



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Evaluación de metotrexato y fosfato de cloroquina mediante algunos hallazgos
Inmunológicos y bioquímicos en ratones CD1 et/et que muestran
exocrinopatía.

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo.

Presenta:

Barrientos Vázquez Esperanza Antonia

Director de Tesis:
Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor:
M.C. Maurilio Flores Pimentel

Junio 2005

Agradecimientos.



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.

A mi familia por su apoyo.

A mi Director y Asesor por su paciencia.

A mis sinodales por su asesoría.

A todos los amigos por su valiosa amistad.

INDICE

	PÁGINA
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1 Síndrome de Sjögren	3
3.2 Definición	3
3.3 Clasificación	3
3.4 Epidemiología	3
3.5 Patogénesis inmunitaria	3
3.6 Anatomía patológica	3
3.7 Características clínicas	4
4. Metotrexato	5
4.1 Fórmula	5
4.2 Mecanismo de acción	5
4.3 Farmacocinética	5
4.4 Efectos adversos	6
5. Fosfato de cloroquina	6
5.1 Fórmula	6
5.2 Mecanismo de acción	6
5.3 Farmacocinética	7
5.4 Efectos adversos	7
6. Pruebas enzimáticas	8
6.1 AST y ALT	8
7. Creatinina	9
7.1 Definición	9
7.2 Prueba de Jaffé	9
8. Urea	10
8.1 Definición	10
8.2 Método de Berthelot	10
9. Autoanticuerpos	11
9.1 Factor reumatoide	11
9.1.1 Prueba de Rose Waaler	11
9.2 Anticuerpos anticardiolipina	11
9.3 Anticuerpos antinucleares	12
9.3.1 SSA	12
9.3.2 SSB	12
10. Prueba de ELISA	13
11. Planteamiento del problema	14

12. Objetivo	15
13. Hipótesis	16
14. Diseño experimental	17
14.1 Población de estudio	17
14.2 Criterios de inclusión y exclusión	17
14.3 Variables	17
14.4 Material y reactivos	18
14.5 Diagrama de flujo	20
14.6 Método	21
15. Resultados	27
16. Análisis de resultados	40
17. Conclusiones	42
18. Anexos	43
19. Referencias bibliográficas	48

1. RESUMEN

El Síndrome de Sjögren (SS) es un cuadro autoinmune caracterizado por sequedad ocular y bucal, consecuencia de una destrucción de las glándulas salivales y lagrimales. Los síntomas más molestos son sequedad en la boca y a menudo se relaciona con molestia y dificultad para deglutir comidas secas. Se presenta queratoconjuntivitis seca, síntomas con sensación de quemadura, prurito, disminución de lagrimeo, dolor y sensación de ojos “arenosos”.

La cepa de ratones et/et criada en el bioterio de la FES-Zaragoza desarrolló espontáneamente síntomas que semejan al SS, los cuales se han corroborado con anteriores estudios. En pacientes con SS secundario se utiliza tratamiento con metotrexato y fosfato de cloroquina; estos se administraron al modelo en estudio para valorar su efecto mediante determinación de algunos parámetros bioquímicos e inmunológicos.

A dosis terapéutica no se observaron diferencias significativas; a mayor dosis, en los grupos tratados se presentaron mayor título de anticuerpos anti Ro y anti La, evolución en lesiones, y cambios en los índices de glándula submaxilar, hígado y bazo así como la presencia de FR.

La dosis terapéutica presentó ciertas tendencias a disminuir los marcadores de daño, es probable que si se aumentara el tiempo y el número de muestras, se consiga observar una mejor eficacia. Se cree que a dosis aumentada 10 veces, los fármacos afectan una población de células reguladoras, provocando un desequilibrio en la respuesta inmune.

2. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Sjögren (SS) es un cuadro clínico patológico caracterizado por sequedad ocular y bucal, provocado por una destrucción en las glándulas salivales y lagrimales de mecanismo autoinmunitario desconocido.^{1,2}

Existe sequedad en los ojos, boca, nariz, tráquea, bronquios, vagina y piel.³ En algunos pacientes la enfermedad se presenta como una entidad primaria (SS primario), mientras que en otros casos se observa también artritis reumatoide u otra enfermedad del tejido conjuntivo (SS secundario).⁴

Los ratones CD1 et/et criados en el bioterio de la FES-Zaragoza, muestran signos y síntomas que semejan al SS; tras realizar estudios y habiéndose encontrado similitud con dicho padecimiento⁵, se propuso utilizar esta cepa como modelo animal para la evaluación de los fármacos metotrexato y fosfato de cloroquina.

En la actualidad se cuenta con varios medicamentos contra el SS⁶, sin embargo y debido a la naturaleza de la enfermedad, la mayoría están encaminados a minimizar las manifestaciones secundarias.

Entre los medicamentos utilizados se encuentran: pilocarpina, cevimedina, metotrexato y cloroquina,^{7,8,9} estos dos últimos son antirreumáticos, aunque presentan otros efectos como antineoplásico (metotrexato) y antipalúdico (cloroquina).

El objetivo de esta tesis fue observar el comportamiento de los autoanticuerpos contra proteínas nucleares (SS/A y SS/B), anticuerpos anticardiolipinas (ACA), factor reumatoide (Rose Waaler), proteínas séricas y las enzimas ALT y AST además de urea y creatinina, en animales con tratamiento y contrastados con animales testigo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Síndrome de Sjögren.

3.1.1 Definición.

El Síndrome de Sjögren (SS) es un cuadro clínico patológico caracterizado por sequedad ocular y bucal, provocado por una destrucción en las glándulas salivales y lagrimales de mecanismo autoinmunitario desconocido.^{1,2}

3.1.2 Clasificación

Existen dos formas clínico-patológicas de SS⁴: la primaria, síndrome seco (queratoconjuntivitis seca y xerostomía), que cursa aisladamente; la secundaria, la cual esta asociada a otra enfermedad y con más frecuencia a la artritis reumatoide (AR), como también al lupus eritematoso, esclerosis sistémica, polimiositis, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar, etc.

3.1.3 Epidemiología

El 90% de individuos con este síndrome es de sexo femenino; aunque la edad promedio de inicio es a los 50 años, la enfermedad puede presentarse en niños.¹⁰ No se ha observado que existan diferencias raciales, pero se ha descrito agregación familiar.

3.1.4 Patogénesis inmunitaria

Se ha planteado la hipótesis de que los pacientes con SS tienen respuesta inmunitaria anormal a uno o más antígenos no identificados, quizá virales o autoantígenos alterados por virus. Esta respuesta anormal se caracteriza por exceso de células B y células plasmáticas, lo cual se manifiesta por hipergamaglobulinemia policlonal y producción de factor reumatoide, anticuerpos antinucleares, crioglobulinas y anticuerpos contra el conducto salival.

3.1.5 Anatomía patológica.

Histológicamente existe un infiltrado linfocítico en las glándulas exócrinas de los aparatos respiratorio, digestivo y genital, así como en las glándulas de la mucosa ocular y bucal. La demostración histológica de infiltración linfocítica en la biopsia tomada de las glándulas salivales labiales menores, constituye la prueba diagnóstica más sensible.

3.1.6 Características clínicas

Las manifestaciones iniciales pueden resultar inespecíficas (como artralgia y fatiga) y por lo general, transcurren entre 8 a 10 años desde que aparecen los síntomas iniciales hasta la manifestación florida de la enfermedad.^{3,4}

Los síntomas principales se relacionan con la disminución de la función lagrimal y de la glándula salival.

La afección ocular se caracteriza por el desarrollo de sequedad y atrofia de conjuntiva y córnea, denominándose dicha afección queratoconjuntivitis seca, lo cual provoca sensación de arenillas, ardor, prurito, congestión, disminución del lagrimeo que lleva a la acumulación de bandas gruesas en la comisura interna del ojo, fotosensibilidad y visión borrosa.

En la cavidad bucal la saliva, en un comienzo espesa, disminuye luego considerablemente (xerostomía), provocando serias dificultades para la masticación, deglución y fonación; es frecuente el desarrollo de caries de progresión rápida e infecciones orales.

Se comprueba con frecuencia ulceraciones y fisuras de lengua y mucosa.

Es probable también la presencia de pérdida de los sentidos del gusto y del olfato ya que se puede presentar sequedad en la nariz, orofaringe posterior, laringe y árbol respiratorio, puede originar epistaxis, disfonía, y otitis media recurrente. La mucosa vaginal también está seca.

Un 25% de los pacientes tiene infiltrados linfocíticos extraglandulares, en particular en riñón, hígado, pulmón y ganglios linfáticos.

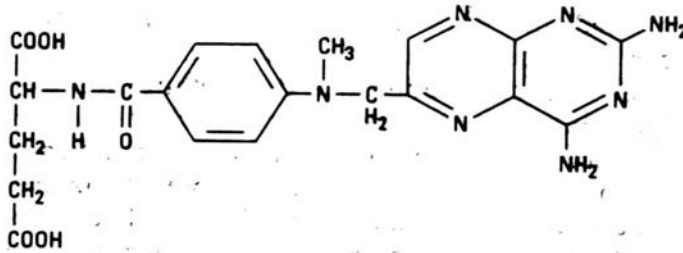
Las manifestaciones articulares son variadas. Con frecuencia, el cuadro es el de la típica artritis reumatoide; en otros casos se trata de artralgias o artritis episódicas de difícil clasificación.

La xerodermia, se observa en la mitad de los casos. Suele acompañarse de descamación y prurito. La sequedad y fragilidad pilosa condiciona alopecia de cuero cabelludo, axilas y pubis. El examen histológico revela importante disminución de glándulas sudoríparas y sebáceas.⁴

Las manifestaciones sistémicas incluyen disfagia, pancreatitis, disfunción neuropsíquica, pleuritis y vasculitis .

