

79



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BUSQUEDA DE ANTICUERPOS ANTI-LA Y ANTI-RO EN SUERO DE RATONES CD1 ET/ET

T E S I S

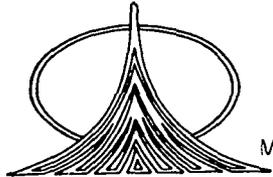
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

VITE GUTIERREZ MARY LANDY

DIRECTOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA
ASESOR: M.C. RICARDO CALVILLO ESPARZA



MEXICO, D.F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A Dios:

Por darme paciencia, coraje para
llegar

a la meta que me impuse

A mis padres:

A quienes les debo la vida, gracias
por sus sabios consejos que me
inculcaron de llegar a la meta
siempre por más que difícil que
esta fuera y ser el sendero que
ilumina mi vida.

A mis hermanas:

Mediante el apoyo, cariño,
comprensión, gracias por estar
conmigo en todos los buenos y
malos momentos que hemos pasado
juntas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

Al Doctor Marroquín:

A quien le agradezco los bellos momentos,

sabios consejos, por ser un excelente guía en la elaboración de esta tesis y lo más importante por ser un excelente amigo.

A todos mis amigos:

Por sus consejos, regaños, paciencia, amistad no tengo palabras para expresar

si cada uno de ustedes lo importante que han caminado juntos conmigo de la mano a

la meta. A ustedes con cariño

- ❖ Antonieta Reyes
- ❖ Guadalupe Razumoff
- ❖ Enrique Escalera
- ❖ Daniel Rojas
- ❖ Dolores Arango
- ❖ César Roquero
- ❖ Amancio Hernández

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

- ❖ Dora Quintana
- ❖ Silvia Sánchez
- ❖ Arturo Cano
- ❖ Martha Ortiz
- ❖ Soraida Rojas
- ❖ Adea Ortiz
- ❖ Silvia Cruz
- ❖ Laura Ventura
- ❖ Lara Jiménez

A mis sinodales:

Les agradezco a cada uno de
ustedes por el
granito de arena que pusieron
para mi formación
profesional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De alguna manera no puedo creer
que haya alluras que no puedan ser
escaladas por el hombre que conoce
Los secretos para hacer sus sueños
Realidad.

Este secreto especial puede ser
Resumido en cuatro 'Cs' y son

- ❖ Curiosidad
- ❖ Confianza
- ❖ Constancia
- ❖ Coraje

La más grande de todas es la confianza,
Cuando creas en algo, cretto con todo,
Implicitamente y sin lugar a dudas.

Walt Disney

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El ganador siempre es parte de la respuesta

El perdedor siempre es parte del problema

El ganador siempre tiene un programa

El perdedor siempre tiene una excusa

El ganador dice: permíteme ayudarlo

El perdedor dice: ese no es mi trabajo

El ganador ve una respuesta para cada problema

El perdedor siempre ve problemas en cada respuesta

El ganador dice: puede ser difícil pero no imposible

El perdedor dice: puede ser posible pero es

Muy difícil

¡É un ganador!

Autor desconocido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta tesis fue realizada en
el laboratorio de
Inmunología L-313 bajo
la supervisión del Dr.
Rubén Marroquín Segura
En la Facultad de
Estudios Superiores
Zaragoza, campus II

1

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN.

A partir de timos de ternera joven y separando el estroma de la grasa fueron extraídos los antígenos Ro y La, se purificaron realizando precipitaciones con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 66%. El precipitado se lavó y fue sometido a tratamiento con mercaptoetanol y yodoacetamida. Se pasó por una columna de Sephadex G50-100 que fue previamente calibrada con ovoalbúmina y albúmina sérica bovina (BSA). Se seleccionaron 2 picos que correspondían a los antígenos Ro y La. Se liofilizaron y resuspendieron en 2.5 mL. Se determinó la concentración de proteínas, por el método de Lowry. Se realizó un corrimiento en geles de poliacrilamida al 7.5% y se observó una banda bien definida entre 52 - 60 kD. Se estandarizó la metodología de ELISA usando sueros de ratones hembras et/et, con alteraciones en glándulas. La concentración de antígeno óptima fue de $16\mu\text{g/mL}$ y las diluciones de los sueros de 1:100 y 1:200, la dilución del conjugado anti IgA fue de 1:500. Las muestras que resultaron positivas se les realizó una inmunolectrotransferencia, confirmando que el anticuerpo es específico para antígenos La y Ro comprendidos entre 52-60 kD.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Sjögren (SS) es un desorden crónico autoinmune que se caracteriza por la infiltración linfocitaria y atrofia acinar de células glandulares exócrinas, dando lugar a una disminución o ausencia de las secreciones (fundamentalmente glándulas lagrimales y salivares) con la consecuente sequedad de las mucosas.¹

Desde el punto de vista inmunológico se caracteriza fundamentalmente por su afección del sistema linfocitario, que oscila desde su activación hasta su evolución maligna. Esta hiperreactividad de las células B, se expresa básicamente a nivel glandular y está avalada por la síntesis local de IgG, IgM, de factor reumatoide y por la presencia de linfocitos T activos en el infiltrado linfocitario.^{2,5}

Otra característica importante del SS son las alteraciones de la inmunidad celular,⁶ ya que se presenta una citotoxicidad natural mediada por las células NK, neoplasias linfoides malignas, así, el estudio del SS presenta un interés adicional porque la característica más peculiar de esta infiltración es su potencialidad evolutiva desde una etapa de infiltración linfoide benigna hasta la neoplasia linfoide.

El riesgo de desarrollar neoplasias linfoides es similar en todos los subgrupos de SS, con un riesgo relativo de 43 veces superior a la población sana. Los signos clínicos de alarma son los que sugieren una hipertrofia linfoide sistémica o local, mientras que analíticamente lo sospecharemos ante una disminución en los títulos de IgM o por un aumento de la betaglobulina y de la titulación de los anticuerpos antinucleares (ANA) o por la demostración de un proceso monoclonal con cadenas libres en orina.⁷

En el síndrome de Sjögren lo que ocurre es que el sistema inmune pierde el control de sus funciones y se alteran sus propios mecanismos de autocontrol, por eso es caracterizado como una enfermedad crónica autoinmune. Esto da lugar a que un tipo de leucocito (linfocito) invade una serie de glándulas del cuerpo, como consecuencia de esta invasión y destrucción, estas glándulas dejan de funcionar, no producen secreciones importantes para el buen funcionamiento del organismo y las glándulas pueden quedar totalmente destruidas.

DEFINICIÓN

El síndrome de Sjögren es una enfermedad inflamatoria crónica de causa desconocida, que se caracteriza por la disminución en la secreción lacrimal y salival, lo cual origina queratoconjuntivitis sicca y xerostomía. Existe sequedad de ojos, boca, nariz, tráquea, bronquios, vagina y piel. En la mitad de los pacientes, la enfermedad se presenta como una enfermedad patológica primaria (síndrome

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CD1 et/et

primario de Sjögren). En la otra mitad, se observa en relación con artritis reumatoide u otra enfermedad del tejido conjuntivo. El 90% de los individuos con este síntoma es de sexo femenino. Aunque la edad promedio de inicio es a los 50 años, la enfermedad se puede presentar en niños.¹²

CLASIFICACIÓN

La clasificación del SS contempla dos formas esenciales:

1) Síndrome de Sjögren primario, definido por la demostración de queratoconjuntivitis sicca y xerostomía en ausencia de otro cuadro, se caracteriza por una inflamación crónica de las glándulas salivales y lagrimales con disminución de la secreción.

2) Síndrome de Sjögren secundario, cuando están presentes una xerostomía y /o una xerofstalmia en el contexto de una enfermedad autoinmune bien definida,⁹ junto a las características de diagnóstico descritas en el primario, se asocia la presencia de una enfermedad autoinmune, especialmente aquéllas que afectan al tejido conectivo como¹⁰:

1. Conectivitis mixta
2. Esclerodermia
3. Vasculitis
4. Crioglobulinemia mixta
5. Púrpura hipergammaglobulinemia
6. Hepatitis crónica activa
7. Artritis reumatoide
8. Enfermedad mixta del tejido conectivo
9. Tiroiditis de Hashimoto
10. Lupus eritematoso sistémico
11. Polimiositis
12. Hepatitis crónicas autoinmunes

MARCO TEÓRICO

HISTORIA

La historia del síndrome de Sjögren comienza en 1882, en un congreso llevado a cabo en Heidelberg (Alemania) donde el Dr. Leber presentó tres casos de pacientes con queratitis y sequedad de boca. Seis años después, el Dr. J. Von Mikulicz -Radecki, un médico cirujano presentó, a la sociedad médica de Königsberg el caso de un paciente de 42 años con hinchazón bilateral de las glándulas lagrimales y salivales, por este motivo se denominó inicialmente esta patología como enfermedad de Mikulicz. Poco tiempo después, el Dr. W.B. Hadden también presentó a la sociedad médica de Londres a una paciente de 65 años que desde hacía varios meses padecía de una sequedad bucal y lagrimal que se incrementaba gradualmente. El Dr. Hadden introdujo el término xerostomía.

En la década de los 50 y 60 se publicaron diferentes trabajos clínicos y en la década siguiente se documentaron diferencias clínicas y de laboratorio en pacientes que eran portadores o no de artritis reumatoidea. Estos dos grupos se diferencian por su perfil de autoanticuerpos y sus marcadores genéticos.¹¹

CAUSAS DEL SÍNDROME DE SJÖGREN (SS)

El SS es una enfermedad crónica autoinmune, por lo que el sistema inmunológico reacciona contra su propio cuerpo, destruyendo las glándulas exócrinas (secretoras de mucus). Esto produce la disminución o falta de producción de lágrimas y saliva porque las glándulas encargadas de producir estas secreciones han sido invadidas por linfocitos y por lo tanto su función está disminuida o anulada.

Los pacientes con SS tienen auto-anticuerpos en la sangre lo cual sugiere que su sistema inmunológico está reaccionando contra sus propios tejidos. La causa es desconocida pero se piensa que probablemente algún virus o factores hereditarios pudiera ser un factor desencadenante.¹³

FIISIOPATOLOGÍA E INMUNOPATOGENIA

Los dos mecanismos principales de la destrucción tisular en el síndrome de Sjögren son la infiltración linfocitaria y el depósito de inmunocomplejos. Además aproximadamente del 10% de estos pacientes desarrollan un proceso linfoproliferativo llamado pseudolinfoma. Este trastorno presenta muchas características histológicas similares al linfoma, aunque evoluciona clínicamente de forma benigna. En el paciente con síndrome de Sjögren se puede afectar prácticamente cualquier órgano y sistema. El proceso patológico es más intenso en las glándulas salivales y lagrimales, en las que se produce una infiltración progresiva por células mononucleares que habitualmente finaliza con una cicatrización completa. La afectación renal puede deberse a una nefritis intersticial linfocitaria o a una glomerulonefritis por inmunocomplejos. La afectación pulmonar se debe con mayor frecuencia a una neumonitis intersticial secundaria a la infiltración por células mononucleares, aunque también se puede producir lesiones nodulares debidas a pseudolinfoma. Los pacientes con síndrome de Sjögren también pueden desarrollar una vasculitis por inmunocomplejos, asociada en ocasiones a crioglobulinemia. Se han observado casos de tromboangitis obliterante, habitualmente en pacientes

con fenómeno de Raynaud preexistente. Las manifestaciones del sistema nervioso periférico y central en esta enfermedad parecen deberse a la inflamación de los vasos sanguíneos.

