



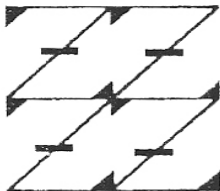
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIMITOCONDRIALES COMO
MARCADOR DE CIRROSIS BILIAR PRIMARIA, EN RATONES CD1 et/et
QUE PRESENTAN SINTOMATOLOGIA SEMEJANTE AL SINDROME DE
SJÖGREN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
HILDA GUZMAN CRUZ

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

DIRECTOR: M en C CLAUDIA FABIOLA MARTINEZ RODRIGUEZ

ASESOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

MEXICO, DF.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"Cuando quieres alguna cosa, todo el Universo conspira para que la consigas. Creo absolutamente en ésto. No obstante, el acto de vivir el propio destino incluye una serie de etapas que exceden en mucho a nuestra comprensión, y cuyo objetivo es siempre reconducciones al camino de nuestra Leyenda Personal; o hacer que aprendamos las lecciones necesarias para cumplir el propio destino."

Paulo Coelho

DEDICATORIAS

A mis padres.

Eloy e Hilda, por su amor infinito, por su entrega y apoyo sin condiciones. Por las enseñanzas, los consejos, las lecciones y las innumerables muestras de cariño. Por ser los dos grandes pilares de mi vida, por que con su ejemplo y amor han formado el ser humano que soy. Gracias por todo. Los quiero mucho...

A mis hermanas.

Adelí, Yami y Nany, por el día a día en que compartimos anécdotas, vivencias alegrías y tristezas. Gracias por ser parte de mi vida y permitirme ser parte de la suya. Porque saben que a pesar de todo y todos cuentan conmigo. Las quiero...

A mis Abuelitos.

Maguito y Erasto, que aunque en el cielo se encuentran, siempre su recuerdo estará presente en mi mente y corazón, dándome la fortaleza y motivo para seguir adelante.

Ramón y Chagüita, por ser seres humanos maravillosos, cariñosos y entregados. Por las vivencias compartidas y por todo el amor que me han dado sin pedir nada a cambio.

A mis tíos, tías, primos y primas.

Porque con sus consejos, su afecto y cariño contribuyen a enriquecer mi vida. Porque cada acto suyo es un aprendizaje para mi.

A mis amigos.

Geovas, Erick, Marielo y Lucio, compañeros fieles y amigos incondicionales. Por todos los momentos vividos, por su apoyo y su afecto

A el PB y mi grupo de CLÍNICOS.

Por las miles de anécdotas, por los buenos momentos, porque de cada persona que se encuentra en el camino se pueden aprender grandes cosas.

Hilda Guzmán Cruz

A G R A D E C I M I E N T O S

A mi Director de tesis.

M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez, por su tiempo y empeño. Por alentarme siempre a seguir adelante, por su optimismo y confianza. Porque su ayuda, consejos y conocimientos se ven reflejados en la culminación de este proyecto.

A mi Asesor de tesis.

Dr. Rubén Marroquín Segura, por permitirme ser parte de uno de sus proyectos, por compartirme sus conocimientos y enseñanzas. Por su gran calidad humana.

A mis sinodales.

M. en C. Leonor Aguilar Santelises, M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez, Dr. Rubén Marroquín Segura, Q.F.B. Ma. De las Mercedes Zamudio Durán, Q.F.B. Francisco Javier Parada García. Por su atención y sugerencias.

A los profesores.

M. en C. Maurilio Flores y M. en C. Ricardo Calvillo por el aporte a este trabajo. Por su apoyo y consejos.

A los profesores y tesisistas del L1-PA.

Por los momentos compartidos, por las buenas charlas, por las enseñanzas y por los días de trabajo.

A la UNAM.

Por enseñarme que ser universitario no solo engloba los conocimientos adquiridos como profesionista, si no también se refleja en la nobleza de corazón y espíritu.

Hilda Guzmán Cruz

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teóricos	3
3.1. Enfermedades autoinmunes	3
3.2. Lesión y muerte celular	4
3.2.1. Causas de lesión celular	6
3.2.2. Lesión y necrosis celular	6
3.2.3. Lesión inducida por radicales libres	7
3.3. Oxido nítrico	8
3.4. Ceruloplasmina	9
3.5. El hígado	11
3.5.1. Estructura del hígado	11
3.5.2. Vías biliares	11
3.5.3. Funciones del hígado	12
3.6. Síndrome de Sjögren	13
3.6.1. Características	13
3.6.2. Morfología	13
3.6.3. Epidemiología	14
3.6.4. Manifestaciones clínicas	14
3.6.5. Mecanismo de respuesta inmune	15
3.7. Cirrosis biliar primaria	16
3.7.1. Definición de cirrosis	16
3.7.2. Historia	16
3.7.3. Definición	16
3.7.4. Etiología	17
3.7.5. Autoinmunidad	17
3.7.6. Anatomía patológica	18
3.7.7. Cuadro clínico	20
3.7.8. Síntomas y signos	20
3.7.9. Otros síntomas	21
3.7.10. Diagnóstico	22
3.7.11. Alteraciones bioquímicas	22
3.7.12. Diagnóstico serológico	23
3.7.13. Características histopatológicas	24
3.7.14. Tratamiento	25
3.8. Técnicas inmunológicas de laboratorio	25

3.8.1. ELISA	25
3.8.2. Electroforesis	28
3.8.3. Inmunoelectrotransferencia	31
3.8.4. Inmunodifusión radial	32
3.9. Preparación de tejidos para histología	33
3.10. Modelo animal	35
4. Planteamiento del problema	36
5. Hipótesis	36
6. Objetivos	37
7. Diseño de investigación	38
8. Material, Equipo y Reactivos	40
9. Método	43
9.1. Obtención de órganos y suero de ratones: CD1, et/+ y et/et.	43
9.2. Preparación de antígeno mitocondrial a partir de hígado de un mamífero.	43
9.3. Cuantificación de proteínas del antígeno mitocondrial por el método de Lowry.	44
9.4. ELISA	45
9.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida.	47
9.6. Inmunoelectrotransferencia (IET).	51
9.7. Determinación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial.	53
9.8. Análisis de Nitritos.	53
10.Resultados	56
11.Análisis estadístico	66
12.Análisis de resultados	73
13.Conclusiones	75
14.Glosario	76
15.Referencias	79

1. Resumen

Se sacrificó un lote de 30 ratones: 10 +/+, 10 et/+ y 10 et/et; con la finalidad de obtener el suero y algunos órganos internos (glándula lagrimal y submaxilar, hígado, riñón y bazo).

También se obtuvo antígeno mitocondrial a partir de hígado de rata, el cual se corrió electroforéticamente en distintas concentraciones para obtener la concentración ideal a usar en la inmunoelectrotransferencia, y verificar su peso molecular.

Primero se realizó la técnica de ELISA para todas las muestras de suero del lote de ratones, obteniendo títulos altos de anticuerpos antimitocondriales en los sueros correspondientes a los ratones et/et, a éstos se les realizó inmunoelectrotransferencia como prueba confirmatoria para la determinación de anticuerpos antimitocondriales, resultando éstos positivos.

Se obtuvo el peso relativo de las glándulas y órganos para correlacionarlos con los resultados anteriores. Se realizaron cortes histológicos de hígado pudiendo observar lesiones en los conductos biliares interlobulares en los ratones et/et a diferencia de los +/+ que no presentaron lesiones.

2. Introducción

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad inflamatoria crónica secundaria como consecuencia de una alteración del sistema inmunológico, caracterizada por sequedad de ojos y de boca, consecuentes a la destrucción de glándulas salivales y lagrimales por un mecanismo inmunitario. Este puede ocurrir como un trastorno aislado (forma primaria) o más frecuentemente asociado a otras enfermedades autoinmunitarias (forma secundaria).

Este síndrome presenta una característica particular, los órganos afectados presentan un infiltrado linfocitario predominando células T colaboradoras CD4+ y algunas células B.

En pacientes con SS se han identificado muchos anticuerpos, tanto específicos como no específicos de órgano; sin embargo los más importantes son los dirigidos contra dos anticuerpos anti-ribonucleoproteínas (RNP), antígeno nuclear SS-A (Ro) y antígeno citoplasmático SS-B (La), que pueden detectarse hasta en un 90% de los pacientes.^(51, 52)

En su forma secundaria el SS puede tener manifestaciones sistémicas, en este sentido se ha encontrado que un porcentaje importante de pacientes con ese padecimiento desarrollan Cirrosis Biliar Primaria (CBP), esta es una enfermedad crónica, progresiva y muchas veces mortal y se caracteriza por la destrucción granulomatosa de los conductos biliares, un rasgo característico de esta enfermedad es la presencia de autoanticuerpos, especialmente los anticuerpos antimitocondriales.

Estudios anteriores muestran que una cepa de ratones alopécicos hipotímicos denominados et/et (por su forma mutante), muestra síntomas semejantes al cuadro clínico presente en pacientes con Síndrome de Sjögren, estos ratones derivaron de una mutación espontánea descendiente de la cepa albina CD1 como resultado de un gen recesivo autosómico simple, surgida en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.^(52, 53)

Este trabajo pretende evaluar el daño hepático (cirrosis biliar primaria) en ratones que muestran sintomatología semejante a la presente en el Síndrome de Sjögren, por medio de la determinación de anticuerpos antimitocondriales.

3. Marco Teórico

3.1. Enfermedades autoinmunes

Procesos autoinmunes que contribuyen en la patogenicidad de la enfermedad y que están asociadas con la formación de autoanticuerpos.

Y pueden clasificarse:

- Enfermedades específicas de órgano: con producción de autoanticuerpos específicos de cada órgano. Por ejemplo la enfermedad de Hashimoto (lesión específica de la glándula tiroides).
- Enfermedades autoinmunes sistémicas o no específicas de órgano: pertenecientes a la clase de trastornos reumáticos, por ejemplo lupus eritromatoso sistémico.

Entre estas dos clases encontramos trastornos en los que las lesiones tienden a estar ubicadas en un único órgano, pero los anticuerpos no son específicos del órgano. Por ejemplo, la cirrosis biliar primaria, en la cual el pequeño conducto biliar es blanco principal de la infiltración de la célula inflamatoria, pero los anticuerpos presentes (sobre todo mitocondriales) no son específicos de hígado.

Específicas de Órgano	Tiroiditis de Hashimoto Enfermedad de Graves Enfermedad de Addison Miastenia gravis Síndrome de Goodpasture Penfigoide Oftalmía simpática Esclerosis múltiple Anemia hemolítica autoinmune Cirrosis biliar primaria Colitis ulcerosa Síndrome de Sjögren Artritis reumatoide Esclerodermia
↓ No específicas de Órgano	Lupus eritematoso sistémico (LES)

Tabla 1. Espectro de enfermedades autoinmunes

3.2. Lesión y muerte celular

La célula normal está confinada a un rango muy estrecho de función y estructura por sus programas genéticos de metabolismo, diferenciación y especialización; por las restricciones de las células vecinas; y por la disponibilidad de sustratos metabólicos. No obstante, es capaz de manejar las demandas fisiológicas normales (llamada homeostasis normal). Esfuerzos fisiológicos más excesivos o algunos estímulos patológicos pueden llevar a una serie de adaptaciones celulares fisiológicas y

morfológicas, en las que se alcanza un estado nuevo pero claramente alterado, preservando la viabilidad de las células y modulando su función en respuesta a tales estímulos.

Si se exceden los límites de la respuesta adaptativa a un estímulo, o ciertas circunstancias en las que la adaptación no es posible, se produce una serie de acontecimientos, imprecisamente denominada lesión celular. La lesión celular es reversible hasta un cierto punto, pero si el estímulo persiste o es lo suficientemente intenso desde el principio, la célula alcanza el punto de no retorno y sufre una lesión celular irreversible y muerte celular.

La muerte celular, es resultado final de la lesión celular, es uno de los acontecimientos más importantes en anatomía patológica, afectando a cada tipo celular y siendo la consecuencia principal de la isquemia (falta de flujo sanguíneo), infección, toxinas y reacciones inmunitarias. Hay dos patrones morfológicos de muerte celular: necrosis y apoptosis. La necrosis es el tipo más común de muerte celular tras estímulos exógenos, presentándose después de agresiones como la isquemia y la lesión, y se manifiesta por hinchazón celular intensa o ruptura celular, desnaturalización y coagulación de las proteínas citoplasmáticas y ruptura de los orgánulos celulares. La apoptosis es un acontecimiento más regulado. Está diseñado para la eliminación normal de poblaciones celulares no deseadas durante la embriogénesis y en varios procesos fisiológicos. También se produce, en condiciones patológicas en las que se acompaña, en ocasiones de necrosis. Otros tipos de alteraciones morfológicas son: alteraciones subcelulares que se producen principalmente en respuesta a estímulos lesivos más crónicos o persistentes; acumulaciones intracelulares de diversas sustancias como resultado de trastornos en el metabolismo celular; y calcificación patológica, una consecuencia común de la lesión celular y tisular.

Adaptaciones celulares

Atrofia, hipertrofia, hiperplasia, metaplasia

Lesión celular aguda

Lesión reversible

Muerte celular

Necrosis

Apoptosis

Alteraciones subcelulares e inclusiones celulares

Acumulaciones intracelulares

Calcificación patológica

Tabla.2. Respuestas celulares a la lesión

3.2.1. Causas de la lesión celular

Las causas de la lesión celular reversible y de muerte celular varían mucho, pero podemos agruparlas en:

- Hipoxia. Afecta a la respiración oxidativa aeróbica. La falta de irrigación sanguínea (isquemia), que se produce cuando el flujo arterial es interrumpido por arteriosclerosis o por trombos, es la causa principal de hipoxia. Otra forma de oxigenación inadecuada de la sangre es la pérdida de la capacidad transportadora de oxígeno de la sangre, como anemia o intoxicación por monóxido de carbono.
- Agentes físicos. Comprenden el traumatismo mecánico, extremos de temperatura, cambios en la presión atmosférica, radiación y shock eléctrico.
- Agentes químicos y fármacos. La lista de sustancias químicas que pueden producir lesión celular escapa a la recopilación. Desde sustancias simples como la glucosa o sal, venenos como arsénico o cianuro y otras sustancias como contaminantes ambientales alcohol o narcóticos son algunos de los agentes que producen lesión celular.
- Agentes infecciosos. Estos agentes se distribuyen entre los virus submicroscópicos y los grandes céstodos.
- Reacciones inmunológicas. Aunque el sistema inmunitario es útil en la defensa contra agentes biológicos, las reacciones inmunitarias pueden, de hecho, causar una lesión celular.
- Trastornos genéticos. La lesión genética puede provocar un defecto tan intenso como malformaciones o una alteración sutiles. Los diversos errores innatos del metabolismo que surgen a partir de anomalías enzimáticas son ejemplo de lesión celular debido a alteraciones sutiles a nivel del ADN.
- Desequilibrio nutricional. Las deficiencias y excesos nutricionales se han convertido en causas importantes de lesión celular.

3.2.2. Lesión y necrosis celular

Los mecanismos moleculares responsables de la lesión celular que conducen a la lesión celular que conducen a la muerte de la célula necrótica son complejos.

Cuatro sistemas intracelulares son particularmente vulnerables:

1. El mantenimiento de la integridad de las membranas celulares
2. La respiración aeróbica

3. La síntesis de proteínas enzimáticas y estructurales
4. La conservación de la integridad del aparato genéticos de la célula

Hay cuatro factores bioquímicos comunes que parecen ser importantes en la mediación de la lesión celular y la muerte celular, cualquiera que sea el agente instigador:

- Oxígeno y radicales libres derivados del oxígeno.
- Calcio intracelular y pérdida de la homeostasis del calcio.
- Depleción de ATP.
- Defectos de la permeabilidad de la membrana.

3.2.3. Lesión celular inducida por radicales libres

Un importante mecanismo de lesión de la membrana, es la lesión inducida por radicales libres, en particular por especies de oxígeno activado. Se presenta en procesos variados como la lesión química y por radiación, la toxicidad por oxígeno y otros gases, el envejecimiento celular, la muerte microbiana por células fagocíticas, la lesión inflamatoria, la destrucción tumoral por macrófagos y otros.

Los radicales libres son especies químicas que tienen un único electrón no apareado en una órbita externa, es extremadamente reactivo e inestable y entra en reacción con sustancias químicas inorgánicas u orgánicas, en especial con moléculas claves de las membranas y con ácidos nucleicos.

Los radicales libres pueden iniciarse dentro de las células por:

1. La absorción de la energía radiante (luz ultravioleta, rayos X)
2. Reacciones endógenas, habitualmente oxidaciones, que se producen durante los procesos metabólicos normales
3. El metabolismo enzimático de sustancias químicas exógenas o fármacos.

Las especies reactivas más importantes son:

- Tres especies del oxígeno, superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), e iones hidroxilo (OH^-).
- Oxido nítrico: puede actuar como radical libre y puede ser convertido a un anión peroxinitrito altamente reactivo ($ONOO^-$), además de NO_2^- y NO_3^- .

Los efectos de estas especies se pueden englobar en 4 reacciones:

1. Peroxidación de los lípidos de las membranas. Los radicales libres en presencia de oxígeno pueden causar la peroxidación de lípidos dentro de las membranas plasmáticas y organelos.
2. Modificación oxidativa de las proteínas. Los radicales libres promueven la formación de enlaces cruzados mediada por sulfhidrilo en los polipéptidos.
3. Lesiones en el ácido desoxirribonucleico (ADN).

Hay, sin embargo, diversos sistemas enzimáticos y no enzimáticos que contribuyen a la terminación o inactivación de las reacciones de radicales libres, por ejemplo:

- Antioxidantes endógenos y exógenos que bloquean la formación de radicales libres o la inactivan. P. ej., vitamina E, cisteína, ceruloplasmina, albúmina, transferrina y células barrenderas.
- Enzimas. Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa.⁽⁴⁴⁾

3.3. Óxido nítrico (NO)

En 1980, Furchgott observó que la vasodilatación inducida por la acetilcolina requería que el endotelio estuviera intacto. Las células endoteliales producían un factor de acción breve –el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF)- que distendía o relajaba el músculo liso de la pared vascular. Luego se demostró que el endotelio vascular produce NO y que este gas presenta propiedades físicas y biológicas del EDRF.

El óxido nítrico es un radical libre soluble y gaseoso, que es secretado no sólo por las células endoteliales sino también por los macrófagos y neuronas cerebrales específicas. Se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular y NADPH, por acción de la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS). En las células endoteliales y en las neuronas, la NOS está presente de forma constitutiva, y puede ser activada rápidamente por el incremento en la concentración citoplásmica de iones de calcio en presencia de calmodulina. La NOS en los macrófagos no es constitutiva sino inducida en las situaciones en las que estas células son activadas por citocinas.

El NO realiza otras funciones importantes en la inflamación. Reduce la agregación y adhesión plaquetaria. El NO producido por macrófagos actúa como un radical libre y es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales. Puede oxidar grupos sulfhidrilo de las proteínas con el consiguiente agotamiento del glutatión citosólico, y puede reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de nitrógeno (fuertemente

oxidante) y un radical hidroxilo (intensamente reactivo). La producción de NO por parte de macrófagos activados en casos de shock séptico puede producir vasodilatación periférica extrema con shock; a su vez, el NO también ha sido implicado en diversas enfermedades inflamatorias.⁽⁴⁴⁾

Óxido nítrico y cirrosis biliar primaria

En la CBP la capacidad estimuladora de células dendríticas es baja y esto puede ser responsable de la disminución en la producción de citocinas. Se estima también que las células dendríticas expresan antígenos superficiales y producen citocinas como IL-10 e IL-12 y radicales libres como Óxido nítrico (NO). En la CBP se presentan niveles más altos de NO que en las otras cirrosis.