4. Metotrexato

4.1 Fórmula¹¹. C₂₀H₂₂N₈O₅



4.2 Mecanismo de acción.

Como agente neoplásico. Es un antagonista del ácido fólico que se fija al sitio catalítico activo de la dihidrofolato reductasa (DHFR) interfiriendo con la síntesis de la forma reducida que acepta unidades de carbono. La falta de este cofactor interrumpe la síntesis de timidilato, nucleótidos de purina y los aminoácidos serina y metionina, interrumpiendo así la formación de DNA, RNA y proteínas.¹²

Como antiinflamatorio. Se sabe que el metotrexato (MTX) es un potente inhibidor inmune con alta relación entre efectos terapéuticos y los efectos tóxicos; suprime las respuestas humorales y celulares.

La inhibición de la dihidrofolato reductasa implicada en la síntesis de purinas libera adenosina, un potente inhibidor de los leucocitos polimorfonucleares activados, lo que dota al MTX de su capacidad antiinflamatoria.

4.3 Farmacocinética.

El MTX se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal y vías parenterales, siendo muy activo por vía bucal. Una vez absorbido, el fármaco llega a la sangre en donde se combina con proteínas del plasma en un 60-70%, y se distribuye en todos los tejidos, en el líquido extracelular y después en el intracelular, pero no atraviesa la barrera hematoencefálica.

El MTX puede sufrir biotransformación a 7-hidroxi metotrexato, pero se excreta en la orina casi en su totalidad (90%) en 12 horas, por filtración glomerular y secreción tubular.¹³

Indicaciones. En pacientes con leucemia aguda linfoblástica, linfomas no Hodgkin, y como tratamiento de artritis reumatoide,⁷ en pacientes incapaces de responder a los antiinflamatorios no esteroideos. (AINE)¹⁴

4.4 Efectos adversos.

A nivel digestivo se produce estomatitis ulcerosa, anorexia, faringitis con disfagia, náuseas, vómitos y diarreas, que llegan a ser sanguinolentas.

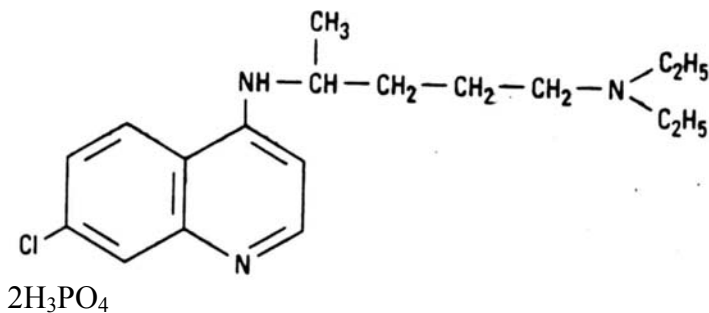
Trastornos hemáticos. Se produce depresión de la médula ósea, con leucopenia, granulopenia, linfopenia, trombocitopenia, que puede dar lugar a hemorragias en piel y mucosas.

Manifestaciones cutáneas. Además de las hemorragias, se presenta alopecia, pero ésta es transitoria.

A nivel de hígado se presenta hepatitis con ictericia; en general puede existir aumento de transaminasas, que comúnmente ceden al interrumpir el tratamiento.¹⁵

5. Fosfato de cloroquina

5.1 Fórmula¹¹. $C_{18}H_{31}N_3O_4PCl$



5.2 Mecanismo de acción.

Es incierto el mecanismo de acción antiinflamatorio en padecimientos reumáticos. Se sabe que suprimen la respuesta de los linfocitos T a los mitógenos, interfieren con la replicación de los virus, disminuye la quimiotaxis leucocitaria, estabilizan las membranas lisosómicas, inhiben la síntesis de DNA y RNA y fijan radicales libres; uno o más de estos efectos puede ser relevante. Con frecuencia, el fármaco es útil como coadyuvante del tratamiento con AINE y no tiene interacción adversa con otros antirreumáticos.^{13,14}

5.3 Farmacocinética.

El fosfato de cloroquina se absorbe con rapidez y casi por completo en vías gastrointestinales, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas (50-65%) en aproximadamente 3 horas, y se distribuye rápidamente en los tejidos; tiene un volumen de distribución muy grande. Desde estos sitios se libera y metaboliza.

Penetra con rapidez a la placenta. Se excreta en la orina con una vida media de 3-5 días. La excreción renal aumenta por acidificación renal.

Indicaciones. Con frecuencia se administra a pacientes con AR que no responden de manera óptima a los AINE. Además de su uso en AR, se ha utilizado con éxito, por su efecto antiinflamatorio en artritis crónica juvenil, SS¹⁴ y lupus eritematoso sistémico (LES).

5.4 Efectos adversos.

Los síntomas gastrointestinales son poco frecuentes; se presenta dolor de cabeza leve, prurito, anorexia, malestar general, visión borrosa y urticaria.

No debe utilizarse en pacientes con anomalías retinianas o del campo visual, a menos que los beneficios sobrepasen los riesgos.

6. Pruebas enzimáticas

Las enzimas son agentes que ayudan a que los procesos bioquímicos del organismo se lleven a cabo a una velocidad compatible con la vida. Las enzimas actúan como catalizadores biológicos; un catalizador modifica la velocidad de la reacción sin tomar parte en ella. Al ser catalizadores, la cantidad de enzima presente en las muestras biológicas es muy pequeña, por tanto, se cuantifican según su actividad enzimática, la cual se expresa en unidades internacionales por litro (U/L).¹⁶

6.1 AST y ALT

Las enzimas AST y ALT denominadas transaminasas, constituyen un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en el organismo que cataliza la transferencia de un grupo amino a un oxalato.

AST (Aminotransferasa aspártica)

Cataliza la transferencia de un grupo amino de un L-glutamato o L-aspartato al α -oxoglutarato u oxalacetato.

Se le encuentra en el citoplasma y mitocondria del hepatocito, en el músculo cardiaco y esquelético además del riñón.

ALT (Alaninaminotransferasa)

Cataliza la transferencia de un grupo amino de L-glutamato o L-alanina a α -cetoglutarato o piruvato.

La ALT se encuentra en altas concentraciones en el citoplasma del hepatocito, en menor grado se encuentra en músculo esquelético, riñón, corazón, páncreas, bazo y eritrocitos.

La determinación de AST y ALT son de gran utilidad para diagnosticar enfermedades hepáticas agudas y crónicas.¹⁷

Procedimiento analítico

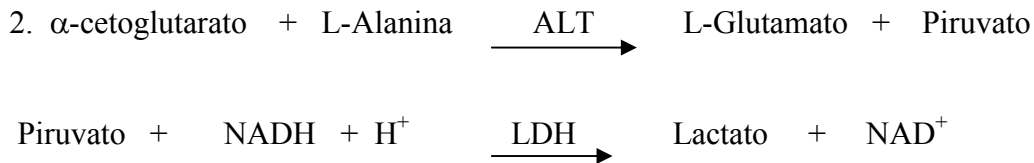
Método cinético

Se denominan métodos cinéticos a los procedimientos en los cuales, una vez que se ha iniciado la reacción por el agregado de la muestra a una mezcla de amortiguador, sustrato y algunas veces activadores, el grado de reacción se determina por el monitoreo a distintos intervalos de tiempo.¹⁸

Fundamento del método



La actividad del NADH a NAD es directamente proporcional a la actividad de AST y ALT



7. Creatinina plasmática.

7.1 Definición

La creatina, un aminoácido de origen no proteico, es un ingrediente del tejido muscular que se forma por la acción de la creatinfosfocinasa (CPK) cuando se requiere energía para procesos metabólicos. Cuando se consume para energía, forma el metabolito inactivo creatinina, que pasa del músculo a la circulación a un índice constante. En los varones se producen cantidades más grandes que en las mujeres debido a su masa muscular mayor.

El glomérulo renal filtra la creatinina y los túbulos no la resorben, por lo cual el índice de excreción en la orina es también constante. Al parecer, las concentraciones sanguíneas fluctúan incluso menos que los valores urinarios, tal vez por la capacidad de los túbulos para secretar creatinina en presencia de concentraciones aumentadas en suero. La creatinina es excretada sin cambio en la orina debido a que se modifica poco durante su paso a través de la nefrona. Los riñones la excretan con mayor facilidad que la urea o el ácido úrico.¹⁹

7.1.2 Método de Jaffé (Método cinético)

La mayoría de los métodos para la determinación de creatinina se basan en la reacción de Jaffé descrita desde 1986.

Fundamento

La creatinina reacciona con el picrato alcalino para formar picrato de creatinina (complejo de Janowski) de color naranja que se mide fotométricamente.

Longitud de onda: 492 nm.

8. Urea.

8.1 Definición

La urea se produce a través de un proceso de degradación proteínica: la proteína se transforma a partir de aminoácidos en amoniaco (desaminación oxidativa) como un producto final y de ahí en urea (ciclo de la ornitina) dentro del hígado. Debido a que el organismo no utiliza urea, se transporta en la sangre hasta que se excreta por vía urinaria.

Sus concentraciones varían fisiológicamente, dependiendo de manera directa del consumo de proteínas en la dieta (exógeno) y del estado de hidratación. La urea se excreta en el filtrado glomerular y se resorbe en el túbulo de la nefrona. Sólo se excreta una fracción de todo el material de desperdicio contenido en el filtrado glomerular, pero a causa de que la urea se resorbe en los túbulos de manera deficiente, se resorbe poca urea; esto es un defecto benéfico.

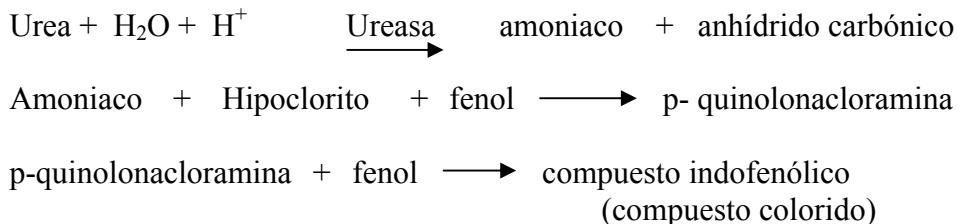
Las determinaciones de urea y creatinina en suero son de los estudios más solicitados para detectar la capacidad del riñón para excretar desechos metabólicos. La interpretación de los valores de urea exige el conocimiento de la ingestión de proteína exógena y de líquidos, y las condiciones que pueden incrementar la producción endógena de urea (por ejemplo la actividad muscular, un traumatismo, una infección, una dieta muy restringida, el ayuno o la inanición).