Los pacientes con síndrome de Sjögren presentan dos tipos principales de alteraciones inmunorreguladoras. La primera de ellas es una actividad anómala del sistema inmunitario celular. Esta alteración se pone de manifiesto por la intensa infiltración inflamatoria por células monoclonales que se observa en las glándulas salivales de estos pacientes. Estos infiltrados celulares están compuestos predominantemente por linfocitos T activados; no obstante también se puede detectar linfocitos B activados. Estos infiltrados de células mononucleares son los responsables de muchas de las manifestaciones clínicas del síndrome de Sjögren, como la intensa sequedad de la conjuntiva y mucosas, la nefritis intersticial, la neumonitis intersticial y la meningoencefalitis. El segundo trastorno inmunorregulador que presentan los pacientes con síndrome de Sjögren, es una alteración oligoclonal de células B. Esta activación produce hipergammaglobulinemia "picos" oligoclonales en la electroforesis de proteínas, elevación en los niveles de inmunocomplejos circulantes y producción de autoanticuerpos. Entre los anticuerpos que se pueden observar cabe citar el factor reumatoide, los SSA(anti- Ro) y el SSB (anti-La). Aunque no se ha aclarado el significado clínico exacto de estos y otros marcadores, parece ser que la mayoría de los pacientes con manifestaciones sistémicas graves de enfermedad de Sjögren son positivos para el SSA.

Se ha planteado la hipótesis de que los pacientes con síndrome de Sjögren tienen una respuesta inmunitaria anormal a uno o más antígenos no identificados, quizás antígenos virales o autoantígenos alterados por virus. Esta respuesta anormal se caracteriza por el exceso de actividad de las células B y células plasmáticas, lo cual se manifiesta por hipergammaglobulinemia policlonal y la producción de factor reumatoide, factores antinucleares, crioglobulinas y anticuerpos contra conducto salival . Los estudios de inmunofluorescencia han mostrado linfocitos B y T cooperadores y células plasmáticas que infiltran los tejidos dañados. Se sintetizan grandes cantidades de IgM e IgG por estos linfocitos infiltradores. En los pacientes con macroglobulinemia coexistente, se puede sintetizar IgM monoclonal en las glándulas salivales. El exceso en la actividad de las células B puede deberse a un defecto primario en estas o a regulación defectuosa por linfocitos T, ya que existen datos de disminución en la función de células T supresoras en pacientes con síndrome de Sjögren.¹⁴

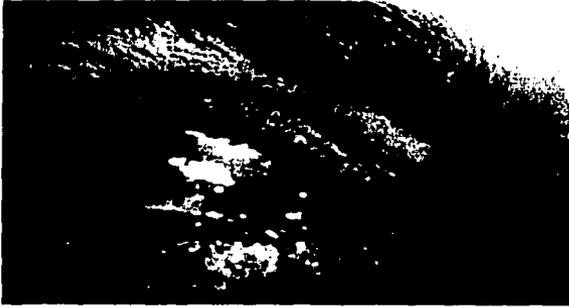
MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El padecimiento ataca con más frecuencia a mujeres que a hombres (9:1). Lo más común es que las glándulas salivales y lagrimales afectadas permanezcan de tamaño normal, pero pueden presentar crecimiento y endurecerse aunque no muestren hiperestesia.

OJOS

El paciente se queja de sensación de arenilla superficial y enrojecimiento, en ocasiones se despierta con los párpados pegajosos, situación que dura las primeras horas de la mañana. Es frecuente que el paciente no percibe la reducción real de la secreción lagrimal. La reseca conjuntival puede conducir a conjuntivitis, queratitis filamentosa, o la formación de erosiones corneales.

En ocasiones poco frecuentes, puede haber pérdida de la vista por la vascularización de la córnea.¹⁵



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 1. Manifestación Ocular : Obsérvese derrame subconjuntival

TUBO DIGESTIVO

La resequedad de la boca interfiere con la formación y lubricación del bolo alimenticio. Hay dificultad tanto para la masticación como para la deglución. Algunos alimentos como las galletas secas se tornan inmanejables en la boca.

Los labios y la boca se tornan lisos, secos e hiperestésicos y el proceso carioso de las piezas dentarias se acelera.

Las secreciones gástricas y pancreática disminuyen, pero su deficiencia rara vez tiene significado clínico.¹⁵

ÁRBOL RESPIRATORIO

La disminución de la secreción de moco predispone a las infecciones e irritaciones del árbol respiratorio, tanto superior como inferior.¹⁵

RIÑONES

Cierta porción de pacientes atacados por el síndrome presentan disminución de la función tubular renal, por lo general, se hace perceptible como un ligero decrecimiento en las capacidades de acidificación y concentración de la orina. Es poco frecuente que esta manifestación se pueda agravar hasta conducir al paciente a una acidosis tubular renal metabólica o una diabetes insípida nefrogénica con un cuadro clínico completo.¹⁵

TRACTO GENITAL

La resequedad vaginal puede producir vaginitis atrófica y dispaurenia.¹⁵

TEJIDO LINFOIDE

En casos excepcionales, la hiperplasia del tejido linfoide avanza en forma que, desde el punto de vista histopatológico, parece haber un linfoma maligno, sin embargo, el tratamiento con corticosteroides puede producir su regresión "pseudolinfoma". Otros casos evolucionan hacia linfomas malignos verdaderos como el sarcoma reticular.¹⁵

CORAZÓN

Las alteraciones descritas a nivel de corazón se han ubicado en el endocardio, esta localización puede predisponer al desarrollo de endocarditis infecciosa o eventos embólicos.⁸

OTRAS MANIFESTACIONES

Ha sido descrita una amplia variedad de otras manifestaciones en relación al síndrome de Sjögren entre ellas, el fenómeno de Raynaud, linfadenopatía, esplenomegalia, neuropatía periférica, síndrome de hiperviscosidad, hiperglobulinémica y un aumento en la labilidad a reacciones de hipersensibilidad con medicamentos como la penicilina.¹⁵

DIAGNÓSTICO

-Las glándulas salivales se valoran con la exploración de isótopos, flujo salival y la sialografía secretora con colorante radiopaco para mostrarse manifestaciones de desorganización glandular como la visualización de focos de linfocitos, células plasmáticas asociadas a atrofia del tejido acinar.

-Otro estudio que se realiza es la centellografía salival con pertnecato de tecnecio ^{99m} revelando una disminución en función secretoria parótida.¹⁶

-Como prueba ocular es utilizada la tinción con solución de rosa de bengala, que es muy específica donde la porción del ojo ocupa la abertura palpebral ésta atrae el colorante observándose triángulos rojos en sus bases dirigidas hacia el limbo.

-La prueba de Schirmer que mide la cantidad de lágrimas secretadas en 5 minutos como respuesta a una irritación producida por una tira de papel filtro que se coloca abajo de cada párpado.¹⁷



Fig. 2. Prueba de Schirmer

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-Otra prueba más a realizarse, es la histología de infiltración linfocítica en muestra de glándulas salivales labiales menores esta es una prueba sensible, específica para el síndrome de Sjögren.

-La biopsia de tejido bucal es una operación menor que proporciona una muestra excelente para la detección de las alteraciones histopatológicas de las glándulas mucosas.

-La instalación de gotas de rosa de bengala o fluoresceína en el saco conjuntival revela las ulceraciones de la córnea que se producen en la queratoconjuntivitis sicca.

-La realización de la exploración con lámpara de hendidura muestra depósitos de moco y epitelio corneal adheridos a la córnea y a la concentración bulbar (queratitís filamentosa).

TRATAMIENTO

BUCALES

Se deberá insistir a los pacientes que mantengan una higiene bucal perfecta, con uso regular de pasta dental fluorada, lavados bucales y evaluaciones dentales regulares. Los sorbos frecuentes de agua y el uso de goma de mascar sin azúcar o dulces para estimular la secreción salival, en ocasiones ayuda a aliviar la xerostomía. Muchos individuos encuentran que son de ayuda las preparaciones de saliva artificial en aerosol. Un humidecedor en la recámara auxiliará a disminuir la xerostomía nocturna y sequedad nasal. El tratamiento más eficaz contra la candidiasis bucal son los trociscos de nistatina.¹⁸

OJOS

El tratamiento es sintomático. El uso frecuente de metilcelulosa al 1% en gotas oftálmicas "lágrimas artificiales" y enjuagues bucales con glicerina pueden ser de gran utilidad. Los ojos resecos son particularmente vulnerables al viento y polvo. Por ello, en los casos graves puede ser recomendable usar anteojos panorámicos.

CUADRO CLÍNICO

La linfoproliferación significativa está confinada al tejido glandular salival, lagrimal y otras mucosas resultando un pronóstico crónico y benigno, junto con la xerostomía y xeroftalmia. Existen cuadros de esplenomegalia, leucopenia, vasculitis con úlceras en piernas, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica, aclorhidria gástrica, pancreatitis, glomerulonefritis, etc. En raras veces hay desarrollo de sarcoma inmunoblástico o macroglobulinemia de Waldenström. El pronóstico se encuentra relacionado a trastornos del tejido conjuntivo, la muerte se debe a infecciones pulmonares rara vez a insuficiencias renales.

En raras ocasiones la resequeidad de los ojos puede volverse problemática o bien, conducir a secuelas más graves, y con una frecuencia aun menor pueden aparecer complicaciones renales, amiloidosis, o formaciones neoplásicas.¹⁹

Las manifestaciones clínicas del síndrome de Sjögren atacan a un gran espectro de enfermedades características cuya situación ha llegado a algunos autores a la clasificación de las mismas. Por último, si se considera globalmente como pronóstico benigno, aunque está aún por definirse, algunos pacientes pueden desarrollar procesos linfocitoproliferativos, como pseudolinfoma, linfoma B, mieloma, reticulosarcoma u otras neoplasias malignas²⁷.

INCIDENCIA Y PREVALENCIA

El Dr. Sjögren describió al SS como una enfermedad rara con una prevalencia del 0.05%. En 1971, el Dr. M.A. Sheam estimó la prevalencia del SS primario y secundario entre el 0.2 y el 0.44% respectivamente. Existen sin embargo, evidencias crecientes de que la prevalencia del SS supera a la de la artritis reumatoide que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. En la década de los 70's y 80's los estudios llevados a cabo en poblaciones geriátricas mostraron una prevalencia que oscila en un rango del 2 al 4.8%. Un estudio sueco que evaluó la prevalencia del SS en personas de 52 a 72 años determinó que la misma alcanzó al 2.7%. Una reciente publicación china registró una

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CD1 et/et

prevalencia del 0.8%. Puede concluirse que el SS parece ser un desorden común que tiene una amplia distribución mundial. En el caso del SS secundario, aproximadamente el 30% de los pacientes con artritis reumatoidea, un 10% de los que padecen lupus y un 20% de los que sufren esclerodermia presentan este síndrome.²⁰

ANTÍGENO Ro y La

Las alteraciones serológicas autoinmunitarias características del síndrome de Sjögren son la presencia de anticuerpos contra unas proteínas denominadas Ro/SS-A y La/SS-B, es decir, anti-Ro/SSA y anti-La/SSB. La integración de este concepto surge de los trabajos iniciales de Anderson et al, quienes en 1961, describieron unas precipitinas que denominaron Sjd y Ha; posteriormente Reichlin describió un antígeno soluble obtenido de extractos citoplásmicos humanos que fue denominado Ro; y mediante el cual se detectaron anticuerpos en un paciente con lupus eritematoso sistémico cuyas iniciales eran precisamente Ro, en 1974, Mattioli y Reichlin describieron otro sistema de antígeno-anticuerpo que denominaron La/anti-La. Un año después, en 1975, Alspaugh y Tan dieron a conocer tres sistemas de precipitinas en pacientes con Síndrome de Sjögren solo o asociado a artritis reumatoide, mismas que denominaron A, B, C, y en su siguiente comunicación como SS-A, SS-B, SS-RA, las dos primeras, SS-A, y SS-B, fueron relacionadas en gran medida desde el principio con el síndrome de Sjögren no asociado a artritis reumatoide. En 1979, mediante un estudio en colaboración, se aclaró que los antígenos Ro/SSA y La/SSB/Ha, respectivamente, eran inmunológicamente idénticos.

