	0.101	.283
22	3	27	2	0	6.4	11.7	0.102	.292
24	3	27	2	2	4.3	5.7	0.090	.198
25	3	25	2	0	5.4	10.3	0.087	.241
28	3	25	2	1	8.6	9.5	0.101	.308

29	3	25	2	3	4	9.4	0.032	.106
30	3	25	2	0	4.5	10.2	0.095	.250
31	3	25	2	3	5.1	7.9	0.059	.201
32	3	25	2	2	4.3	9.6	0.059	.183
36	3	39	1	3	5.3	9.5	0.059	.536
37	3	39	1	3	6.7	9	0.055	.542
39	3	39	1	1	9.1	5.1	0.130	.328
40	3	39	1	3	8.4	10.7	0.063	.176
43	3	35	1	0	6.1	8.8	0.160	.251
44	3	35	1	0	7.2	8.9	0.067	.410
45	3	35	1	1	8.7	9.3	0.063	.261
125	3	19	1	2	9.6	8.2	0.087	.249
139	3	19	1	1	6.8	6.3	0.087	.279
164	3	28	1	2	6.3	8.1	0.104	.293
167	3	28	1	1	6.3	8.1	0.097	.282
81	1	18	1	0	5.4	22.9	0.104	.336
82	1	18	1	0	13.6	11.5	0.097	.396
83	1	18	1	0	14.1	17.9	0.099	.338
84	1	18	1	0	28.5	10.8		.239
86	1	18	1	0	9.6	16.3	0.118	.186
87	1	18	1	0	5.7	13.6	0.088	.329
88	1	18	1	0	11.5	13.4		.380
89	1	18	1	0	7.6	9.4		.384
90	1	18	1	0	6.3	11.1	0.091	.319
65	2	40	2	2	4.3	26	0.086	.201
66	2	40	2	0	5.7	18.8	0.067	.229
67	2	40	2	0	3.2	27.6	0.127	.352
68	2	40	2	0	2.8	12.8	0.080	.267
69	2	40	2	0	6.5	12.4	0.029	.085

70	2	40	2	0	3.2	19.6	0.074	.225
71	2	40	2	0	5.3	17.3	0.072	.149
72	2	40	2	0	2.3	15.4	0.078	.242
73	2	40	1	0	10.3	11.7	0.075	.221
74	2	40	1	0	4.1	9.9	0.088	.306

7.1 RESULTADOS ESTADISTICOS

DESCRIPCIÓN DE SUBPOBLACIONES CD1, CD et/+, CD et/et UTILIZANDO EL PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS-10 PARA MS WINDOWS

TABLA No.8 Comparación de los índices glandulares totales lagrimales (Igtlag) y submaxilares (Igtsub) y las cepas utilizadas

CEPA	CASOS	MEDIA Igtlag	DESV ESTANDAR	MEDIA Igtsub	DESV ESTANDAR
CEPA 1= CD 1	20	15.1850	3.4932	11.2700	5.0425
CEPA 2= CD1et/+	16	14.4438	5.9511	6.0932	3.0532
CEPA 3= CD1et/et	98	11.6541	5.2059	8.1500	3.5026

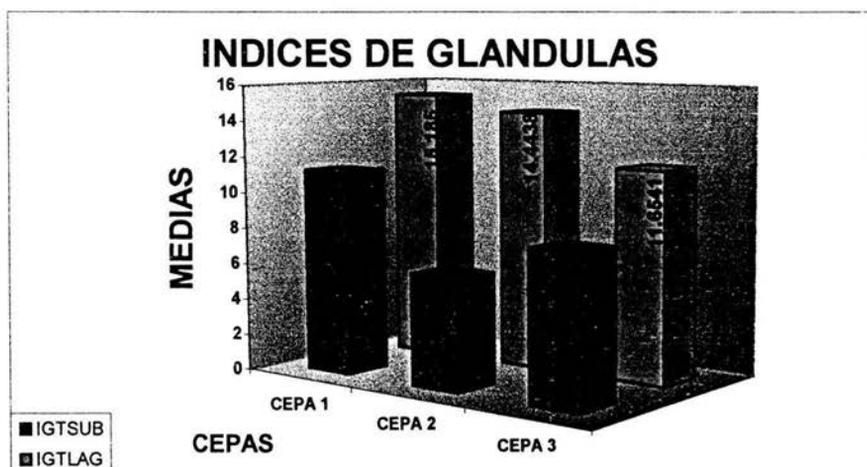
TABLA No.9 Prueba de diferencia significativa honesta (DSH) de tukey para el índice total de glándulas lagrimales vs cepa

$\alpha = 0.05$ DSH= 3.36

	MEDIA DE CEPA 1	MEDIA DE CEPA 2	MEDIA DE CEPA 3
MEDIA DE CEPA 1	0	0.7412	3.53 *
MEDIA DE CEPA 2	0.7412	0	2.7897
MEDIA DE CEPA 3	3.53 *	2.7897	0

TABLA No.10 Prueba de diferencia significativa honesta (DSH) de tukey para el índice total de glándulas submaxilares vs cepa $\alpha = 0.05$ DSH= 3.36

	MEDIA DE CEPA 1	MEDIA DE CEPA 2	MEDIA DE CEPA 3
MEDIA DE CEPA 1	0	5.1763	3.1200
MEDIA DE CEPA 2	5.1763	0	2.0560
MEDIA DE CEPA 3	3.1200	2.0560	0