Así se dice que hay una relación directa entre la producción aumentada de NO por la células dendríticas y la interrupción de la tolerancia autogénica en la CBP, ya que la producción aumentada de NO ha sido implicada en patologías de muchos procesos autoinmunes.

Una relación entre la producción de NO y la disminución de tolerancia autogénica es posible, porque el NO está relacionado con daño a tejido sano por la inhibición de varias enzimas, además de sus efectos tóxicos sobre macrófagos y células malignas.⁽³⁶⁾

Además se ha descubierto la participación de la óxido nítrico sintetasa (NOS) en enfermedades autoinmunes, se supone una relación entre la actividad de la NOS y subpoblaciones de linfocitos T y la influencia del NO sobre la producción de citocinas. Se estima que el infiltrado de células T en el hígado tiene actividad inducible de la NOS, además de observarse un aumento de nitritos y nitratos en la CBP.⁽³⁸⁾

3.4. Ceruloplasmina

Los diversos anticuerpos desarrollados contra las muchas clases de antígenos, se encuentran en la fracción globulina γ de las proteínas del plasma. Las globulinas γ se subdividen en los grupos γ_1 y γ_2 .

La ultracentrifugación ha mostrado, la presencia de un componente principal con una constante de sedimentación de alrededor de 7 s y otro menos de alrededor de 19 s. El componente de 19 s está constituido por dos clases muy diferentes de proteínas, una de ellas emigra como globulina γ_1 y la otra como globulina α_2 .⁽⁴²⁾

Dentro de las globulinas α_2 encontramos a la ceruloplasmina.

	Cantidad estimada mg/100 mL	Movilidad electroforética	Peso molecular	Punto isoeléctrico, pH	Función principal
Ceruloplasmina	30	4.6	132 kDa	4.4	Transporte de cobre

Tabla3. Características de la ceruloplasmina.

La ceruloplasmina es una proteína plasmática, que participa en el metabolismo del cobre y el hierro en la célula. Esta globulina se sintetiza principalmente en hígado, se dice que es una proteína de fase aguda.

Las funciones fisiológicas de la ceruloplasmina incluyen:

- Transporte de cobre
- Coagulación
- Angiogénesis
- Ayuda en el estrés oxidativo por captación de radicales superóxidos y secuestro de iones libres de cobre.
- Oxidación de lipoproteínas de baja densidad.
- Homeostasis del hierro como ferroxidasa, catalizando la conversión de Fe^{2+} en Fe^{3+} .⁽³⁷⁾

Ceruloplasmina y cirrosis biliar primaria

Se ha encontrado que los niveles de ceruloplasmina sérica y la actividad y cantidad de cobre se incrementan en la CBP. El transporte de cobre en los conductos biliares es interrumpido por el colapso de los conductos biliares interlobulares y por tanto el cobre se acumula en el hígado, así es probable que la actividad de la ceruloplasmina sérica aumenta para metabolizar los acúmulos de cobre en el hígado.⁽³⁹⁾

Sin embargo, los niveles de ceruloplasmina en suero no son significativos para el diagnóstico de la CBP, pero sí en el grado de cicatrización del hígado.⁽³⁵⁾

Un estudio realizado sobre la relación de la CBP y la ceruloplasmina, nos muestra las concentraciones de está:

Paciente	Diagnóstico	Concentración ceruloplasmina (mg/100mL de suero)
A	CBP	59
B	CBP	58
C	CBP	44
D	Cirrosis biliar secundaria	46
E	Cirrosis idiopática	31
F	Cirrosis idiopática	50
G	Cirrosis idiopática	59
H	Voluntario normal	32±3

Tabla 4. Estudio sobre la relación de la CBP y la ceruloplasmina.

3.5. El hígado

El hígado es la glándula más grande del cuerpo. En los hombres saludables pesa de 1400 a 1800 g y en la mujer de 1200 a 1400g.⁽⁴⁰⁾

El hígado está situado debajo de la porción derecha del diafragma, en la parte inferior de la parte derecha de la jaula torácica. El hígado normal es firme y tiene una superficie es lisa.⁽⁴³⁾

3.5.1. Estructura de hígado

El hígado está rodeado por una delgada cápsula de tejido conectivo, la cápsula de Glisson, la cual continúa hacia el interior de la glándula.⁽⁴¹⁾

El parénquima hepático está dividido en unidades funcionales llamada lobulillos.⁽⁴³⁾ Los lobulillos están limitados por el tejido conectivo interlobulillar, los lobulillos están compuestos por cordones de hepatocitos que irradian hacia la periferia.⁽⁴¹⁾

Las células hepáticas están separadas de los sinusoides por un espacio estrecho (espacio de Disse) que contiene tejido conectivo y representa el compartimiento intersticial que limita el hígado. Células especializadas del sistema macrofágico (células de Kupffer) se distribuyen irregularmente en los sinusoides, entre las células endoteliales.⁽⁴³⁾

3.5.2. Vías biliares

Las vías biliares comienzan como capilares biliares intralobulares que se comunican con las vías biliares interlobulillares intrahepáticos.

Capilares biliares. Tienen localización intralobulillar, entre los hepatocitos, que se caracterizan por presentar un único capilar biliar central.

Conductos de Hering. Son conductos muy cortos que conducen la bilis desde los capilares biliares en la periferia del lobulillo, a través de la placa limitante de las ramificaciones interlobulillares terminales del sistema de vías biliares.

Conductillos terminales. Representan las últimas ramificaciones interlobulillares del sistema de vías biliares y transcurren a lo largo de los lados de los lobulillos hepáticos hexagonales. Los conductillos terminales reciben la bilis de los conductos de Hering y transcurren hacia el sitio de unión entre varios lobulillos.⁽⁴¹⁾

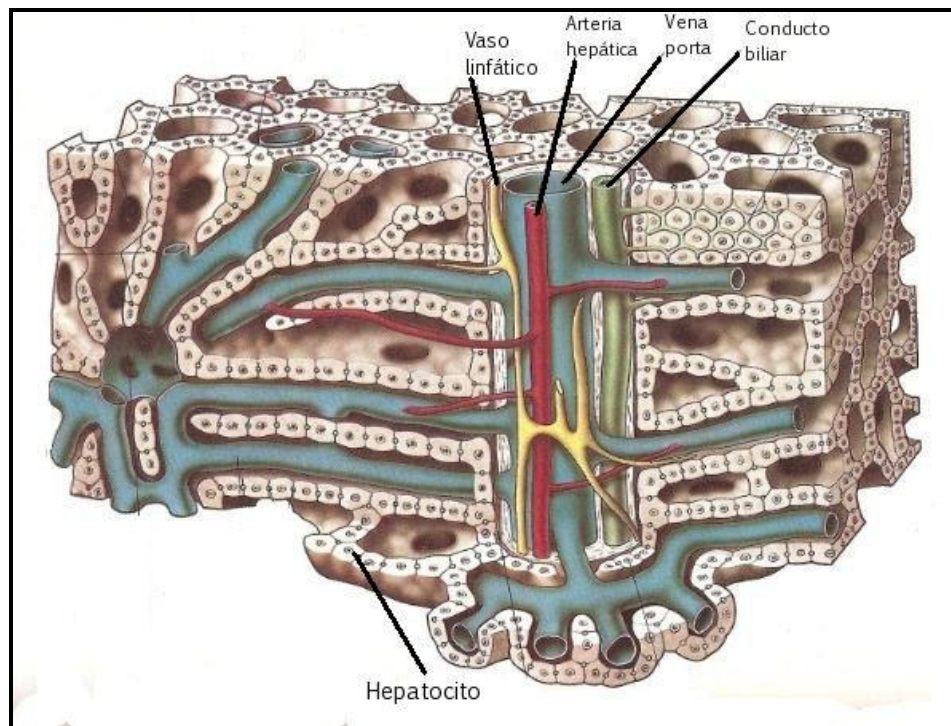


Figura 1. Diagrama de la estructura del hígado. (Fawcett W; Tratado de Histología. 11ª ed. Madrid: Editorial Interamericana·McGraw-Hill, 1987: 686)

3.5.3. Funciones del hígado

El hígado tiene una reserva enorme de capacidad funcional, tiene funciones sintéticas, excretorias y metabólicas.⁽⁴³⁾

- Funciones de depósito: acumula glucosa como glucógeno, almacena cantidades importantes de vitaminas A y B₁₂, ácido fólico y hierro.
- Sitio de síntesis de varias proteínas plasmáticas: albúmina, varias globulinas, protrombina y fibrinógeno.
- Metabolismo y transporte de lípidos: la síntesis de algunas lipoproteínas plasmáticas tiene lugar en los hepatocitos.
- Metaboliza numerosos compuestos liposolubles. Entre ellos numerosos medicamentos y varios pesticidas.
- Metabolismo de las hormonas esteroideas: las hormonas sexuales.
- Función exocrina: producción de bilis, que se secreta en forma continua a los capilares biliares en niveles de unos 500 µL por día. La bilis es al mismo tiempo una secreción digestiva y un medio de excreción.⁽⁴¹⁾

3.6. Síndrome de Sjögren

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 3 mujeres del total de este grupo sufrían de artritis crónica acompañada de sequedad de ojos y boca.⁽¹⁾

3.6.1. Características

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.^(3,4)

Se caracteriza por sequedad de los ojos y de la boca secundaria a la destrucción de las glándulas salivales y lagrimales, por un mecanismo inmunitario. Puede ocurrir como trastorno aislado (forma primaria o síndrome seco), o más frecuentemente, en asociación con otras enfermedades autoinmunitarias (forma secundaria), como artritis reumatoide, esclerodermia, vasculitis, enfermedad mixta del tejido conjuntivo y tiroiditis.

3.6.2. Morfología

El primer hallazgo histológico, tanto en las glándulas salivales mayores como en las menores, es la infiltración linfocitaria periductal y

perivascular. Las células epiteliales que revisten los conductos sufren una hiperplasia que acaba por obstruirlos.

La ausencia de lágrimas produce sequedad del epitelio corneal que se inflama, se erosiona y se ulcera; la mucosa oral puede atrofiarse y la inflamación provoca figuración y ulceración; la sequedad y las costras que se forman en la nariz pueden también provocar ulceraciones e incluso perforación del tabique nasal.

En el 25% de los casos se produce alteraciones de tejidos extraglandulares como riñones, los pulmones, la piel, el SNC y los músculos.⁽³⁾

3.6.3. Epidemiología

El SS afecta en mayor proporción a mujeres en edad madura o menopáusica.

Esta patología compromete a todas las razas, el 90% de los casos se observa en mujeres menopáusicas y el 10% corresponde a hombres o a jóvenes de uno u otro sexo.^(5, 6)

3.6.4. Manifestaciones clínicas.

La enfermedad sistémica en el SS puede atravesar por etapas con síntomas generales como astenia, adinamia o febrículas-fiebre persistente o con las manifestaciones específicas producidas al comprometer diferentes órganos.⁽²⁾

Sistema Comprometido	Manifestaciones
Músculo esquelético	Artralgias Mialgias Artritis Miositis Fibromialgia
Respiratorio	Sequedad nasal Xerotráquea Enfermedad pulmonar intersticial Enfermedad obstructiva Pseudolinfoma Linfoma
Renal	Nefritis intersticial Glomerulonefritis
Gastrointestinal	Disfunción esofágica Gastritis crónica atrófica Linfoma gástrico

	Síndrome de mala absorción Disfunción pancreática
Hepatobiliar	Cambios histológicos compatibles con cirrosis biliar primaria Hepatitis autoinmune
Vascular	Vasculitis leucocitaria Vasculitis visceral
Neurológico	Neuropatía periférica Vasculitis sistema nervioso central Mielitis-esclerosis múltiple
Hematológico	Anemia Leucopenia Gamapatía monoclonal Crioglobulinemia
Linforeticular	Linfadenopatía Esplenomegalia Pseudolinfoma Linfoma

Tabla 5. Manifestaciones sistémicas en el síndrome de Sjögren primario.

3.6.5. Mecanismo de respuesta inmune

Se han propuesto tres líneas principales implicados en los mecanismos de respuesta inmune alterada para estos pacientes: anomalías en la regulación linfocitaria periférica y en la selección de repertorio de células T, alteración en la proliferación de células B y finalmente, la expresión de autoantígenos. Parece ser relevante la existencia de errores en la selección tímica de clonas de células T potencialmente autorreactivas; existe evidencia de que estas células T autorreactivas pueden progresar hacia la anergia o apoptosis al reconocer en ciertas circunstancias a los antígenos propios en la superficie celular.

En los lugares de infiltración glandular y tisular, en general se produce acumulación de linfocitos, la mayoría son linfocitos T CD4+ ^(7, 8, 9) entre 40 y 50% y en menor cantidad linfocitos T CD8+ ^(11, 12) en un 10-20%.

Los anticuerpos⁽³⁾ característicos del SS son los denominados anti-Ro y anti-La (denominados también anti-SSA y anti-SSb respectivamente), estos autoanticuerpos están fuertemente asociados a las formas severas de SS y con manifestaciones clínicas más precoces. Los anticuerpos antinucleares (ANA) van dirigidos contra constituyentes nucleares, de ordinario a la nucleoproteína; están presentes en una proporción de 50-90% y los anticuerpos La (SSB) aparecen en un 50% estos últimos están presentes con mayor frecuencia en el SS primario, siendo menos frecuentes en la

forma secundaria. Los anticuerpos anti-La (SSB) son los más específicos, ya que son raros en otras enfermedades autoinmunes, exceptuando el lupus eritematoso sistémico (LES), en el que pueden aparecer en el 10% de los casos. Los anticuerpos anti Ro (SSA) son más frecuentes en el SS, pero pueden aparecer también en el LES (en un 40%) o en el lupus cutáneo sub-agudo. Los ANA se han mencionado fundamentalmente en el Síndrome de Sjögren secundario (SSs), con la presencia de artritis reumatoide (AR). También es frecuente la aparición de anticuerpos organoespecíficos, como los antitiroideos, anti-célula parietal gástrica, antimitocondriales, anti-músculo liso o anti-glándula salival. Como consecuencia de la hiperactividad de los linfocitos B, es frecuente encontrar hipergammaglobulinemia policlonal (50-80%), elevación de los niveles de IgM, inmunocomplejos circulantes, crioglobulinemia y gammapatía monoclonal.

3.7. Cirrosis Biliar Primaria

3.7.1. Definición de cirrosis

Cirrosis del griego Κίρροζ, que significa amarillo; Laënnec la usó para referirse al hígado grande en enfermos con ascitis, ictericia y varices esofágicas.

Una definición más moderna es la de: fibrosis progresiva del hígado con distorsión del patrón vascular hepático, debido a la neoformación de nódulos, entre ramas de la vena porta y la vena hepática, sobreañadido a una inflamación crónica con destrucción del parénquima hepático.⁽²⁸⁾

3.7.2. Historia

Addison y Gull la describieron primero en 1851 pero poniendo más énfasis en la lesiones de la piel que en el hígado y que corresponde a Hasol hace más de 100 años, el mérito de haber señalado una variedad de cirrosis hipertróficas.⁽²⁶⁾

3.7.3. Definición

La Cirrosis biliar primaria (CBP) es una enfermedad hepática autoinmune, que se distingue por la destrucción granulomatosa progresiva de los conductos biliares intrahepáticos microscópicos. Se caracteriza por prurito persistente, ictericia discreta, hepatoesplenomegalia y a veces xantomas.^(26, 27, 29)

3.7.4. Etiología

Si bien no se conoce con precisión el mecanismo o agente que precipita el desarrollo de autoinmunidad, se han postulado varias teorías que atribuyen a los agentes genéticos, ambientales e infecciosos el desarrollo de la misma.⁽²⁹⁾

Conocer las teorías etiopatogenias nos ayudará a la comprensión de la enfermedad.

- a) Etiología viral y antígeno australiano: Hace 30 años, se presentaron 6 casos de hepatitis viral que luego aparentemente evolucionaron hacia cirrosis biliares primarias. Con la aparición de un antígeno australiano se pensó que se iba a comprobar su positividad en gran número de casos de CBP, pero posteriormente usando diferentes métodos, otras publicaciones no lo confirmaron más que en un pequeño porcentaje. Hoy se piensa que la hepatitis B no desempeña un papel etiológico en la CBP:
- b) Drogas: Hay dos medicamentos que se han relacionado patogénicamente con la CBP: la clorpromacina y la metiltestosterona y si bien pueden producir colestasis, hoy se cree que no son la causa de la CBP, pues es de simple observación que la mayoría de los pacientes que la padecen no han recibido estas medicinas.
- c) Cobre: Una característica habitual de la cirrosis biliar primaria es la de presentar concentraciones altas de cobre en el hígado y corteza renal, esto hace pensar en un desorden generalizado del metabolismo de este metal.⁽²⁶⁾

3.7.5. Autoinmunidad

Los mecanismos inmunorreguladores normalmente inhiben procesos potencialmente autodestructivos y protegen al organismo de enfermedades autoinmunes, estos mecanismos son defectuosos en la CBP porque se presenta una disminución en la capacidad funcional de los linfocitos; por ejemplo proliferación disminuida de células T CD4 ρ , disminución en la producción de citocinas como: linfoxina, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interferón γ (IFN-G) por linfocitos T, así como sensibilidad defectuosa de IL-2 de células T, a pesar de no existir un aumento de linfocitos reguladores.⁽³⁶⁾

La autoinmunidad sugiere la presencia de anticuerpos antimitocondriales (AMA) muy específicos, la participación de células en la destrucción de los

conductos biliares y la presencia de numerosos defectos de la regulación inmune. El AMA se encuentra presente en el 84- 96 % de los casos y permanece más o menos constante en toda la evolución.^(26, 27)

AMA es un autoanticuerpo dirigido contra el componente E2 (Tabla 6) del complejo piruvato deshidrogenasa (PCD-E2), la unidad E2 del complejo 2-oxo deshidrogenasa ácida de cadena ramificada (BCOADC-E2) y la subunidad E2 del complejo 2-oxo-glutarato deshidrogenasa (OGDC-E2), así como la subunidad E1 del PDC y la proteína X. Todas estas enzimas se localizan en las membranas mitocondriales internas.^(27, 30)

Antígeno	Peso Molecular (kDa) ^a	Frecuencia (%) en pacientes con CBP ^b
PDC-E2	70	>95
BCOADC-E2	52	53-55
OGSC-E2	48	39-88
PDC-E1 α	41	41-66
E3BP (proteína X)	55	<95

Tabla 6. Antígeno mitocondrial 2-oxo deshidrogenasa ácida en CBP.

^aDeterminado por inmunotransferencia con una preparación mitocondrial de corazón de ternera.

^bDeterminado por diferentes estudios.

Los AMA presentes pertenecen a subclases IgG1 e IgG3, sin embargo se presenta un aumento de la IgM en la CBP, tal vez esto se debe a un defecto en el proceso de síntesis de IgM a la síntesis de IgG después de la exposición a un antígeno desconocido o a una actividad deficiente de las células T supresoras.

También se detectan otros anticuerpos como: anticuerpo contra la proteína de poro nuclear gp210, una glucoproteína transmembrana en un 25% de los pacientes positivos para AMA.