ANTICUERPOS SS-B

La detección de la presencia de los anticuerpos SS-B en los sueros de pacientes con síndrome de Sjögren primario es muy variado y oscila entre el 40% y el 96%. Estos autoanticuerpos fueron descritos en una población de pacientes con SLE.

Los anticuerpos SS-B constituyen una variedad de autoanticuerpos, que reconocen diferentes moléculas de SS-B, algunas de las cuales han sido mapeadas y se conocen los sitios de unión para el anticuerpo. Recientemente se ha demostrado que la formación de anticuerpos anti-SSB parece estar dirigida, en un comienzo hacia la porción aminoterminal de la molécula SS-B, desarrollándose finalmente una respuesta autoinmune contra la molécula entera.²⁹

ANTICUERPOS SS-A

Son fosfoproteínas cuyo peso molecular es de 52kD.

La técnica usualmente utilizada en el laboratorio para la detección de estos anticuerpos es la doble difusión en agar (Ouchterlony).²⁹

ANOMALÍAS HUMORALES

Se aprecia hipergammaglobulinemia en la mitad de los casos con SS. Aunque la electroforesis de proteínas séricas en general muestra hipergammaglobulinemia policlonal, algunos sujetos desarrollan paraproteinemia monoclonal IgM, generalmente del tipo kappa. Las personas quienes desarrollan linfoma, en ocasiones presentan hipogammaglobulinemia grave y muestran desaparición de

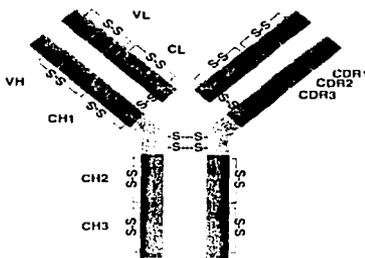
autoanticuerpos . Los factores reumatoídes se pueden detectar por la prueba de fijación de látex en 90% de aquellos con síndrome de Sjögren. Los anticuerpos antinucleares (ANA) en patrón homogéneo o de puntos, se encuentra en un 70% de los individuos. Muchos de estos anticuerpos antinucleares se dirigen contra antígenos nucleares extraíbles por ácido. Los anticuerpos contra uno de tales antígenos denominado SS-B , son relativamente específicos para aquellos de síndrome de Sjögren primario. Los anticuerpos contra un segundo antígeno nuclear extraíble por ácido SS-A, pueden encontrarse en el síndrome de Sjögren solo o en el síndrome de Sjögren vinculado con LES (Lupus Eritematoso Sistémico).²⁸

GENERALIDADES DE LOS ANTICUERPOS

Son proteínas que al ser estimuladas por un antígeno reaccionan específicamente con el inductor y como consecuencia de esta reacción haya una neutralización. Son glicoproteínas y su contenido de carbohidratos varía en cada una de sus clases, las diferentes clases de inmunoglobulina forman una población heterogénea de moléculas que son de origen policlonal.³⁸

INMUNOGLOBULINAS

Las inmunoglobulinas se clasifican de acuerdo a sus propiedades antigénicas. Existen 5 clases que son: IgG, IgE, IgM, IgA, IgD. Están formadas de cadenas, las cadenas ligeras (H) que tienen dos variedades antigénicas: las cadenas κ , λ , y las pesadas (L). Cada monómero de la molécula de la inmunoglobulina cuenta con dos cadenas L unidas a las cadenas H por puentes de disulfuro.³²



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 3. Representación esquemática de una inmunoglobulina: VL y VH son regiones variables. cadenas ligera y pesada respectivamente; CL, región constante, cadena ligera; CH1 y CH2 y CH3 dominios de la región constante, cadena pesada. CDR, región determinante de complementariedad, SS, puentes de disulfuro.

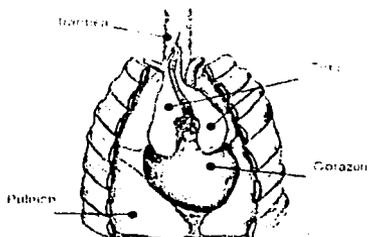
TIMO

Es una glándula donde se desarrolla la ontogenia la cual aumenta de tamaño desde la vida fetal hasta la pubertad está organizado en dos compartimientos principales: la médula y la corteza es esta última la

más predominante de los dos contiene numerosos timocitos y pocos macrófagos; que tienden a concentrarse en donde se realiza la diferenciación tímica.

El timo es el primer órgano linfóide que aparece en la mayoría de los mamíferos de todas las especies, es una glándula de secreción interna que produce hormonas tímicas: timosina, factor tímico y tímopoyetina poseedoras del factor de maduración para producción de las células T.³³

Es importante para la maduración de los linfocitos no diferenciados en células T inmunocompetentes.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 4. El timo es órgano bilobulado de forma piramidal. Es el órgano más importante del aparato inmunológico, mantiene un papel central de las funciones inmunológicas del individuo.¹⁷

De acuerdo a la selección clonal propuesta por Burnet (1957-1959) propone que las clonas vírgenes de inmunocitos circulan en el organismo esperando el contacto con sus antígenos específicos, desde lo cual experimentan una transformación blástica y se dividen repetidas veces para producir miles de células descendientes con la misma especificidad. Este concepto fue seguido por el postulado de Jerne, de que las moléculas de anticuerpo no son moldeadas sobre una plantilla formada por un antígeno invasor sino que ya están preformadas, esperando ser seleccionadas por su antígeno complementario. En otras palabras, los antígenos se producen antes de la exposición a los antígenos y la especificidad de su sitio de combinación es determinada únicamente por genes estructurales sobre las cuales los antígenos no tienen más influencia para inducir la proliferación de la clona que expresa el idiotipo específico.³⁸

INMUNORREGULACIÓN EN EL SÍNDROME DE SJÖGREN

La presencia de hipergammaglobulinemia policlonal, autoanticuerpos no organoespecíficos y anticuerpo de antígenos extraíbles sugieren que existe una hiperreactividad de células "B" con o sin anomalías de inmunorregulación de células T con actividad supresora. Se ha observado que los pacientes con Síndrome de Sjögren tienen un número absoluto de linfocitos, células T y B normales.³⁹

DISTRIBUCIÓN MOLECULAR Y PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

Los anticuerpos se encuentran unidos en la membrana citoplasmática (retículo endoplásmico y aparato de Golgi) sobre la superficie de los linfocitos B.

Se les encuentra a los anticuerpos sobre la superficie de las células efectoras, como los fagocitos mononucleares, las células agresoras naturales NK, las células cebadas (mastocitos) que aunque no sintetizan anticuerpos pero tienen receptores específicos para unirse a los anticuerpos. Los anticuerpos se les encuentra en leche, moco.

PROTEÍNAS

Las proteínas son cadenas polipeptídicas muy grandes, constituidas por aminoácidos, unidos entre sí por enlaces peptídicos. Poseen diversas funciones biológicas y son importantes para el funcionamiento de la célula.³⁸

Las proteínas son frágiles por lo que la conformación original de las proteínas globulares, ésta sujeta a interacciones por diversas agentes químicos, físicos, sin que ocurran cambios en la secuencia de aminoácidos esta pérdida de la conformación original, se le llama desnaturalización.

Para poder aislar las proteínas puras es necesario romper las células para formar un extracto celular. La precipitación de globulinas se puede llevar a cabo con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, alcohol, sulfato de magnesio Mg (SO_4) entre otros. El sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tiene la ventaja de que sus soluciones saturadas, contienen grandes cantidades de sal y que su solubilidad se modifica poco con la temperatura. El fraccionamiento con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no requiere el ajuste exacto de pH.

Las desventajas del sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es que, la sal se debe remover por diálisis y este proceso requiere de 1 a 3 días y corre el riesgo de contaminación bacteriana y se recomienda que el sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sea puro, sin contaminantes de metales, ya que estos iones pueden ser unidos firmemente por algunas proteínas y pueden catalizar reacciones de oxidación. La precipitación de la gammaglobulina por este método se basa en el fenómeno de salting out que es una deshidratación de la proteína por la sal de tal manera, que las moléculas de agua que recubren a las moléculas de anticuerpo, son desplazadas por los iones de sulfato, que además neutralizan a los grupos cargados de la proteína, la cual alcanza su punto isoeléctrico y precipita.

Las características de las proteínas son su origen, tamaño, forma y pueden separarse de los solutos de bajo peso molecular mediante diálisis, para ello se usa una membrana semipermeable que retiene las moléculas de proteína de alto peso molecular. Se considera una forma de filtración molecular que separa moléculas de acuerdo a su tamaño, utilizando membranas semipermeables que tienen poros de dimensiones inferiores a las macromoléculas, estos poros permiten la salida de moléculas pequeñas como catabolitos pequeños, sales, disolventes que se difunden a través de la membrana. Los materiales usados son: el celofán que es acetato de celulosa es la membrana más utilizada, aunque se usa también de nitrocelulosa.³⁹

PRUEBAS DE LABORATORIO

ELISA (*análisis de inmunoabsorbente unido a enzimas*)

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

Existen diversas variantes del método de ELISA; como son los métodos indirectos, directos en "sandwich" y el método de ELISA competitivo. Éstos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos a excepción del método indirecto con el que se detecta el anticuerpo.

En los métodos directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que se lleva la enzima. En cambio en los métodos indirectos el conjugado enzima-anticuerpo reacciona contra el primer anticuerpo, el cual ya reaccionó con el antígeno adsorbido en la fase sólida.

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CD1 et/et

En los métodos de ELISA "sandwich", el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con el antígeno que se ha unido a un primer anticuerpo, adsorbido a una fase sólida. El o los componentes que no reaccionaron se eliminan en los lavados por último se agrega el sustrato de la enzima y un cromógeno y se mide la intensidad del color desarrollado, el cual es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo.

El método de ELISA tiene aplicaciones muy variadas, por lo cual se hace muy versátil, se emplea en el diagnóstico de enfermedades infecciosas virales o parasitarias, cuantificación de hormonas, cuantificación de haptenos, titulación de anticuerpos en bajas concentraciones, determinación de isotipo específico de anticuerpos, etc.

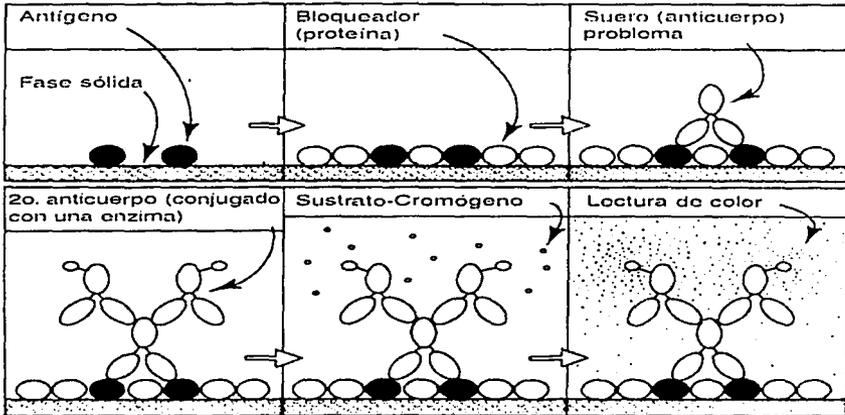
Las enzimas más empleadas en las pruebas de ELISA son: peroxidasa de rábano (PR), la fosfatasa alcalina (FA) y la β -D galactosidasa (BG) debido a su estabilidad y reproducibilidad de resultados. Los sustratos que se emplean para la enzima PR son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser reducidos dan productos incoloros, por lo que se acompañan de productos cromógenos, los cuales al ser oxidados en la reacción enzimática desarrollan color.