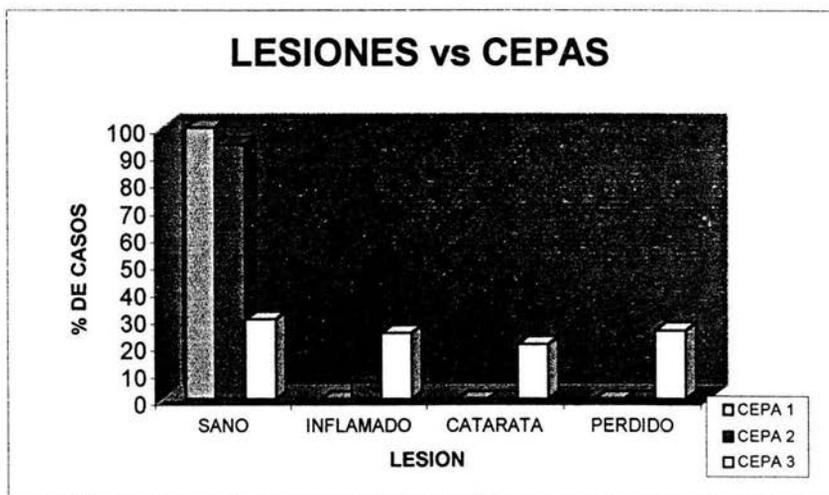
GRAFICA 1. Diferencias de medias de las glándulas lagrimales y submaxilares con relación a las cepas utilizadas

Del mismo modo se analizó el tipo de lesión según la cepa la cual se presenta en la tabla 11

TABLA No11 Tipo de lesiones presentadas con relación a la cepa

	SANO	INFLAMADO	CATARATA	PERDIDO
CEPA 1	100	0	0	0
CEPA 2	93.75	6.25	0	0
CEPA 3	29.59	24.49	20.40	25.51

Si se analiza los resultados de la tabla 11 se puede observar que existe diferencia significativa entre la cepa 3 (CD1 et/et) con relación las cepas 1 Y 2.

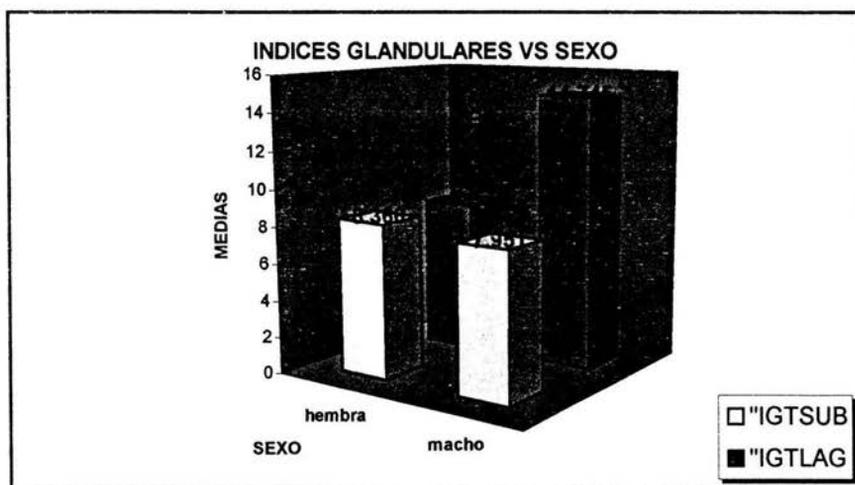


GRAFICA 2 Porcentaje de tipo de lesión por cepa

DESCRIPCIÓN DE LA SUBPOBLACION CD1 et/et LLAMADA CEPA 3

TABLA No.12 Indice total de glándulas vs sexo

	HEMBRAS	MACHO
No.RATONES	47	51
INDICE GLANDULAR TOTAL LAGRIMAL (MEDIA)	8.30	14.74
INDICE GLANDULAR TOTAL SUBMAXILAR (MEDIA)	8.36	7.95

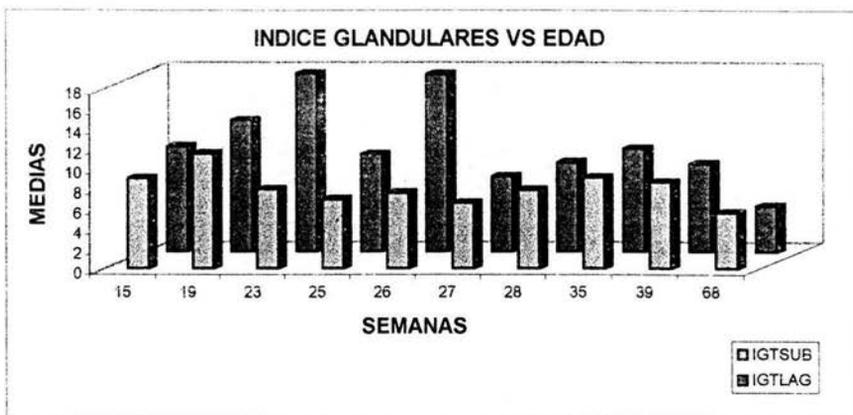


GRAFICA 3 Medias de índices glandulares totales lagrimales y submaxilares con relación al sexo en la cepa 3

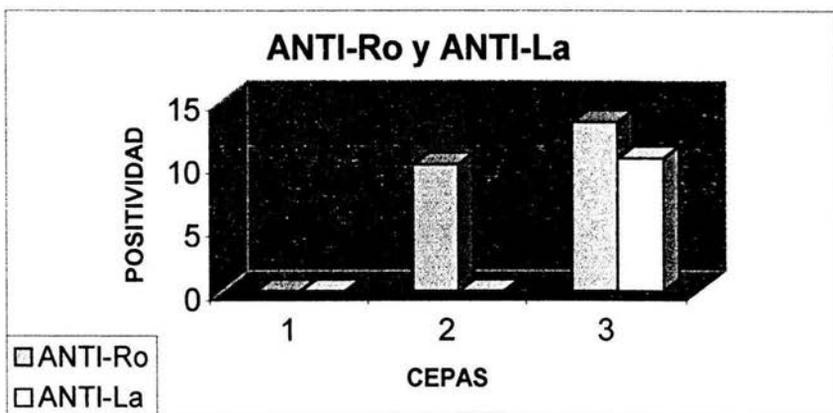
Con base en los datos anteriores se encontró que existe diferencia significativa en el índice glandular lagrimal por sexo, mientras que en el índice glandular submaxilar no existe diferencia significativa.