El sistema del complemento se encuentra activado en forma crónica en los pacientes con CBP, algunos tienen complejos inmunes circulantes, resultado de una producción aumentada, estos pueden contener antígenos que presentan una identidad parcial o reaccionan en forma cruzada con antígenos epiteliales de los conductos biliares o las mitocondrias.⁽²⁷⁾

3.7.6. Anatomía patológica

Macroscópica

Se presenta hígado agrandado, al principio puede ser liso y algo más firme, al avanzar la fibrosis se vuelve irregular y las nodulaciones pueden ser más

o menos grandes, pero generalmente menores a 0.5 cm de diámetro. Posteriormente el hígado puede tornarse pardo o menos verde, con borde redondeado y cortante y casi siempre duro.

Histología

La biopsia hepática se considera necesaria para establecer el diagnóstico definitivo y descartar otras posibles enfermedades del hígado.

Se describen 4 estadios o etapas: 1) Lesión florida del conducto biliar (colangitis destructiva no supurativa). 2) Proliferación de los conductillos. 3) Etapa cicatrizal y progresión de la fibrosis. 4) Cirrosis biliar verdadera con nódulos de regeneración.^(26, 27)

Etapa 1: Lesión inicial florida del conducto biliar. Se caracteriza por daño focal en los conductos biliares septales e interlobulares, la parénquima presenta células de Kupffer aumentadas de tamaño y más numerosas (B). La disposición plana y cuboide del epitelio se pierde, los espacios porta se agrandan debido al acúmulo de células inflamatorias especialmente linfocitos, macrófagos y plasmocitos con pocos eosinófilos. En muchos casos el elemento diagnóstico de mayor importancia es la ductopenia, definida como la ausencia de conductos biliares interlobulares en más del 50% de los tractos portales.^(26, 27)

Etapa 2: Proliferación de conductillos. A medida que se destruyen los conductos, proliferan los conductillos, Atraviesan las placas limitantes y están rodeados por un conjunto de células inflamatorias y fibroblastos. Esta lesión se llama pericolangitis.

Etapa 3: Cicatrización. A medida que progresa la lesión inflamatoria crónica, aparece fibrosis que lleva a la colestacia periportal, por obstrucción de las vías biliares, se observan cicatrices estrelladas sin que contengan células epiteliales.

Etapa 4: Cirrosis verdadera. A partir de los espacios porta cicatrizales, salen bandas radiadas y si el paciente vive lo suficiente, el parénquima lobular queda disecado y se forman nódulos regenerativos.⁽²⁶⁾

Velocidad de progresión	Estadio histológico inicial		
	1	2	3
1 año	41%	43%	35%
2 años	62%	62%	50%

Tabla 7. Cronología de la progresión histológica en pacientes precirróticos con cirrosis biliar primaria.

3.7.7. Cuadro clínico

Se trata de una enfermedad principalmente de la mujeres de mediana edad, con incidencia entre los 40 y 50 años (Tabla 2), la CBP se ha descrito en todos los grupos étnicos Su inicio es insidioso, se manifiesta a menudo con prurito, ictericia sólo en etapas tardías, hepatomegalia típica y surgen xantomas y xantelasmas.

Cirrosis Biliar Primaria	
Etiología	Posiblemente autoinmunitaria: asociada con otros procesos autoinmunitarios.
Predilección Sexual	Mujer a hombre, 6:1.
Síntomas y signos	Inicio insidioso: Prurito, ictericia, malestar, orina oscura, heces claras, hepatoesplenomegalia.
Hallazgos de laboratorio	Hiperbilirrubinemia conjugada: aumento de la fosfatasa alcalina sérica y ácidos biliares. Aumento de la IgM sérica, presencia de autoanticuerpos (AMA), hipercolesterolemia.
Hallazgos anatomopatológicos específicos de los conductos biliares	Infiltrado linfocitario denso alrededor y en las paredes de los conductos biliares interlobulares con formación de granulomas y destrucción de conductos biliares.

Tabla 8. Rasgos distintivos de la Cirrosis Biliar Primaria.

3.7.8. Síntomas y signos

La CBP puede presentarse de dos formas, una asintomática y otra sintomática. Por lo regular forma asintomática se establece por un aumento de fosfatasa alcalina y AMA durante la evaluación de rutina de pacientes asintomáticas.

Desde el punto de vista clínico el síntoma más precoz, es el prurito, aunque el malestar general puede ser suficiente para que el enfermo vaya al médico. Otros síntomas posibles son dolor en el hipocondrio derecho, anorexia, ictericia y hepatoesplenomegalia (Tabla 6).^(27, 28)

- Prurito: Es uno de los síntomas más precoces, suele ser más intermitente durante el día y se torna más molesto en las tardes y noches.
- Ictericia: La ictericia es primero leve y luego franca con tinte “verdínico” más o menos oscuro. La ictericia no se presenta al inicio de la enfermedad y por lo denota un pronóstico desfavorable.
- Hepatoesplenomegalia: la hepatomegalia es moderada en esta afección, de 2 a 4 cm debajo del reborde y es uno de los signos característicos de la afección. La esplenomegalia está presente en el 50% a 70% de los casos.^(26, 27)

3.7.9. Otros síntomas

Se observa también una disminución de peso a medida del progreso de la enfermedad y puede bajar entre 10 y 20 o más kilos.

En algunos individuos se identifican depósitos cutáneos de lípidos en zonas de presión (xantomas) o alrededor de los ojos (xantelasma). Cuando la enfermedad dura varios años se desarrollan varices esofágicas, arañas vasculares y alteraciones ungüales.

También se presenta una linfadenopatía generalizada, frecuentemente en axilas e ingles.

Debido a la disminución de sales biliares a nivel intestinal, ciertos sujetos sufren estatorrea y osteoporosis de consideración que se manifiesta por dolor óseo, en particular a nivel lumbar y algunas fracturas espontáneas.

En los dos últimos años de la vida aparecen hemorragias por ruptura de las varices esofágicas, ascitis y coma hepático.^(26, 27, 28, 29)

Hallazgo	Frecuencia (%)
Fatiga	70
Prurito	55
Ictericia	10
Hiperpigmentación	25
Hepatomegalia	25
Esplenomegalia	15
Xantelasma	10
Ninguno	25

Tabla 9. Signos y síntomas de cirrosis biliar primaria en el momento de la presentación

3.7.10. Diagnóstico

El diagnóstico se establece por resultados de estudios bioquímicos compatibles con colestasis, la detección de AMA en el suero y características histopatológicas.⁽²⁶⁾

3.7.11. Alteraciones bioquímicas

El conjunto de pruebas hepáticas es característico de una ictericia obstructiva. Los valores muestran una acentuada elevación de los índices de obstrucción biliar (bilirrubina total y directa, lípidos totales, fosfolípidos, colesterol total, libre y esterificado, fosfatasa alcalina).

Bilirrubinas. La bilirrubina total puede ser normal al principio de la enfermedad, pero generalmente su valores están entre 2 y 25mg%, aumentando en el progreso de la enfermedad. En la enfermedad avanzada, un cuadro con bilirrubinemia elevada, hipoalbuminemia y prolongación del tiempo de protrombina sugieren mal pronóstico.^(26, 27)

Ácidos biliares. Hay elevación de los ácidos cólico (trihidroxi) y desoxicólico (dihidroxi). La concentración de ácidos biliares en la piel se correlaciona con el prurito secundario a la enfermedad.

Fosfatasa alcalina. Casi todos los pacientes presentan elevación de la fosfatasa alcalina (FA) en un promedio de dos o tres veces más sobre su valor normal, éste es el signo clínico más temprano en la enfermedad. La obstrucción produce un gran aumento de actividad de la fosfatasa alcalina en el hígado, y es esta nueva enzima sintetizada la que se va a sangre.

Lípidos séricos. El colesterol total se eleva de 3 a 4 veces más, el colesterol libre es el que explica este aumento más que el esterificado, los fosfolípidos también se encuentran aumentados. El aumento de los lípidos está vinculado con los xantomas y xantelasmas.

Aminotransferasas: La aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) están ligeramente elevadas, unas tres veces el valor de lo normal.^(26, 27)

3.7.12. Diagnóstico serológico

La presencia de AMA en el suero se comprueba en alrededor del 90 a 95 % de todos los casos. Se evidencian títulos altos de anticuerpo antimitocondriales, de 1:40 o mayores, sobre todo el anti-M2, éste es dirigido contra el complejo piruvato deshidrogenada de la membrana mitocondrial interna, tiene sensibilidad del 98% y especificidad del 96%. Otros autoanticuerpos presentes son factor reumatoide (70%), anticuerpo antimúsculo liso (66%) y anticuerpo antinúcleo (35%).^(26, 29)

3.7.13. Características histopatológicas

La biopsia hepática es muy útil, para confirmar el diagnóstico de CBP o excluirlo. El cuadro histológico se caracteriza por la destrucción y proliferación de conductos biliares interlobulares, a nivel histológico se ha dividido en cuatro estadios⁽²⁹⁾, los cuales han sido descrito ya anteriormente.

Síntomas clínicos.
Aparece ictericia en algunos casos. Hipertensión portal y ascitis o varices esofágicas pueden aparecer. Osteoporosis según la insuficiencia de vitamina D o calcio puede ocurrir.
Datos de laboratorio.
Presencia de AMA. Elevación sérica de enzimas ALP, g-GTP. Elevación sérica de ácidos biliares. Elevación de colesterol total. Elevación sérica de IgM.
Parámetros histológicos.
CNSDC de tamaño medio en conductos biliares interlobulares y septales; desaparición de conductos biliares y granuloma.
Complicaciones.
Xantomas en piel (especialmente cuando la hipercolesterolemia es continua). Incluida en enfermedades autoinmunes, esclerodermia, Síndrome de Sjögren, artritis reumatoide y tiroiditis crónica.
Diagnóstico.
Se determina que el paciente tiene CBP cuando uno de los siguientes rasgos es reconocido: <ol style="list-style-type: none"> 1. CNDS es reconocido en hígado y los datos de laboratorio son compatibles con CBP. En algunos casos. AMA son negativos pero ANA son positivos. 2. Anticuerpos AMA o anti-PDH son positivos, y la histología del hígado es compatible con PBC aun cuando CNDC no es reconocida. 3. Anticuerpos AMA o anti-PDH son positivos, y los datos de laboratorio o el historiales compatible con CBP aun cuando la histología del hígado no sea revisada.

Tabla 10. Características clínicas de la CBP^a.

^aALP, fosfatasa alcalina; g-GTP, γ -glutamil tranferasa; CNDC, Colangitis destructiva no supurativa; ANA, anticuerpos antinucleares; anti-PDH, anti-piruvato deshidrogenasa.

3.7.14. Tratamiento

Los medicamentos usados pueden ser clasificados según su mecanismo de acción y estos pueden ser: agentes inmunosupresores, antiinflamatorios, cupriuréticos o antifibróticos.

Glucocorticoides: algunos estudios mencionan mejoría de los parámetros clínicos y bioquímicos, así como la reducción de la magnitud del proceso inflamatorio, en la actualidad estos medicamentos no son recomendables pues se puede agravar la enfermedad osteopénica.

D- Penicilamina: el aumento de cobre en la CBP condujo a un posible efecto benéfico de la D-Penicilina, se reporto mejoría moderada en algunos pacientes pero muchos efectos adversos a su uso, así que este fármaco no es utilizable.

Ácido Ursodesoxicólico: El AUDC (7- β epímero del ácido quenodesoxicólico) se encuentra naturalmente presente en escasa cantidad en la bilis, hay varias teorías sobre su mecanismo de acción, por ejemplo: la inhibición de la absorción intestinal de sales biliares endógenas tóxicas, la estabilización de las membranas de los hepatocitos contra sales biliares tóxicas y la reducción de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad mayor clase I y II sobre el epitelio biliar.⁽²⁷⁾

3.8. Técnicas inmunológicas de laboratorio

3.8.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

El inmunoensayo enzimático conocido como ELISA, fue descrito en 1971 por S. Avrameas y B. Guilbert en Francia, E. Engvall y P. Perlmann en Suecia, y por B. Van Weemen y H. Schuurs en Holanda, estos fueron utilizados para la cuantificación de antígeno y posteriormente para la titulación de anticuerpos. Se basa en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y en la sensibilidad del sistema indicador.⁽¹²⁾

En este método se utilizan anticuerpos conjugados a una enzima. El anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras la enzima es capaz de una reacción oxido-reducción, en la cual el sustrato y un sistema indicador da un producto colorido. En este sistema el antígeno o el anticuerpo se absorben a una fase sólida insoluble (microplacas de poliestireno, o bien membranas de nitrocelulosa).

Hay diversas variantes del ELISA, como métodos directos, indirectos, sandwich y competitivo. Estos permiten la determinación de antígeno en

fluidos biológicos, a excepción del método indirecto con el que se detectan anticuerpos.

Los métodos indirectos se usan para medir la concentración de anticuerpos en muestras de fluidos biológicos; el antígeno inmovilizado reacciona con el anticuerpo de la muestra y posteriormente reacciona con un segundo anticuerpo unido a la enzima. En tanto en el método directo, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es que lleva unida la enzima.

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

En la técnica de ELISA la concentración de los productos del sustrato son inversamente proporcionales a la concentración del estándar o del antígeno de la muestra. Se aplica a una gran variedad de sustancias como IgG, gonadotropina coriónica y ATP.⁽¹³⁾

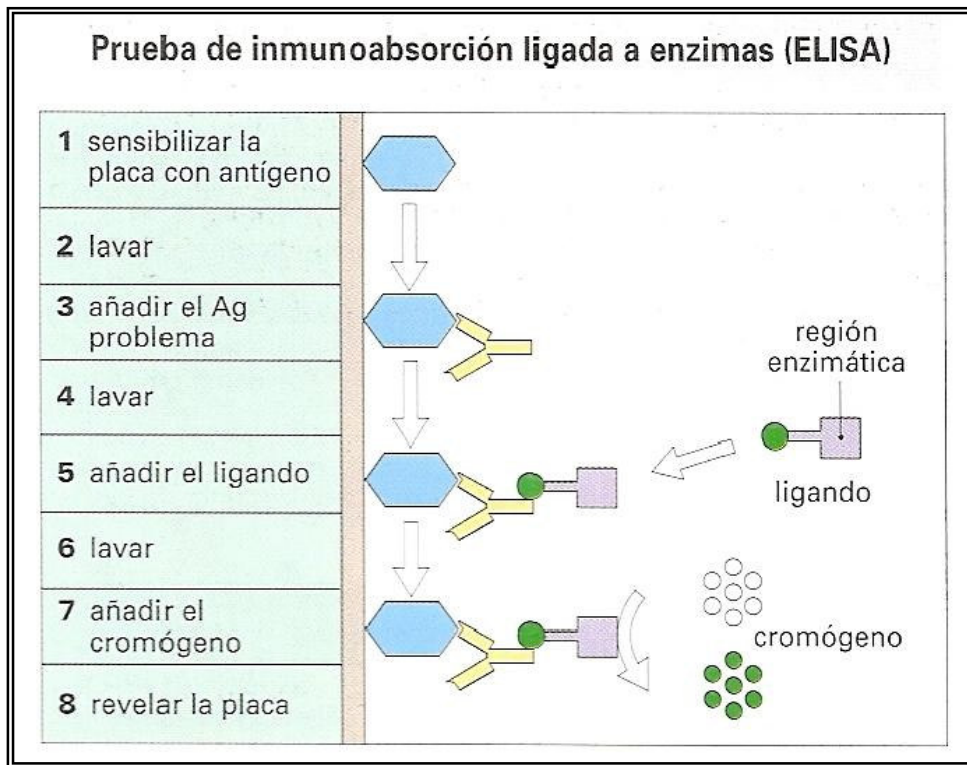


Figura 2. ELISA indirecto. (Roitt Ivan; Inmunología. 5ª ed. Madrid: Editorial Harcourt, 2000: 386)

Elementos usados en la técnica de ELISA.

Fase sólida.

Son usadas placas de poliestireno o nylon, las cuales se pueden irradiar con luz UV (por una hora) con ello se aumenta su adhesividad, tubos de polivinilo, policarbonato, partículas de agarosa y poliacrilamida.

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

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

Etapas de lavado. Esta se realiza con una solución amortiguadora de fosfatos salinos-tween 20 (PBS-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 PM elevado, que pueden pegarse de manera inespecífica a la fase sólida. Este problema puede reducirse si la muestra se diluye en PBS conteniendo agente detergente.

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

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

- Preparación de inmunoglobulina: tipo de inmunoglobulina, especie de animal usado en la inmunización (conejo, oveja u otro).
- Tipo de enzima: ésta debe ser económica, de alto grado de pureza, elevada actividad específica, estable al almacenamiento, soluble y no dar reacción cruzada. Las enzimas más usadas en el ELISA son las peroxidasas de rábano (PR), la fosfatasa alcalina (FA) y la β -D-galactosidasa (BG), debido a su estabilidad y reproducibilidad de resultados.
- Método de acoplamiento o conjugación: estos métodos se basan en la reacción entre los grupos amino presentes en el anticuerpo y los grupos carbohidratos de la enzima con ayuda de un reactivo bifuncional, como glutaraldehído, ó benzoquinona.^(13, 14)

Sustrato

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

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

Los sustratos empleados para la BG son el orto-para-nitrofenil-beta-D-galactósido y el 4-metil-umbeliferil-beta-D-galactósido.^(15, 16)

La técnica de ELISA tiene aplicaciones muy variadas, lo cual lo hace muy versátil para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, virales o parasitarias, cuantificación de hormonas, haptenos, determinación de anticuerpos isotipo-específicos, titulación de anticuerpos etc.^(17, 18)

Por lo tanto esta prueba es sumamente útil en el diagnóstico de anticuerpos antimitocondriales (AMA) dentro del diagnóstico de cirrosis biliar primaria (CBP).

3.8.2. Electroforesis

El término electroforesis se puede definir como una técnica en la cual una partícula cargada se hace desplazar a través de un medio aplicando un campo eléctrico. Las velocidades de migración son función de la densidad de carga por lo que se podrán separar unas partículas de otras con arreglo a esta propiedad, a su vez, la densidad de carga de la partícula será función de una serie de parámetros que marcan las condiciones experimentales de la electroforesis: pH, fuerza iónica, gradientes de voltaje, interacciones con el soporte, etc.⁽¹⁹⁾

Muestra. Actualmente se llevan a cabo análisis mediante electroforesis sobre diferentes líquidos biológicos, la muestra a emplear y el tratamiento previo al que puede ser sometida depende de los compuestos que se pretenden analizar electroforéticamente.

Soporte. Los procedimientos electroforéticos se llevan a cabo sobre soportes, la llamada “electroforesis de zona”. El proceso lleva a la

obtención de un “mapa” en el cual se pueden visualizar las distintas fracciones separadas.

Los principales soportes utilizados son de dos tipos:

- No restrictivos: las partículas colocadas sobre ellos se separan únicamente en función de sus cargas eléctricas, y pueden moverse libremente en los mismos.
 1. Papel: primer soporte empleado en electroforesis de zona (1950), en la actualidad se sustituyó por el acetato de celulosa.
 2. Acetato de celulosa: se consigue por reacción entre los grupos hidróxido de la celulosa y el anhídrido acético. Las tiras de acetato de celulosa están formadas por fibras de este compuesto, que engloban el aire entre ellas. Cuando se va a usar, la tira se sumerge en el amortiguador, y estos espacios de aire son sustituidos por amortiguador, que será el encargado de transportar la corriente a través de ella. Se emplea comúnmente el “cellogel”, o acetato de celulosa gelatinizado, que tiene como ventaja su fácil manejo, buena reproducibilidad, fácil lectura, y rapidez de ejecución.
 3. Agarosa: la agarosa es uno de los componentes del agar (compuesto de agarosa y agarpectina). El componente de agarpectina contiene restos de sulfato y carboxilo que aportan cargas eléctricas no deseables en el soporte, las cuales crean problemas de endósmosis y captan el colorante de fondo no deseable. El componente de azarosa, sin embargo, carece de estos grupos cargados y no representa los problemas de la agarpectina.