De éstos los más empleados son: orto-fenilendiamina, la diaminobencidina, orto-dianisidina, que continúan en forma soluble después de ser oxidados. El 1,4-cloronaftol se utiliza en las técnicas de ELISA en mancha (dot-ELISA) debido a su insolubilidad en solución acuosa, cuando se encuentra en forma oxidada. Los sustratos empleados para la FA son: para-nitro-fenil fosfato que produce color al ser degradado por la enzima a temperaturas mayores de 30 °C, el 5-cloro-4-bromo -3 indol fosfato se usa como sustrato de FA que inhibe por iones fosfatos libres presentes en soluciones amortiguadoras de salina fosfatos, por lo que es recomendable utilizar soluciones de Tris-HCl.

Los sustratos usados para BG son la para-nitrofenil- β -D galactósido y el 4-metilumbeliferil- β -galactósido. Esta enzima no se encuentra en el suero, pero puede encontrarse en algunos microorganismos.

En comparación con el radioinmunoensayo (RIA), las pruebas de ELISA presentan algunas ventajas, por ejemplo: es más económico, no presenta el inconveniente de la eliminación de desechos radioactivos, los conjugados antígeno-anticuerpo son generalmente más estables durante períodos de tiempo más estables durante período de tiempo más prolongado, es un método muy sensible, específico, simple, reproducible detecta antígenos- anticuerpos en el orden de ng.³⁰

El fundamento de ELISA se basó en que se emplean anticuerpos antiglobulina (método indirecto) marcadas con una enzima que desarrolla una reacción colorida (peroxidasa) que emplea como sustrato H₂O₂ y como cromógeno la o-fenilendiamina. Las proteínas tienen una cualidad que es la de pegarse a esferas, discos, concavidades con placas de plástico a un pH de 9.0 a 10 también se pegan a los tubos esto ayuda a que las concentraciones de antígenos en pequeñas cantidades.²¹



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 5. Pasos que se llevan a cabo en la técnica de ELISA.

TAMICES MOLECULARES

Las técnicas de cromatografía son en la actualidad los métodos más utilizados para fraccionamiento de proteínas. En 1959 Porath y Flodin introdujeron la filtración en gel tipo el SEPHADEX (dextranas de separación de Pharmacia). La filtración en gel separa moléculas de acuerdo a su tamaño. El gel está compuesto de esferitas formadas por una malla de dextranas de tal manera que las moléculas más grandes que los poros de las esferitas no pueden entrar y se excluyen, son las que eluyen primero. Las moléculas más pequeñas penetran en los poros en diferentes grados de acuerdo a su forma y tamaño y eluyen saliendo las más grandes primero y al final las más pequeñas.

El volumen de exclusión está dado en el número de SEPHADEX v.gr. SEPHADEX G-100 excluye las moléculas de más de 100kD.

La cromatografía de intercambio iónico separa moléculas mediante el uso de las diferencias en sus cargas eléctricas.

La unidad fundamental del gel es un grupo cargado absorbido sobre una estructura soluble como la celulosa, dextranas entrecruzadas o polímeros de acrilamida. La dietilaminoetil celulosa (DEAE) grupo con carga positiva, se usa para separar a la IgG de conejo, absorbe a las proteínas séricas con carga negativa y deja en el sobrenadante a la IgG de donde se recupera. Mientras que la carboximetil con carga negativa se usa para separar moléculas con carga positiva.²²

Las mezclas de proteínas disueltas en buffer apropiado se deja fluir a lo largo de una columna de empaquetamiento con perlas, gránulos de material polimérico inerte con elevado grado de hidratación; que ha sido previamente lavado y equilibrado con una solución amortiguadora, el material más utilizado es el Sephadex biogel, el Sephadex es un derivado comercial de la agarosa y dextrana y el biogel es un derivado comercial de la poli(acrilamida), en el Sephadex, están preparados estos derivados con diferente grado de porosidad interna.

Las proteínas que tienen diferentes pesos moleculares en columnas penetran en los poros internos de gránulos en grados diferentes de intensidad y descendiendo a distintas velocidades, si el peso de la

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CD1 et/et

proteína es muy grande entonces no penetrará en los poros de las partículas se dice que son excluidas permanciendo en el volumen de exclusión de la columna mientras que, las proteínas muy pequeñas que penetran se quedan obstaculizadas por el poro de las perlas y las proteínas de tamaño intermedio serán excluidas dependiendo de las partículas en un grado que dependerá de sus dimensiones por eso se le llama cromatografía de exclusión.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Es un método analítico de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida.

Al tener una mezcla de antígenos extraídos del agente infectante se separan sus diversos componentes por electroforesis en gel de poliacrilamida (bajo condiciones reductoras) y son transferidas por electroforesis a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se cortan en tiras verticales y se incuban en sueros de individuos para poder observar la interacción con éstos formando complejos estables. Los anticuerpos que forman parte de estos complejos se identifican con un segundo anticuerpo dirigido contra globulinas humanas y conjugado con una enzima. Una adición posterior del sustrato de la enzima y un cromógeno insoluble hará la formación de un producto colorido e insoluble, observándose un precipitado en forma de bandas coloridas en las zonas de interacción con el antígeno -anticuerpo³⁷.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome de Sjögren es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología desconocida, caracterizada por la disminución en la secreción lagrimal, salival, vaginal, se necesitan tres criterios clínicos para diagnosticarlo que son:

- A) Xeroftalmia
- B) Xerostomía
- C) Poliartritis reumatoide

En muchos pacientes se observan anticuerpos antinucleares anti-La (SS-B) y anti-Ro (SS-A) los cuales van produciendo un infiltrado celular, que será una característica inmunitaria de la enfermedad.

Existe la necesidad de contar con un modelo animal para experimentar las terapias para el Síndrome de Sjögren y posteriormente extrapolarlas a los humanos. Para ello se estudiaron los ratones CD1 *et/et* que presentan las características siguientes: son desnudos y sin pelo, mortalidad alta, vida corta, fertilidad baja, promedio de vida de dos años.

OBJETIVOS

1. Obtener los antígenos La y Ro a partir de timo de ternera.
2. Purificar estos antígenos por precipitaciones con sales y tamices moleculares.
3. Buscar mediante la técnica de ELISA anticuerpos contra La y Ro en sueros de los ratones con glándulas alteradas (glándulas con índices bajos que nos indican retracción).
4. Identificar los antígenos Ro y La usando sueros de ratones con problemas de glándulas, mediante inmunoelectrotransferencia.

HIPÓTESIS

Los ratones et/et con alteraciones en glándulas similar al encontrado en el SS, deben poseer anticuerpos contra antígenos Ro y La, que son específicos en este síndrome.

TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio de tipo transversal, prospectivo y observacional.

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron ratones machos y hembras de varias edades de las cepas: et/et, et/+ y +/+.
Sacros de ratones que tienen un registro de peso de la glándulas, edad, lesiones en glándulas y en ojos y algunos con estudios histopatológicos.
Antígenos Ro y La obtenidos de timos de ternera joven .

TAMAÑO DE LA MUESTRA DE ESTUDIO

160 Ratones et/et, 20 Ratones et/+ y 20 Ratones +/+.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Ratones hembras y machos de 20 a 50 semanas.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Ratones del estudio que presenten infecciones, tumoraciones.

MATERIAL Y EQUIPO.

Equipo.

Equipo e instrumentos	Marca
Agitador de placa para microtitulación	<i>Bello Glass Inc</i>
Balanza analítica	<i>Mettler H 80</i>
Cámara de electroforesis	<i>Owl Scientifics</i>
Columna para cromatografía molecular	<i>Pharmacia Fine Chemical</i>
Espectofotómetro	<i>Perkin Elmer</i>
Espectofotómetro para ELISA	<i>Dynatech MR 250</i>
Membrana de nitrocelulosa de μm	<i>Bio-Rad</i>
Micropipetas	<i>Transferpette</i>
Placas para ELISA	<i>NUNC</i>
Separadores de electroforesis	<i>BIO-RAD</i>
Vidrios para electroforesis	<i>OWL SCIENTIFICS, INC</i>

Reactivos utilizados en la realización de las técnicas

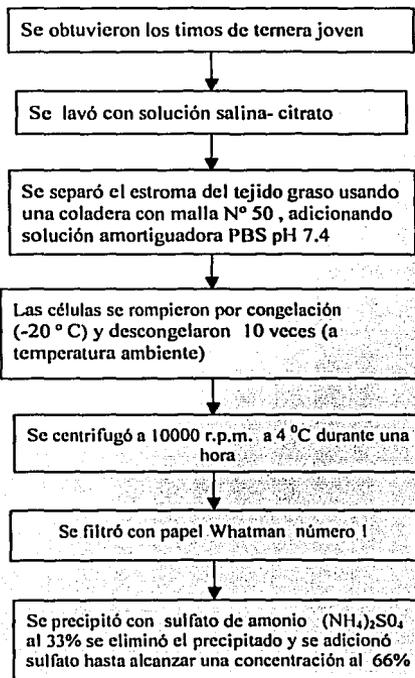
Reactivo	Marca
2- β -Mercaptoetanol (2SHCH ₂ CH ₂ OH)	<i>Sigma</i>
Acrilamida (C ₃ H ₅ NO)	<i>Sigma</i>
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	<i>J.T. Baker</i>
Azida de sodio NaNO ₃	<i>Sigma</i>
Azul de Bromofenol (C ₁₉ H ₉ Br ₃ O ₃ SNa)	<i>Sigma</i>
Azul de Coomassie (C ₄₇ H ₄₈ N ₃ O ₇ S ₂ Na)	<i>Sigma</i>
Azul dextrana 2000	<i>Pharmacia Fine Chemical</i>
Bis-acrilamida (C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂)	<i>Sigma</i>
Carbonato de sodio anhidro (Na ₂ CO ₃)	<i>J.T. Baker</i>

Vite Gutiérrez Mary Landy

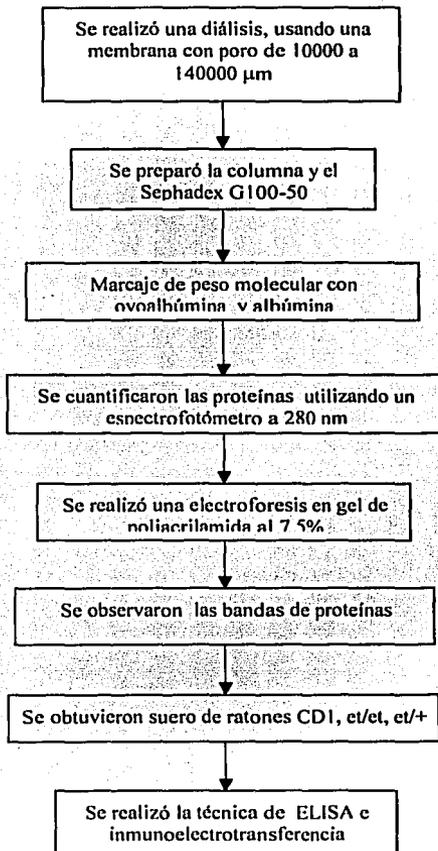
Citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	<i>Técnica Química</i>
Cloruro de potasio (KCl)	<i>Técnica Química</i>
Cloruro de sodio (NaCl)	<i>Técnica química</i>
Diaminobencidina (DAB) ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4 \cdot 4\text{HCl}$)	<i>Sigma</i>
Dodecilsulfato de sodio SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{Na}$)	<i>Sigma</i>
EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	<i>Sigma</i>
Folin & Ciocalteu ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	<i>Sigma</i>
Fosfato de potasio dibásico (KH_2PO_4)	<i>Merk</i>
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	<i>J.T. Baker</i>
Glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	<i>J.T. Baker</i>
Glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	<i>Sigma</i>
Hidróxido de sodio (NaOH)	<i>Merk</i>
Metanol (CH_3OH)	<i>J.T. Baker</i>
o-Fenilendiamina (OPD) ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$)	<i>Sigma</i>
Ovoalbúmina	<i>Sigma</i>
Peroxidasa	
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	<i>Productos Químicos</i> <i>Monterrey</i>
Persulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2(\text{S}_2\text{O}_8)$)	<i>Sigma</i>
Sephadex G50-100	<i>Sigma</i>
Solución buffer de fosfatos PBS, pH 7.4	
Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	<i>J.T. Baker</i>
Sulfato de cobre anhidro (CuSO_4)	<i>J.T. Baker</i>
Tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	<i>Merk</i>
Tween 20	<i>Hycl de México</i>

METODOLOGÍA

Extracción de los antígenos del timo de ternera según el método²⁵ de Hajime Y. et al



Purificación de los antígenos obtenidos del timo de ternera



Ensayo de Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).