TABLA 13. Se presentan las medias de los índices glandulares totales lagrimales y submaxilares de la cepa 3 con relación a la edad.

EDAD SEMANAS	INDICE GLANDULAR TOTAL SUBMAXILAR (medias)	INDICE GLANDULAR TOTAL LAGRIMAL (Medias)
15	9	10.5
19	11.488	13.141
23	7.91	17.82
25	6.888	9.737
26	7.544	17.756
27	6.538	7.5
28	7.84	8.92
35	9.088	10.338
39	8.6	8.783
68	5.55	4.563



GRAFICA 4. Indices de glándulas totales lagrimales y submaxilares con relación a la edad



GRAFICA 5 Positividad obtenida de anti-Ro y anti-La en las diferentes cepas

7.2. RESULTADOS HISTOLOGICOS

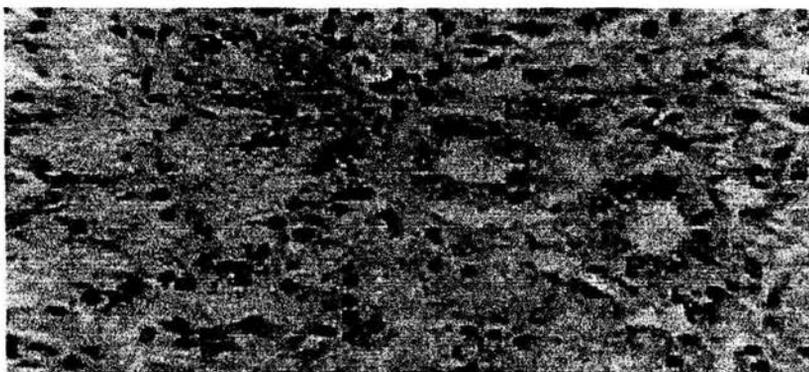


FIGURA 3 Glandula submaxilar ratón CD1 *et/+* macho de 40 semanas de edad a 40 X. Se observan conductos interlobulares, conductos salivales y estructura acinar definida

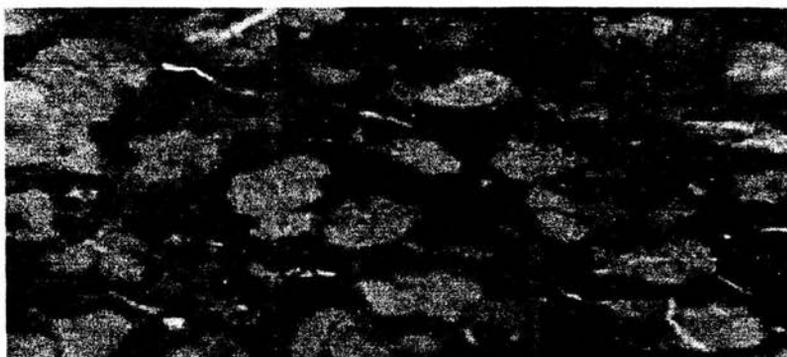


FIGURA 4.Glándula lagrimal Ratón CD1 *et/+* macho de 40 semanas de edad a 40X. Se observa tejido conectivo como los acinos bien definidos

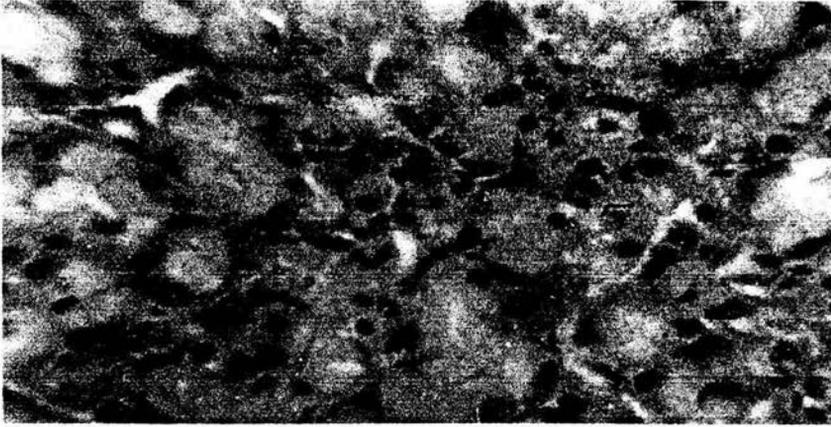


FIGURA 5. Glándula lagrimal Ratón CD 1e/et hembra de 23 semanas de edad a 40 X. Pequeña área de infiltración con presencia de células plasmáticas