Se emplea por ello como soporte el gel de azarosa, los más purificada posible. Se utiliza a una concentración de 0.5 a 1 gramos por 100mL de amortiguador.

El tamaño de su poro es mayor que el de otros geles, y permite el paso a través de ellos de sustancias de peso molecular relativamente alto, por lo cual las partículas migran tan sólo en función de su carga eléctrica.

Su aspecto es claro y transparente, por lo que se presta muy bien a la cuantificación por fotodensitometría.
- Restrictivos: el soporte ejerce algún tipo de resistencia al desplazamiento de las proteínas de la muestra, la intensidad de esta resistencia estará determinada por el tamaño de poro del gel, y por el tamaño y características de las macromoléculas que deben desplazarse sobre el mismo.

1. Geles de poliacrilamida: es el soporte ideal si se quiere conseguir más y mejores separaciones electroforéticas. Los geles se forman por polimerización de la acrilamida con un agente enlazante. El tamaño del poro del gel dependerá de la concentración de cada componente de manera que se pueden conseguir geles con un tamaño de poro variable; así las moléculas pueden ser separadas de acuerdo con las diferencias de sus cargas o, además de ello, según la diferencias de sus tamaños. Sus ventajas son: hidrófilos e insolubles en agua, químicamente inertes. Porosidad variable en función de los constituyentes. Transparencia de los geles, con densitometría. Posibilidad de utilizar gradientes, consiguiendo mejores resoluciones aún y bandas más estrechas. Capacidad de filtración molecular. Posibilidad de introducir en el gel otros compuestos químicos para electroforesis especiales (dodecil sulfato sódico, urea).⁽¹⁹⁾

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida se forma por la polimerización del monómero acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y el cromonómero de entrecruzamiento N,N'-metilén-bis-acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}=\text{CH}_2$). Variando las concentraciones del monómero y del monómero de entrecruzamiento, se consiguen geles de poliacrilamida con un nivel amplio de tamaño de poro, que puede ajustarse para optimizar la separación de los componentes de la muestra. La reacción de polimerización se inicia con un catalizador redox. El sistema de catálisis más utilizado es el TEMED (N, N', N''-tetrametilén-etilén-diamida) y persulfato amónico. Otro sistema muy habitual es la descomposición de la riboflavina por la luz.⁽²⁰⁾

Permite la separación con arreglo a la carga neta de la partícula y al tamaño de ésta. Cuando transcurre el proceso electroforético, las partículas migran en función de su carga eléctrica, pero son frenadas en su migración según su tamaño si está es mayor que el tamaño del poro en el que se realiza el proceso.

Como resultado de estos fenómenos, se consiguen separaciones más completas, y mayor cantidad de bandas en el espectro electroforético.

Tinción y lectura.

Hay que tener en cuenta que los distintos colorantes tienen afinidad distinta sobre diferentes grupos químicos o moléculas. Está se debe conocer, con el fin de emplear adecuadamente cada colorante para teñir las moléculas.

Los procesos de coloración, fijación, transparentación, etc. Deben ser respetados minuciosamente, pues son reacciones químicas que requieren tiempo y condiciones de ejecución diferentes.

Se deben tener en cuenta así mismo, la estabilidad y conservación de estos reactivos, para lograr procesos reproducibles. ^(19, 21)

3.83. Inmunoelctrotransferencia

La técnica de inmoelectrotransferencia (IET) o Western Blott, fue descrita por Towbin et al. En 1979, es uno de los métodos más útiles con que se cuenta en la actualidad para el análisis antigénico. ⁽²¹⁾

Este método combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia o ausencia de detergentes como duodecil sulfato de sodio (SDS), con la reacción antígeno-anticuerpo en fase sólida. ^(22, 23)

Esencialmente, Wester-blott involucra la separación de polipéptidos en geles por una variedad de medios, seguido por la transferencia electroforética de los polipéptidos separados por una matriz inmovilizante o membrana, la más comúnmente usada es la membrana de nitrocelulosa. En este paso, una “réplica” de la separación de polipéptidos previa, a partir del paso de electroforesis en gel es creado en la membrana, que puede ser probado con antisuero y otros ligandos, tales como oligonuclótidos o lectinas para identificar polipéptidos específicos. ^(24, 25)

Existen muchas ventajas en transferir los polipéptidos a una membrana:

- La membrana es más fácilmente manejable que el gel original (especialmente las membranas a base nylon).
- Los polipéptidos inmovilizados sobre la membrana son más accesibles a probar con varios reactivos (por ej. Anticuerpos).
- Las membranas con estos polipéptidos inmovilizados pueden ser almacenados por algún tiempo previo a su uso, y en algunos casos, puede ser posible rehusar la misma membrana varias veces con diferentes reactivos. ⁽²²⁾

El método de IET tiene un gran número de aplicaciones en diversos campos de la inmunología y áreas afines, por su alto poder analítico permite identificar que antígenos pueden ser útiles para el diagnóstico. ⁽²⁵⁾

La IET junto con la técnica de ELISA nos permitirá realizar un diagnóstico más eficiente, completo y seguro acerca de la presencia de anticuerpos antimitocondriales en el suero de la población de estudio.

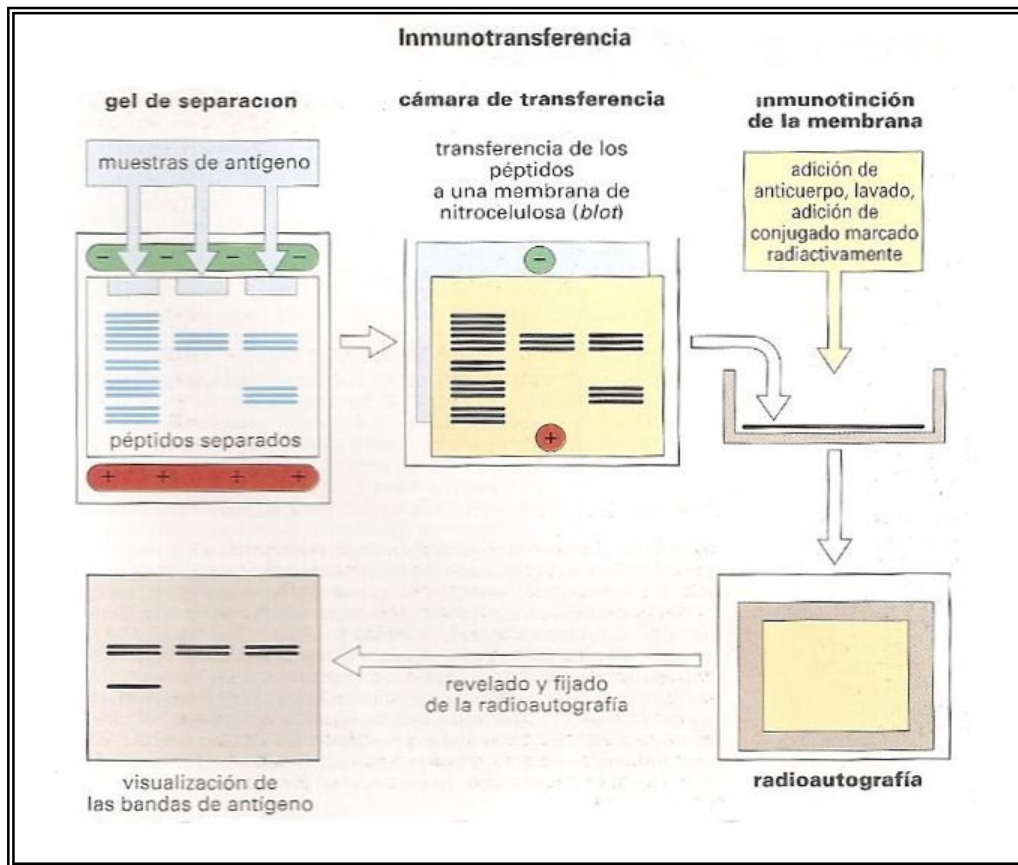


Figura 3. Inmunoelectrotransferencia. (Roitt Ivan; Inmunología. 5ª ed. Madrid: Editorial Harcourt, 2000: 387)

3.8.4. Inmunodifusión radial

Uno de los primeros descubrimientos acerca de las reacciones antígeno-anticuerpo fue su capacidad para dar lugar a precipitados cuando se combina en proporciones iguales o próximas al punto de equivalencia

Las técnicas en gel sólo permiten analizar los antígenos y los anticuerpos de forma cualitativa, pero mediante una modificación posterior se desarrolló la técnica de inmunodifusión radial que permite cuantificarlos.(6)

Cuando un antígeno difunde desde un orificio al agar que contiene el antisuero apropiado diluido, en un comienzo está presente en una concentración relativamente alta y forma complejos solubles, a medida que el antígeno difunde más, la concentración disminuye de modo continuo hasta que se alcanza el punto en el cual los reactantes están más cerca de

las proporciones óptimas y se forma un anillo de precipitado. Cuanto más alto es la concentración de antígeno, mayor es el diámetro del anillo.(7)

La inmunodifusión radial permite cuantificar Ag. Se añade Ab a un gel de agarosa de agar que, a continuación, se vierte sobre una lámina de vidrio y se deja solidificar. Cuando el agar ya está sólido, se excavan en el mismo unos pocillos y se añade a cada un volumen estándar de Ag problema a diferentes concentraciones. Las placas se incuban durante un periodo mínimo de 24 horas, durante el cual el Ag se difunde hacia el exterior de los pocillos y forma complejos con el Ab. La concentración de las muestras problema se determina mediante interpolación a partir de una curva de calibración. El proceso también se puede llevar a cabo a la inversa utilizando un gel con Ag para determinar concentraciones desconocidas de Ab.(6)

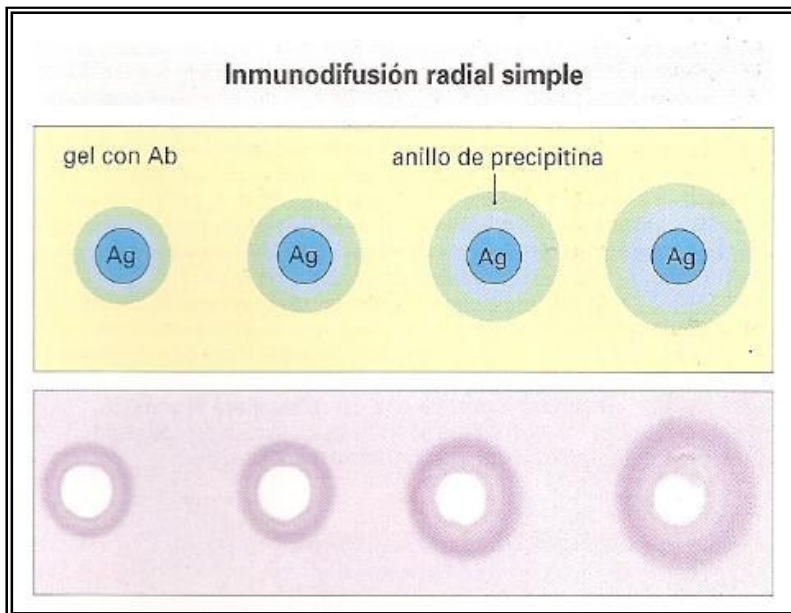


Figura 4. Inmunodifusión radial simple. (Roitt Ivan; Inmunología. 5ª ed. Madrid: Editorial Harcourt, 2000: 383)

3.9. Preparación de tejidos para histología

Se lleva a cabo la fijación ^(48, 49, 50), utilizando una porción del o los órganos extraídos, se etiquetan y se fijan con formalina al 10% en PBS, durante un tiempo mínimo de una semana.

Para la deshidratación ⁽⁵⁰⁾, primero se extraen el 75% del agua del tejido, para lo cual las muestras se someten a concentraciones crecientes de etanol (70°, 96°) se mantienen dentro de cada solución a temperatura ambiente, durante un lapso de 50 minutos, hasta obtener la deshidratación total. ⁽⁴⁸⁾

En el proceso de inclusión^(48, 50), posteriormente a la deshidratación, los tejidos se colocan en parafina, la cual se mantiene durante todo el proceso a temperatura de fusión (entre 56-60°C). Una vez embebidos los tejidos en parafina, se colocan en moldes, los cuales previamente deben tener parafina, para terminar el relleno del molde, y por último se deja solidificar.

Posteriormente se lleva a cabo la microtomía, ya solidificada la parafina, se separan los bloques del molde y se recortan para exponer el tejido embebido; se montan en el microtomo, y se obtienen cortes finos con un espesor de 3-4 µm, las bandas se hacen flotar en agua tibia con un poco de gelatina, lo que ejercerá un efecto de planchado y entonces se pueden recoger sobre un portaobjetos, finalmente se colocaron dentro de la estufa a 30°C, con la finalidad de que el corte tenga mayor adherencia al portaobjetos.

En el siguiente paso se tiñe y monta, se elimina el agente de inclusión, y posteriormente se pasan dentro de etanol absoluto por concentraciones decreciente de (96°, 70°) para permitir nuevamente su hidratación. Por último se realiza su tinción con hematoxilina y eosina y una vez más se deshidratan, aclaran y montan.

3.10. Modelo animal

El modelo animal que se utilizará es el ratón hipotímico alopecico (et/et) derivado por una mutación espontánea de la cepa albina CD1 como resultado de un gen recesivo autonómico simple ⁽⁵⁴⁾, surgido en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Estos animales se origina al aparear machos y hembras et/+ o bien machos et/et y hembras et/+.

A este ratón se le llamó et/et, “et” se adoptó para referirse a la forma mutante y se encontró que los ratones machos de esa cepa, presentan un timo rudimentario el cual es de aproximadamente la mitad en peso de uno presente en un ratón eutímico et/+, mientras que las hembras 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 una hembra eutímica et/+. ⁽⁵⁵⁾

En el 2002, se realizaron estudios en los cuales se encontraron datos que sugieren que el ratón et/et presenta manifestaciones clínicas similares a las asociadas al Síndrome de Sjögren primario en el humano, el cual es una enfermedad autoinmune caracterizada clínicamente por la sequedad ocular y orofaríngea (síndrome seco), la cual se produce por la destrucción progresiva de las glándulas salivales y lagrimales por un infiltrado linfoplasmocitario, ⁽¹³⁾ y presencia de anticuerpos anti Ro y La ⁽⁵²⁾.



Figura 5. Ratones et/et.

4. Planteamiento del problema

El síndrome de Sjögren (SS) en su forma secundaria presenta una serie de manifestaciones sistémicas, se ha encontrado que una parte importante de los pacientes con este síndrome desarrolla cirrosis biliar primaria (CBP), esta enfermedad se caracteriza por presentar destrucción progresiva de los conductos biliares intrahepáticos y tiene una característica clínica particular, que es la de presentar un título alto de anticuerpos antimitocondriales (AMA) en suero.

Por tanto es importante tener un modelo animal con el cual comparar este síndrome, y la relación que guarda con la cirrosis biliar primaria para así entender mejor su patogenia. De este modo se desarrollará un estudio en ratones *et/et*, ya que este presenta un cuadro clínico parecido al de un paciente con síndrome de Sjögren y se comparará con otras poblaciones de ratones sanos *+/+* y portadores *et/+*.

Es de interés entonces determinar si esta cepa de ratones tienen presencia de AMA, y asociarlo con otros datos como las lesiones en los ojos, el índice hepático, ceruloplasmina y nitritos; a fin de obtener un panorama mas completo sobre las características de esta enfermedad en el modelo animal.

5. Hipótesis

Los ratones et/et que desarrollan el Síndrome de Sjögren, presentan mayor título de anticuerpos antimitocondriales, específicos para el diagnóstico de Cirrosis biliar primaria y con los rasgos y signos característicos de la exocrinopatía.

6. Objetivos

Objetivos generales

1. Obtener los índices hepáticos y glandulares de ratones hembras et/et, et/+ y +/+.
2. Determinar los niveles de anticuerpos antimitocondriales en sueros de ratones hembras et/et, et/+ y +/+.
3. Realizar otras pruebas de laboratorio como ceruloplasmina y nitritos, relacionadas con el padecimiento.
4. Relacionar los niveles de anticuerpos antimitocondriales, con los otros datos obtenidos, para así tratar de asociar la cirrosis biliar primaria en esta cepa de ratones que presenta sintomatología afín a la del síndrome de Sgögren.

Objetivos particulares

1. Sacrificar a los animales y obtener, suero, glándulas e hígado.
2. A partir del suero determinar anticuerpos antimitocondriales por la técnica de ELISA e Inmunoelectrotransferencia.
3. A partir de las glándulas y el hígado obtener los índices glandulares y hepáticos.
4. Determinar ceruloplasmina en suero por la técnica de inmunodifusión radial.
5. Determinar nitritos en suero.

7. Diseño de investigación.

Tipo de estudio: Prospectivo, observacional, transversal.

Población: 10 et/et, 10 et/+, 10 +/+ de 4 a 6 semanas.

Criterios de inclusión: Ratones hembra de 4 a 6 semanas de las cepas +/+, et/+ y et/et.

Criterios de exclusión: Ratones macho de las cepas +/+, et/+ y et/et, ratones que no se encuentren entre las edades requeridas.

Criterios de eliminación: Ratones que presenten tumoración o síntomas de alguna enfermedad.

8. Material, equipo y reactivos

Reactivos

Nombre	Proveedor
Ácido acético	Baker Analyzed
Ácido cítrico	JT.Baker
Ácido clorhídrico	EM SCIENCE
Acrilamida (99.9%)	SIGMA
Agarosa	BIOXON
Agua bidestilada	
Albumina sérica bovina	JT. Baker
Azul de bromofenol	SIGMA
Azul de Coomassie	SIGMA
2-β-mercaptoetanol	SIGMA
Bis-acrilamida	SIGMA
Carbonato de sodio anhidro	JT. Baker
Citrato de sodio	Técnica química
Cloruro de amonio	JT. Baker
Cloruro de potasio	Técnica química
Cloruro de sodio	JT. Baker
Colorante Ponceau S	SIGMA
Diaminobencidina (DAB)	SIGMA
EDTA	SIGMA
Folin & Ciocalteu's (Agente de fenol)	SIGMA
Fosfato de potasio dibásico	Merck
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado	JT. Baker
Fosfato de sodio monobásico	JT. Baker
Glicerol	JT. Baker
Glicina	SIGMA
Metanol	JT. Baker
NED	SIGMA
O-fenilendiamina	SIGMA

(OPD)	
Peróxido de hidrogeno al 30%	Productos químicos Monterrey
Persulfato de amonio	SIGMA
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	SIGMA
Sulfanilamida	Merck
Sulfato de cobre	Técnica Clínica
Sulfato de zinc	HYCEL de México
Tartrato de sodio y potasio	Merck
TEMED	SIGMA
TRIS base	SIGMA
Tween 20	Hycel de México

Material biológico

- Suero de ratones et/et, et/+, +/+.