Se diluyeron las soluciones de los antígenos La y Ro, obtenidos del timo de ternera haciendo diluciones al doble, partiendo de una concentración inicial de 16 µg/mL.

Se colocaron en una gradilla 7 tubos, rotulados de la A-G.

En el tubo A, se colocaron 3 mL de los antígenos La y Ro a una concentración de 16 µg/mL. Disueltos en amortiguador de recubrimiento. Se realizaron diluciones al doble con volúmenes de 1.5 mL de amortiguador de recubrimiento en los tubos B-G, de tal manera que al final todos tengan un volumen de 1.5 mL, excepto el tubo G con 3 mL.

Se colocaron 100 µL de amortiguador de recubrimiento a la fila H de la placa de ELISA (Testigo Negativo del Antígeno). Adicionando el volumen en el resto de las filas empezando con la fila G y terminando con la fila A, en ese orden y usando una sola punta, se colocó el mismo volumen en cada pozo.

Se mantuvo en incubación durante 1 hora.

Se eliminó el sobrenadante y posteriormente se bloqueó con albúmina sérica bovina al 1.0% y leche descremada al 5%, todo en PBS, durante 30 minutos.

Se diluyó cada muestra 1:100 y 1:200 y se realizó por triplicado colocando 100 µL de las diluciones de las muestras en cada pozo. Se incubó durante 1 hora a 37 °C.

Se lavaron las placas 4 veces con PBS Tween y se adicionó el conjugado anti IgA diluido 1:500 en PBS. Incubándose durante 1 hora a 37 °C.

Se realizaron lavados 4 veces con PBS-Tween.

Se adicionaron 100 µL del sustrato con ortofenilendiamina (OPD) en cada pozo. Incubándose a 37 °C durante 1 hora.

Las lecturas se hicieron a 490 nm en un lector de ELISA

Electroforesis de poliacrilamida.

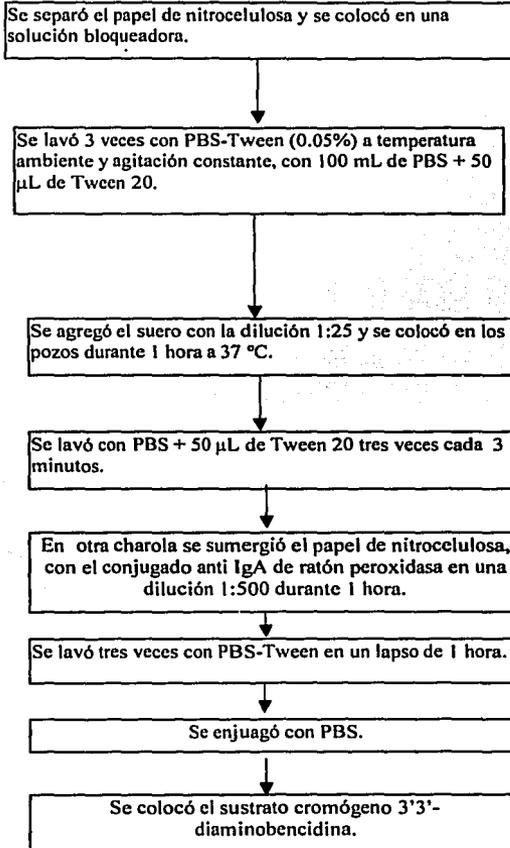
Con dos cristales de 12x11 y 12x10 cm respectivamente y dos empacadores de teflón de 0,5 mm de ancho montar el soporte donde se formó el gel de poliacrilamida preparado al 7. 5%

Una vez que los pozos estuvieron formados, se colocaron en el armazón con el gel formado dentro de la cámara de electroforesis la cual debe contener solución amortiguadora de corrimiento. Se procedió a colocar la muestra (60 μ L) y 15 μ L de un marcador de pesos moleculares. (Sigma marker de alto rango).

Se separaron las proteínas del gel con un voltaje de 80 volts para empaquetar y después se aumentó el voltaje a 120 volts durante hora y media hasta alcanzar el final del gel.

Se tiñó con azul de Coomassie y se transfirió a papel de nitrocelulosa para realizar la inmunoelectrotransferencia

Inmunoelctrotransferencia.



DESARROLLO EXPERIMENTAL

Procedimiento para la extracción de los timos de ternera joven

1. Se obtuvieron cuatro timos de ternera joven
2. Se mantuvieron en solución salina (0.85%) – citrato (0.4%).
3. Posteriormente con unas tijeras se cortaron en partes finas y se homogenizaron en un cedazo con una malla de número 50.
4. Se separó el estroma de la grasa en solución fría de PBS (solución buffer de fosfatos).
5. La suspensión se filtró en gasa para quitar las partes gruesas y esta suspensión se sometió a congelamiento y descongelamiento 10 veces.
6. Se centrifugó a 4 °C a 10000 rpm. durante una hora.
7. Al sobrenadante obtenido se le dió tratamiento con una solución de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 33%.
8. Se centrifugó a 6000 rpm, se eliminó el precipitado.
9. Al sobrenadante se le adicionó la cantidad necesaria de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para tenerlo al 66%, se volvió a centrifugar a 10000 r.p.m. durante 1 h.
10. El precipitado se resuspendió en 10 mL de PBS. Al producto obtenido se le realizó una diálisis a 4 °C hasta eliminar todo el sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
11. Para poder verificar si este sobrenadante estaba libre de sales se hizo la prueba con cloruro de bario (BaCl_2) al 1%.

Procedimiento para el montaje de la columna

1. Se montó una columna con Sephadex G50-100, utilizando dextrana azul 1% para calcular el volumen vacío y la columna se calibró con BSA y ovoalbúmina .
2. Se colocó en la columna una muestra de 5 mL del antígeno obtenido.
3. Se uso un colector de fracciones calibrado a 40 gotas (volumen de 2 mL), se colectaron 63 tubos. Se determinó la lectura de absorbancia de cada una de estas fracciones a 280 nm en espectrofotómetro uv Perkin Elmer. Posteriormente se graficaron los resultados (número de fracción contra absorbancia).
4. De esta gráfica se observaron dos conjuntos de picos, el primero que abarca la fracción uno a la fracción 14 (los primeros 28 mL) y el segundo pico de la fracción 32 a la fracción 35 (correspondiente a los volúmenes 64 - 70 mL).
5. Para separar las cadenas de la fracción 1, se trató con mercaptoetanol y yodoacetamida . Se pasó nuevamente por la columna de Sephadex G50-100.

6. Se determinó la absorbancia de las fracciones obtenidas (54 fracciones) a 280 nm, dando ahora dos picos al graficar los resultados. Uno en la fracción 14 (correspondiente al 28 mL) y otro en la fracción 17 (correspondiente al 34 mL).

7. Se realizó una mezcla de las fracciones que incluye los picos máximos de absorbancia, y se mandó liofilizar para concentrar la proteína.

8. El liofilizado se reconstituyó con 2.5 mL de agua destilada y posteriormente se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry leyendo la absorbancia a 640 nm dando un valor de 760 µg/mL.

Tabla de cuantificación de proteínas por el método de Lowry leída a 640 nm.

No.de Tubo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol. Patrón (250µg/mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Agua destilada	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Reactivo "C"	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Se deja reposar 10 minutos											
Reactivo "D"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Se deja reposar 30 minutos para después ser leído

Procedimiento para realizar ELISA.

1. La placa de ELISA es irradiada 20 minutos con luz ultravioleta antes de usarse.

2. Se diluye una solución de los antígenos Ro y La en una gradilla con siete tubos de ensaye previamente marcados en las letras A hasta la G, de la manera siguiente:

a) En el tubo A se colocan 3 mL de los antígenos Ro y La a la concentración de 16 µg/mL se disuelve en la solución de recubrimiento.

b) Posteriormente se realizan diluciones al doble con disoluciones de 1.5 mL de amortiguador de recubrimiento en los tubos B hasta G de manera tal que todos tengan un volumen final de 1.5 mL excepto el tubo G con 3 mL

c) Colocados 100µL de amortiguador de recubrimiento en la fila H (testigo negativo) de las placas de poliestireno para ELISA haciendo lo mismo en el resto de las filas empezando en la fila G terminando en la fila A en ese orden fue realizado, se utilizó una punta de la micropipeta para toda la placa y en cada pozo el volumen fue el mismo.

3. La incubación de la placa es de una hora a 37 °C.

4. Se elimina del sobrenadante luego se bloquea con albúmina sérica bovina al 1.0%, leche descremada al 5.0% estas soluciones fueron preparadas en PBS y el bloqueo duró 30 minutos.

5. La dilución del antígeno Ro y La se realiza 1:100, 1:200 (por triplicado) colocando 100µL de estas disoluciones en cada pozo de la placa. Se incubó durante una hora a 37 °C.

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CDI et/et

6. Se hacen cuatro lavados en PBS-Tween a los pozos y posteriormente se adiciona el conjugados anti IgA peroxidasa de ratón a una dilución a 1:100 en PBS.
7. Se hacen nuevamente cuatro lavados con PBS-Tween.
8. Se adiciona a cada pozo 100 µL de ortofeniléndiamina OPD.
9. Se hace la incubación a 37 °C durante una hora.
10. La lectura se hace en un lector de ELISA a 490 nm.