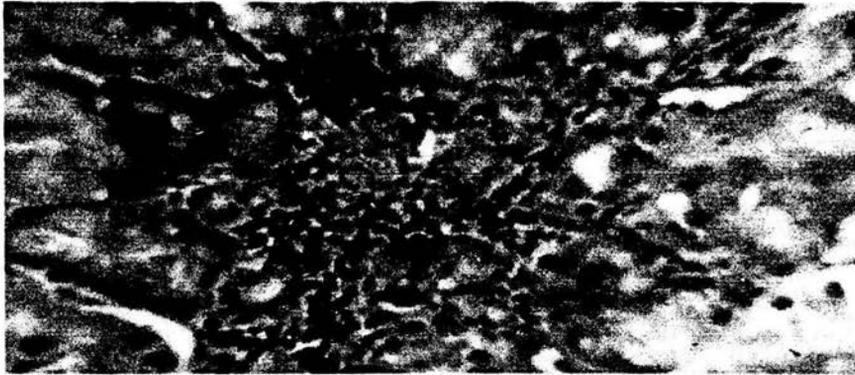


FIGURA 6. Glándula submaxilar ratón CD1 e/et hembra de 22 semanas de edad a 40 X. Presencia de focos linfocitarios con áreas de fibrosis



FIGURA 7. Glándula submaxilar Ratón hembra de 27 semanas de edad a 100 X. Areas de atrofia, fibrosis e infiltración (células mononucleares, plasmáticas y linfocitos)

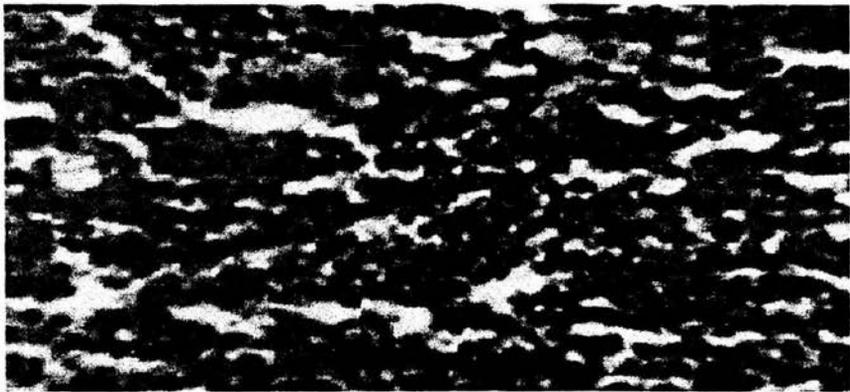


FIGURA 8. Glandula lagrimal ratón CD1 *et/et* hembra de 68 semanas de edad a 40 X. Destrucción y sustitución del parénquima por infiltrado linfocitario

8.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al realizar un análisis comparativo del índice glandular total lagrimal(Igtlag), se encuentra que es menor en la cepa 3 (CD et/et) y la prueba de Tukey refleja que la diferencia solo es significativa ($\alpha 0.05$) entre las cepas 1 y 3(tabla 8, 9). Por otro lado, al analizar los índices glandular submaxilar (Igtsub) en las cepas encontramos un índice menor en la cepa 2, observandose que la diferencia significativa se presenta entre esta y cepa 1.

Si la cepa 1 es nuestro control negativo, la grafica 1 indica que las glándulas en la cepa 3 están disminuidas, probablemente como una consecuencia del daño producido por la autorespuesta. Esto coincide con lo encontrado en la literatura para el caso de los humanos.

Por otro lado, al hacer la comparación de los índices glandulares en la cepa 3 en relación al sexo se observa que es menor en las hembras que en los machos (grafica 3), esto nos puede indicar que el daño que presenta la glándula esta ligada a los factores constitutivos, siendo uno de los más relevantes las hormonas, como parece sugerir el hecho de que exista una mayor prevalencia de SS en mujeres. Las hormonas parecen desempeñar un papel muy importante en la enfermedad debido a que los estrógenos son inmunopotenciadores. Mientras que la testosterona tiene actividad inmunosupresora.

Al analizar los índices glandulares se observa que se modifican con la edad (grafica 4), el tamaño mayor de la glándula lagrimal se encuentra en la semana 19 y disminuye en forma muy importante en la semana 68. Mientras que para la glándula submaxilar el máximo tamaño se presenta en la semana 25 y disminuye con la edad.

La principal característica del SS es un alteración de la respuesta inmune que se manifiesta por un infiltrado linfocitario en las glándulas submaxilares y lagrimales .

En los ratones CD1 et/et se encontraron cambios histopatológicos en glándulas salivales y lagrimales que son similares a los encontrados en el caso de los humanos. Las glándulas analizadas presentan lesiones que van desde infiltraciones clase I-IV en áreas periductales y perivasculares por células mononucleares, plasmáticas y linfocitos, observándose un desarreglo celular en los acinos de la glándula lagrimal, además de la pérdida de los conductos interlobulares (figura 5-8). Dado que estos acinos son secretores de tipo seroso, la ausencia de estos conductos en la glándula submaxilar nos permite sugerir que presenta xerostomia, mientras que en la glándula lagrimal queratoconjuntivitis. En los resultados obtenidos de la determinación de anticuerpo Anti-Ro y Anti-La permiten inferir que, contrario a lo que se esperaba no existe una relación al menos evidentes entre la presencia de estos anticuerpos y el daño presentado en la glándula aunque en los datos de literatura indican que pueden presentarse antes o después del daño.

Así mismo encontramos en los especímenes en que se detectó Anti-Ro no necesariamente se encontró anti-La, como lo sugiere la literatura para el caso de la enfermedad en humanos, sin embargo no consideramos estos concluyente ya que como encontraron M.Sakarellos-Doitsiotis et al (29) algunas técnica como ELISA pueden conducir a falsos negativos, lo cual se puede resolver utilizando una técnica de anti-idiotipo (Id/anti-ID). (29). Como se ha comprobado, la técnica de ELISA presenta una sensibilidad del 78 al 89% y una especificidad del 69 al 97% (30).