8.1.2 Método de Berthelot

Es una prueba indirecta, ya que no se cuantifica directamente al metabolito, sino algún producto de su degradación^{20,21}

Fundamento

La ureasa hidroliza la urea en amoniaco y anhídrido carbónico; el amoniaco liberado reacciona con el fenol y el hipoclorito para formar la p-quinolonacloramina; ésta, con una segunda molécula de fenol, produce un compuesto indofenólico de color azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de urea presente.



9. Autoanticuerpos

Son aquellos anticuerpos que reconocen a antígenos propios y reaccionan contra ellos. La reacción autoinmune es aquella en la que el sistema inmune reacciona contra el propio organismo.

9.1 Factor reumatoide

El factor reumatoide (FR) es un autoanticuerpo con especificidad por la porción Fc de inmunoglobulinas de tipo IgG.²²

El factor reumatoide puede ser de las clases IgM, IgA, IgG ó IgE.

Probablemente contribuye a la patogénesis de la artritis reumatoide, debido a la capacidad de formar complejos inmunes.

El factor reumatoide fue descrito por primera vez por Waaler,²³ quien notó que el suero de algunos pacientes con artritis reumatoide, causaban aglutinación de eritrocitos de carnero que habían sido sensibilizados.

Posteriormente Rose introdujo la determinación de FR como una prueba para la evaluación de pacientes con AR.

Más tarde se utilizaron partículas de látex y bentonita en lugar de glóbulos rojos de carnero, dando lugar a ensayos de aglutinación pasiva.

La aglutinación pasiva es una técnica en la cual se pega un antígeno a una partícula.²⁴

9.1.1 Prueba de Rose-Waaler

Es una prueba de hemaglutinación pasiva, utilizada para la determinación de FR, en donde eritrocitos de carnero se recubren en cantidades subaglutinantes de anticuerpos IgG de conejo, específicos para eritrocitos de carnero.

El FR humano aglutinará estos eritrocitos sensibilizados en virtud de la reacción cruzada entre IgG de conejo y la humana.^{10,25}

9.2 Anticuerpos anticardiolipinas (ACA)

Los anticuerpos antifosfolípidos son autoanticuerpos que pueden ser detectados en suero y son importantes en el diagnóstico del síndrome fosfolípídico, un desorden autoinmune caracterizado por episodios de trombosis venosa.

Los anticuerpos antifosfolípidos son un grupo heterogéneo de anticuerpos presentes en pacientes con una variedad de condiciones que incluyen desordenes autoinmunes, infecciones, condiciones neoplásicas y síndrome lúpico inducido por drogas. Los anticuerpos antifosfolípidos asociados con enfermedades autoinmunes tienden a ser de la clase IgG, en contraste, los anticuerpos que están asociados con infecciones, tienden a ser la clase IgM.²³

Estos anticuerpos fueron detectados por primera vez en pacientes con sífilis. Wassermann usó extracto de hígado y bazo como antígeno en una prueba de fijación de complemento y demostró una reacción positiva con suero sifilítico.

Pronto se observó que un extracto de corazón, tanto de humanos como de animales, daban una reacción positiva con suero sifilítico. Más tarde este componente se aisló e identificó como cardioplipina.

9.3 Anticuerpos antinucleares

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son un grupo de autoanticuerpos en circulación, cuyo blanco son los antígenos que se encuentran en el interior del núcleo de la célula.²⁶ Pueden ir dirigidos a DNA, RNA, antígenos nucleares extraíbles (ENA), histonas, no histonas y el centrómero. Todos los antígenos están asociados con el núcleo.²⁷

9.3.1 Anti SSB/La

Los autoanticuerpos anti SS/B reconocen a una proteína nuclear de 48 KD que actúa como cofactor por la ARN polimerasa III. El antígeno está asociado también con todas las RNA transcritos por ARN polimerasa III, incluyendo tARN, 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 SSB en los sueros de pacientes con SS primario es muy variado y oscila entre el 40 y 96%.

9.3.2 Anti SSA/Ro

Clark y col, en 1969 descubrieron por primera vez en antígeno SS/A en un paciente con LES. Años más tarde se demostró que el antígeno Ro y el SS/A eran el mismo y no era específico 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 60 KD que se asocia a pequeños ARN de 83-112 nucleótidos.²⁸

10. Técnica de ELISA (Enzyme linked immunoabsorbent assay)

El inmunoensayo enzimático es una técnica en la cual uno de los reactantes, el anticuerpo o el antígeno, se fija en un soporte sólido antes de su interacción con el reactante complementario.^{29,30} Hay diversas variantes de esta técnica, dentro de las cuales las más comunes son el ELISA directo, indirecto, en sándwich y competitivo.

En el método directo, el antígeno se adsorbe sobre la fase sólida (placas de poliestireno); en el ELISA en sándwich las placas se sensibilizan con anticuerpos dirigidos contra el antígeno problema.³¹

El ELISA directo comúnmente se utiliza para cuantificar antígenos conocidos; el indirecto, para buscar y cuantificar anticuerpos contra antígenos conocidos, el ELISA en sándwich se utiliza la búsqueda y cuantificación de antígenos; en los métodos competitivos se puede utilizar 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.

Las soluciones para dilución de los reactantes y lavado de los pozos son variadas, la más utilizada es el regulador de fosfatos 0.1 M en solución salina 0.15 M a pH 7.4 (PBS). Un paso muy importante es el bloqueo de los pozos con soluciones de proteínas ajenas al sistema antígeno-anticuerpo en estudio. Los bloqueadores más utilizados son la albúmina (bovina, humana o de huevo, según el ensayo), gelatina, caseína y leche descremada. Los anticuerpos de detección son dirigidos contra alguno de los reactantes (antígeno o anticuerpo problemas) acoplados a enzimas.

Las enzimas de mayor uso son la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina, y β -galactosidasa, pero no son las únicas.

Para el revelado del sistema se utiliza el sustrato de la enzima; a veces se requiere del uso simultáneo de un cromógeno (como en el caso de la peroxidasa donde además de un peróxido de hidrógeno se utiliza orto-fenilendiamina o algún otro).

El cromógeno es necesario para que el producto resultante tenga algún color. El color se registra en un colorímetro a la longitud de onda de máxima absorción del producto coloreado.

11. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SS es un trastorno autoinmune, caracterizado por sequedad bucal y ocular, provocado por una destrucción de las glándulas salivales y lagrimales. Es común encontrar anticuerpos antinucleares, como SS/A y SS/B, FR y ACA en los sueros de estos pacientes.

Se ha reportado que además de la infiltración de linfocitos en las glándulas salivales y lagrimales, estos infiltrados se presentan en glándulas exócrinas del aparato digestivo, respiratorio y genital. Además, aproximadamente un 10% de los pacientes presenta infiltración extraglandular, como en riñón, pulmón, ganglios linfáticos y músculos.

También se presenta una respuesta inmunitaria anormal a uno o más antígenos propios; esta respuesta anormal se caracteriza por exceso de actividad de células B y células plasmáticas, lo cual se manifiesta por hipergamaglobulinemia policlonal.

El metotrexato y fosfato de cloroquina son fármacos utilizados en enfermedades reumáticas, inhiben la respuesta celular y humoral, por lo que están prescritos en pacientes con SS secundario; en años recientes se ha destacado su efecto como inmunosupresores participando en la reducción de la síntesis de inmunoglobulinas.³²

Además de ello el metotrexato y fosfato de cloroquina no presentan interacción adversa; por lo anterior, se determinarán algunos parámetros clínicos, que reflejarán la eficacia de este tratamiento.

12. OBJETIVO

Evaluación de metotrexato y fosfato de coloroquina, mediante la determinación de anticuerpos SS/A y SS/B, factor reumatoide, anticuerpos anticardiolipina, urea y creatinina, AST y ALT en suero de ratones que presentan exocrinopatía, así como la evaluación de lesiones iniciales y finales en ojos.

13. HIPÓTESIS

El metotrexato y fosfato de cloroquina están indicados en pacientes con SS secundario, por presentar efectos antiinflamatorios e inhibir la respuesta humoral, disminuyendo la síntesis de inmunoglobulinas. Se espera que el uso de metotrexato y fosfato de cloroquina a dosis adecuadas y por un periodo de tiempo conveniente, provocarán un descenso en los valores de autoanticuerpos y los marcadores enzimáticos de daño, así como las manifestaciones de este síndrome.

14. DISEÑO EXPERIMENTAL

14.1 Tipo de estudio

Observacional, prospectivo, longitudinal, descriptivo. ³³

14.1 Población de estudio

Ratones CD1 et/et

14.2 Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión.