Metodología para realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

1. Limpieza de los vidrios, peine y separadores, con dodecil sulfato de sodio (SDS) y agua de la llave.
 2. Armar de la placa para el gel, se pone entre los dos vidrios los separadores y con pinzas se sujeta sobre otro vidrio en una superficie nivelada, se coloca la agarosa líquida para fijar sobre esta los vidrios que se armó para la placa.
 3. Preparación del gel separador al 7.5%
 - a) Vaciar este gel separador entre los vidrios dejando un espacio de 3 cm aproximadamente en la parte superior y llenar con agua bidestilada toda la superficie de los vidrios.
 - b) Después de aproximadamente 2 minutos , en que ya se formó el gel separador (se retira el agua inclinando los vidrios con cuidado para que no se separen y se rompa el gel).
 4. Preparación del gel empacador.
 - a) Vaciar sobre el gel separador hasta que el límite de los vidrios y colocar inmediatamente el peine cuidado de que no se formen burbujas, esperando aproximadamente 3 minutos para que se forme el gel y retirar el peine, enjuagando cada pozo con agua bidestilada.
 5. Preparación de las muestras: suero de ratones CDI et/et.
 - a) Se adiciona una parte buffer 4x y 3 partes de la muestra, calentando en un baño maría a punto de ebullición la muestra y el buffer 4x durante dos minutos.
 6. Colocar los vidrios con el gel formado en la cámara de electroforesis con una solución amortiguadora de corrimiento (metanol, trizma base, glicina, dodecil sulfato de sodio SDS).
 7. Colocar en cada pozo la muestra y en otro pozo el marcador de peso molecular, dando un pozo de espacio y correr por duplicado.
 8. Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder aplicando una corriente de 80 volts y aumentando este voltaje a 120 volts cuando las muestras hayan concentrado el gel separador.
 9. Se detiene la electroforesis hasta que se hayan desplazado por completo las muestras hasta el final del gel. Apagar la fuente de poder , desconectar la cámara de electroforesis.
 10. Quitar el armazón y colocar el gel (cuidando de no romperlo), en la solución I de azul de Coomassie aproximadamente una hora con agitación moderada.
 11. Retirar el colorante y desteñir con la solución K (solución decolorante 1) y la solución L (decolorante 2) hasta obtener las bandas.
-

12. Colocar sobre un papel filtro el gel y cubrir con kleen-pack y llevar a un secador de geles.

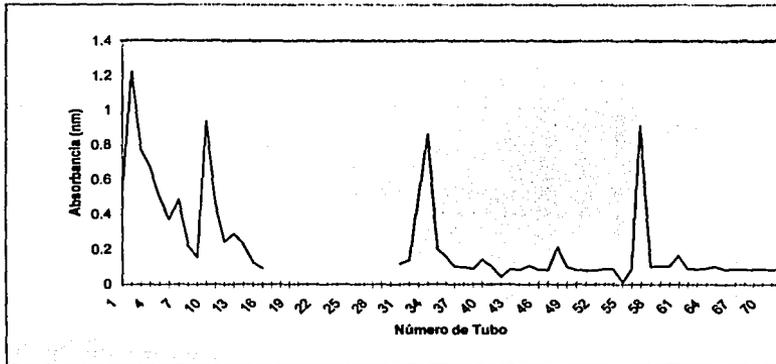
Metodología para realizar la inmunoelectrotransferencia.

1. Se realiza el mismo procedimiento de la electroforesis desde el paso número 1 hasta el paso número 12 es decir, no se debe teñir el gel.
2. Se desmonta el armazón y se coloca el gel en un recipiente con solución buffer de transferencia (metanol, glicina, trizma base).
3. Se forma un "sandwich" colocando una esponja del cassette para la transferencia y sobre la esponja se coloca el papel filtro whatman y sobre el papel se coloca el gel de poliacrilamida con la muestra y el marcador ya eluidos y se pone sobre el gel una membrana de nitrocelulosa al tamaño del gel y sobre la membrana de nitrocelulosa se coloca la otra esponja del cassette.
4. El "sandwich" se coloca en el cassette cuidando de poner el lado que tiene la membrana de nitrocelulosa del lado rojo del cassette y el lado que tiene el gel, del lado negro del cassette.
5. Colocar el cassette con el "sándwich" en la cámara de transferencia con buffer de transferencia (metanol-glicina-trizma base), de manera que coincidan los colores de los polos positivo (+) y negativo (-) con los colores de los lados del cassette.
6. Cerrar la cámara de transferencia y conectarla a la fuente de poder, aplicando una corriente de 80 volts dejándola toda la noche.
7. Al otro día se separa el "sandwich" se trabaja con la membrana de nitrocelulosa, colocándola en:
8. Leche Svelty –EDTA en PBS, durante una hora de agitación.
9. Se realizan posteriormente dos lavados con solución PBS- Tween aproximadamente 20 minutos cada uno a la membrana de nitrocelulosa.
10. Se corta con tijeras la membrana donde se observa la transferencia de las bandas de peso molecular, para trabajar sólo con la tira donde se puso la muestra problema.
11. La tira que tiene la muestra problema se corta en dos tiras nuevamente y se coloca en cada tira suero de ratón eU/cet (dilución 1:25 en PBS).
12. Se realizan tres lavados con PBS-Tween con agitación, de 15 minutos cada uno.
13. Las tiras son colocadas en una charola con solución de conjugado anti-IgA (1: 250) en PBS, incubando durante una hora. a temperatura ambiente con agitación.
14. Se realizan tres lavados a las tiras de 15 minutos cada uno con solución PBS –Tween y agitación.
15. Adicionar el cromógeno (diaminobencidina) con peróxido de hidrógeno (66µL) a las tiras agitando durante un minuto.
16. Observar las bandas que aparecen en las tiras.

RESULTADOS

TABLA 1: resultados arrojados al pasar la muestra por la columna y ser leídos a 280 nm

TUBO (NÚMERO)	ABSORBANCIA	TUBO (NÚMERO)	ABSORBANCIA	TUBO (NÚMERO)	ABSORBANCIA
1	0.545	25	0.093	49	0.104
2	1.226	26	0.088	50	0.085
3	0.776	27	0.091	51	0.084
4	0.675	28	0.093	52	0.882
5	0.504	29	0.098	53	0.090
6	0.372	30	0.120	54	0.089
7	0.486	31	0.120	55	0.141
8	0.226	32	0.139	56	0.093
9	0.157	33	0.502	57	0.091
10	0.937	34	0.861	58	0.105
11	0.466	35	0.204	59	0.105
12	0.246	36	0.159	60	0.105
13	0.290	37	0.106	61	0.166
14	0.232	38	0.100	62	0.094
15	0.129	39	0.092	63	0.090
16	0.094	40	0.143	64	0.095
17	0.099	41	0.108	65	0.105
18	0.100	42	0.095	66	0.087
19	0.100	43	0.089	67	0.092
20	0.088	44	0.086	68	0.088
21	0.088	45	0.108	69	0.090
22	0.088	46	0.086	70	0.090
23	0.092	47	0.084	71	0.086
24	0.085	48	0.217	72	0.090

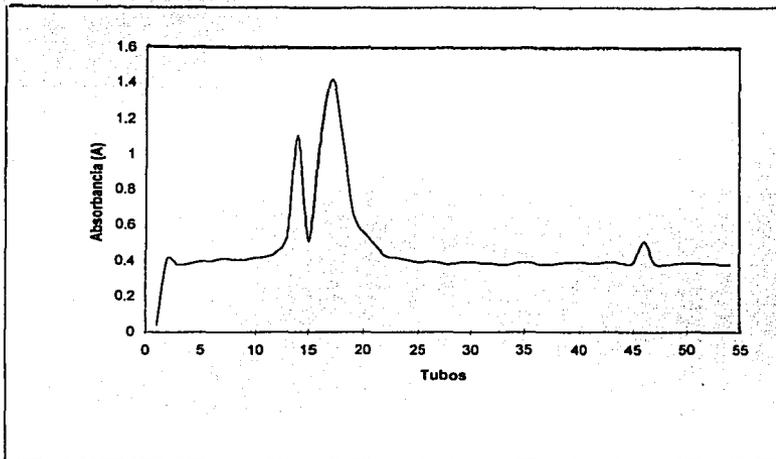


GRÁFICA 1: se aprecia en la gráfica que la muestra después de ser pasada por la columna de sephadex G50-100 existe un conjunto de picos que indican por donde puede encontrarse el antígeno Ro y La.

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CD1 et/et

Tabla 2: cuantificación de proteínas por el método de Lowry leída a 640 nm.

TUBO	ABSORBANCIA	TUBO	ABSORBANCIA
1	0.379	28	0.378
2	0.410	29	0.388
3	0.375	30	0.389
4	0.385	31	0.382
5	0.398	32	0.383
6	0.399	33	0.377
7	0.413	34	0.385
8	0.403	35	0.387
9	0.406	36	0.384
10	0.417	37	0.379
11	0.423	38	0.383
12	0.451	39	0.388
13	0.535	40	0.388
14	1.106	41	0.386
15	0.510	42	0.386
16	1.106	43	0.387
17	1.424	44	0.386
18	1.070	45	0.383
19	0.659	46	0.506
20	0.562	47	0.385
21	0.494	48	0.380
22	0.433	49	0.381
23	0.417	50	0.383
24	0.401	51	0.386
25	0.389	52	0.383
26	0.393	53	0.380
27	0.392	54	0.379



GRÁFICA 2: Los dos picos representan los antígenos Ro y La aislados después del tratamiento con yodoacetamida y mercaptoetanol. La muestra fue leída a 640 nm.

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CDI et/et

Tabla 3: resultados de la técnica de ELISA determinando isotipo IgA, a 490 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.111	0.079	0.105	0.085	0.098	0.069	0.142	0.111	0.128	0.109	0.217	0.184
B	0.086	0.064	0.294	0.273	0.162	0.133	0.246	0.187	0.281	0.207	0.247	0.176
C	0.348	0.225	0.272	0.237	0.093	0.060	0.146	0.108	0.097	0.085	0.162	0.139
D	0.272	0.190	0.046	0.048	0.088	0.063	0.364	0.274	0.093	0.065	0.040	0.056
E	0.604	0.555	0.159	0.117	0.078	0.027	0.078	0.063	0.294	0.184	0.026	0.020
F	0.142	0.085	0.179	0.180	0.164	0.085	0.146	0.105	0.212	0.171	0.136	0.087
G	0.215	0.118	0.249	0.200	0.231	0.166	0.143	0.102	0.505	0.356	0.150	0.08
H	0.139	0.069	0.181	0.136	0.174	0.135	0.209	0.110	0.183	0.126	0	0

Del A1 al E4 son sueros de ratones et/et, del E5 al F12 son los et/+ y del G1 al H10 son sueros de ratones CDI.

Tabla 4: análisis estadístico en la técnica ELISA usando anti isotipo IgA de ratón peroxidasa

CD1		et/+		CD1		et/+	
*1:100	*1:200	*1:100	*1:200	*1:100	*1:200	*1:100	*1:200
0.215	0.118	0.215	0.118	0.215	0.118	0.215	0.118
0.249	0.200	0.249	0.200	0.249	0.200	0.249	0.200
0.231	0.166	0.231	0.166	0.231	0.166	0.231	0.166
0.143	0.102	0.143	0.102	0.143	0.102	0.143	0.102
0.150	0.087	0.150	0.087	0.150	0.087	0.150	0.087
0.0139	0.069	0.0139	0.069	0.0139	0.069	0.0139	0.069
0.181	0.136	0.181	0.136	0.181	0.136	0.181	0.136
0.174	0.135	0.174	0.135	0.174	0.135	0.174	0.135
0.209	0.110	0.209	0.110	0.209	0.110	0.209	0.110
0.183	0.126	0.183	0.126	0.183	0.126	0.183	0.126
et/et							
1:100	1:200	1:100	1:200	1:100	1:200	1:100	1:200
0.111	0.079	0.111	0.079	0.111	0.079	0.111	0.079
0.105	0.085	0.105	0.085	0.105	0.085	0.105	0.085
0.098	0.069	0.098	0.069	0.098	0.069	0.098	0.069
0.142	0.111	0.142	0.111	0.142	0.111	0.142	0.111
0.128	0.109	0.128	0.109	0.128	0.109	0.128	0.109
0.217	0.184	0.217	0.184	0.217	0.184	0.217	0.184
0.086	0.064	0.086	0.064	0.086	0.064	0.086	0.064
0.294	0.273	0.294	0.273	0.294	0.273	0.294	0.273
0.162	0.133	0.162	0.133	0.162	0.133	0.162	0.133
0.246	0.187	0.246	0.187	0.246	0.187	0.246	0.187
0.281	0.207	0.281	0.207	0.281	0.207	0.281	0.207
0.247	0.176	0.247	0.176	0.247	0.176	0.247	0.176

*Dilución 1:100, 1:200

Vite Gutiérrez Mary Landy

Se escogió la concentración del antígeno de 16 µg/mL utilizando el tablero de ajedrez las diluciones de los sueros 1:100, fueron las adecuadas y la dilución del conjugado anti-IgA fue de 1:500.