La técnica de ELISA permite, por ejemplo detectar el anticuerpo anti-La con una sensibilidad del 85 % y una especificidad del 94 %, pero en el caso de anti-Ro con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98 % (31).

Todos los anteriores datos nos permiten afirmar que el modelo de ratón utilizado es adecuado y las lesiones en estos ratones son notablemente similares a las que se manifiesta en humanos con SS .

Se presentaron anticuerpo Anti-Ro y Anti-La observando que los anticuerpos Anti-La no correspondieron a un daño en glándulas como esta reportado en humanos, esto pudiera ser debido a que se requiere de un método diferente al ELISA, que nos detecte los anticuerpos anti-La con una sensibilidad y especificidad mayor.

9. – CONCLUSIONES

- Las glándulas lagrimales y submaxilares están disminuidas en las cepa CD 1 et/et (cepa 3) como una consecuencia de un daño autoinmune.
- Las glándulas lagrimales y submaxilares estudiadas en los animales CD 1 et/et presentan diferentes grados de infiltrados linfocitarios.
- Al comparar el tamaño de glándulas en machos y hembras de la cepa et/et encontramos que las hembras tienen glándulas mucho más pequeñas que los machos.
- Las et/et involucionan con la edad obteniendo un máximo alrededor de la semana 19 y 25, encontrándose las glándulas más disminuidas en la semana 68.
- Los anticuerpos Anti-Ro y Anti-La no correlacionan con el daño presentado en las glándulas submaxilares y lagrimales

10.- ANEXO

I.- TECNICA EMPLEADA (ELISA)

Descrito en 1971 por Engvall y Perlman en Suecia, fue utilizado para la cuantificación de antígenos y posteriormente para la titulación de anticuerpos. En esta técnica se utilizan anticuerpos conjugados a una enzima (Fig 1 A). En estos conjugados el anticuerpo conserva su capacidad de unión específica del antígeno, mientras que la enzima es capaz de catalizar una reacción óxido-reducción, en la cual un sustrato o cromógeno se transforma en un producto colorido. En este sistema el anticuerpo o el antígeno se adsorben a una fase sólida insoluble (micropozos, tubos, perlas, papel de nitrocelulosa).

Existen diversas variantes de esta técnica: como son los métodos indirectos, directos, en sándwich y competitivo. Estos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos a excepción del método indirecto con el que se detecta anticuerpo. En los métodos directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que se lleva la enzima, en cambio en los métodos indirectos se usa 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.

En los métodos competitivos se puede usar como conjugado un antígeno-enzima o un anticuerpo-enzima. Cuando el conjugado es anticuerpo-enzima el antígeno específico se adsorbe física o covalentemente a una fase sólida, después el conjugado es inoculado en presencia de un anticuerpo estándar o la muestra a ser analizada y competirá por los sitios de unión del antígeno inmovilizado.

En esta técnica la concentración de los productos del sustrato es inversamente proporcional a la concentración del estándar o del antígeno de la muestra. En los métodos no competitivos o ELISA de sándwich, el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con el antígeno que se ha unido al primer anticuerpo, adsorbido 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.[35]

CARACTERÍSTICAS DE LOS ELEMENTOS QUE SE USAN EN LA TÉCNICA DE ELISA:

FASE SÓLIDA. Se utilizan placas de poliestireno, tubos de polivinilo, policarbonato, partículas de agarosa y poliacrilamida, la inmovilización del antígeno en la fase sólida es por enlace covalente o por absorción continua de interacciones no covalentes

ETAPAS DE LAVADO. Se debe realizar con una solución de buffer de fosfatos salinos-Tween 20 después de revestir la fase sólida esta fase es importante ya que pueden quedar residuos de material que reaccionen y alteren los resultados

MUESTRA A ENSAYAR. Algunas muestras contienen sustancias de peso molecular elevado, que pueden pegarse de manera inespecífica a la fase sólida. Este problema se puede reducir si la muestra se diluye en PBS.

ANTIGENO. Para cada ensayo es necesario determinar la concentración óptima del antígeno, la cual se establece por titulación.

CONJUGADO. Para la obtención del conjugado se debe considerar los siguiente:

- Preparación de la inmunoglobulina
- Tipo de inmunoglobulina
- Especie del animal usado en la inmunización (conejo, oveja u otro)
- Tipo de enzima, debe ser económica, de alto grado de pureza, elevada actividad específica, estable al almacenamiento, soluble y no dar enlace cruzado. La enzima más utilizadas son la peroxidasa de rábano(PR), fosfatasa alcalina (FA) y B-D galactosidasa (BG).

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

SUSTRATO. Los sustratos que se utilizan para la enzima PR son el peroxido de hidrógeno o el peroxido de urea, que al ser reducidos dan productos incoloros por lo que se acompañan con cromógenos, los cuales al ser oxidados en la reacción enzimática desarrollan color, debe ser barato, soluble, y de facil uso los mas frecuentemente usados son orto-fenilendiamina (OPD), diaminobencidina (DAB) y ortodiansidina entre otros [36].

LAS ETAPAS PARA LA BÚSQUEDA DE ANTICUERPOS EN ESTE SISTEMA INCLUYEN:

- 1- El forramiento o recubrimiento de los pozos en las placas para ELISA con una cantidad apropiada de antígeno(ng, ug dependiendo del antígeno).
- 2- La eliminación del exceso de antígeno por lavado de los pozos con un regulador fisiológico adicionado de un detergente (comúnmente se utiliza solución salina- fosfatos, PBS, pH 7.4 con Tween-20),
- 3- El bloqueo de los sitios de los pozos no ocupados por el antígeno, con una proteína inmunológicamente irrelevante para el sistema de prueba (albúmina, gelatina, caseína o leche descremada).