Conjugados

Conjugado	Datos
IgA	Anticuerpo de cabra anti-IgA de rata, específico anti-cadena α unida a peroxidasa de rábano. Catálogo: A-4789 Lote:115H8985 SIGMA
IgG	Anticuerpo de cabra anti-IgG de rata, específico anti-cadena γ unida a peroxidasa de rábano. Catálogo: A-8786 Lote:66H8940 SIGMA
IgM	Anticuerpo de cabra anti-IgM de rata, específico anti-cadena μ unida a peroxidasa de rábano. Catálogo: A-3673 Lote:18H9169 SIGMA

Marcador de peso molecular

SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard
<p>Marca: Invitrogen Catalogo No. LC5925 Contenido: 500µL de SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Estándar Buffer de corrimiento: Tris-HCl, Formamida, SDS, Rojo de Fenol</p> <p>Consiste de 10 bandas de proteínas preteñidas, 8 azules y 2 de colores de contraste, en el rango de 4-250 kDa.</p>

Equipo

Nombre	Marca
Agitador de placas	Bellco Glass Inc
Agitador vortex genie	Scientific Industries Inc
Balanza analítica	Mettler H33AR
Balanza granataria	OHAUS
Cámara para electroforesis	Owl Scientifics, Inc
Cámara para electrotransferencia	BioRad
Centrífuga	Solbat
Congelador (-4°C)	Revco
Espectrofotómetro Spectronic 20	Bausch & Lomb
Fuente de poder	BRL
Incubadora	Riossa EC
Lector de ELISA	Dynatech MR 250
Microcentrífuga	Hermle 2233M-2
Refrigerador	Philips 127 volts-VA
Secador de Geles	BIO-RAD GelAir Dryer

Material

Material	Marca
Micropipeta de 5-40 µL	Finnpipette-Labsystems
Micropipeta de 10-100 µL	Labpette-Labnet
Micropipeta de 100-1000 µL	BIOHIT Proline
Vidrios para electroforesis	Owl Scientifics, Inc
Separadores para electroforesis	BIO-RAD
Membrana de nitrocelulosa	BIO-RAD (0.45µL)
Placas para ELISA	Costar [®] U Bottom/High Binding

9. Método

9.1. Obtención de órganos y suero de ratones: CD1, et/+ y et/et.

Se sacrificó un lote de 30 ratones (10 CD1, 10 et/+ y 10 et/et) por incisión axilar, obteniendo en tubos de ensaye la sangre de éstos y posteriormente se hizo la disección de los órganos y glándulas: glándula lagrimal, submaxilar, hígado, bazo y riñones.

Los órganos se guardaron en formalina al 15% para realizar posteriormente cortes histológicos de cada órgano.

La sangre recolectada fue centrifugada para la obtención de suero, se tomaron alícuotas de 50 μ L, y se guardó en tubos Eppendorf y se mantuvieron en congelación hasta su uso.

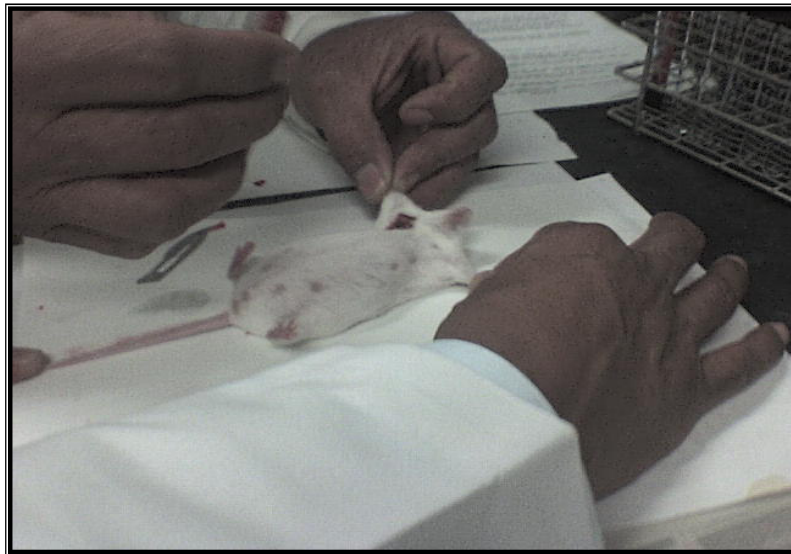


Figura 6. Incisión axilar.

9.2. Preparación de mitocondrias (antígeno mitocondrial) a partir de hígado de un mamífero.

Buffer

Sorbitol 0.5 M
EDTA 0.1 mM
Tris 50 mM (pH=7.4)

Procedimiento

Se homogenizó el hígado de una rata o ratón, aproximadamente 15 g en 30 mL de buffer (el buffer estaba muy frío), posteriormente este se centrifugó a 250 g por 10 minutos. Se filtró el sobrenadante y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a 8500rpm por 10 minutos a 4°C- Se resuspendió el botón en 15 mL de buffer (muy frío) y se centrifugó a 8000 g por 10 a 4°C, se repitió este paso y se resuspendió el botón en 4mL de buffer con 0.05% de albumina sérica bovina. Se almacenó en alícuotas de 1mL a -20°C- La concentración final fue aproximadamente de 40-60 mg/mL.

9.3. Cuantificación de proteínas del antígeno mitocondrial por el método de Lowry.

Reactivo 1.

Carbonato de sodio anhidro (Na ₂ CO ₃)	5 g
Hidróxido de sodio (NaOH)	1 g
Tartrato de sodio y Potasio (KNaC ₄ KNaO ₆ •4H ₂ O)	0.067 g
Agua Bidestilada	250 mL

Reactivo 2.

Sulfato de cobre anhidro (CuSO ₄)	0.024 g
Agua bidestilada	50 mL

Reactivo de Lowry.

Reactivo 1	50 mL
Reactivo 2	1 mL

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Reactivo de Folin-Ciocalteu	1.5 mL
-----------------------------	--------

Patrón de albúmina

Albúmina	25 mg
Agua destilada	100 mL

Procedimiento.

Curva patrón de albúmina: Se preparó una solución de 25 mg de albúmina en 100mL de agua destilada. Y se agregaron distintos volúmenes a 10 tubos de ensaye, como se muestra en el cuadro:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Blanco
Albúmina (25mg/100mL)	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.4 mL	0.5 mL	0.6 mL	0.7 mL	0.8 mL	0.9 mL	1 mL	-
Agua destilada	0.9 mL	0.8 mL	0.7 mL	0.6 mL	0.5 mL	0.4 mL	0.3 mL	0.2 mL	0.1 mL	-	1 mL
Reactivo de Lowry	3mL en cada tubo / reposo de 10 minutos										
Reactivo de Folin- Ciocalteau	0.1 mL en cada tubo / reposo de 30 min										

Tabla 11. Curva estándar. Se lee absorbancia a 660 nm en el espectrofotómetro.

Muestra: Se hizo una dilución de la muestra 1:20 y 1:10, de tal forma que se obtuvo 1 mL de volumen final, se agregó a cada dilución, 3mL de reactivo de Lowry. Se dejó reposar por 10 min. Pasado el periodo de tiempo, se agregó 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteau, y se dejó reposar por 30 min. Se leyó a 660 nm. Se construyó la curva patrón con las absorbancia y las concentraciones registradas, se interpoló y se obtuvo la concentración de la muestra de proteínas.

9.4. ELISA

Amortiguador de recubrimiento.

Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)	0.318 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	0.586 g
Agua bidestilada	200 mL

PBS-Tween 20 al 0.05%

PBS	1 L
Tween 20	0.5 mL

PBS (pH=7.2)

Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8 g
Fosfato de sodio dodecahidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	0.2 g
Agua bidestilada	1 L

Solución bloqueadora.

Leche descremada Sueltes	5 g
BSA	1 g
PBS	100 mL

Sustrato.

Solución A:

Ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.1M	2.101 g
Agua bidestilada	100 mL

Solución B.

Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 0.2M	7.163 g
Agua bidestilada	100 mL
Tomar 24.3mL de la solución A, mezclar con 25,7 de la solución B.	

Peroxidasa de rábano

o-fenilendiamina	20 mg
Sustrato	50 mL
Peróxido de hidrógeno	20 μL

Procedimiento

Se realizó la dilución 1:30 del antígeno de mitocondria con el amortiguador de recubrimiento, y se colocó 100 μL de está en cada pozo de la placa de fondo U para ELISA. Se incubó a 36°C por 1 hora. Se eliminó la solución vertiéndola y se realizaron 3 lavados con PBS-Tween. A cada pozo se le adicionaron 300 μL de solución bloqueadora y se incubó a 36°C por 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la dilución 1:50 correspondiente para los sueros de ratones et/et, et/+ y CD1 en PBS, y se coloca 100 μL de cada dilución de los sueros en los pozos correspondientes. Se incubó nuevamente a 36°C por 1 hora. Pasado este

periodo de tiempo se vertió el contenido de los pozos y se realizaron 3 lavados con PBS-Tween. Se realizó la dilución 1:500 del conjugado y se colocaron 100 μ L de está e cada pozo. Se adicionó a cada pozo 100 μ L de sustrato cromógeno y se incubó 30 minutos a 36°C.

Transcurrido este tiempo se leyó la densidad óptica en un lector para placas de ELISA a 490 nm.

9.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Solución A. Monómero de acrilamida.

Acrilamida	29 g
Bis- acrilamida	1 g

Se lleva a 100 mL con agua desionizada, aforar hasta que la solución este a temperatura ambiente. Filtrar la solución después de aforar y guardar a 4°C, no más de 1 mes.

Solución B. Amortiguador del gel separador, pH= 8.8

Trizma base	36.3 g
Ácido clorhídrico (HCl) 1N	40 mL
EDTA 0.2M pH= 8.0	5.3 mL

Se ajusta el pH con HCl 5N. Se afora a 100 mL. Se filtra con papel Whatman #1 y se guarda a 4°C.

Solución C. Amortiguador del gel concentrador, pH= 6.8

Trizma base	5.98 g
Ácido clorhídrico 5N	6 mL
EDA 0.2M, pH=8.0	5.3 mL

Se ajusta el pH con HCl 5N. Se afora a 100 mL. Se filtra con papel Whatman #1 y se guarda a 4°C.

Solución D. SDS al 10% (dodecil-sulfato de sodio)

SDS	10 g
Agua desionizada	100 mL

Se filtra con papel filtro después de aforar, Guardar a temperatura ambiente.

Solución E. persulfato de amonio (PSA) al 10%

Persulfato de amonio	200 mg
Agua desionizada	2000 µL

Solución F. TEMED

TEMED	1000 µL
-------	---------

Solución G. Amortiguador de muestra 4X

Solución C	300 µL
Solución D	200 µL
Glicerol 100%	400 µL
2-β-mercaptoetanol	50 µL
Azul de bromofenol	50 µL

Mezclar los componentes, colocar en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y almacenar a -20°C.

Solución H. Amortiguador de desarrollo (Tris-HCl 0.025M, pH= 8.3, glicina 0.192M, SDS 0.1%)

Tris-base	3 g
Glicina	14.4 g
SDS	10 mL
Agua destilada	1 L

Solución I. Colorante azul de Comassie R-250val 1% (stock)

Azul de Comassie	1.0 g
Agua destilada	100 mL

Colorante: azul de Comassie R-250 0.125% (MeOH 50%, ácido acético 10%)

Azul de Comassie	62 mL de la solución stock
MeOH	250 mL
Acido acético	50 mL
Agua destilada	500 mL

Solución decolorante 1. (MeOH 50%, ácido acético 10%)

MeOH	500 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	1000 mL

Solución decolorante 2. (MeOH 5%, ácido acético 7%)

MeOH	700 mL
Ácido acético	500 mL
Agua destilada	10 L

Procedimiento.

Formación del gel separador.

Con dos cristales de 12 X 11 y 12 X 10 cm y dos empacadores de teflón de 0.5 mm se montó el soporte donde se formó el gel de poliacrilamida. Se sellaron los extremos, parte inferior y lados, con agarosa al 2% cuidadosamente de no dejar espacios sin cubrir. En un vaso de precipitado de 40 mL se mezclaron las siguientes cantidades para un gel al 10%:

Agua bidestilada	3.232 mL
Solución A	2.333 mL
Solución B	1.316 mL
Solución D	70 µL
Solución E	36 µL
Solución F	10 µL

Se mezcló perfectamente, cuidando que no haya formación de burbujas, se vació la mezcla al armazón de tal forma que quedó un espacio de 4cm aproximadamente sin cubrir en la parte superior, inmediatamente se agregó agua hasta el borde del cristal (cuando el gel polimerizó se observó dos fases, una del gel y otra del agua). Una vez que el gel polimerizó se desalojó el agua, se lavó la superficie del gel con agua bidestilada y se dejó reposar unos minutos.

Formación del gel separador

En un vaso e precipitados de 40 mL se agregaron las siguientes cantidades para un gel al 10%.

Agua bidestilada	2.350 mL
Solución A	0.690 mL
Solución C	0.870 mL
Solución D	41.4 μ L
Solución E	41.4 μ L
Solución F	6 μ L

Se mezclaron evitando la formación de burbujas, se llenó el espacio restante en el armazón y se insertó el peine ciego cuidando de no generar burbujas bajo los dientes de este, se dejó reposar el gel unos 10 minutos.

Tratamiento de la Muestra

Se combinaron 3 partes de la muestra de antígeno mitocondrial, con una parte del amortiguador de muestra 4X (solución G), en un tubo Eppendorf. De tal modo que se colocaron 90 μ L de antígeno mitocondrial y 30 μ L del amortiguador de muestra. Este tubo se colocó en un baño de agua hirviendo por 2 minutos y finalmente se centrifugó a 2000 r.p.m. por 30 segundos.

Corrido del Gel.

Se retiró el peine suavemente del gel ya polimerizado, se llenaron los pozos con agua y se drenaron invirtiendo el dispositivo, se repitió el lavado de 2 a 3 veces para evitar la formación de redes de gel en los pozos. Se colocó el armazón en la cámara de electroforesis y se llenó la cámara interna y cada pozo con el amortiguador de corrimiento (solución H), se llenó el pozo mas grande con 110 μ L de la muestra y el otro pozo pequeño se dispuso para colocar 10 μ L del marcador de peso molecular.

Se llenó el compartimiento inferior de la cámara de electroforesis con el amortiguador se corrimiento (solución H), se conecto a la fuente de poder y se corrió a 80 V de corriente constante hasta que llegó al gel separador, entonces se subió el voltaje a 120 V de corriente continua y se detuvo hasta que el colorante quedó unos 0.5 cm antes del límite inferior de los cristales.

Tinción, decoloración y secado.

Se desensambló el dispositivo y se sacó el gel con cuidado, este se colocó en la solución colorante Azul de Commassie (solución J) por 1 hora, pasado este tiempo se colocó en la solución decolorante 1, por 1 hora a agitación contante y posteriormente se transfirió a la solución decolorante 2 el tiempo conveniente hasta que se obtuvo la decoloración deseada.

Ya decolorado el gel se colocó entre 2 plásticos resistentes al calor y se llevo al secador de geles a 60° C por 1 hora.

Cuando se realizó la inmunoelectrotransferencia se omitieron los pasos de tinción, decoloración y secado.

9.6. Inmunoelectrotransferencia (IET)

Buffer de transferencia

Tris	5.8 g
Glicina	29.0 g
SDS	1.0 g
Metanol	200 mL
Agua destilada	1 L

PBS (Solución salina de fosfatos)

Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8 g
Fosfato de sodio dodecahidratado (NaH ₂ PO ₄ •12H ₂ O)	2.9 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.2 g
Agua bidestilada	1 L

PBS- Tween 20 al 0.1 %

Adicionar 1 mL de Tween 20 por cada litro de PBS.

Solución bloqueadora

Leche descremada Sveltys	5 g
EDTA	0.08 g
PBS	100 mL

Diaminobencidina (DAB)

12 mg en 40 mL de PBS. Mezclar durante 5 minutos. Preparar 10 minutos antes de su uso.

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

Tomar 132 μ L de una solución al 30% y adicionar inmediatamente antes de su uso a 40 mL de DAB en PBS.

Procedimiento

Previamente se realizó la electroforesis, descrita anteriormente. En el proceso fue necesario utilizar guantes para el manejo de las muestras y la membrana. Se cortó un trozo de papel de nitrocelulosa de poro 0.45 μ m, de tamaño adecuado para que se colocara junto al gel, estos se colocaron entre dos papeles filtro, todo esto se humedeció en el buffer de transferencia por 10 minutos. En un “casette” del aparato se colocó la esponja, sobre la esponja se colocó el papel filtro y encima de este la membrana de nitrocelulosa, todo humedecido previamente, luego se colocó el gel cuidando de no dejar burbujas entre el gel y la membrana, después se colocó el segundo papel filtro y otra esponja y se cerró el “casette”.

El “casette” se colocó en la cámara de transferencia y se llenó con el buffer de transferencia, este se conectó a los electrodos de tal manera que la membrana de nitrocelulosa quedó orientada al electrodo positivo. Se conectó el sistema a la fuente de poder y se realizó la transferencia durante 2- 3 horas a 100 V de corriente constante. Posteriormente se sacó el “casette” se separó la membrana de nitrocelulosa y se colocó en la solución bloqueadora por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se eliminó la solución bloqueadora y se lavó con PBS-Tween 5 veces. Se cortó el papel en tiras y se colocaron en los diferentes carriles de la placa, se realizó la dilución 1:25 del suero en PBS y se colocó en cada uno de los carriles que contenía una tira de papel de nitrocelulosa, se incubó 1 hora a 36°C. Se lavó cada tira por separado con PBS-Tween de 3 a 5 veces. Se realizó la dilución 1:500 del segundo anticuerpo o conjugado de IgG unido a peroxidasa en PBS.

Las tiras se colocaron en el segundo anticuerpo y se incubaron a temperatura ambiente por una hora. Se lavaron de 3 a 5 veces con PBS-Tween y se revelaron con el sustrato para transferencia DAB, hasta la aparición de las bandas.

9.7. Determinación de ceruloplasmina por Inmunodifusión radial

Agarosa al 1%

Agarosa	1 g
PBS	100 mL

Suero anticерuloplasmina

Suero anticерuloplasmina	150 μ L
PBS	2 mL

Procedimiento.

Previamente se disolvió la agarosa en el PBS para preparar la agarosa al 1%, por otra parte se disolvió el suero anticерuloplasmina en los 2 mL de PBS y estos en la dilución de agarosa al 1%. Se colocó en las placas para inmunodifusión y se esperó a que solidificara el medio. Posteriormente se socavaron pozos sobre las placas de agarosa y cada pozo se le colocó 5 μ del suero problema. Se mantuvieron en refrigeración por 48 hrs. y se midió el diámetro del halo de precipitación.

9.8. Análisis de Nitritos

Cadmio metálico

Cadmio metálico	500 mg
-----------------	--------

Solución acuosa de sulfato de cobre al 5%

Sulfato de cobre (CuSO ₄)	500 mg
Agua destilada	100 mL

Solución acuosa de cloruro de amonio al 5% pH=9

Cloruro de amonio (NH ₄ HCl)	500 mg
Agua destilada	100 mL

Se ajusta el pH con borato de sodio.

Solución acuosa de sulfato de zinc

Sulfato de zinc ($ZnSO_4$)	300 g
Agua destilada	1 L

Solución acuosa de ácido acético al 15% (V/V)

Ácido acético
Agua destilada

Reactivo de sulfanilamida

Sulfanilamida	500 mg
Ácido acético 15%	150 mL

Guardar en un frasco oscuro y protegerlo de la luz.

Reactivo NED. N-(1-naftil)-etilendiaminodiclorhidratado

NED	200 mg
Ácido acético 15%	150 mL

Guardar en un frasco oscuro y protegerlo de la luz.

Estándar de Nitritos

Nitrito de sodio ($NaNO_2$)	200 μ g/mL
-------------------------------	----------------

Procedimiento.