Se calculó el valor de corte de positividad de acuerdo a la metodología descrita por Organon Tek³⁴. Calculando la media de los ratones normales (CD1) mas 2 desviaciones estandar de la media, de tal manera que todo valor por arriba de este corte será considerado positivo.

Posteriormente a los que resultaron positivos por ELISA se procedió a realizar la técnica de inmunolectrotransferencia para corroborar la positividad .

Al realizar la técnica de ELISA se calculó el valor de corte que fue de 0.263. Con base en este valor de corte se encontró que los sueros de los ratones et/+ mostraron un 10% de positividad, los ratones et/et un 27%, mientras que los ratones CDI un 0 % de positividad.

P.M. 175

KDa

83

62

47.5

32.5

25

16.5

1 2 3 4

Los carriles de 1 al 4 son sueros de ratones et/et que dieron positivos en ELISA. Se aprecia en la fotografía el corrimiento de las bandas que corresponde a pesos moleculares entre los 50 y 60 kD.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los antígenos La y Ro obtenidos de timos de ternera joven, se encuentran agrupados en cadenas, pues, al purificarlos mediante tamices moleculares, se obtuvo un pico de lectura a 280 nm que correspondió a el volumen vacío, indicándonos una proteína de peso alto molecular. Al tratar la muestra con mercaptoetanol y yodoacetamida y correrla en la columna, nos dio una banda que correspondió a el volumen de un peso molecular entre los 50 y 60 KD, peso molecular de los antígenos La y Ro.

Al realizar la técnica de ELISA, determinando la respuesta de IgAs contra los antígenos La y Ro encontramos que los ratones CD1 e/et mostraron títulos más altos de anticuerpos de IgAs que los animales CD1 y los portadores del gen de alopecia (CD1 e/+). Las lesiones mostradas en las glándulas de los ratones CD1 e/et deben estar causadas por la respuesta contra los antígenos La y Ro, ya que éstos están presentes en la superficie de todas las células que forman las glándulas. Además las glándulas de muchos ratones CD1 e/et mostraron infiltrados de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, que terminó destruyendo la arquitectura de las glándulas³⁶. La respuesta a las glándulas pudiera ser la causa de que los ratones hembras sean incapaces de amamantar a sus crías y presentan una hipotímia⁴⁰, quizás debida a un ataque al timo, el cual es una glándula. Esta descrito que los ratones hembras timectomizados al nacer presentan ooforitis⁴¹ (ataque a los oocitos) lo cual creemos que ocurre en nuestros ratones, pues presentan una baja fertilidad⁴⁰. Estos datos coinciden con los hallazgos histológicos encontrados en las glándulas de los ratones e/et que muestran un patrón de infiltración linfocitaria similar al encontrado en el síndrome de Sjögren en el humano⁴².

La presencia de anticuerpos en el ratón e/+ nos indica que la portación del gen es suficiente para que se presente la respuesta inmune contra antígenos propios como son el Ro y La; sin embargo esta respuesta no es suficiente para que se presenten las lesiones en glándulas, que si se observan en los ratones hipotímicos e/et.

Para demostrar que correspondía a los pesos moleculares los anticuerpos anti-Ro y anti-La obtenidos, fue realizada mediante la técnica inmunoelectrotransferencia, donde se aprecia como la aparición de una sola banda la cual corresponde al peso molecular esperado de 52-60 kD, donde se aprecia la aparición de una sola banda que corresponde al peso molecular esperado, comparado con el marcador de peso molecular.

CONCLUSIONES

-Usando el timo de ternera joven como fuente de antígenos La y Ro fue el adecuado. Se debe usar un reactivo para separar cadenas ya que se presentan los antígenos asociados. El uso de una columna de sephadex G50-100 calibrada con ovoalbumina y BSA es el adecuado para purificar los antígenos, ya que el bandeo de los antígenos La y Ro, se ubican entre las bandas de los marcadores de las albúminas.

-Para la prueba de ELISA la concentración óptima del antígeno es de 16 µg/mL y una dilución para los sueros de 1:100 y para el conjugado anti-IgA 1:500.

-La presencia de los anticuerpos anti-La y anti-Ro son características en el síndrome de Sjögren primario. Por lo tanto, consideramos que los ratones CD1 et/et presentan un modelo de síndrome de Sjögren primario.

-Al realizar la inmunoelectrotransferencia se demostró que la respuesta dada por anticuerpos IgAs fue específica ya que las bandas obtenidas correspondieron a los pesos moleculares reportados en la literatura (52-60kD).

PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

Se debe seguir con la caracterización del ratón CDI et/et con la idea de usarlo como modelo de SS y probar en fármacos que ayuden a la mejoría clínica del síndrome.

ANEXO

Soluciones

<i>Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)</i>	
<i>(2litros) pH 7.4</i>	
KH ₂ PO ₄	0.4 g
Na ₂ HPO ₄ ° 12H ₂ O	5.8 g
KCl	0.04 g
NaCl	16 g

Solución patrón (albúmina sérica bovina) (BSA)
BSA 250µg
Se disuelve 250 µg/dL de agua destilada

Inhibidor de proteasas
IAA. 0.0055 g
Se disuelve en 300 µL de agua destilada

Preparación de los reactivos para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Reactivo "A"
Na₂CO₃ 2.0 g
Tartrato de sodio y potasio 0.02g
C₄H₄NaO₆ ° 4H₂O en NaOH al 0.1N 100 mL

Reactivo "B"
CuSO₄ 5 g
Se disuelve en 100 mL de agua destilada

Reactivo "C"

Es la suma del reactivo "A" más un mililitro del reactivo "B" que deberá ser usado inmediatamente.

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CD1 et/et

Reactivo "D"

REACTIVO FOLIN -CIOCALTEAU 100 μ L

Reactivos utilizados en la tecnica de ELISA.

Amortiguador de recubrimiento (carbonato-bicarbonato) pH 9.6

Na_2CO_3 1.59 g

NaHCO_3 2.93 g

Se afora a un litro con agua destilada debe ser preparada en el momento preferentemente

PBS Tween

NaCl 8.0 g

KH_2PO_4 0.2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g

KCl 0.2 g

TWEEN (20) 0.5 mL

Se afora a un litro con agua destilada ajustando el pH 7.4 y guardalo a 4 °C

Sustrato del cromógeno

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.1M) 2.1014 g

Na_2HPO_4 (0.2M) 1.4196 g

Se disuelven en 50 mL cada reactivo por separado. El sustrato se prepara antes de usarlo pues lo daña la luz.

o-feniléndiamina

40 mg

*todos los reactivos deben de ser preparados con agua bidestilada forzosamente

Preparación de los reactivos para los geles de poliacrilamida al 7.5% (10 mL)

Gel de corrimiento

Agua bidestilada	4200 µL
Acrilamida –bisacrilamida	3600 µL
Tris pH 8.8 (1.5M)	2500 µL
SDS (100%)	100 µL
ASP	100 µL
TEMED	6 µL

El TEMED y ASP son agregados al último juntos.

Gel empacador al 30% (5ml)

Agua bidestilada	2936 µL
Acrilamida-bisacrilamida	714 µL
Tris pH 6.8 (0.5M)	1250 µL
SDS (10%)	50 µL
TEMED	6 µL

Agarosa al 2%

Agarosa.	2 g
Se disuelve la agarosa en agua destilada en 100 mL	

Preparación de soluciones para la electroforesis en geles de poliacrilamida

Solución H(amortiguador de desarrollo)(1000 mL)

Tris (0.025M)	3.0275 g
Glicina (0.192M)	14.413 g
SDS (0.1%)(10mL)	0.01 g

Solución I (colorante azul de Coomassie al 1%)

Azul de Coomassie	1 g
Se disuelve en 100 mL de agua destilada	

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CD1 et/et

Solución J (colorante 500mL)

Azul de Coomassie (0.125%)	62 mL de la solución stock
Metanol (50%)	250 mL
Agua destilada	500 mL
Acido acético (10%)	100 mL

Preparación de soluciones para la electroforesis en geles de poliacrilamida

<i>Solución K (decolorante 1)</i>	(1000 mL)
Metanol (50%)	500 mL
Acido acético (10%)	100 mL
Agua destilada	1000 mL

<i>Solución L (decolorante 2)</i>	(1000 mL)
Metanol (5%)	50 mL
Acido acético (7%)	70 mL
Agua destilada	1000 mL

Solución E	(2 mL)
Persulfato de amonio (PSA)(10%)	0.02 g
Agua desionizada	2000 µL

Solución F	
TEMED	1000 µL

<i>Solución G</i>	<i>amortiguador de muestra</i>
Solución C	300 µL
Solución D	200 µL
Glicerol	400 µL
2-β-mercaptoctanol	50 µL
Azul de bromofenol	50 µL

Reactivos para la realizacion de western blot

<i>PBS (solución salina de fosfatos)</i>	<i>(2000 mL)</i>
KCl	0.2 g
NaCl	8.0 g
NaH ₂ PO ₄ · 12 H ₂ O	2.9 g
NaH ₂ PO ₄	0.2 g
agua bidestilada	1000 mL

PBS-tween 20 (0.01%)
adicionar 1 mL de Tween 20 por cada litro de PBS

<i>Solución bloqueadora</i>	
leche descremada svelty	5.0 g
EDTA	0.08 g
PBS	100mL
Diaminobencidina (DAB)	0.12 g
se disuelve en 40 mL de PBS	

<i>Solución amortiguadora de transferencia</i>	
Metanol	240 mL
Glicina	17.28 g
Solución trizma-base	3.63 g

ABREVIATURAS

ANA:	anticuerpos antinucleares
AR:	artritis reumatoide
BSA:	albúmina sérica bovina
°C:	grado centígrado
DAB:	diaminobencidina
ELISA:	análisis de inmunoabsorbente ligado a enzimas.
et:	forma mutante de la cepa de los ratones alopécicos hipotímicos
derivados de la mutación albina CD1.	
g:	gramos
IAA :	inhibidor de proteasas
IgAs:	inmunoglobulina IgA secretora
Kd:	kilodalton
LES:	lupus eritematoso sistémico
mL:	mililitros
nm:	nanómetros
OPD:	o-fenilendiamina
PAGE:	significa electroforesis en geles de poliacrilamida.
Pp:	precipitado.
PSA:	persulfato de amonio
rpm.:	revoluciones por minuto
SDS:	dodecilsulfato de sodio
SS:	síndrome de Sjögren
TEMED:	N-N-N tetrametilendiamino
v.gr. :	por ejemplo
µg:	microgramos
µL:	microlitros

GLOSARIO

ANTICUERPO O INMUNOGLOBULINA: es una proteína formada de cuatro cadenas polipeptídicas cuya función es pegarse a un antígeno propio.

ANTIGENO O INMUNÓGENO: es una molécula reconocida específicamente por el sistema inmune.

ARTRITIS REUMATOIDE: Síndrome crónico caracterizado por una inflamación linfocitaria de las glándulas causada al parecer por factores autoinmunes.

AUTOANTICUERPO: Anticuerpo contra antígenos propios.

AUTOANTÍGENO: antígenos propios

CRIOGLOBULINEMIA MIXTA: cuando hay precipitado de éstas globulinas al enfriarse la sangre mientras circula por la piel y tejido subcutáneo de las extremidades, puede producir una lesión de los vasos pequeños.

CROMATOGRAFÍA: consiste en que todas aquellas sustancias de muestra que se encuentran disueltas en una fase móvil, se hace pasar a un medio estacionario, que al tener distintos grados de interacción, con los compuestos individuales, obstaculizando el flujo en diferentes medidores así las diferentes sustancias migran a diferentes velocidades.

DIÁLISIS: mediante el uso de una membrana semipermeable que sirve para retener las moléculas de proteína, permitiendo que las moléculas pequeñas de solutos las atraviesen.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE): Proviene del inglés *Polyacrilamide Gel Electrophoresis* y es una herramienta que se utiliza para efectuar operaciones, aislamientos, evaluaciones de pureza y cuantificaciones del peso molecular de una proteína.