-
- 4- La adición de los sueros problema apropiadamente diluidos en PBS (la dilución se establece experimentalmente) e incubación del sistema.
 - 5- La eliminación del exceso de suero por lavado con solución PBS-Tween.
 - 6- Incubación del sistema con un segundo anticuerpo conjugado a una enzima (la más común es peroxidasa de rábano) a la dilución conveniente.
 - 7- La eliminación del exceso de anticuerpo conjugado por lavado con PBS-Tween
 - 8- La adición de una mezcla de sustrato y cromógeno (cuando el segundo anticuerpo está conjugado a peroxidasa, se utiliza una mezcla de peróxido de hidrógeno y orto-fenilendiamina).
 - 9- La incubación de las placas a temperatura ambiente
 - 10 -La detención de la reacción por adición de H_2SO_4 diluido
 - 11- La lectura de la absorbancia

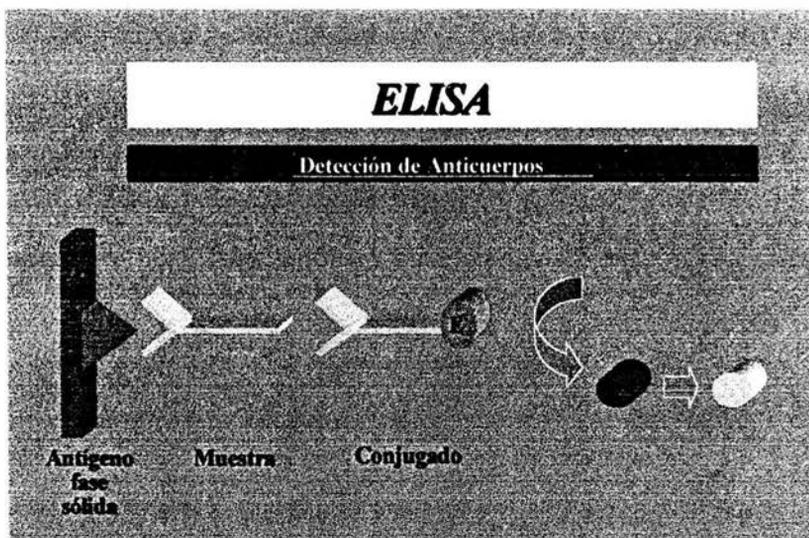


Figura 1 A Representación esquemática del método de ELISA para la determinación de anticuerpos.

II. METODOS HISTOPATOLÓGICOS

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 autólisis, distorsiones y retracciones, además de prepararlo para posteriores tratamientos.

FUNDAMENTO DE LA TINCION

La tinción es una manera de mejorar la imagen del tejido. La reacción con células y tejidos varia mucho ya que algunos colorantes son muy selectivos para ciertos componentes celulares o tisulares. La hematoxilina (básica H) y eosina (ácida E) son inespecíficos y se usan frecuentemente en histología, en este caso el colorante básico es la se aplica primero seguido de un ácido. La hematoxilina se extrae de una fuente natural que al combinarlo con un mordente como el alumbre presenta en color púrpura azul intenso que confiere un color morado azulado a los elementos celulares ácidos, mientras que la eosina es un colorante sintético, que confiere un color rosado o rojo a los componentes básicos .

Las propiedades pigmentantes 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 postmortem, 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 mercuríco y los ácidos crómicos y ósmico. El fijador más común es la solución de formalina amortiguadora neutra al 10% la proporción ideal de volumen de fijador respecto al volumen del tejido es 30:1, la acción de los fijadores son:

- 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.
- 5) Como efecto antiséptico que protege a las personas que trabajan con e

DESHIDRATACIÓN Y ACLARACIÓN : Primero deberá extraerse el 75% del agua del tejido con un deshidratante (alcohol etílico, butírico dioxano, isopropanol) y después las muestras se someten a concentraciones crecientes hasta la deshidratación total. Su uso obliga que las muestras se procesen después con aclaradores, siendo más importantes el xileno, tolueno y benceno, su efecto de aclaración y transparentación .

En general, los deshidratantes y los agentes de inclusión no son miscibles entre sí, por otra parte, los aclaradores son miscibles 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: Una vez aclarados, los tejidos se colocan en soluciones de concentración creciente de parafina, que deben mantenerse durante todo el proceso a temperatura de derretimiento (50 a 68°C) una vez embebidas se colocan en moldes donde se vierten más parafina y se deja cuajar.

MICROTOMIA: Cuando la parafina está dura, se sacan los bloques del molde y se recortan para exponer 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, Por último se colocan en una plancha tibia para una mejor adherencia del 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; quedando listas para su tinción, deshidratación, aclaración y su montaje [37,39]

III -PREPARACIÓN DE REACTIVOS

REACTIVOS PARA ELISA

A) AMORTIGUADOR DE RECUBRIMIENTO pH 9.6

Carbonato de sodio Na_2CO_3	0.150g
Bicarbonato de sodio Na_2HCO_3	0.293g

Disolver en 100mL de agua bidestilada .

B) PBS (BUFFER SALINA FOSFATOS)

Cloruro de sodio NaCl	8.0g
Fosfato de potasio KH_2PO_4	0.2g
Fosfato de sodio $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9g
Cloruro de potasio KCl	0.2g

Disolver en 1000mL de agua bidestilada.

C) PBS- TWEEN

A un litro de solución de PBS se le agrega 0.5mL de tween 20 .