Ratones de 6-8 semanas

Obtención de 500 µL de suero

Ratones hembra

Exclusión

Muerte del ratón

Suero insuficiente

Suero altamente hemolizado

Ratones macho

14.3 Variables

Dependiente

Características (signos y síntomas de los ratones)

Lesiones

Independiente

Dosis de Metotrexato

Dosis de metotrexato-fosfato de cloroquina

14.4 Material y reactivos

Placas de poliestireno de alta adherencia
Micropipetas 10-50 μ L, 200 μ L,1000 μ L.
Tubos eppendorf
Puntas para pipetas
Equipo de microdissección
Matraz volumétrico 1000mL
Matraz volumétrico 500mL
Matraz volumétrico 50 mL
Vasos de precipitados de 500 y 1000 mL
Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL
Probeta graduada 100 mL
Tubos de ensayo

Equipo

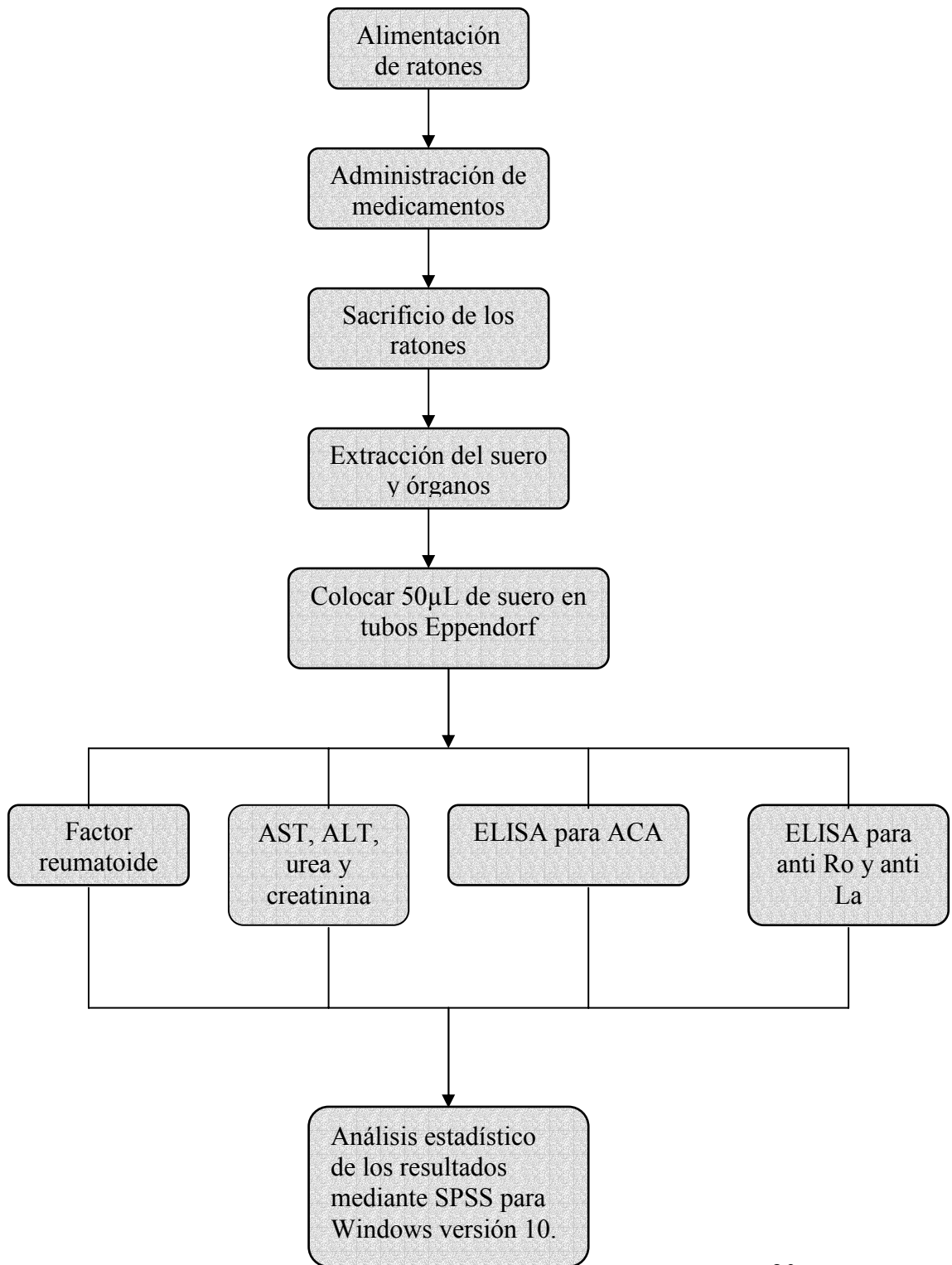
	Marca
Lector de ELISA	Awareness Technology Inc
Lámpara de UV	Cole-Palmer Instrument Company
Balanza analítica	Mettler H 80
Baño María	Lab-line
Agitador vórtex-genie	Scientific industries NC
Centrífuga	Solbat
Refrigerador	Phillips 127 volts-VA
Balanza granataria	Ohaus
Incubadora	Riossa Ec
Congelador -20° C	Fisher Scientific Isotemp
Espectrofotómetro	Bausch & Lomb
Estufa	Riossa

Reactivos

Nombre	Proveedor
Acido cítrico	JT. Baker
Alcohol etílico absoluto al 96%	JT. Baker
Albúmina sérica bovina (BSA)	JT. Baker
Carbohidrato de sodio anhidro	JT. Baker
Citrato de sodio	Técnica química
Cloruro de potasio	Técnica química
Cloruro de sodio	JT. Baker
Eter	JT. Baker
Fosfato de potasio dibásico	Merk
Fosfato de potasio dibásico dodecahidratado	JT. Baker
Fosfato de sodio monobásico	JT. Baker
Membrana de acetato de celulosa	Gelman Sciencies, Inc
O-fenilendiamina	Sigma
Peróxido de hidrógeno	Productos químicos Monterrey
Sulfato de amonio	JT. Baker
Tartrato de sodio y potasio	Merk
Suero de bovino adulto (ABS)	
Twen 20	Hycel de México
Kit para AST	Wiener-Lab
Kit para ALT	Wiener-Lab
Kit para Urea	Wiener-Lab
Kit para creatinina	Wiener-Lab

Nota: La preparación de los reactivos se encuentra en el anexo 2.

14.5 Diagrama de flujo.



14.6 Método

Se eligieron 41 ratones hembras CD1 et/et de 6 -8 semanas de edad que mostraban características de exocrinopatía⁵; se mantuvieron bajo condiciones de bioferio y libre acceso al agua y alimento.

Mediante una tabla de números aleatorios, (columna 11 de arriba hacia abajo y de derecha a izquierda) los ratones se distribuyeron según la tabla 1 y 2.

Se dosificaron metotrexato y fosfato de cloroquina de acuerdo a la dosis utilizada en humanos (250mg/Kg, y 400 mg/kg, respectivamente). Se utilizaron 2 dosis: dosis terapéutica y aumentada 10 veces.

◆ Dosis terapéutica

Tabla 1

Grupo/jaula	No. de ratón	Sitio	Posición	Tratamiento	Color
Testigo absoluto	1		No lleva	Sin administración	Negro
Jaula 1	2		No lleva		
	3		No lleva		
	4		No lleva		
	5		No lleva		
	6		No lleva		
Testigo	1	Oreja izquierda	Arriba	Placebo (administración de agua)	Verde
Jaula 2	2		En medio		
	3		Abajo		
	4		Arriba y en medio		
	5		Arriba y abajo		
	6		Se corta la oreja		
Metotrexato	1	Oreja derecha	Arriba	Administración de metotrexato	Azul
Jaula 3	2		En medio		
	3		Abajo		
	4		Arriba y en medio		
	5		Arriba y abajo		
	6		Se corta la oreja		
	7		No lleva		
Mezcla	1	Ambas orejas	Arriba	Administración de metotrexato y fosato de cloroquina.	Rojo
Jaula 4	2		En medio		
	3		Abajo		
	4		Arriba y en medio		
	5		Arriba y abajo		
	6		Se cortan las orejas		

◆ **Dosis 10 veces mayor**

Tabla 2

Grupo/jaula	No. de ratón	Sitio	Posición	Tratamiento	Color
Testigo absoluto	1 2 3		No lleva No lleva No lleva	Sin administración	Negro
Jaula 1			No lleva		
Testigo	1	Oreja izquierda	Arriba	Placebo (administración de agua)	Verde
Jaula2	2		Abajo		
	3		En medio		
	4		Arriba y en medio		
	5		No lleva		
Metotrexato	1	Oreja derecha	Arriba	Administración de metotrexato	Azul
Jaula3	2		Abajo		
	3		En medio		
	4		No lleva		
Mezcla	1	Ambas orejas	Arriba	Administración de metotrexato y fosato de cloroquina.	Rojo
Jaula 4	2		En medio		
	3		Abajo		
	4		No lleva		

Una vez que los ratones quedaron distribuidos en las jaulas, además de las marcas en las orejas, se enumeraron mediante el uso de líneas en la cola, es decir, al ratón uno, se le colocó una línea, al ratón dos, dos líneas y así sucesivamente. Dichas líneas se marcaron con plumón indeleble correspondiente al color de jaula. Estas líneas se remarcaron todos los lunes y miércoles.

Se administró fosfato de cloroquina y placebo diariamente, mientras que el metotrexato sólo lunes, miércoles y viernes. La vía de administración fue oral, y para ello se utilizó una sonda gástrica (animal feeding needles cat 9921 20GX1 ½" Popper and Sons, Inc New Hiden Park N. Y. USA).

Los ratones se pesaron cada lunes en una balanza granataria. Se evaluaron las características de los ojos, cuyas categorías fueron:

- Ojo sano
- Inflamación/leucoma
- Catarata
- Ojo perdido

Las jaulas se lavaron los días lunes, miércoles y viernes; el aserrín a utilizar se esterilizó en autoclave 15 lb por 20 minutos.

Transcurridos 4 meses, los ratones se sacrificaron y se extrajo el suero y órganos.

❖ Sacrificio de los ratones.

Cada ratón se metió en una cámara de éter y una vez anestesiado, se le hizo una incisión en el plexo axilar izquierdo; la sangre se colectó en tubos de ensayo perfectamente marcados con el número del ratón correspondiente.

Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos; se separó el suero y se colocó en tubos Eppendorf con alícuotas de 50 µL.

A si mismo se extrajeron los siguientes órganos: hígado, bazo, riñones, glándulas salivales y lagrimales; estos se pesaron utilizando para ello una balanza digital.

Se obtuvo el índice del órgano correspondiente mediante la siguiente fórmula:

$$\text{índice} = \frac{\text{peso del órgano}}{\text{peso del ratón}} \times 100$$

Nota: El índice esplénico se multiplicó por 1,000

El índice glandular se multiplicó por 10,000 para obtener números enteros.

❖ Factor reumatoide

Los GRC se colocaron en solución de Alsever estéril para su conservación.

Se lavaron dos veces los GRC en solución salina, para preparar una solución al 2%.

Se tomaron 5 mL de suspensión al 2% y se mezclaron con 5 mL de hemolisina a una unidad subaglutinante; se incubó a 37°C por 20 minutos.