Plateamiento del cadmio

En tubos de 13X100 se colocó 0.5 g de cadmio metálico y se agregó 2mL de sulfato de cobre al 5%, se agitó en un rocker por 10 minutos. Posteriormente se lavó 3 veces con agua destilada para eliminar el cobre y se le dio un último lavado con ácido clorhídrico 0.1N para remover el hidróxido de cadmio, aproximadamente a 2 volúmenes con el tubo lleno. Después se lavó el cadmio con cloruro de amonio al 5% pH=9, y se guardó en esta solución hasta su utilización.

Preparación de la muestra

A 100 μ L de suero se le adicionó 300 μ L de agua destilada (obteniendo una dilución 1:4), se tiran 20 μ L de la dilución y se agregan 20 μ L de la solución de $ZnSO_4$, se mezcló bien y esta solución forma un precipitado de proteínas, por ello, se centrifugó a 10 000g durante 5 min.

A los tubos con el cadmio activado se les tiró el NH_4Cl y se les adicionó el sobrenadante del centrifugado anterior, se taparon con parafilm y se agitaron en un rocker por 15 min. Se centrifugaron los tubos a 3500 g por 5 min. Y se toman 200 μL del sobrenadante para el ensayo.

Se construyó la curva de calibración con el patrón.

Tubo	Estándar (μL)	Agua destilada (μL)
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
Muestra	200 del sobrenadante	700
Adicionar 50 μL de sulfanilamida. Incubar 10 min.		
Adicionar 50 μL del reactivo de NED, mezclar e incubar 30 min.		
Leer a 540 nm.		

Tabla 12. Curva patrón. Concentración del estándar 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Nitrito de sodio.

10. Resultados

Características de los ojos entre los grupos de estudio.

Los ratones +/+ y et/+, no presentaron ninguna alteración en los ojos.

et/et		
Ratón	Ojo derecho	Ojo izquierdo
1	Inflamado	Sano
2	Inflamado	Inflamado
3	Sano	Sano
4	Perdido	Inflamado
5	Perdido	Inflamado
6	Inflamado	Inflamado
7	Sano	Catarata
8	Sano	Catarata
9	Sano	Sano
10	Catarata	Catarata

Tabla 13. Características de los ojos de ratones et/et.

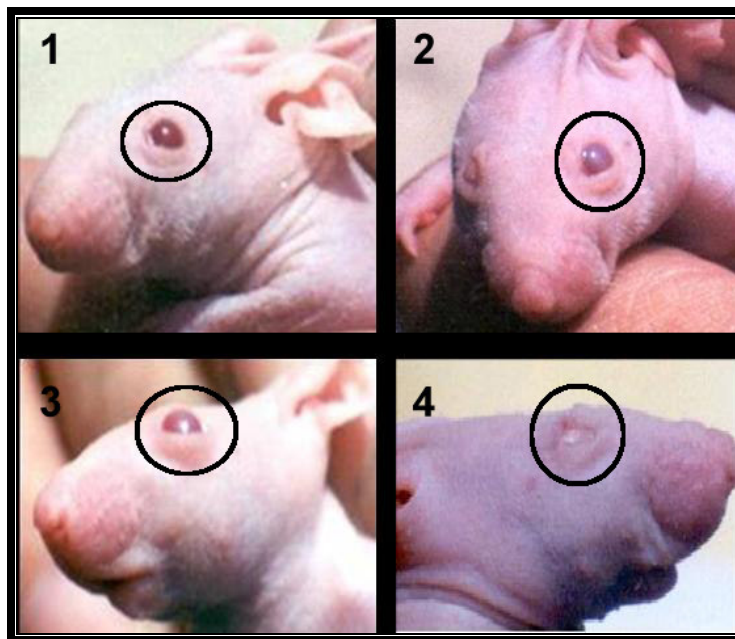


Figura 7. Tipos de lesiones de ojo en ratones et/et. 1) Ojo normal. 2) Ojo con Catarata. 3) Ojo inflamado. 4) Ojo perdido.

Índices glandulares, hepáticos, renales y esplénicos en el lote de ratones de estudio.

Estos índices fueron calculados bajo la fórmula de:

$$\frac{\text{Peso de la glándula} \times 1000}{\text{Peso del ratón}}$$

CD1			
Ratón	Índice hepático (10 ³)	Índice renal (10 ³)	Índice esplénico (10 ³)
1	54.50	10.43	2.30
2	38.01	8.76	2.45
3	51.40	9.80	3.09
4	40.40	9.54	4.17
5	46.12	8.90	3.79
6	37.00	8.37	2.47
7	50.40	9.87	3.80
8	48.60	12.63	4.93
9	33.40	10.15	5.08
10	34.91	9.40	2.36

Tabla 14. Índices en la cepa +/-

et/+			
Ratón	Índice hepático (10 ³)	Índice renal (10 ³)	Índice esplénico (10 ³)
1	42.00	11.78	3.53
2	47.91	10.53	3.98
3	39.05	8.95	3.14
4	41.60	9.45	4.04
5	49.48	10.35	5.03
6	55.07	8.48	6.07
7	54.84	11.16	4.92
8	46.14	10.28	4.85
9	47.43	11.32	3.80
10	43.52	9.96	3.24

Tabla 15. Índices en la cepa et/+.

et/et			
Ratón	Índice hepático (10 ³)	Índice renal (10 ³)	Índice esplénico (10 ³)
1	44.85	12.85	3.97
2	58.74	12.46	4.91
3	37.74	11.88	4.49
4	53.43	13.72	4.46
5	51.76	13.02	6.21
6	56.13	14.57	5.75
7	42.79	15.16	3.54
8	56.78	15.75	4.48
9	56.86	12.81	7.47
10	56.32	13.54	5.82

Tabla 16. Índices de la cepa et/et.

et/et		
Índice glandular (10 ³)		
Ratón	Lagrimal	Submaxilar
1	0.690625	0.943750
2	0.746031	0.625396
3	0.479411	0.644117
4	0.501694	0.925423
5	0.648275	0.737931
6	0.724528	0.664150
7	0.760869	0.691304
8	0.693333	0.710000
9	0.701449	0.805797
10	0.657575	0.884848

Tabla 17. Índices glandulares de la cepa et/et.

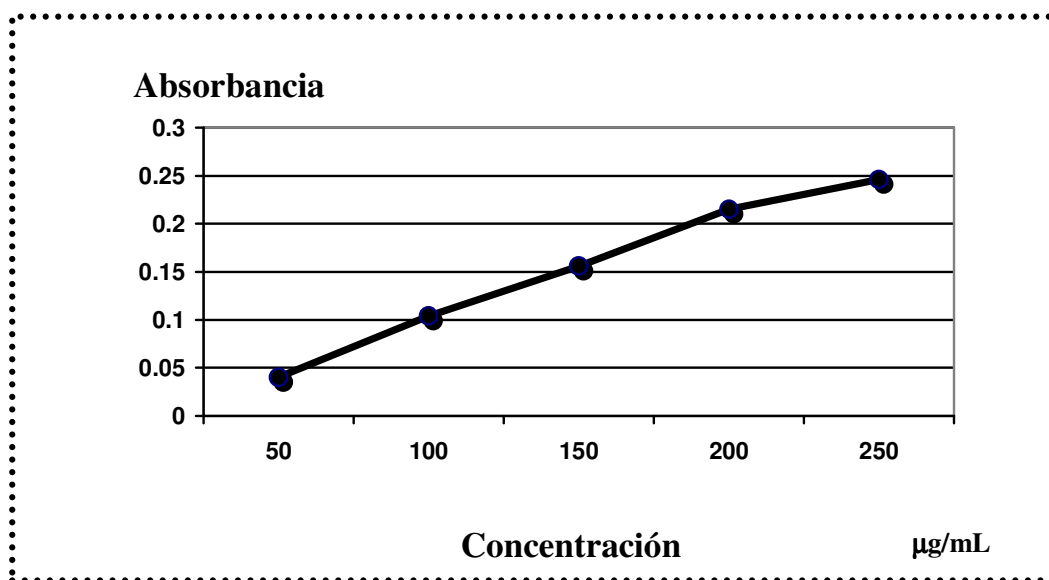
Curva patrón de proteínas por el método de Lowry

Se determinó la concentración de antígeno mitocondrial por el método de Lowry.

Tubo	Albúmina (mL)	Absorbancia (660 nm)	Albúmina (mg)
1	0.2	0.040	0.05
2	0.4	0.104	0.10
3	0.6	0.156	0.15
4	0.8	0.215	0.20
5	1.0	0.246	0.25

Estándar de proteínas (BSA, 0.25 mg/mL)

Grafica 1. Curva patrón de proteínas por le método de Lowry.



Dilución	Absorbancia	Concentración del antígeno mitocondrial
1:20	0.204	200-250 µg/mL

Tabla 18. Concentración de la muestra de antígeno antimitocondrial

Identificación del antígeno mitocondrial por su peso molecular.

Se realizó el corrimiento electroforético de la muestra del antígeno en distintas concentraciones y el marcador de peso molecular.

Carril	Cantidad (μL)	Antígeno
1	10	MPM
2	20	Antígeno mitocondrial
3	30	Antígeno mitocondrial

Tabla 19. Cantidades usadas para la identificación del antígeno mitocondrial.

El gel se tiñó con azul de Commasie y se observaron las siguientes bandas:

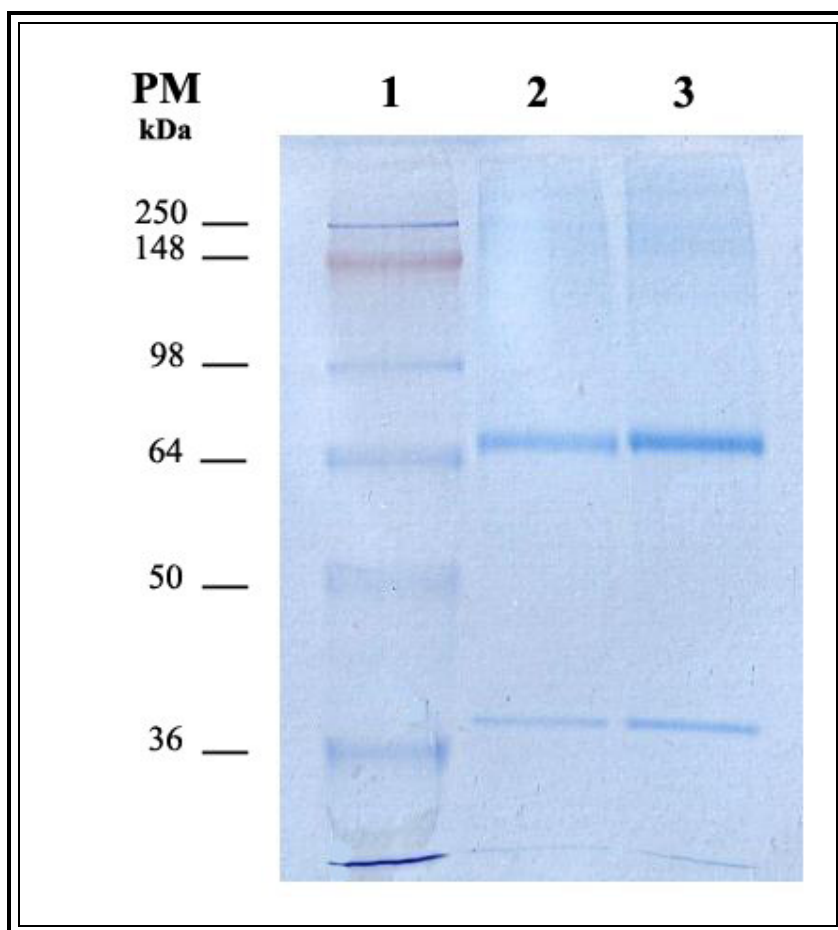


Figura 8. Electroforesis. Identificación del antígeno mitocondrial.

Se observó que la banda del antígeno mitocondrial se encuentra por encima de la banda de los 64 kDa, correspondiendo aproximadamente a los 70 kDa, peso molecular reportado para el antígeno mitocondrial, identificado el antígeno se prosiguió con ELISA.

ELISA

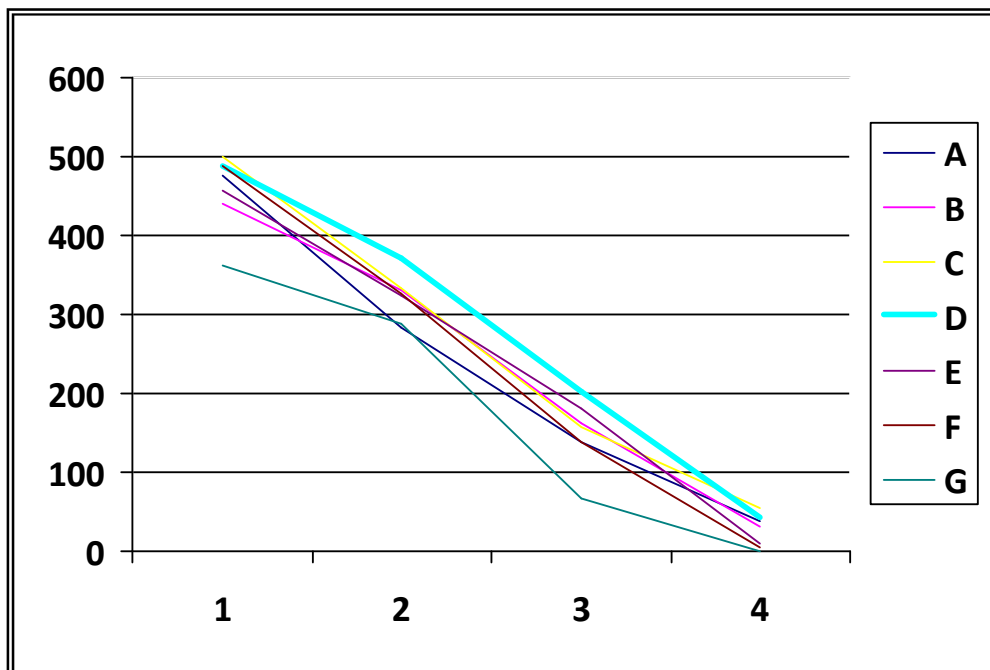
Título del conjugado.

Se realizó ELISA indirecto para obtener la dilución del conjugado que será usado, se utilizó anti-IgA de ratón, anti-IgG de ratón y anti-IgM de ratón y el suero de un ratón CD1 en diferentes concentraciones. Obteniendo mayor título con anti-IgM de ratón:

	1	2	3	4
1 ^a	0.476	0.283	0.137	0.038
1B	0.440	0.331	0.163	0.030
1C	0.499	0.333	0.157	0.055
1D	0.488	0.371	0.203	0.042
1E	0.458	0.324	0.182	0.009
1F	0.488	0.327	0.139	0.004
IG	0.363	0.289	0.067	-

Tabla 20. Títulos del conjugado con anti-IgM de ratón.

Grafica2. Título del conjugado.



Por medio de este gráfico se obtuvo la dilución del conjugado a usar para realizar el título del antígeno mitocondrial, en este caso 1:800, obtenido por medio de la recta D, la cual se muestra por encima de las demás.

Absorbancias obtenidas de antígeno mitocondrial por la técnica de ELISA.

Sueros	Absorbancia de Anticuerpos antimitocondriales
Ratón +/+	
1	0.136
2	0.095
3	0.056
4	0.203
5	0.061
6	0.041
7	0.092
8	0.061
9	0.056
10	0.067
Ratón et/+	
1	0.072
2	0.064
3	0.086
4	0.138
5	0.070
6	0.064
7	0.018
8	0.056
9	0.032
10	0.100
Ratón et/et	
1	0.88
2	0.084
3	0.074
4	0.055
5	0.081
6	0.072
7	0.110
8	0.055
9	0.091
10	0.185

Tabla 21. Títulos de anticuerpos antimitocondriales en las 3 cepas de ratones.

Inmunoelectrotransferencia

Una vez realizado el ELISA se procedió a realizar la inmunoelectrotransferencia con los sueros problemas.

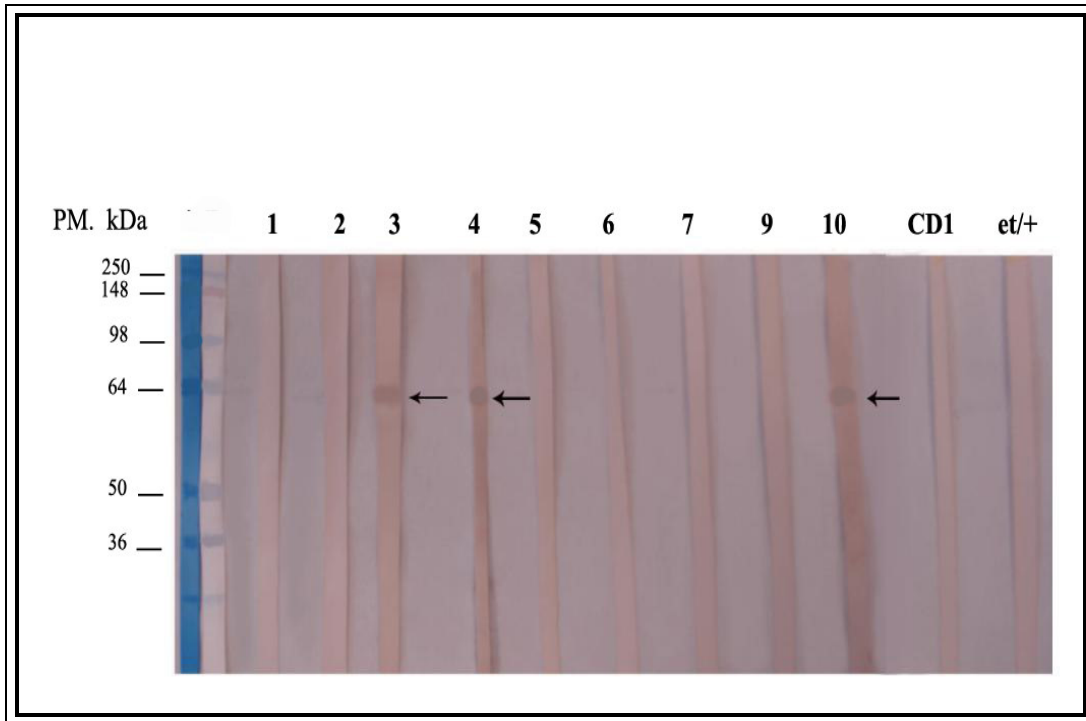


Figura 9. Inmunoelectrotransferencia. Usando los sueros de ratones et/et contra el antígeno mitocondrial, se observan positivos los sueros con título de anticuerpos en ELISA mas altos.

Podemos observar que los sueros número 3, 4 y 10 son positivos y corresponden a los sueros con título más alto de antígeno mitocondrial en la prueba de ELISA.

Cortes histológicos

Se realizaron cortes histológicos a hígado de ratón $+/+$ y et/et con la finalidad de observar sus diferencias morfológicas.