D) SUSTRATO DE PEROXIDASA

Ácido cítrico 0.1M (24.3mL) (1.0507g/ 50mL)

NA₂HPO₄ 0.2M (225.7mL) (1.41196/ 50mL)

Disolver 40mg de o-fenilendiamina en 100ml de amortiguador del sustrato y
adicionar 40uL de peroxido de hidrógeno al 30%

El sustrato se prepara al momento de usarse pues lo daña la luz

E) SOLUCION BLOQUEDORA

Gelatina V.S.P (0.5g/50mL)

Albúmina de huevo (0.5g/50ml)

Se mezclan en el momento de usarse

11. – GLOSARIO

ANTICUERPO: Es una molécula glucoprotéica denominada Ig, producida por los linfocitos B y que se une a antígenos. Realizan diferentes funciones como la neutralización de antígenos activación del complemento y la promoción de la destrucción de microorganismos dependientes de los leucocitos.

ANTICUERPO MONOCLONAL: anticuerpo que es específico de un antígeno y que es producido por un hibridoma de células B una línea celular derivada por la fusión de una sola célula B normal con una línea tumoral de células B inmortales.

ANTIGENO: Es una molécula que se une a los anticuerpos o a un TCR.

ARTRITIS REUMATOIDE (AR): Enfermedad autoinmune caracterizada, principalmente por la lesión inflamatoria crónica de las articulaciones y en ocasiones por inflamación de los vasos sanguíneos los pulmones y otros tejidos.

AUTOANTICUERPO: anticuerpo producido en un individuo que es específico de un antígeno propio, pueden causar daños en las células y los tejidos y se producen en exceso en las enfermedades autoinmunitarias tales como LES.

AUTOINMUNIDAD: Estado del sistema inmunitario adaptativo caracterizado por la respuesta a los antígenos propios, que se produce cuando fracasa los mecanismos de autotolerancia.

CITOQUINAS: Proteína producidas por muchos tipos de células distintos que median las reacciones inflamatorias e inmunitarias, son uno de los principales mediadores de la comunicación entre las células del sistema inmunitario.

ELISA: Es un enzimoimmunoanálisis en el cual uno de los reactantes, es el anticuerpo o el antígeno, que se fija a un soporte previamente y su interacción con el reactante complementario da como resultado un producto colorido, el nombre proviene del inglés enzyme-linked immunosorbent assay

ESCLERODERMIA: Enfermedad de causa desconocida que se caracteriza por un incremento anormal de depósito de colágena en la piel

ETIOLOGÍA: Algún agente causante de la enfermedad ya sea virus, bacteria, factor genético, o factor ambiental.

HLA: Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que se expresan en las superficies de las células humanas.

IgA: Clase de inmunoglobulinas que se encuentra en las secreciones.

IgD: Inmunoglobulina que su función es incierta, que se encuentra presente en la superficie de las células linfoides B.

IgE: Inmunoglobulina mediadora de la hipersensibilidad inmediata.

IgG: Inmunoglobulina que es producida en las respuestas secundarias sanguíneas.

IgM: Inmunoglobulina que se expresa en los linfocitos B vírgenes y secretadas en respuestas inmunes primarias.

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO: trastorno inflamatorio del tejido conjuntivo

XEROFTALMIA: Sequedad ocular.

XEROSTOMIA: Sequedad oral

12. -REFERENCIAS

1. Sjögren H. Zur Kenntnis der tranendrusen acta ophthalmol kbbD 1933;11-1-181
2. Fox RI. Patogénesis of Sjogren´s Syndrome. Rheumatic disease clinics of North America. 1992;8:517-537
3. Chapel Helen, Haeney M, Misbah Snowden N, Essentials of Clinical immunology 4ª: Ed Blackwel Science, 1999: 200-201
4. Manual de reumatología y transtornos ortopédicos y ambulatorios. Diagnóstico y terapéutica. Buenos Aires, Argentina: Ed. Salvat editores, 1987:297-302.
5. Molina R., Provost T. Types of inflammatory vascular disease in Sjögren´s syndrome. *Arthritis and Rheumatism*. 1985;28;11.
6. Ramos M, Cervera R, Garcia-Carrasco M, Miret C , Muñoz FJ, Espinosa G et al síndrome de Sjögren primario, características clínicas e inmunológicas en serie de 80 pacientes. *Med Clin (Barc)* 1997;108:652-657.
7. Daniells TE, Fox PC, Salivary and oral components of Sjögren´s syndrome: *Rheum Dis Clin North Am*. 1992 Aug ;18(3): 571-89
8. Price,E. J. and Venables, P. J. W. The etiopathogenesis of Sjögren´s syndrome. *Semin. Arth. Rheum*.1995;25:117-133.
9. Moutsopoulos HM, Webber BL, Vlagopoulos TP, Chused TM, Decker JL. Diference in the clinical manifestation of sicca syndrome in the presence and absence of rheumatoid arthritis . *Am J. Med*. 1979;66: 733-736.
10. Shearn MA, Tu WH. Nephrogenic diabetes insipidus and other defects of renal tubular function in Sjögren syndrome *Am. J. Med*. 1965;39:312-318
11. Talal N, Zisman E, Schur PH. Renal tubular acidosis, glomerulonephritis and immunologic factores in Sjögren syndrome. *Arthritis Rheum* 1968;11:774-786.