Después de la incubación se lavaron los eritrocitos con solución salina dos veces por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 minutos y se ajustaron al 1%.

Los sueros de los ratones se descomplementaron, durante 30 minutos a 56 °C en un baño María.

En una placa de poliestireno se realizaron diluciones del suero, 1:5, 1:10 y 1:20 agregando al final 50µL de la solución GRC-hemolisina.

Se incubó 60 minutos a 37°C en estufa y se realizó la lectura.

❖ Enzimas

AST

Muestra (suero)	25 µL
Reactivo de uso (R ₁ + R ₂)	250 µL
Blanco. (agua)	

Temperatura 37° C.

Se ajustó a cero de absorbancia con el blanco.

Se leyó la absorbancia cada minuto durante tres minutos a 340 nm en un espectrofotómetro.

ALT

Muestra (suero)	25 μ L
Reactivo de uso (R ₁ + R ₂)	250 μ L
Blanco (agua)	

Temperatura 37° C.

Se ajustó a cero de absorbancia con el blanco.

Se leyó la absorbancia cada minuto durante tres minutos, a 340 nm en un espectrofotómetro.

Cálculos: $\Delta A \times 1750 = U/L$

Donde: $\Delta A =$ Diferencia de temperatura.

Nota: El cálculo es el mismo para AST

❖ Urea

	Blanco	estándar	Problema
Estándar	-	10 μ L	-
Suero	-	-	10 μ L
Reactivo 1 + ureasa	1 mL	1 mL	1 mL
Mezclar. Incubar 5 minutos a 37°C. Luego agregar:			
Reactivo 2	1mL	1 mL	1mL

Leer a 570 nm en un espectrofotómetro.

Cálculos.

Urea g/L = Absorbancia X Factor

Factor = $\frac{0.60 \text{ g/L}}{\text{Ab Stándar}}$

Ab Stándar

Creatinina

	Problema	estándar
Suero	20 μ L	-
Estándar	-	20 μ L
Solución amortiguadora	500 μ L	500 μ L
Blanco. (agua)		

Se ajustó a cero de absorbancia con el blanco.

Se mezcló y colocó la solución en la celda del espectrofotómetro y leer la absorbancia después de 1 minuto. (A_1)

Se midió la absorbancia (A_2) del problema y el estándar, exactamente 5 minutos después de la primera lectura, utilizando cronómetro.

Longitud de onda = 500 nm, temperatura 37° C.

Cálculos:

$$\text{Creat.} = \frac{A_{p2} - A_{p1}}{A_{s2} - A_{s1}} = \text{mg/dL}$$

Donde:

A_{p2} = Absorbancia 2 del problema.

A_{p1} = Absorbancia 1 del problema.

A_{s2} = Absorbancia 2 del problema.

A_{s1} = Absorbancia 1 del problema.

❖ **Anticuerpos anticardiolipina** (Método de McNeil³⁴).

Todo el material (cristalería) se lavó y se enjuagó varias veces con agua del grifo, posteriormente con agua destilada y finalmente con agua desionizada.

Se colocaron dos placas de ELISA (poliestireno de alta adherencia) una hora con radiación UV.

Pegado del antígeno.

Se pesaron 0.001 g de cardiolipina para 20 mL de alcohol etílico absoluto. Se colocaron 100µL a cada pozo (pipeta de plástico nueva). Se dejó evaporar 37°C por 24 horas.

Bloqueo de los sitios no específicos.

Se pesaron 0.5 g de albúmina sérica bovina (BSA) y se disolvió en 25 mL de PBS, se adicionaron 125 µL a cada pozo y se incubó a 37°C por una hora.

Se lavó tres veces con PBS a chorro.

Adición de las muestras problema.

Los sueros problema se diluyeron 1:200 con 10% de suero bovino adulto en PBS²³ y se adicionaron 100 µL a cada pozo.

Se incubó 1 hora a 37° C, se lavó nuevamente con PBS/Tween.

Adición del conjugado (anticuerpo con una enzima acoplada).

Se utilizaron muestras diluidas 1:100 de conjugado de chivo anti ratón-peroxidasa de rábano picante anti IgA, IgG e IgM; se adicionaron 100 µL a cada pozo.

Se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS-Tween.

Revelado y lectura.

Se colocó el sustrato de la enzima (peróxido de hidrógeno al 30% con o-fenilendiamina), y se colocó una hora en la oscuridad, transcurrido este tiempo se realizó la lectura a 405 nm en un espectrofotómetro para placas deELISA.

❖ **Anti SS/Ro y SS/La**

Se usaron placas de comerciales con antígeno Ro y La obtenidos de timo de ternera (DiaSorin ETI-SS-B/La y ETI-SS-A/Ro. Saluggia Vercelli, Italy). Se realizó una dilución 1:50 de los sueros en PBS y se depositaron 100µL a cada pozo, dejando incubar la placa 35 minutos a 37°C. Se lavó 3 veces con PBS y se colocaron 100µL de conjugado enzimático; nuevamente se incubó 35 minutos a 37°C.

Se lavó con PBS-Tween 3 veces y se agregó el cromógeno en todos los pozos dejando incubar 15 minutos a 37°C lejos de la luz. Se agregaron 50µL de solución bloqueadora a todos los pozos; se midió la absorbancia después de ligera agitación a 405 nm, en un espectrofotómetro para placas de ELISA.

15. RESULTADOS

➤ Resultados obtenidos utilizando la dosis terapéutica.

Tabla donde se muestra el coeficiente de correlación y significancia obtenidos al analizar el tratamiento con respecto a los valores de FR, anti Ro, anti La, IgA, lesión, índice glandular submaxilar, índice glandular lagrimal, índice esplénico, índice hepático e índice renal.

No se observó correlación del tratamiento con ninguno de los parámetros comparados.

	Coeficiente de correlación	significancia
Tratamiento Lesión	0.226	0.150
Tratamiento FR	0.227	0.149
Tratamiento GS	-0.079	0.361
Tratamiento GL	0.223	0.153
Tratamiento Ro	-0.034	0.439
Tratamiento La	-0.256	0.119
Tratamiento Riñón	0.075	0.368
Tratamiento Bazo	0.355	0.058
Tratamiento Hígado	0.074	0.369
Tratamiento IgA	-0.017	0.213

Tabla 1. Correlación bivariada de Spearman.

$p < 0.05$

FR= factor reumatoide

GL= índice glandular lagrimal

GS= índice glandular submaxilar

Tabla donde se muestra el coeficiente de correlación y significancia obtenidos al analizar lesión (de ojos) con respecto a los valores de FR, anti Ro, anti La, IgA, índice glandular submaxilar, índice glandular lagrimal, índice esplénico, índice hepático e índice renal.

No se observó correlación de las lesiones en ojos con ninguno de los parámetros comparados.

	Coeficiente de correlación	Significancia
Lesión FR	-0.095	0.333
Lesión Ro	-0.126	0.284
Lesión La	-0.178	0.208
Lesión IgA	-0.267	0.109
Lesión GL	0.110	0.309
Lesión GS	-0.070	0.376
Lesión Riñón	0.215	0.162
Lesión Hígado	-0.196	0.185
Lesión Bazo	0.055	0.402

Tabla 2. Correlación bivariada de Spearman.
 $p < 0.05$

Tabla donde se muestran los valores de las medias del índice glandular submaxilar, índice hepático, índice esplénico, título de anti Ro y anti La, índice renal, índice glandular lagrimal, e IgA.

No se observan diferencias marcadas entre las estas medias.

Tratamiento	GS	Hígado	Bazo	Ro	La	riñón	GL	IgA
Tesabs	8.65	5.37	3.89	0.017	0.086	1.42	5.05	0.032
Tes	6.96	5.35	4.55	0.042	0.065	1.55	5.68	0.095
Meto	9.18	5.40	4.26	0.047	0.067	1.40	5.78	0.048
Mezcla	6.63	5.42	4.75	0.058	0.058	1.52	5.72	0.064
Total	7.09	5.39	4.33	0.057	0.069	1.46	5.50	0.078

Tabla 3. Medias de los índices de órganos y título de anticuerpos anti Ro y anti La.

Tesabs=. testigo absoluto

Tes= testigo

Meto= metotrexato

Se ha reportado la posible relación entre las lesiones en glándulas con el aumento en los títulos autoanticuerpos Ro y La.

En esta tabla se muestra el coeficiente de correlación y significancia del análisis de los índices glandulares con respecto a los autoanticuerpos anti Ro y anti La; sin embargo no se observó una relación estadísticamente significativa.

	Coefficiente de correlación	Significancia
Gs y Ro	-0.010	0.482
Gs y La	-0.153	0.243
Gl y Ro	-0.302	0.081
Ro y La	-0.384	0.055

Tabla 4. Correlación bivariada de Spearman.

$p < 0.05$

Correlación entre el índice renal con respecto a urea y creatinina.

En el SS puede existir una infiltración linfocitaria en otros órganos además de las glándulas.

Estos resultados no presentaron significancia; puede visualizarse que el riñón está funcionando normalmente.

	Cofeciente de correlación	Significancia
Riñón Creatinina	-0.283	0.088
Riñón Urea	-0.280	0.166

Tabla 5. Correlación bivariada de Spearman
 $p < 0.05$

Correlación entre el índice hepático con respecto a las enzimas AST y ALT.

Estos valores no presentan significancia.

Esto es de esperarse ya que no se observó relación entre el tratamiento y lesión de hígado, ni tampoco en el tratamiento con el índice hepático.

	Cofeciente de correlación	Significancia
índice hepático AST	-0.046	0.424
índice hepático ALT	-0.073	0.379

Tabla 6. Correlación bivariada de Spearman
 $p < 0.05$

Tabla donde se presentan las medias, mínimos y máximos de absorbancias de anticuerpos anticardiolipinas de tipo IgM, IgG e IgA.

Los valores más altos se observaron en IgA, aunque no se presentó significancia.