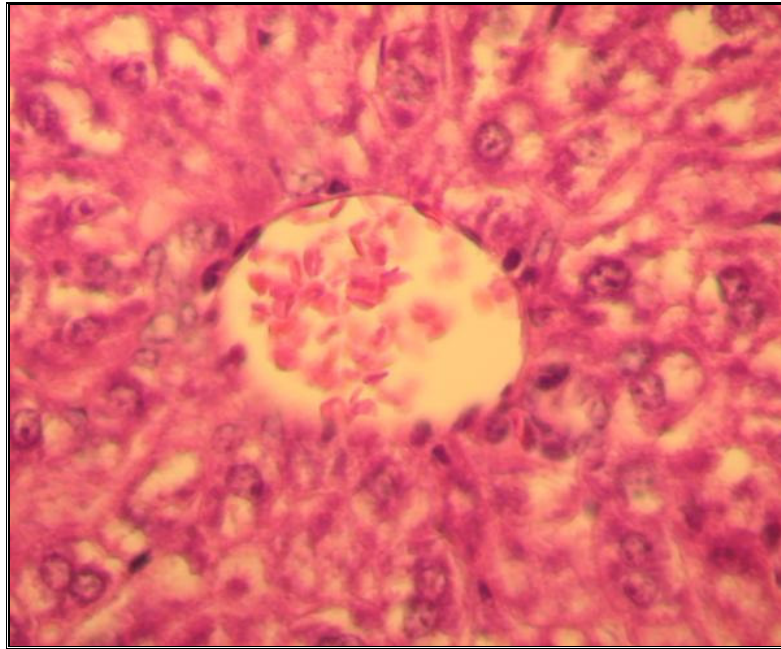


Figura 10. Hígado de ratón $+/+$ a 40X. Vena central del lobulillo con columnas de hepatocitos respetando la estructura normal.

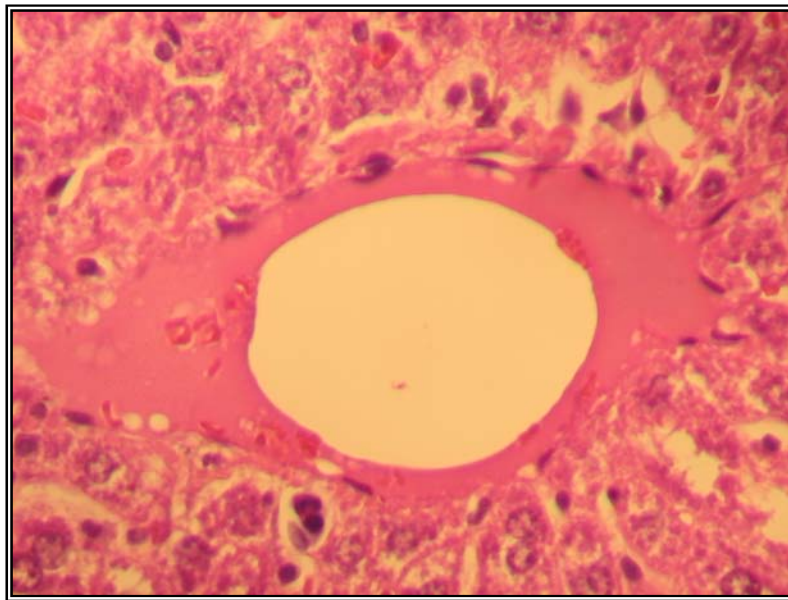


Figura 11. Hígado de ratón et/et a 40X. Vena central del lobulillo con proceso fibrótico importante, así como alteración del parénquima normal y sinusoidal.

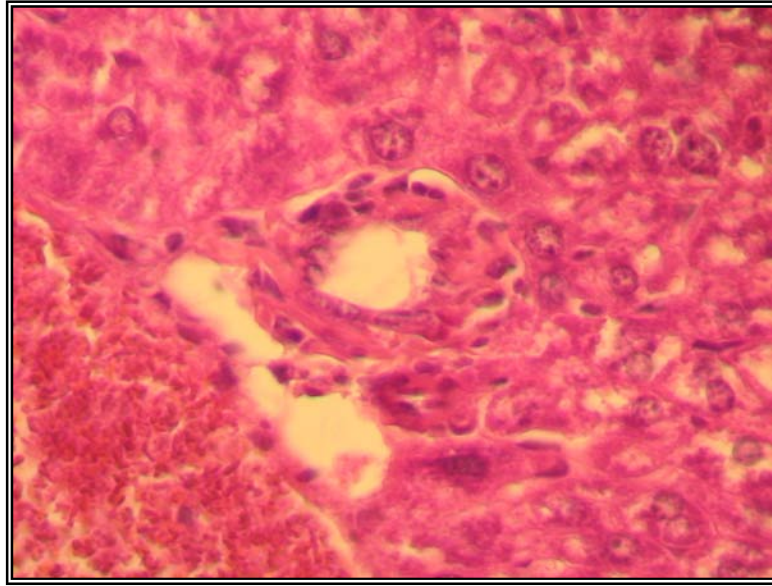


Figura12. Hígado de ratón +/- a 40X. Elementos propios de la triada portal.

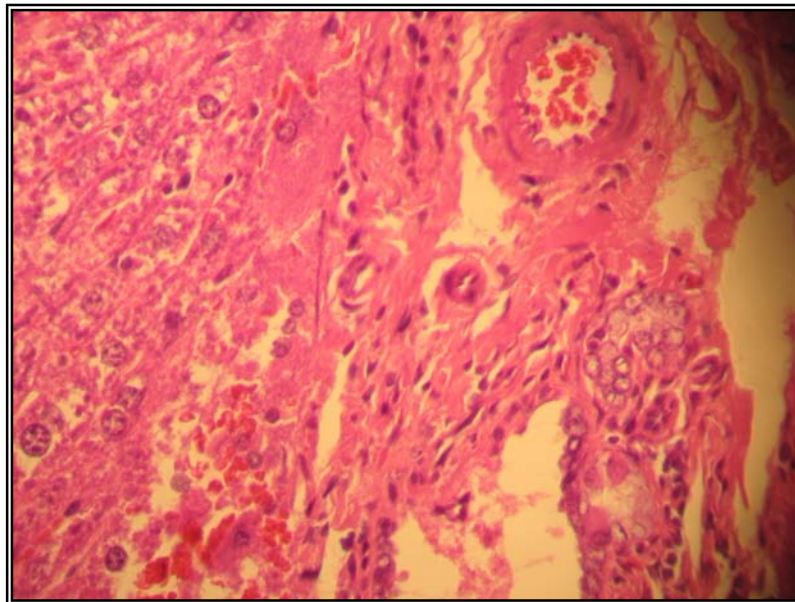


Figura 13. Hígado de ratón et/et a 40X. Proceso fibrótico alrededor de la triada portal con presencia de células inflamatorias

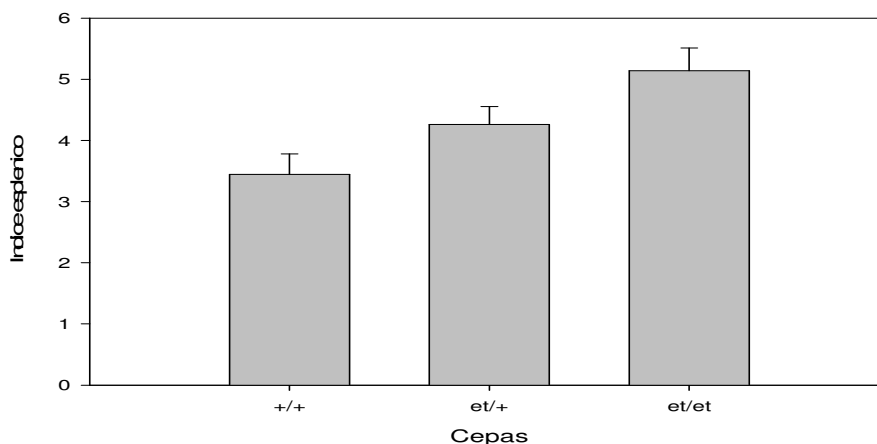
11. Análisis estadístico

Se aplicó el programa estadístico SPSS-10 para Windows 10.0.

Comparación de medias entre los diversos parámetros determinados y las cepas estudiadas.

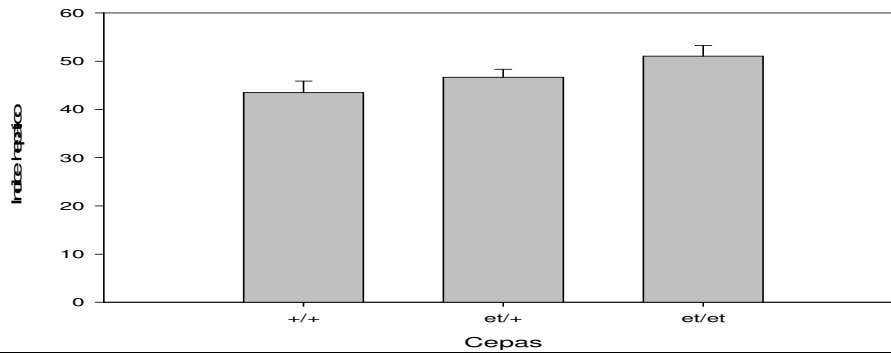
Índice esplénico		
Cepa	Media	Error estándar
+/+	3.4440	0.33672
et/+	4.2600	0.29475
et/et	5.1420	0.37104
Total	4.2828	0.22702

Grafica3. Comparación de medias los índices esplénicos entre las diferentes cepas de ratones.



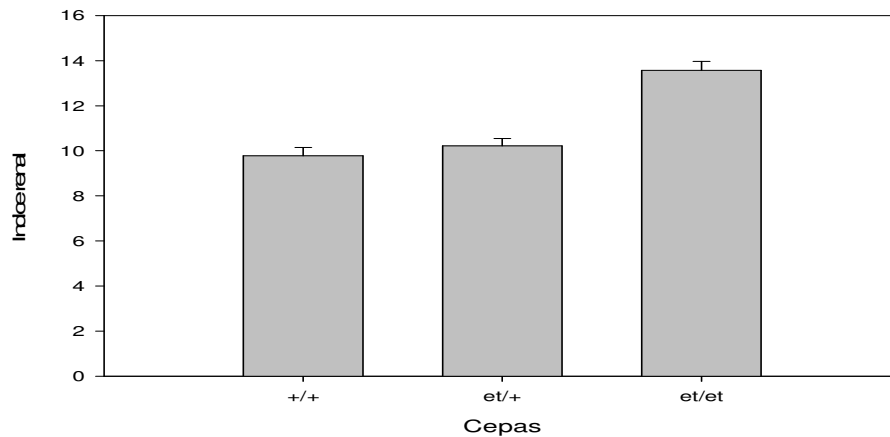
Índice hepático		
Cepa	Media	Error estándar
+/+	43.4740	2.40759
et/+	46.6620	1.70697
et/et	51.0270	2.21983
Total	47.0543	1.31959

Grafica4. Comparación de medias de los índices hepáticos entre las diferentes cepas de ratones.



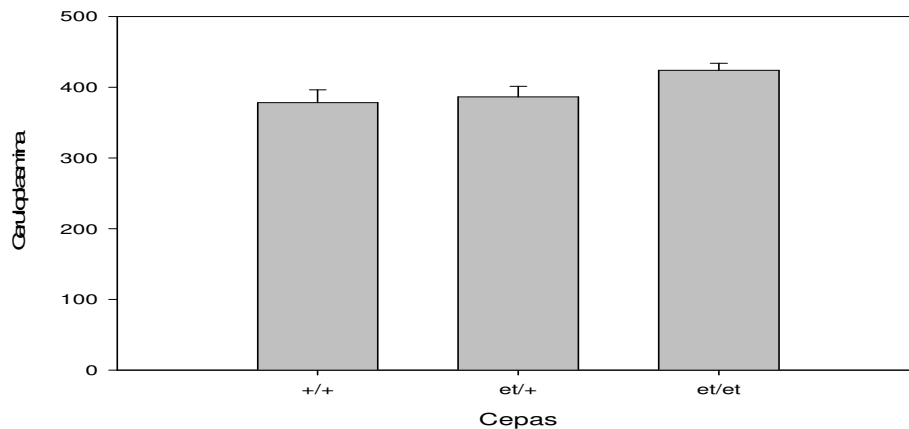
Índice renal		
Cepa	Media	Error estándar
+/+	9.7850	0.37557
et/+	10.2260	0.33241
et/et	13.5760	0.39144
Total	11.1957	0.37507

Grafica 5. Comparación de medias de los índices renales entre las diferentes cepas de ratones.



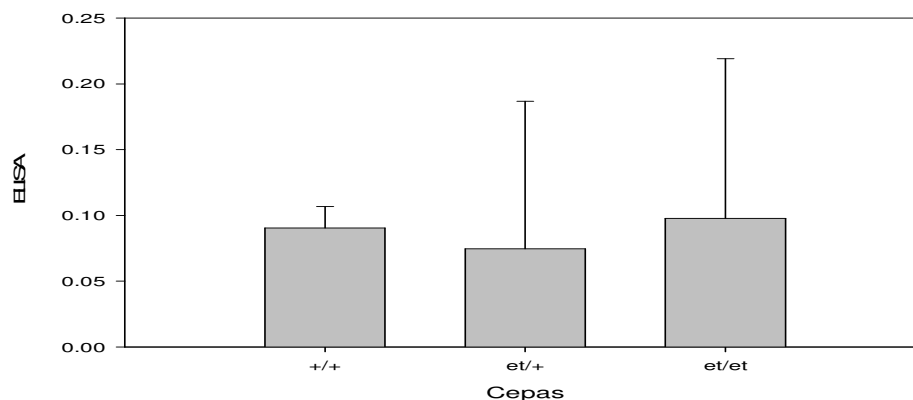
Ceruloplasmina		
Cepa	Media	Error estándar
+/+	378.0000	18.00000
et/+	386.1000	15.08675
et/et	423.9000	9.90000
Total	396.0000	9.00000

Grafica 6. Comparación de medias de los valores de ceruloplasmina entre las diferentes cepas de ratones.



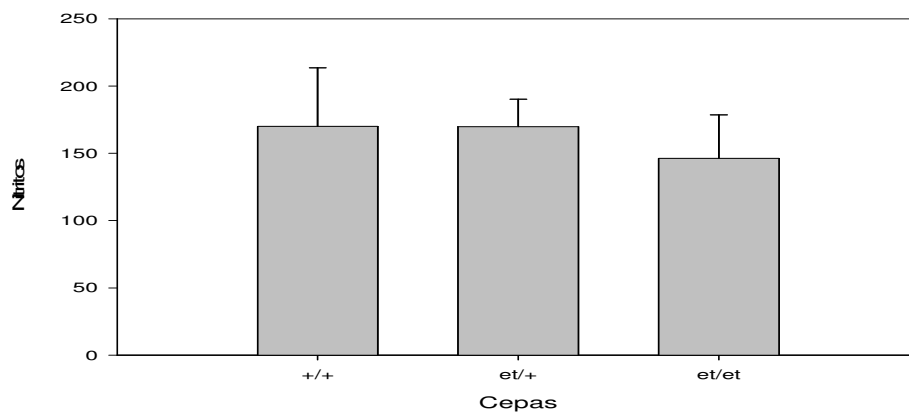
ELISA		
Cepa	Media	Error estándar
+/+	0.0904000	0.01644128
et/+	0.0746000	0.01122319
et/et	0.0977000	0.01215735
Total	0.0875667	0.07117920

Grafica7. Comparación de medias de los valores de ELISA entre las diferentes cepas de ratones.



Nitritos		
Cepa	Media	Error estándar
+/+	169.96200	43.664879
et/+	169.70300	20.462747
et/et	146.28700	32.309751
Total	161.98400	18.782793

Grafica. Comparación de medias de los valores de nitritos entre las diferentes cepas de ratones.



Prueba de diferencia significativa honesta (HSD) de Tukey para el índice esplénico, índice hepático, índice renal, ceruloplasmina, ELISA y nitritos vs cepa, con una $\alpha=0.05$.

Variable dependiente	Cepa	Cepa	Valor de P	Resultado
Índice esplénico	+/+	et/+	0.217	No hay diferencia significativa.
	+/+	et/et	0.004	Hay diferencia significativa.
	et/+	+/+	0.217	No hay diferencia significativa.
	et/+	et/et	0.170	No hay diferencia significativa.
	et/et	+/+	0.004	Hay diferencia significativa.
	et/et	et/+	0.170	No hay diferencia significativa.
Índice hepático	+/+	et/+	0.548	No hay diferencia significativa.
	+/+	et/et	0.047	Hay diferencia significativa.
	et/+	+/+	0.548	No hay diferencia significativa.
	et/+	et/et	0.332	No hay diferencia significativa.
	et/et	+/+	0.047	Hay diferencia significativa.
	et/et	et/+	0.332	No hay diferencia significativa.
Índice renal	+/+	et/+	0.676	No hay diferencia significativa.
	+/+	et/et	0.000	Hay diferencia significativa.
	et/+	+/+	0.076	No hay diferencia significativa.
	et/+	et/et	0.000	Hay diferencia significativa.
	et/et	+/+	0.000	Hay diferencia significativa.

	et/et	et/+	0.000	Hay diferencia significativa.
Ceruloplasmina	+/+	et/+	0.920	No hay diferencia significativa.
	+/+	et/et	0.088	No hay diferencia significativa.
	et/+	+/+	0.920	No hay diferencia significativa.
	et/+	et/et	0.183	No hay diferencia significativa.
	et/et	+/+	0.088	No hay diferencia significativa.
	et/et	et/+	0.183	No hay diferencia significativa.
ELISA	+/+	et/+	0.688	No hay diferencia significativa.
	+/+	et/et	0.922	No hay diferencia significativa.
	et/+	+/+	0.688	No hay diferencia significativa.
	et/+	et/et	0.456	No hay diferencia significativa.
	et/et	+/+	0.922	No hay diferencia significativa.
	et/et	et/+	0.456	No hay diferencia significativa.
Nitritos	+/+	et/+	1.000	No hay diferencia significativa.
	+/+	et/et	0.872	No hay diferencia significativa.
	et/+	+/+	1.000	No hay diferencia significativa.
	et/+	et/et	0.875	No hay diferencia significativa.
	et/et	+/+	0.872	No hay diferencia significativa.
	et/et	et/+	0.875	No hay diferencia significativa.

Correlación de Spearman.

Diferencias significativas menores a 0.05 al realizar la correlación no paramétrica de una cola de Spearman, con una $P < 0.05$, realizando combinaciones de 2 parámetros.

Parámetro	Valor de P	Resultado
Lesión vs índice esplénico	0.039	Diferencia significativa.
Lesión vs índice hepático	0.012	Diferencia significativa.
Lesión vs índice renal	0.000	Diferencia significativa.
Lesión vs ceruloplasmina	0.035	Diferencia significativa.
Ceruloplasmina vs ELISA	0.041	Diferencia significativa.

12. Análisis de resultados

Se realizó el análisis comparativo de las medias para cada uno de los índices (índice esplénico, hepático y renal) en cada una de las cepas (+/+ , et/+ y et/et), encontrando que para los tres tipos de índices analizados la cepa et/et es mayor. Siendo significativa según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para las cepas:
+/+ vs et/et en el índice esplénico con una $p= 0.004$
+/+ vs et/et en el índice hepático con una $p= 0.047$
+/+ vs et/et y +/et vs et/et en el índice renal con una $p=0.000$ para ambas.

Siendo la cepa de ratones +/+ nuestro control positivo y encontrando que el índice esplénico, hepático y renal está aumentado para la cepa et/et, esto se debe probablemente al daño producido por la autorespuesta, un proceso inflamatorio y el consiguiente infiltrado celular expuesto con anterioridad para el S.S en la literatura, descrito como padecimiento sistémico, así como la CBP se correlaciona con el aumento del índice hepático, ya que en ésta el hígado sufre un aumento.

En la comparación de medias con respecto a los valores de ceruloplasmina se observa que la cepa et/et muestra un ligero aumento por encima de las otras dos cepas. No encontrando una significancia por la prueba de Tukey. En la CBP el transporte de cobre se ve interrumpido por la destrucción de los conductos biliares interlobulares y este se acumula en el hígado, la ceruloplasmina tiene como función el transporte de cobre, durante la CBP se incrementa la ceruloplasmina sérica como respuesta al acúmulo de cobre en el hígado.