-
12. Wolf, H., Haus, M., and Wilmes, E. Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland, *J Virol*, 1984;51:795-798.
 13. Tzioufas, A.G., Wassmuth R., Dafni. U.G., Guialis, A. Clinical immunological, and immunogenetic aspect of autoantibody production against Ro/SSA, La/ssb and their linear epitopes in primary Sjogren's (pSS): a European multicentre study". *Annals of the rheumatic diseases*, 2002;61(5):398-404.
 14. Stites Dp et al .*Inmunología básica y clínica 8ª ed.* México: El Manual Moderno, 1996:489,499,504,511-514,788.
 15. Haralampos M. Immunoregulation in Sjögren's Syndrome *The journal of clinical investigation* 1980;65:519-428.
 16. Moleres FR. *Atlas práctico para el médico general de reumatología.* ed. Barcelona, España salvat editores, 1982 :217-221.
 17. Wolin, S.L. and Steitz, J. A. genes for two small cytoplasmic Ro DNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. *Cell* 1993;32:735-744.
 18. Ben-Chetrit, E., Chan, E. K. L., Sullivan, K, F., and Tan, E. M a 52-kDa protein is a novel component of the SS-A/ Ro antigenic particle. *J Exp. Med* 1998;167:1560-1571.
 19. Ben-Chetrit, E., Fox, R.I., and Tan, E. M. Dissociation of immune responses to the SS-A(Ro) 52kDa polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome .*Arthritis Rheum.*1990;33:349-355.
 20. de Wilde, P. C. M., Kater, L., Bodeutsch, C., van den Hoogen ,F. H., van de putte, L. B. A., and van de Venroij, W. J. Aberrant expresión patter of the SS-B/La antigen in the labial salivary gland of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Reheum.* 1996;39, 783-791.
 21. Sudhir Paul. *Autoimmune Reactions: Totowa, Nueva jersey :ed Humana Press* 1999: 61-77 .
-

-
22. Flanagan SP. Nude: A new hairless gene with pleist effects in the mouse. *Genet Res* 1996;8:295-309
 23. Pantelouris E.M: Thymus rudiment of the athymic nude mouse. *Nature* 1975.256:491-493
 24. Averbach R. *Animal Models of Immunological Process*. Academic Press London 1982:138-141.
 25. Rojas-Espinosa O, Marroquín Segura R, Wek Rodriguez K, Reyes-Maldonado E, Arcer Paredes P. Susceptibility of "et" the Spontaneously Mutating CD1-Derived Nude Mouse, to infection of *M lepraemurium*. *International journal of Leprosy* 1999;67:46-51.

 26. Rubén Marroquin-Segura, Ma. de los Angeles Lara Hernandez, Ricardo Calvillo Esparza, Martha Mercedes Garcia Burciaga, Ma Eugenia Castro Mussot, José Luis Alfredo Mora Guevara, Maurilio Flores Pimentel Exocrinopatía mostrada en el ratón hipotímico CD1 et/et que semeja al síndrome de Sjögren. *Veterinaria .México* ,2003;2:34
 27. Talal N; Sjögren síndrome . In *pimer on the Rheumatic Diseases*. 9th ed. Atlanta, Arthritis foundation, 1988 p 136.
 28. Berkow R: Sjögren´s syndrome . In *The Merck manual of diagnostis and therapy* . 15th ed. Rahway , NJ, Merck and Co.,1987:1249-1250.
 29. M. Sakarellos-Doitsiotis, J.G. Roustias, E. Dotsika, D. Keramisanou, V. Tsikaris, M. Cung, C. Sakarellos, H. M. Moutsopoulos, A. G. Tzioufas, *Innovation and Perspectives in Solid Phase Sintesis & Combinatorial Libraries,; Peptides and Nucleic Acids-Small Molecule Organic Chemistry Diversity*, 7th International Symposium, Southampton, U. K, September 18-22, 2001, Mayflower Worldwide Ltd., Kingswinford, UK 2002.
-

-
30. E.E. Yiannaki, A. G. Tzioufas, M. Bachmann, J. Hantoumi, V. Tsikaris, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, H. M. Moutsoipoulos, *Clinical and Experimental Immunology*, 112(1) (1998) 152-158.
 31. C. H. A. Veldhoven, J. F. Meilof, J. G. Huisman, R. J. T. Smeenk, *J. Of Immunological Methods*, 151(1.-2) 1992; 1778-1789.
 32. Arraz CJA, Perez GA, Zea MA, Alvarez-Mon SM. síndrome de Sjögren . *Medicine* 1977; 7 (54):2437-2445
 33. Fox RI, *Systemic diseases associated with dry eye. International Ophthalmology Clinics*, 1994;34:71-97.
 34. Adachi J.D. Buchanan W.W. Kean W. Sjögren Syndrome; Its Clinical Manifestations and Associations. *Arthritis etiology, diagnosis, management*;465-486.
 35. Rose N.R. Friedman J.L. *Manual of Clinical Immunology*. 3er. Edittion Washington D.C. American Society for Microbiology 1986: 414-426, 484-489 y 798-807.
 36. Wisdom Erlan. *Enzyme immunoassay. Clinical Chemistry* 1976; 22 (8) :1234.
 37. William J. Banks . *histología veterinaria aplicada. Manual moderno México*; 1986:33-66
 38. William J. Brocha, Whood M.Linda *Color atlas of veterinary histology*. Lea & febiger. Phildelphia, London. 1990: 2, 120-121 y 242
 39. Boya V.J. *Atlas de histologia y organografia microscopica*. Interamericana España 1996; 262-263, 255-256.
 40. Drosos AA, Andonopoulos AP, Costopoulos JS et al. Prevalence of pimary Sjögren's syndrome in an elderly population. *Br J Rheumatol* 1988;27:123-127.
-

-
- 41 Price EJ, Venables PJW. The etiopathogenesis of Sjögren's syndrome sem Arthritis Rheum 1995;25: 117-133.
 - 42 Flescher E.Talal N, Do viruses contribute to the development of Sjögren's syndrome Am J Med 1991;90:283-285.
 43. Yomaoka K, Miyasaka N, Yamamoto K, Possible involvement of Epstein-Barr virus in poyclonal B cell activation in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1988;31:1.014-1.021.