Trat	IgM			IgG			IgA		
	media	min	max	media	min	max	media	Min	max
Tes	0.004	0.001	0.001	0.007	0.001	0.014	0.095	0.0	0.281
Meto	0.0	0.0	0.0	0.012	0.004	0.048	0.048	0.0	0.131
Mez	0.007	0.0	0.018	0.011	0.0	0.064	0.064	0.0	0.235
Taba	0.004	0.0	0.008	0.011	0.0	0.033	0.032	0.0	0.098
Total	0.002	0.0	0.018	0.010	0.0	0.0571	0.061	0.0	0.231
Sig	0.786			0.95			0.749		

Tabla 7. Anticuerpos anticardiolipina por el método de ELISA.

Análisis de varianza (ANOVA) $p < 0.05$

Rangos obtenidos por análisis de Kruskal Wallis.

Existe diferencia significativa; al finalizar el tratamiento los ratones no presentaron mejoría, si no que las lesiones evolucionaron hasta pérdida de ojo.

Rango de lesión final en ojos	
Lesión	Rango
Sano	7.0
Inflamado	9.0
Catarata	17.14
Perdido	18.83
Significancia	0.001

Tabla 8. Análisis de varianza de Kruskal Wallis.

$p < 0.05$

Tabla donde se muestran los porcentajes de las lesiones iniciales y finales en ojos. Hubo evolución de las lesiones hasta ojo perdido al finalizar el tratamiento.

% Lesiones iniciales				
Grupo	Sano	Inflamado	Catarata	Perdido
Tesabs	50	16.6	33.3	0
Tes	80	20	0	0
Meto	57.1	14.2	28.5	0
Mez	40	20	40	0
Total	56.5	17.3	26.2	0
% Lesiones finales				
Grupo	Sano	Inflamado	Catarata	Perdido
Tesabs	50	16.6	33.3	0
Tes	40	20	40	0
Meto	57.1	0	14.2	28.5
Mez	20	20	40	20
Total	43.4	13.1	30.4	13.1

Tabla 9. Porcentaje de lesiones antes y después del tratamiento.

En esta tabla se muestran los porcentajes de positividad del factor reumatoide a diferentes diluciones.

El grupo de metotrexato presentó el mayor número de casos negativos en comparación con los grupos testigo y mezcla que presentaron el menor número de casos negativos.

Tratamiento	Inverso de la dilución	Porcentaje (%)
Testigo absoluto	5	33.3
	10	0.0
	20	0.0
	negativo	66.6
Testigo	5	0.0
	10	0.0
	20	80.0
	negativo	20.0
Metotrexato	5	0.0
	10	0.0
	20	28.5
	negativo	71.5
Mezcla	5	0.0
	10	40.0
	20	40.0
	negativo	20.0

Tabla 10. Porcentajes de positividad de factor reumatoide.

➤ **Resultados obtenidos al utilizar dosis 10 veces mayor.**

Tabla donde se muestra el coeficiente de correlación y significancia obtenidos al analizar el tratamiento con respecto a los valores de FR, anti Ro, anti La, IgA, índice glandular submaxilar, índice glandular lagrimal, índice esplénico, índice hepático e índice renal, además de lesión.

Aquí se presentó diferencia significativa del tratamiento con índice glandular submaxilar, índice hepático, índice esplénico, anti Ro y anti La.

	Coeficiente de correlación	Significancia
Tratamiento Lesión	0.096	0.372
Tratamiento FR	0.211	0.235
Tratamiento GS	0.517	0.029
Tratamiento GL	0.276	0.170
Tratamiento Hígado	0.490	0.038
Tratamiento Bazo	0.741	0.001
Tratamiento Riñón	0.171	0.279
Tratamiento Ro	0.499	0.035
Tratamiento La	0.609	0.010
Tratamiento IgA	-0.399	0.079

Tabla 11. Correlación bivariada de Spearman.
p<0.05

Tabla donde se muestra el coeficiente de correlación y significancia obtenidos al analizar lesión con respecto a los valores de FR, anti Ro, anti La, IgA, índice glandular submaxilar, índice glandular lagrimal, índice esplénico, índice hepático e índice renal. No se observó significancia en ninguno de los casos.

	Coeficiente de correlación	Significancia
Lesión FR	0.194	0.253
Lesión Ro	0.385	0.087
Lesión La	0.093	0.376
Lesión IgA	-0.012	0.484
Lesión GL	-0.034	0.455
Lesión GS	-0.191	0.257
Lesión Riñón	-0.310	0.141
Lesión Hígado	0.119	0.343
Lesión Bazo	-0.253	0.192

Tabla 12 . Correlación bivariada de Spearman
p<0.05

Tabla donde se muestran los valores de las medias cuyos parámetros presentaron significancia en el análisis de Spearman (tabla 11): índice glandular submaxilar, índice hepático, índice esplénico, título de anti Ro y anti La.

Los grupos de testigo y testigo absoluto presentaron el menor título de anti Ro y anti La, y menores índices con respecto a los grupos tratados.

Grupo	GS	Hígado	Bazo	Ro	La
Tesabs	10.73	5.88	4.10	0.07	0.086
Tes	6.27	5.37	4.31	0.063	0.065
Meto	9.08	5.90	6.75	0.104	0.426
Mezcla	9.10	7.55	9.0	0.174	0.218
Total	8.43	6.06	5.79	0.135	0.187

Tabla 13. Medias de índice glandular, bazo, e hígado y del título de anticuerpos.

Tabla donde se presentan las medias, mínimos y máximos de absorbancias de anticuerpos anticardiolipinas de tipo IgM, IgG e IgA.

Hubo diferencia significativa en los valores de IgA; las absorbancias de anticuerpos IgG e IgM fueron sumamente pequeñas y no presentaron diferencia significativa.

Grupo	IgM			IgG			IgA		
	media	min	max	media	Min	max	media	min	max
Tesabs	0.0	0.0	0.0	0.037	0.023	0.05	0.185	0.121	0.255
Tes	0.0	0.0	0.0	0.027	0.017	0.047	0.041	0.0	0.127
Met	0.0	0.0	0.0	0.027	0.014	0.035	0.026	0.0	0.047
Mezcla	0.004	0.0	0.014	0.136	0.014	0.347	0.074	0.0	0.147
Total	0.001	0.0	0.014	0.052	0.014	0.347	0.076	0.0	0.255
Sig	0.325			0.322			0.012		

Tabla 14. Anticuerpos anticardiolipina, determinados mediante la prueba de ELISA. Análisis de varianza (ANOVA) $p < 0.05$

Tabla donde se presentan rangos de subpoblaciones CD4, CD8, células necrosadas y linfocitos B.³⁵

En los grupos tratados se observa un rango menor de células CD4 en comparación con los grupos no tratados.

Parámetro	Tratamiento	Rango	Significancia
CD4	Testigo absoluto	8.67	0.067
	Testigo	10.8	
	Metotrexato	4.33	
	Mezcla	4.00	
CD8	Testigo absoluto	8.0	0.090
	Testigo	10.4	
	Metotrexato	7.0	
	Mezcla	2.67	
Células necrosadas	Testigo absoluto	6.67	0.719
	Testigo	8.0	
	Metotrexato	9.33	
	Mezcla	5.67	
Linfocitos B	Testigo absoluto	4.0	0.338
	Testigo	9.6	
	Metotrexato	7.33	
	Mezcla	7.67	

Tabl 15. Análisis de varianza de Kruskal Wallis.
p<0.05

Tabla donde se muestra el coeficiente de correlación y significancia del análisis de los índices glandulares con respecto a los autoanticuerpos anti Ro y anti La. No existe significancia.

	Coeficiente de correlación	Significancia
Gs y Ro	0.226	0.218
Gs y La	0.446	0.055
Gl y Ro	0.385	0.057
Gl y La	0.143	0.313

Tabl 6. Correlación bivariada de Spearman.
p<0.05

Valores de rangos obtenidos por análisis de Kruskal Wallis.
No existe diferencia significativa.

Rango de lesión final en ojos	
Lesión	Rango
Sano	7.0
Inflamado	7.0
Catarata	9.33
Perdido	
Significancia 0.160	

Tabla 17. Análisis de varianza de Kruskal Wallis
 $p < 0.05$

Tabla donde se muestran los porcentajes de las lesiones iniciales y finales en ojos.
No se observa evolución considerable en las lesiones; al finalizar el tratamiento no hubo pérdida de ojos.

% Lesiones iniciales				
Tratamiento	Sano	Inflamado	Catarata	Perdido
Tesabs	100	0	0	0
Tes	75	25	0	0
Metó	100	0	0	0
Mez	100	0	0	0
Total	92.8	7.14	0	0
% Lesiones finales				
Tratamiento	Sano	Inflamado	Catarata	Perdido
Tesabs	100	0	0	0
Tes	40	20	40	0
Metó	66.6	0	33.3	0
Mez	66.6	33.3	0	0
Total	64.2	14.28	21.52	0

Tabla 18. Porcentaje de lesiones antes y después del tratamiento.

En esta tabla se muestran los porcentajes de positividad del factor reumatoide a diferentes diluciones.

El grupo de metotrexato y testigo absoluto presentaron el mayor número de casos negativos.

Tratamiento	Inverso de la dilución	Porcentaje (%)
Testigo absoluto	5	33.3
	10	0.0
	20	0.0
	negativo	66.6
Testigo	5	20.0
	10	0.0
	20	40.0
	negativo	40.0
Metotrexato	5	0.
	10	33.3
	20	0.0
	negativo	66.6
Mezcla	5	0.0
	10	33.3
	20	33.3
	negativo	33.3

Tabla 19. Porcentaje del factor reumatoide.

16. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados fueron sometidos a análisis con el programa estadístico SPSS para Windows versión 10. Se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA), Kruskal Wallis y correlación bivariada de Spearman.³⁶

En los ratones que fueron tratados con la dosis terapéutica no se encontró significancia en el análisis de correlación bivariada de Spearman (tabla 1) del tratamiento con respecto a lesión, FR, IgA, anti Ro, anti La, índice de glándulas, hígado, bazo y riñón. La tabla 3 muestra las medias de los índices de hígado, bazo, riñón y glándulas, así como los títulos de anti Ro y anti La, aquí se observa que los datos son muy homogéneos, motivo por el cual no se presentan variaciones significativas.