ELISA: sus siglas en inglés son *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*. Es una técnica en la cual uno de los reactantes, ya sea el antígeno o el anticuerpo, se fija a un soporte sólido (como placas de poliestireno) previamente a su interacción con el reactante complementario.

ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONECTIVO: es un síndrome con características clínicas del LES suele ser crónica y recidivante, a menudo con largos períodos de remisión.

ESCLERODERMIA: Síndrome crónico caracterizado por una inflamación linfocitaria de las glándulas causada al parecer por factores autoinmunes. Enfermedad crónica de causa desconocida caracterizada por anomalías vasculares en la piel.

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

HEPATITIS CRÓNICA ACTIVA: ésta enfermedad que suele aparecer después de una hepatitis crónica aguda típica.

IGA: clase de inmunoglobulina que se encuentra en secreciones.

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

IGE: inmunoglobulina que es la medidora de la hipersensibilidad inmediata.

IGG: inmunoglobulina que es producida en las respuestas inmunes secundarias sanguíneas.

IGM: inmunoglobulina que se expresa en los linfocitos B vírgenes y secretadas en respuestas inmunes primarias.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA: técnica enfocada a la identificación de antígenos dentro de una mezcla donde serán antígenos dentro de una mezcla donde serán reconocidos por los anticuerpos presentes ya sea en suero de individuos o animales infectados.

INCIDENCIA: Mide los nuevos casos de enfermedad que surgen en una población durante un período determinado.

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CD1 et/et

LUPUS ERITEMATOSO SITÉMICO: Trastorno inflamatorio del tejido conjuntivo de etiología desconocida que predomina en mujeres jóvenes aunque también puede presentarse en niños

MÉTODO DE LOWRY: es una modificación del método de Folin-Ciocalteu para cuantificación de proteínas, basado en la presencia de triptofano y tirosina en las proteínas.

PEPTIDO: son moléculas resultantes de la unión de dos o más aminoácidos

POLIMIOSITIS: Trastorno sistémico del tejido conjuntivo caracterizado por alteraciones inflamatorias y degenerativas de los músculos

PRECIPITACIÓN POR SALADO: al agregar grandes cantidades de solutos iónicos como NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, etc se produce la precipitación de la proteína.

PREVALENCIA : mide el total de casos de la enfermedad que existen en la población durante un período específico.

PROTEÍNA: son polímeros de α aminoácidos unidos entre sí mediante uniones amídicas que reciben el nombre de enlaces peptídicos.

SEPHADEX: es una mezcla de polímeros los cuales dependiendo del número de sephadex es separación de la proteína.

XEROFTALMIA: sequedad en los ojos.

XEROSTOMÍA: sequedad en la boca.

REFERENCIAS

1. Fox. RI. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. Rheumatic disease clinics of North America. 1992; 8:517-537
2. Munther A.J, Font J. Enfermedades autoinmunes del tejido conectivo. Barcelona, España: Ed. Doyma, 1992. pag 93-104
3. Herrero BG. Manual de enfermedades reumáticas. Barcelona, España: Ed. Doyma, 1992 pag 199-204
4. Roles SJ. Tratamiento de las enfermedades reumáticas. Barcelona, España: Ed. Leroy, 1983 pag 50-53
5. Bellanti AJ. Inmunología. México: Ed. Interamericana, 1986 pag 460-461
6. Rose RN. Principios de Inmunología. México: Ed. Continental, 1983 pag 222-224
7. Bracós MA. Licenciatura y reumatología. Barcelona, España: Ed. Salvat 1990 pag 81-89
8. Espindola ZN, Morales BJ, Arch Inst Cardiol. México. 1997; 67: 114-125
9. Vitali C, Bombardieri S, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. 10. Arthritis and Rheumatism.. 1993; 36: 340-347
10. Manual de reumatología y transtornos ortopédicos y ambulatorio. Diagnóstico y terapéutica. Buenos Aires, Argentina: Ed. Salvat editores, 1987 pag 297-302
11. Ibañez LG. Introducción a la reumatología. México: Ed. Méndez Cervantes, 1985 pag 124-127
12. Molina R. Provost T. Types of inflammatory vascular disease in Sjögren's syndrome. Arthritis and Rheumatism. 1985; 28; 11
13. Currey HLF. Reumatología básica. México: Ed. Científica, 1990 pag 79- 83
14. Moleres FR. Atlas práctico para el médico general en reumatología . Barcelona , España : Ed. Salvat editores, 1982 pag 217-221
15. Abbas A K. Inmunología celular y molecular. 2ª edición. Madrid, España: Ed. Interamericana, 1992 pag 420-422
16. Howkins C. Enfermedades reumatológicas. México: Ed. Trillas, 1975 pag 142-147
17. Rojas Espinosa O. Inmunología de memoria. Segunda edición. México. Ed. Médica Panamericana 2001.
18. Stuart SK. Manual de reumatología y transtornos ortopédicos en ambulatorios. 3ª edición. Barcelona, España: Ed. Salvat editores, pag 297-303
19. Alarcón SD. Introducción a la reumatología. México: Ed. Méndez Cervantes, 1986 pag 44-47
20. Stites D et al. Inmunología. 8ª México: Ed. Méndez Cervantes, 1994 pag 460-463
21. Carson W, Goodacre J. Introducción a la reumatología básica. México: Ed. P.L.M. Científica, 1992 pag 45-48
22. Hudson L, Hay FC. Practical Immunology. second edition. U.S.A. Ed. Blackwell Scientific Publications. 1981, pag 78-83
23. Voet. D. Bioquímica. Madrid, España: Ed. Omega, 1992 pag 86-102
24. Ferrán A. M. SPSS para Windows programación y análisis estadístico. Madrid, España. Ed. Mc Graw- Hill 1996, pag 77-82
25. Hajime Y, Harley J. et al. Molecular properties of the Ro/SSA antigen and enzyme -linked immunosorbent assay for quantitation of antibody. J. Clin. Invest. 1984 ; 74: 625-633
26. Handbook of experimental immunology. volume 1. Inmunochimistry . 3ª edición. U.S.A. Ed. Blackwell scientific publication 6.31-6.33
27. Ramos N F. Enfermedades reumatológicas (criterios de diagnóstico) México: ed. McGrawhill Interamericana. 1999 pag 203-205

Búsqueda de anticuerpos anti-La y anti-Ro en suero de ratones CD1 et/et

28. Fox RI, Saito I. Criteria for diagnosis of Sjögren's syndrome . Rheum Dis Clin North Am. 1994; 20: 391
29. Margni R. Inmunología e Inmunoquímica. 5ª edición. Cd. Argentina: ed. médica panamericana, 1996; pag 590-592, 907-922
30. Rose NR. Manual of clinical Immunology. 3ª edición. Washington D.C: ed. American society of microbiology 1986; 414-426
31. Dabrowsky PM. Immunoregulatory role of thymus. U.S.A. 1990: 445-451
32. Zambrano S. Inmunología. México: ed. McGraw-Hill. 1994. pag 200-202
33. Data on file organon Tek. 1988 pag 11
34. Lara H M. Hallazgos clínicos asociados al síndrome de Sjögren en el ratón hipotímico alopéico CD1 et/et. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza UNAM. 2000.
35. Kuchel P. Bioquímica general. Segunda edición. México: ed. McGraw Hill. 1993: 103-105
36. Moreno R.J. Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. México: ed. uteha, 1996; pag 22-24
37. Leningher L.A. Bioquímica las bases moleculares y de estructura y función celular. 2ª edición. Barcelona: ed editorial Omega, S.A. 1991; pag 162
38. Moreno RJ. Respuesta Inmune y Mecanismos de autoinmunidad. México: ed.Uteha, 1996; 79-104
39. Valero GJ, Arroyave MC. Manifestaciones Clínicas e Inmunología del Síndrome de Sjögren . Alergia. 1983;XXX-2:67-76.
40. Rosas P; Castellanos P. Domínguez. The existence of spontaneus hairless (nude) hypotymic mutant mice from the CD1 strain, rearer under conventional animal house conditions. Med. Sci. Res. 1987;15:553-554.
41. Kosiewicz M.M., Michael S.D. Neonatal thymectomy affects follicle populations before the onset of autoimmune oophoritis in B6A mice. J.Reprod. Fert. 1990; 88: 427-440.
42. Fox RI, Ch A, Curd JG, Kozin F, Howell FV. Sjögren's syndrome. Seminars in Arthritis Rheum. 1986;29(5):577-585.

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
DEFINICIÓN	3
CLASIFICACIÓN	4
MARCO TEÓRICO	5
HISTORIA	5
CAUSAS DEL SÍNDROME DE SJÖGREN (SS)	5
FISIOPATOLOGÍA E INMUNOPATOGENIA	5
MANIFESTACIONES CLÍNICAS	6
OJOS	6
TUBO DIGESTIVO	7
ÁRBOL RESPIRATORIO	7
RIÑONES	7
TRACTO GENITAL	7
TEJIDO LINFOIDE	7
CORAZÓN	8
OTRAS MANIFESTACIONES	8
DIAGNÓSTICO	8
TRATAMIENTO	9
BUCALES	9
OJOS	9
CUADRO CLÍNICO	9
INCIDENCIA Y PREVALENCIA	9
ANTÍGENO RO Y LA	10
ANTICUERPOS SS-B	10
ANTICUERPOS SS-A	10
ANOMALÍAS HUMORALES	10
GENERALIDADES DE LOS ANTICUERPOS	11
INMUNOGLOBULINAS	11
TIMO	11
INMUNORREGULACIÓN EN EL SÍNDROME DE SJÖGREN	12
DISTRIBUCIÓN MOLECULAR Y PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS	12
PROTEÍNAS	13
PRUEBAS DE LABORATORIO	13
ELISA (ANÁLISIS DE INMUNOABSORBENTE UNIDO A ENZIMAS)	13
TAMICES MOLECULARES	15
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	16

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
OBJETIVOS	18
HIPÓTESIS	19
TIPO DE ESTUDIO	19
MATERIAL BIOLÓGICO	19
TAMAÑO DE LA MUESTRA DE ESTUDIO	19
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	19
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	19
MATERIAL Y EQUIPO	20
EQUIPO.....	20
REACTIVOS UTILIZADOS EN LA REALIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS	20
METODOLOGÍA	22
EXTRACCIÓN DE LOS ANTÍGENOS DEL TIMO DE TERNERA SEGÚN EL MÉTODO ²⁵ DE HAJIME Y. ET AL ...	22
PURIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS OBTENIDOS DEL TIMO DE TERNERA	23
ENSAYO DE INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA).....	24
ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA	26
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	27
DESARROLLO EXPERIMENTAL	28
PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE LOS TIMOS DE TERNERA JOVEN	28
PROCEDIMIENTO PARA EL MONTAJE DE LA COLUMNA	28
TABLA DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY LEÍDA A 640 NM	29
PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR ELISA.....	29
METODOLOGÍA PARA REALIZAR LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE).....	30
4. PREPARACIÓN DEL GEL EMPACADOR.....	30
METODOLOGÍA PARA REALIZAR LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	31
RESULTADOS	32
ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
CONCLUSIONES	39
PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	40
ANEXO	41
SOLUCIONES.....	41
PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY	41
REACTIVOS UTILIZADOS EN LA TÉCNICA DE ELISA	42
PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA LOS GELES DE POLIACRILAMIDA AL 7.5% (10 ML)	43
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	43
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	44
REACTIVOS PARA LA REALIZACIÓN DE WESTERN BLOT	45
ABREVIATURAS	46

Vite Gutiérrez Mary Landy

GLOSARIO	47
REFERENCIAS	49
INDICE	51