Mediante la técnica de ELISA pudimos detectar los AMA con una sensibilidad del 98% y especificidad del 96%, observando que la cepa et/et presentó títulos ligeramente más altos en comparación con las otras cepas de ratones. No siendo significativo según la prueba de Tukey, pero si confirmando el probable diagnóstico de la CBP ya que estos anticuerpos se presentan en el 90-95% de los casos.

Se realizó la técnica de IET, como prueba confirmatoria al diagnóstico serológico de AMAS en los 10 sueros de la cepa et/et, obteniendo bandas correspondientes para el antígeno mitocondrial en los sueros 3, 4 y 10, siendo estos 3 sueros los que presentaron títulos más altos de anticuerpos antimitocondriales. Cabe mencionar que el suero fue insuficiente para realizar esta prueba, ya que fue la última en realizarse.

En cuanto a los cortes histológicos realizados, se observó la estructura normal del hígado en la cepa +/+ (control positivo) a diferencia del realizado a la cepa de ratones et/et (problema) observando un infiltrado de células inflamatorias característico de la CBP y proceso fibrótico importante alrededor de la vena central del lobulillo hepático y de los elementos de la triada portal. El tejido cicatrizal concuerda con el cuadro histopatológico de la CBP, originado a partir de una lesión provocada por la autorespuesta contra este órgano.

En lo que respecta a la correlación no paramétrica de Spearman, la pareja conformada por lesión- índice esplénico, presentó una correlación positiva ($p=0.039$) deduciendo así que mientras las lesiones en ojos agravan se presenta un aumento del bazo del ratón.

Del mismo modo se encontró una correlación positiva para el binomio lesión-índice hepático ($p=0.012$) y lesión-índice renal ($p=0.000$). Esto significa que los órganos involucrados aumentan en su tamaño a razón del aumento en la gravedad de las lesiones que presentan los ratones en los ojos (inflamación, catarata o pérdida), tomando en cuenta que las cepa control (+/+) y la cepa et/+ (portador) no presentaron lesión y que las lesiones en ojos solo se presentaron en la cepa et/et, se infiere que esta cepa de ratones presenta características similares a las presentes en el S.S y que a razón de que se incrementa la respuesta autoinmunitaria contra glándulas lagrimales se agrava la respuesta contra los órganos estudiados, específicamente el hígado que presenta un aumento considerable en su tamaño por la autoinmunidad generada por los AMAs, generando la lesión, inflamación y el posterior infiltrado linfocitario característico de la CBP.

Para el conjunto lesión-ceruloplasmina ($p=0.035$) se observó una correlación positiva, de una manera mas específica este conjunto muestra la relación entre la gravedad de la lesión en los ojos y el aumento de ceruloplasmina, es decir conforme la CBP se agudiza y los conductos interlobulares son destruidos, la ceruloplasmina sérica sufre un aumento conforme el cobre se acumula en el hígado. De igual forma se observó una correlación positiva para el binomio ceruloplasmina-ELISA ($p=0.041$), infiriendo que al mismo tiempo que los anticuerpos antimitocondriales (AMA) aumentan, se da el incremento de ceruloplasmina como consecuencia del daño hepático ocasionado por los mismos AMAs.

Comparando las tres cepas de estudio, se encontró que existen diferencias significativas entre ellas, específicamente entre las cepa +/+ (control positivo) y la cepa et/et, demostrando claramente que los ratones et/et presentan características similares a las observadas en el S.S y la CBP.

13. Conclusiones

- El hígado, riñón y bazo muestran un aumento en la cepa de ratones et/et en comparación con las cepas et/+ y +/+ por el proceso autoinmunitario, característico del SS en su forma secundaria como una manifestación sistémica.
- Los valores de AMAs determinados por la técnica de ELISA se encuentran elevados para la cepa et/et y esto fue confirmado por IET.
- Se observó destrucción de conductos biliares interlobulares en los cortes histológicos realizados a la cepa et/et, en contraste con la arquitectura normal que se observó en la cepa +/+.
- Los valores de ceruloplasmina en sangre se encuentran aumentados en la cepa et/et como consecuencia al daño hepático que sufre el ratón por una respuesta autoinmune.
- Las lesiones observadas en los ojos de los ratones et/et están correlacionadas con el aumento de tamaño del hígado, bazo y riñón, así como con los valores de ceruloplasmina de tal modo que entre más se presentan las lesiones y mayor gravedad tienen, aumenta el tamaño del órgano y los niveles de ceruloplasmina sérica.
- Todos los factores anteriores permiten inferir que la cepa de ratones et/et presenta características semejantes a las que se presentan en la Cirrosis biliar primaria y que forma parte de las manifestaciones sistémicas del Síndrome de Sjögren.
- La cepa de ratones et/et, por sus características, funge como modelo animal para el estudio del Síndrome de Sjögren y más particularmente de la Cirrosis biliar primaria.

Tabla de abreviaturas

°C	Grados centígrados
Ab	Anticuerpo
ADN	Acido Desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
AMA	Anticuerpos Antimitocondriales
ANA	Anticuerpos Antinucleares
CBP	Cirrosis Biliar Primaria
cm	Centímetros
Da	Daltons
IET	Inmunoelectrotransferencia
g	Gramos
h	Horas
KDa	Kilodaltons
L	Litros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mm	Milímetros
min.	Minutos
MPM	Marcador de Peso Molecular
N	Normalidad
NO	Oxido nítrico
NOS	Enzima sintetasa del óxido nítrico
r.p.m	Revoluciones por minuto
SS	Síndrome de Sjögren
V	Volts
WB	Wester-blot

14. Glosario

Albúmina: proteína que se encuentra en gran abundancia en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre. Es sintetizada en el hígado.

Anergia: incapacidad del organismo para reaccionar ante un alérgeno o antígeno que se le ha administrado.

Apoptosis: es uno de los principales tipos de muerte celular programada. Como tal es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada, a diferencia de la necrosis.

Artralgia: dolor en una o más articulaciones.

Células T: las células T pertenecen al grupo de glóbulos blancos conocidos como linfocitos. Los linfocitos T son los responsables de coordinar la respuesta inmune mediada por células, así como de funciones de cooperación para que se desarrollen todas las formas de respuestas inmunes, incluida la respuesta de anticuerpos por los linfocitos B.

Células B: los linfocitos B de los cuales depende la inmunidad mediada por anticuerpos, con actividad específica de fijación de antígenos. Las células B dan origen a las células plasmáticas que producen anticuerpos.

Ceruloplasmina: es una proteína fijadora de cobre sintetizada por el hígado y secretada a la circulación.

Colitis ulcerosa: enfermedad inflamatoria del colon (el intestino grueso) y del recto. Está caracterizada por la inflamación y ulceración de la pared interior del colon. Los síntomas típicos incluyen diarrea (algunas veces con sangre) y con frecuencia dolor abdominal.

Enfermedad de Addison: deficiencia hormonal causada por daño a la glándula adrenal lo que ocasiona una hipofunción o insuficiencia corticosuprarrenal primaria.

Enfermedad de Graves: tiroiditis autoinmune de etiología desconocida, que estimula la glándula tiroides, y es la causa de hipertiroidismo más común.

Esclerodermia: enfermedad del tejido conectivo difuso caracterizada por cambios en la piel, vasos sanguíneos, músculos esqueléticos y órganos internos.

Esclerosis múltiple: enfermedad crónica que debilita el sistema nervioso central, que afecta al cerebro y a la médula espinal. Es probablemente una enfermedad autoinmune, lo que significa que el cuerpo destruye por alguna razón sus propios tejidos, células o sustancias propias del cuerpo y las reconoce como sustancias extrañas.

Fibromialgia: condición caracterizada por la propagación de dolor en las articulaciones, los músculos, los tendones y otros tejidos blandos.

Gen autosómico recesivo: significa que se necesitan dos copias del gen para que la condición se manifieste, una heredada del padre y otra de la madre, que son portadores obligados.

Granulomatosa: Tumoración formada por tejido de granulación.

Hepatoesplenomegalia: crecimiento del hígado y bazo.

Lupus eritematoso sistémico: es una enfermedad autoinmune crónica. En ésta, el sistema inmunológico ataca a las células del organismo y los tejidos, produciendo inflamación y daño debido a la unión de autoanticuerpos a las células del organismo, y al depósito de complejos antígeno-anticuerpo.

Mialgia: dolor en uno o varios músculos.

Miastenia gravis: enfermedad neuromuscular autoinmune y crónica caracterizada por grados variables de debilidad de los músculos esqueléticos (voluntarios) del cuerpo.

Miositis: edema o inflamación de los músculos voluntarios (esqueléticos) que, por lo general, es producida por una lesión o una infección.

Oftalmia simpática: patología de la úvea, poco frecuente en la actualidad, que se desarrolla a partir de un traumatismo previo en el ojo dañado.

Penfigoide: comprende un grupo de enfermedades autoinmunes adquiridas caracterizadas por formación de ampollas subepidérmicas causadas por la síntesis de autoanticuerpos frente a un antígeno común, el antígeno del penfigoide ampoloso, producido por los queratinocitos basales.

Poliacrilamida: Gel sintético formado a partir de la polimerización de acrilamida, bisacrilamida, y catalizadores.

Polipéptido: péptido formado por una cadena simple de más de 10 aminoácidos y de menos de 50 aminoácidos. Varias cadenas de polipéptidos se pueden asociar para formar las proteínas.

Prurito: hormigueo peculiar o irritación incómoda de la piel que conlleva un deseo de rascar la parte en cuestión. Comúnmente es llamada picazón.

Síndrome de Goodpasture: enfermedad autoinmunitaria, perteneciente al grupo de enfermedades de hemorragia alveolar o pulmonar, que suele acabar en una enfermedad pulmonar intersticial y se caracteriza por la producción de anticuerpos antimembrana basal tanto del glomérulo renal como de los alveolos pulmonares.

Tiroiditis de Hashimoto: es una enfermedad congénita de carácter autoinmune (por auto- anticuerpos anti-tiroideos), causando una inflamación de la glándula tiroides.

Xantoma: afección cutánea caracterizada por la formación de placas o nódulos más o menos planos, amarillos, ligeramente elevados y de tamaño diverso. Generalmente dependen de una afectación del hígado o de un trastorno metabólico

15. Referencias

1. Sjögren H. Zur Kenntnis der tranendrusen acta ophthalmol kbbD 1933; 11-1-181.
2. Serán MA, Tu WH. Nephrogenic diabetes insipidus and other defects of renal tubular function in Sjögren syndrome *AM. J Med.* 1979; 66: 733-736.
3. Alspaugh, M.A.N. Talal and E.M: Differentiation and characterization of antibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 19; 216-222, 1976.
4. Helen Chapel, Meusen Haeney; *Inmunología clínica. Editorial Manual moderno S.A. México D.F 1989. pp. 238-249.*
5. Cañas C, Jiménez C, Restrepo JF, Rondón F, Peña M, Sánchez A, Iglesias A. Síndrome de Sjögren primario (estudio prospectivo para conocer las características clínicas en nuestro medio) *Rev. Col Reum* 1997; 4: 127-136.
6. Anaya JM, Correa PA, Mantilla RD. Síndrome de Sjögren primario. Características clínicas e inmunogenéticas. *Acata Med Col* 1999; 24:127-136.
7. G. Henriksson, R. Manthorpe and A. Bredberg. Antibodies to CD4 in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 2000; 39: 142-147.
8. Kirtava Z, Blomberg J, Bredberg A, Henriksson G, Jacobsson L, Manthorpe R. CD4+ T-lymphocytopenia without HIV infection: increased prevalence among patients with primary Sjögren's syndrome, *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13:609-16.
9. Laurence J. T-cell subsets in health, infectious disease, and idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. *Ann Intern Med* 1993; 119: 55-62.

10. Tristran G. Parslow, Daniel P. Stites, Abba I. Terr, John B. Imbaden; Inmunología básica y clínica. Edit. Manual moderno. 10^a. Edición. Año 2002; pags: 156-175, 269-278, 186-493.
11. Abul K. Abbas, Andrew H. Litchman, Jordan S. Pober. Inmunología celular y molecular. Editorial Americana McGraw-Hill. 2^a. Edición. Año 1995; 128-137, 148-149, 166-169, 179-181.
12. Rabin P, Engvall E. Perlmann P. Enzyme-Liked immunoabsorbent assay (ELISA). *Immunochemistry* 1971; vol. 8: 874-9.
13. Avrameas Guesdon. Brief general review of immunoenzyme techniques united d'immunocytochimie, Institute Pasteur (France), 1-25.
14. Wisdom Erlan. Enzyme immunoassay, *Clin Chemistry* 1976; 22 (8):1243.
15. Venkateson P, Waqkelin D. ELISASs for parasitologist or lies, damned lies and ELISAs. *Parasitol Today* 1993; 9 (6): 288-32.
16. Aníbal Margni R. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1997; 798-820, 869-922.
17. Engvall E, Permman P. Enzyme-Liked immunoabsorbent assay (ELISA) III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. of Immunol*, 1972; 109 (1): 129-135.
18. Nakamura RM, Voller A. Enzyme immunoassay heterogeneous and homogeneous systems. *Immunochemistry in handbook of experimental immunology*, 1986, Charper 27, Blakwell Scientific Publication.
19. Wright EP, Kager PA, Laarman JJ, Pondman KW, Mohammed EE. ELISA using intact promastigotes for immunodiagnostic of Kala-azar. *Transactions of the royal of tropical medicine and hygiene* 1985; 19, 344-350.

20. Prieto HS, Amich OS, Salve MM. Laboratorio clínico: principios generales. Madrid: Editorial Interamericana-McGraw-Hill, 1995: 394-412.
21. Cannon DL, Winkelmann JW, Henry RJ. Química clínica, Principios y técnicas. 2ª ed. Madrid: Editorial Interamericana, 1995: 63-69.
22. Zambrano SA. Inmunología. DF: Editorial Interamericana-McGraw-Hill, 1995:92.
23. Donal M, Stewart J, Inmunología. 2ª ed. DF: Editorial El Manual Moderno, 1995:312.
24. Towin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979; 76 (9): 4350-54.
25. Erickson PF, Minier LN, Lasher RS. Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their reuse in immunoautoradiographic detection of antigens. J. of Immunol Methods, 1982; 51: 241-49.
26. Pérez V. Enfermedades del hígado. 2ª ed. Buenos Aires: Editorial "El ateneo" Editores, 1982: 299-317.
27. Friedman M, Friedman LS, Sleisenger MH. Enfermedades gastrointestinales y hepáticas (fisiopatología, diagnóstico y tratamiento). 7ª ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 2004, Tomo II: 1566-1575.
28. Latuff AJ, Schaffner F, Popper H. Cirrosis hepática. Madrid: Editorial Científico-Médica, 1966: 1, 69-77.
29. Torres JB. Enfermedades de la vesícula y vías biliares. México: Editorial Mc Graw-Hill, 2004: 18-20.
30. Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. Manual of clinical laboratory immunology. 6ª ed. Washington, DC: Editorial ASM PRESS, 2000:1023-1026.

31. Flanagan SP, Nude. A new hairless gene with pleist effects in the Mouse. *Genet Res* 1996;8:295-309.
32. Pantelouris EM. Thymus rudiment of the athymic nude mouse. *Nature* 1975.256:491-309.
33. Constantopoulos, SH, PapadimitrioCS, Moustsopoulos HM. Respiratory manifestations in primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 19:216-22, 1976.
34. Moutsopoulos HM, Webber BL, Vlagopoulos TP, et al: Differences in the clinical manifestations of sicca syndrome in the presence and absence of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 66:733-736. 1979.
35. Worwood M, Taylor DM, Hunt AH. Copper and Manganese Concentrations in Biliary Cirrhosis of Liver. *Med. J (Brit)*. 1968; Agosto: 344-346.
36. Yamamoto K, Fazle Akbar MD, Masumoto T, Onji M. Increased nitric oxide (NO) production by antigen-presenting dendritic cells is responsible for low allergenic mixed leucocyte reaction (MLR) in primary biliary cirrhosis (PBC). *Blackwell Science (Japan)*. 1998; 114: 94-101.
37. Das D, Tapryal N, Goswami SK, Fox, PL, Mukhopadhy CK. Regulation of ceruloplasmin in human hepatic cells by redox active copper: identification of a novel AP-1 site in the ceruloplasmin gene. *Biochem J*. 2007; 402: 135-141.
38. Hokari A, Zeniya M, Esumi H, Kawabe T, Gershwin ME, Toda G. Detection of serum nitrite and nitrate in primary biliary cirrhosis: possible role of nitric oxide in bile duct injury. *Pub Med*. 2002; 17(3): 308-315.
39. Sogawa K, Yamada T, Suzuki Y, Masaki T, Watanabe S, Uchida Y et al. Elevation of ceruloplasmin activity involved in changes of hepatic metal concentration in primary biliary cirrhosis. *Pub Med*. 1994; 84(3): 367-370.
40. Harold H, Lindner MD. *Anatomía. México: El manual moderno*; 1990.

41. Geneser F. Histología sobre bases biomoleculares. 3^{ra} ed. Buenos Aires: Editorial médica Panamericana; 2000.
42. Stauton E, Todd WE, Mason HS, Van Bruggen JT. Bioquímica medica. 4^{ta} ed. México: Interamericana; 1966.
43. Chandrasoma P, Cliver MD, Taylor R. Patología general. México: El manual moderno; 1994.
44. Robbins S L, Vinoy K, Ramzi S C. Patología estructural y funcional. México: Interamericana-McGraw-Hill; 2000.
45. Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. 5^{ta} ed. Madrid: Harcourt; 2000.
46. Delves J P, Roitt I M. Inmunología fundamental. 10^a ed. Argentina: Panamericana; 2003.
47. Lara-Hernández MA. Hallazgos clínicos asociados al síndrome de Sjögren en el ratón alopecico CD1 et/et. Tesis de licenciatura. México D. F. FES-Zaragoza. UNAM, 2000.
48. Michael H. Ross, Ph.D. Lynn J Romrell, Ph.D Gordon I. Kaye, Ph.D. Histología texto y atlas a color. 3^a ed. México: Panamericana; 1997: 104-113.
49. Banks, W.J. Histología Veterinaria aplicada. 1^a ed. México: El manual moderno; 1996: 33-66.
50. Boya V.J. Atlas de histología y organografía microscópica. 1^a ed. España: Interamericana; 1996: 255-256, 262-263.
51. Alexander EL, Arnett FC, Provest TT, Steven MB. Sjögren's syndrome: association of anti Ro(SSA) antibodies with vasculitis hematologic abnormalities and serologic hyperreactivity. Ann Intern Med 1983; 98: 155-159.
52. Marroquín-Segura R, Martínez RCF, García BMM *et al.* Anticuerpos anti-Ro/ssa. Anti-La/ssb y anticuerpos anti fosfolípidos, en suero de ratones mutantes et/et que muestra exocrinopatía. Vet Mex 2007; 3^o: 347-357.

53. Marroquín-Segura R, Lara HMA, Calvillo ER, *et al.* Exocrinopatía mostrada en el ratón hipotímico CD1 *et/et* que semeja el Síndrome de Sjögren. *Vet Mex* 2003; 34: 129-141.
54. Rosas P, Castellanos P, Dominguez R. The existence of spontaneous hair less (nude) hypotymic mutant mice from the CD1 stain, reared under conventional animal house conditions. *Med Sci Res* 1987; 15: 553-554.
55. Basurto-Alcántara FJ, Márquez DMJ, Rosas SP *et al.* Comparación de las constantes fisiológicas sanguíneas de los ratones CD1, heterocigótico *et/+* y desnudo *et/et*. *Vest Méx* 2000; 31: 209-216.