Tampoco se encontró significancia entre las lesiones y los demás parámetros (tabla 2). Al realizar una correlación entre los índices glandulares y anticuerpos anti Ro y anti La (tabla 4) se muestra que el coeficiente de correlación es negativo en comparación con la tabla 16 (dosis mayor), en donde fue positivo.

Aunque no hubo significancia, el resultado muestra que existe una tendencia a disminuir los títulos de anti Ro y anti La al aumentar el tamaño de glándula.

No hubo correlación entre el índice renal con urea y creatinina, tampoco hubo correlación entre el índice hepático con las enzimas AST y ALT (tabla 5 y 6).

Al realizar análisis de varianza no se encontró significancia para ACA (tabla 7), sin embargo, en cada grupo se presentaron casos de títulos altos.

Se realizó análisis de varianza de Kruskal Wallis de las lesiones iniciales y finales, la tabla 8 muestra los rangos obtenidos, y la tabla 9 los porcentajes; se encontró $p=0.001$; las lesiones evolucionaron hasta pérdida de ojo, sobre todo en el grupo de metotrexato; no hubo evolución de lesiones en el grupo de testigo absoluto.

La tabla 10 muestra los porcentajes obtenidos de la positividad del factor reumatoide; no hubo significancia ($p=0.714$), pero el grupo de metotrexato presenta el mayor porcentaje de casos negativos por tener efectos como antiinflamatorio.

A los ratones tratados a dosis 10 veces mayor se les realizó un análisis de varianza (tabla 14), para anticuerpos anticardiolipina, en el cual se halló una $p=0.012$ para el isotipo IgA; no hubo significancia en los isotipos IgG e IgM. Las medias revelan que el grupo de testigo absoluto presentó el mayor título de IgA comparado con los grupos tratados, es decir, se observó disminución de esta inmunoglobulina en aquellos que recibieron tratamiento.

Es de esperar que el isotipo predominante sea IgA, puesto que es la inmunoglobulina que se encuentra en mayor cantidad en secreciones.¹⁰

Se realizó un estudio de correlación bivariada de Spearman (tabla 11), del tratamiento con diversos parámetros, en el cual se halló significancia del tratamiento con respecto a índice de glándula submaxilar ($p=0.029$), índice hepático ($p=0.038$), índice esplénico ($p=0.001$), anticuerpos anti Ro ($p=0.015$) y anti La ($p=0.042$).

El coeficiente de correlación del tratamiento con el índice glandular submaxilar es positivo, esto indica que las glándulas se tuvieron un deterioro menor. En la tabla 13 se observan las medias, aquí el grupo testigo presenta el menor índice glandular con respecto a los grupos tratados y al grupo de testigo absoluto. No hubo diferencia significativa con respecto al índice de glándula lagrimal.

Se obtuvo una correlación positiva entre el tratamiento y el índice hepático. Los grupos tratados presentan mayor tamaño (Tabla 13), esto debido a que los fármacos se metabolizan en hígado, provocando un aumento en la actividad microsomal.²

El coeficiente de correlación de tratamiento con respecto al índice esplénico es igualmente positivo, mostrando que en los grupos tratados el peso del bazo es mayor (tabla 13); en la tabla 15 puede observarse que los rangos de células CD4 son menores en el caso de los grupos tratados mientras que el porcentaje de células B aumenta.

La tabla 13 presenta las medias de anticuerpos anti Ro y anti La; los títulos fueron elevados únicamente en los grupos que recibieron tratamiento. Es posible que a esta dosis los fármacos destruyan una población de células reguladoras normalmente presentes y esto a su vez provoque un aumento en la producción de anticuerpos.³⁷ Turk y Col.³⁸ realizaron estudios en cobayos a los cuales se les administró ciclofosfamida 3 días antes de la inmunización, los animales tratados experimentaron un aumento en la reacción de hipersensibilidad comparado con aquellos que no fueron sometidos a este tratamiento. Esto condujo a pensar que la ciclofosfamida elimina una población importante de células reguladoras.

Se cree que las células afectadas pudieran ser de clase T_{H1} , al ocurrir esto las células T_{H2} se expresan y habría mayor producción de anticuerpos. Según algunos autores, el equilibrio entre células T_{H1} y T_{H2} es de suma importancia para mantener en armonía la respuesta inmune.³⁹

Se realizó una correlación entre los índices glandulares y los anticuerpos anti Ro y anti La (tabla 16), en ellos no se encontró significancia alguna. Se cree que pudiera existir relación entre la aparición de estos autoanticuerpos con el daño a glándulas, sin embargo, tal participación no está del todo definida.

Las lesiones iniciales y finales se sometieron a un tratamiento por Kruskal Wallis, en la tabla 17 se observan los rangos; en este estudio no se presentó significancia. La tabla 18 presenta los porcentajes de ojos lesionados, en ella se observa que hubo evolución en las lesiones en todos los grupos, excepto en el testigo absoluto, probablemente por ser el grupo de estudio que fue sometido a menor estrés.

En la tabla 19 se observan los porcentajes de FR, en todos los grupos se presentaron casos positivos; el grupo de testigo absoluto y metotrexato obtuvieron la mayor cantidad de casos negativos, sin embargo no hubo diferencia significativa.

17. CONCLUSIONES

No se observaron cambios significativos en ratones que recibieron el tratamiento a dosis terapéutica, las lesiones evolucionaron y hubo pérdida de ojos, no se presentaron títulos significativos de anticuerpos anti Ro y anti La entre los cuatro grupos. No se presentaron discrepancias en cuanto a los índices de glándulas, bazo, riñón e hígado y se presentaron algunos casos de Factor Reumatoide.

Esto significa que el tratamiento a la dosis terapéutica no evita la evolución de las manifestaciones de este padecimiento.

Sin embargo, se observaron tendencias que se inclinan hacia la eficacia del tratamiento a esta dosis, talvés aumentando el número de muestra pueda conseguirse una mejoría.

Se observaron cambios significativos en los ratones que recibieron tratamiento con dosis 10 veces mayor, sin embargo, entre estos grupos, aquellos que recibieron el tratamiento fueron los que presentaron títulos altos de autoanticuerpos (Ro y La), y aunque hubo disminución en los títulos de IgA para ACA, también se presentó FR positivo, evolución en lesión de ojos, y aumento en los índices de algunos órganos como el bazo e hígado; es posible que esta dosis los fármacos afecten una población de células reguladoras, lo que provoca un desequilibrio en la respuesta inmune.

18. ANEXOS

1. GLOSARIO ⁴⁰

Acido úrico. Producto del metabolismo de las proteínas presente en la sangre y excretado en la orina.

Alopecia . Ausencia parcial o total de pelo.

Anorexia. Ausencia o disminución del apetito.

Anticuerpo. Tipo de glucoproteína, también llamada Ig, producida por los linfocitos B y que se une a antígenos, a menudo con elevado grado de especificidad y afinidad.

Antígeno. Molécula que se une a un anticuerpo o a un TCR. Los antígenos que se unen a anticuerpos son toda clase de moléculas. Los TCR sólo se unen a fragmentos peptídicos de proteínas que forman un complejo con moléculas de CMH.

Artralgia. Dolor de articulación.

Artritis. Inflamación en las articulaciones, que se caracteriza por dolor y tumefacción.

Artritis reumatoide. Enfermedad autoinmunitaria caracterizada por lesión inflamatoria 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.

Barrera hematoencefálica (BHE). Característica anatomofisiológica del cerebro que se cree esta formada por paredes capilares en el sistema nervioso central y rodeado por membranas gliales.

Crioglobulina. Proteína plasmática anormal que precipita y cristaliza a bajas temperaturas.

Disfagia. Dificultad para deglutir.

Escleroderma. Enfermedad autoinmune que afecta a los vasos sanguíneos y el tejido conectivo. Se caracteriza por degeneración fibrosa del tejido conectivo de piel, pulmones y órganos internos, especialmente esófago y riñones.

Esclerosis. Trastorno caracterizado por el endurecimiento de algún tejido debido a diversas causas.

Fotosensibilidad. Cualquier respuesta anormal ante la exposición de la luz.

Hemaglutinación. Reacción de aglutinación en la cual los eritrocitos se unen a un anticuerpo.

Hepatocito. Célula estructural y funcional del hígado.

Hipergamaglobulinemia. Aumento anormal de globulinas gama.

Histona. Grupo de proteínas muy básica, de bajo peso molecular, soluble en agua, insoluble en amoníaco diluido, que se combina con ácidos nucleares para formar nucleoproteínas. Se localiza en los núcleos celulares.

Ictericia. Coloración amarillenta de piel, mucosas y esclerótica, producida por un aumento de bilirrubina en sangre superior a la normal.

Inmunoglobulina.

LES (lupus eritematoso sistémico) Enfermedad inflamatoria crónica que afecta a numerosos sistemas del organismo.

Leucopenia.

Linfocitopenia. Disminución de linfocitos.

Pancreatitis. Transtornos inflamatorio del páncreas que puede ser agudo o crónico.

Pleuritis. Inflamación de la pleura parietal de pulmones, caracterizada por disnea y dolor agudo, limitando la respiración normal.

Polimiositis. Inflamación de numerosos músculos, que habitualmente se acompaña de deformidad, edema, dolor, sudoración y tensión.

Prurito. Síntoma incesante de picor. Comezón.

Queratoconjuntivitis. Inflamación de la córnea y la conjuntiva.

Vasculitis. Proceso inflamatorio de los vasos sanguíneos.

Xeroderma. Alteración cutánea crónica caracterizada por sequedad y aspereza.

Xeroftalmia. Transtorno caracterizado por la presencia de sequedad en córnea y conjuntiva.

Xerosis. Sequedad en la piel.

2. SOLUCIONES

Fórmula de Alsever

Glucosa	20.50 g
Citrato de sodio (2H ₂ O).....	8.0 g
Acido cítrico (H ₂ O)	0.55 g
Cloruro de sodio	4.20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave 10 libras por 15 minutos.
La sangre de carnero se recibe en esta solución v/v;
se mantiene en refrigeración hasta 4 semanas para su uso.

PBS

Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g
Fosfato diácido de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2 g
Fosfato de sodio dodecahidratado)Na ₂ PO ₄ .12H ₂ O)	2.9 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Aforar a 1 L de agua	

Almacenar a 9° C por 2 semanas

Factor reumatoide

Reactivos

- Solución salina amortiguadora
- Glóbulos rojos de carnero (GRC)
- Solución de Alsever
- Hemolisina
- PBS

AST

Reactivos

Reactivo 1. Tampón Tris pH 7.8.	80 mmol /L
L-aspartato	200 mmol/L
Reactivo 2. NADH	0.18 mmol/L
LDH	800 U/L
MDH	600 U/L
α -cetoglutarato	12 mmol/L

Preparación

Se disolvió el comprimido (R₁) en el tampón (R₂)

ALT

Reactivos

Reactivo 1. Tampón TRIS pH 8.0	100 mmol/L
L – Alanina	500 mmol /L
Reactivo 2. NADH	0.18 mmol/L
LDH	1200 U/L
α - cetoglutarato	15 mmol/L

Preparación.

Se disolvió el comprimido (R₁) en el tampón (R₂)

Urea

Reactivos

- Reactivo 1 concentrado: Buffer de fosfatos 200mmol/L, pH 7.0; ácido salicílico 750 mmol/L; nitroprusiato de sodio 20 mmol/L; EDTA 10 mmol/L.
- Reactivo 2 concentrado: Solución de hipoclorito de sodio 10 mmol/L en hidróxido de sodio 0.1 mmol/L.
- Ureasa: Ureasa ≥ 75 U/mL en solución glicerizada.
- Estándar: solución de urea 0.60 g/L.

Proporción de reactivos

Reactivo 1: 1 parte de reactivo 1 concentrado + 4 partes de agua destilada.

Reactivo 2: 1 parte de reactivo 2 concentrado + 4 partes de agua destilada.

Reactivo 1 + Ureasa: 4mL de ureasa por cada 100 ml de reactivo 1.

R₁ = 5mL + 20 mL de agua destilada + 1 mL de ureasa.

R₂ = 5 ml + 20 mL de agua destilada.

Condiciones de reacción

- Temperatura de reacción: 37°C.
- Tiempo de reacción: 10 minutos.
- Volumen de muestra: 10 μ L.

Creatinina

Reactivos

- 1.- solución amortiguadora (NaOH 313 mmol/L: fosfato 12.5 mmol/L).
- 2.- Solución de ácido pícrico (ácido pícrico 8.73 mmol/L).
- 3.- Solución estándar (1 mg de creatinina /dL).

3. CRITERIO DE SAN DIEGO PARA EL SS

- ❖ SS primario
 - Prueba de Schimer positiva (menor de 9 mm a los 5 minutos)
 - Tinción positiva en la prueba con rosa de bengala o fluresceína que demuestre afección corneal (queratoconjuntivitis seca).

- ❖ Signos y síntomas objetivos de sequedad oral.
 - Disminución e flujo de saliva usando copas de Lashley u otro método.
 - Biopsia de glándula salivare menor anormal (más de 2 focos linfocitarios por área).
 - Presencia de transtornos autoinmunitarios (uno o más).
 - Factor reumatoide elevado (mayor a 1/320)
 - ANA a título alto.
 - Anticuerpos anti SSA y SSB.

- ❖ SS secundario
Signos y síntomas características de la sequedad ocular, datos clínicos suficientes para el diagnóstico de AR, IES, polimiositis o escleroderma.

Exclusiones

Pacientes con sarcoidosis, linfoma preexistente, infección por VIH y otras causas de queratitis o crecimiento de glándulas salivales.

19. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Cotran R. Robbins. Patología estructural y funcional. 5^a ed. España: MacgrawHill, 1999 : 202-241.
- 2.- Chandrasoma AP, Taylor C. Patología general. 3^a ed. México: El Manual moderno, 1999: 499.
- 3.- Díaz RM, Espinosa D. Tratado de medicina interna. Madrid: Médica panamericana, 1994: Tomo 2: 2825-2827.
- 4.- Farreras R. Medicina Interna. Madrid: Mosby/Dogma libros, 1995: Vol 1: 1101-1102.
- 5.- Marroquín SR, Lara HM, Calvillo ER, García BM, Castro MM, Mora GJ, Flores PM. Exocrinopathy in the CD1 et/et hypotymic mouse resembling Sjögren syndrome. Vet Mex. 2003; 34:129-141.
- 6.-Fox R. Sjogren's syndrome : evolving therapies. Expert opin drugs: 2003; 12(2): 247-54.
- 7.-Fortran G, Baust D. Methotrexate in primary Sjogren's syndrome. Clinical & Experimental Rheumatology.1996; 14 (5): 555-8.
8. Kruize AA, Henre RJ, Kallenberg CG. Hydroxychloroquine treatment for primary Sjögren's Syndrome: a two year, double blind crossover trial. Ann Rheum Dis. 1993; 52: 360-64.
- 9.- Harris P, Langer A, Marrow H. Treatment of primary Sjogren's syndrome with hydroxychloroquine: a retrospective, open-label study. Lupus suppl. 1996; 1: 1-6.
- 10- Stites DP, Terr AI. Inmunología Básica y Clínica. 8^a ed. México: El manual moderno, 1996: 511-513
- 11.- Secretaría de Salud. Farmacopea USP. 23^a ed. USA: Secretaría de Salud, 1998.
- 12.- Smith CM, Reynard AM. Farmacología. Argentina: Panamericana, 1994: 880-881, 887-890,919-921.
- 13.- Litter M. Farmacología experimental y clínica. 7^a ed. México: El manual moderno, 1986: 1767-1774.

- 14.- Katzung BG. Farmacología básica y clínica. 7^a ed. México: El manual moderno, 1999: 683-684, 965-968, 1021-1022.
- 15.- Clark T, Livings G. Primary Sjogren's Síndrome: Clinical and immunology study of 80 patients. 1997; 108(17): 652-7.
- 16.- Anderson SC, Cockayne S. Química Clínica. México: Interamericana-MacgrawHill, 1995: 223-228, 243-270.
- 17.- Murray RK. Bioquímica de Harper. México: Interamericana, 1997: 281-283
- 18.- .Bhagavan N. Bioquímica. 2^aed. México: Interamericana,1984: 472-479.
- 19.- Tresseler KM. Laboratorio clínico y pruebas diagnósticas. México: El manual moderno, 1998: 336-338.
- 20.- Kaplan LA. Química clínica. Colombia: Panamericana, 1990: 703-708.
- 21.- Bauer M. Química clínica. México: El manual moderno, 1996: 805-807.
- 22.- Weir DM, Stewart J. Inmunología. 2^a ed. México: El manual moderno, 1996: 279-280.
- 23.-Rose NR, Hamilton RG, et al. Manual of clinical laboratory Immunology. 6^a ed. Washington D.C.: Ams-press, 2002: 951-958, 973-978, 961-969.
- 24.-Tierney LM, Krupp MA. Manual de diagnóstico y de laboratorio. 8^a ed. México: El manual moderno, 1986: 315.
- 25.- Chapel H, Haeney M. Inmunología clínica. 2^a ed. México: El manual moderno, 1998: 435.
- 26.- Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. 5^a ed. Argentina: Panamericana, 1996: 559-591.
- 27.- Salgado A, Vivardell M. Manual clínico de pruebas de laboratorio. España: Mosby, 1996: 151-166.
- 28.- Paul S. Reactions autoinmune. New Jersey: Human press, 1999: 62-64.
- 29.- Rojas EO. Inmunología. 2^a ed. México: Panamericana, 2001: 164-165.
- 30.- Brock TD. Madigan MT. 6^a ed. México: Prentice-Hall Hispanoamericana, 1993: 482-485.

- 31.-Abbas AK, Lichtman AH, et al. Inmunología Celular y Molecular. 4^aed. México: McGraw-Hill-Interamericana, 2002: 539-545.
- 32.-Parslow TG, Stites DP. Inmunología básica y clínica. 10^a ed. México: El Manual Moderno, 2003: 873-875,345-348.
- 33.- Cañedo DL. Investigación clínica. México: Interamericana, 1987: 37-51.
- 34.- McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: ...₂-Glycoprotein I (apolipoprotein H). Medical Sciences. 1990; 87: 4120-4124.
35. Falcón MG. Valoración de metotrexato y aralén como una modalidad de tratamiento para exocrinopatía en ratones CD1 et/et. Impreso en México, 2005.
- 36.- Marques CM. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. México: FES-Zaragoza UNAM, 1988; 163,361-369,381,425-436, 506-512.
- 37.- Goldby RA, Kindt TJ. Inmunología. 5^aed. México: McGrawHill, 2004; Cap. 20.
- 38.- Turk JL, Katz SI, Parker D, Sommer G. Suppressor cell in normal immunisation as a basic homeostatic phenomenon. Department of Pathology. 1993; 612-614.
- 39.-Kelso A. T_h1 and T_h2 subsets: paradigms lost?. Immunology today. 1995; 16(8): 374-379.
- 40.- Mendizábal JA. Pocket de Medicina y Ciencias de la salud. España: Diccionario Mosby,1998.
- 41.- Coll J, Porta M, Rubies J, Gutiérrez J, Tomás S. Sjögren's síndrome: a stepwise approach to the use of diagnostic tests. Annals of the Rheumatic Diseases. 1992; 51: 607-610.

TABLA DE ABREVIATURAS

lb	Libra
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
L	Litro
nm	Nanómetro
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
FR	Factor reumatoide
SS	Síndrome de Sjögren
LES	Lupus eritematoso sistémico
MTX	Metotrexato
AST	Aspartato aminotransferasa
ALT	Alanina aminotransferasa
CPK	Creatinfosfocinasa
LDH	Deshidrogenasa láctica
AR	Artritis reumatoide
ACA	Anticuerpos anticardiolipina
ANA	Anticuerpos antinucleares
DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
ENA	Anticuerpo extraible de núcleo
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
PBS	Amortiguador salina de fosfatos
GRC	Glóbulos rojos de carnero