



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

DETERMINACION DE UNIDADES DE COMPLEMENTO, VIA  
CLASICA Y ALTERNAS, EN RATONES CD1 et/et, Y SU  
RELACION HISTOPATOLOGICA DE DAÑO RENAL

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE:

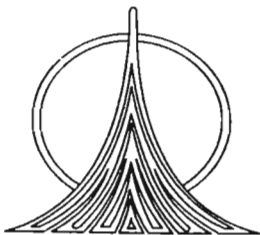
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**ADRIAN SOLIS GONZALEZ**

DIRECTOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

ASESOR: M.C. MAURILIO FLORES PIMENTEL



SEPTIEMBRE DE 2005.

0350556



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno SOLIS GONZÁLEZ ADRIÁN con número de cuenta 098556281 de la carrera de Q. F. B. se le ha fijado el día 05 del mes de Septiembre de 2005 a las 11:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE Dr. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
VOCAL M. C. MAURILIO FLORES PIMENTEL
SECRETARIO M. C. RICARDO CALVILLO ESPARZA
SUPLENTE Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO
SUPLENTE Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA

Handwritten signatures of the jury members.

El titulo de la tesis que se presenta es "Determinación de unidades de complemento, vía clásica y alternas, en ratones CD1 e/tet, y su relación histopatológica de daño renal".

Opción de titulación: Tesis Experimental

ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU México, D.F. a 07 de julio de 2005.

MTRO. JUAN FRANCISCO SÁNCHEZ RUIZ DIRECTOR

DIRECCION

RECIBI

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vo Bo

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ JEFE DE LA CÁRREGA DE Q.F.B.

-Es un hombre... extraño -me atreví a decir  
- Es, o ha sido, en muchos aspectos, un gran  
hombre -dijo Guillermo-.  
Pero precisamente por eso es extraño.  
Sólo los hombres pequeños parecen normales...  
*Humberto Eco. El nombre de la rosa*

---

**AGRADECIMIENTOS.**

*Primeramente al ser cuyo nombre difieren las religiones, pero que sin embargo no creo que importe el nombre, por darme la oportunidad de vivir estas experiencias.*

*A mi familia por aguantar tantas disgustos y desvelos que los he hecho pasar con mis loqueras y principalmente a alguien que no se encuentra físicamente pero sin embargo nunca nos ha abandonado. Gracias Papá*

*Un especial agradecimiento al Dr. Rubén Marroquín Segura y al M. C. Maurilio Flores Pimentel por su apoyo en la realización de este trabajo.*

*A todos mis compañeros y amigos de la escuela, gimnasio, trabajo, desma... ñanadas , etc., cuyos nombres prefiero no mencionar para no omitir a nadie.*

*Un especial agradecimiento a aquellos que me criticaban e inclusive intentaron desalentarme en los proyectos, porque gracias a sus palabras comprendí que no debía de darme por vencido.*

---

## ÍNDICE

	PAG.
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1. AUTOINMUNIDAD	4
3.2.1. SINDROME DE SJÖGREN	5
3.2.2. DIAGNOSTICO	6
3.2.3. PATOGENIA	8
3.2.4. ETIOLOGIA	9
3.3. MODELO BIOLÓGICO	10
3.4.1. COMPLEMENTO	10
3.4.2. FUNCIONES DEL COMPLEMENTO	10
3.4.3. COMPONENTES DEL COMPLEMENTO	13
3.4.4.1. ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO	13
3.4.4.2. VÍA CLÁSICA	14
3.4.4.3. VÍA ALTERNATIVA	17
3.4.4.4. VÍA DE LA LECTINA DE UNIÓN A MANOSA	18
3.4.5. COMPLEJO DE ATAQUE DE MEMBRANA	20
3.4.6. REGULACIÓN DEL COMPLEMENTO	21
3.4.7. COMPLEMENTO E INFLAMACIÓN	27
3.4.8. RECEPTORES DEL COMPLEMENTO	27
3.4.9. DEFICIENCIAS DEL COMPLEMENTO	28
3.5.1. FUNCIÓN RENAL	30
3.5.2. ELEMENTOS DE LA FUNCIÓN RENAL	31
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
5. OBJETIVOS	35
6. HIPÓTESIS	35
7.1. POBLACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL	35
7.2. CRITERIOS	36
7.3. VARIABLES	36
7.4. MATERIAL Y MÉTODO	36
7.5. TÉCNICAS	39
7.6. DIAGRAMA DE FLUJO	41
7.7. DISEÑO ESTADÍSTICO	41
8. RESULTADOS	42
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
10. CONCLUSIONES	53
11. GLOSARIO	54
12. BIBLIOGRAFIA	55

---

## 1. RESUMEN

Se realizó un estudio retrospectivo transversal empleando 85 ratones de tres cepas: 30 CD1  $+/+$ , 30 CD1  $et/+$  y 25 CD1  $et/et$  (de los cuales 15 se consideraron como viejos con aproximadamente 50 semanas de edad, y 10 como jóvenes con 12 semanas de edad), los cuales fueron anestesiados, sangrados por técnica axilar y sacrificados mediante dislocación, extrayéndose los riñones para obtener posteriormente cortes histológicos.

De los sueros se determinaron: unidades de complemento vía clásica y alternas, urea, creatinina (CRSC) y factor reumatoide (FR). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa SPSS versión 10.0 para Windows; empleando las pruebas de ANDEVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon y correlación de Pearson. Se encontró que existe una disminución de las unidades del complemento, vía clásica, de los ratones  $et/et$  y  $et/+$ , con respecto al grupo control  $+/+$  ( $\alpha = 0.004$ ). Las unidades del complemento de las vías alternas sólo se observaron disminuidas en los ratones  $et/et$  ( $\alpha = 0.003$ ). Tanto los pesos de los ratones como sus índices se encontraron disminuidos en los ratones  $et/et$  contra los  $et/+$  y  $+/+$  ( $\alpha = 0.002$  y  $\alpha < 0.0001$  respectivamente). Se encontró que existe una correlación negativa entre la vía clásica y el daño ocular. Hubo diferencia significativa en los niveles de urea ( $\alpha < 0.0001$ ) y la CRSC ( $\alpha = 0.002$ ) entre los ratones  $et/et$  viejos y jóvenes. El factor reumatoide se encontró significativamente incrementado en los ratones  $et/+$  ( $\alpha = 0,009$ ). En los cortes histológicos observamos un daño renal en los ratones  $et/et$  y moderado en los  $et/+$ , mientras que no se encontraron lesiones en los ratones  $+/+$ .

Las unidades del complemento están disminuidas en los ratones CD1  $et/et$  y  $et/+$ ; la falta de elevación del FR en los ratones  $et/et$  (lo cual contradice a lo esperado) se debe a que una de las funciones del complemento es la depuración de complejos inmunes, por lo que la excesiva actividad del complemento por la vía clásica se encarga de eliminar al FR de la circulación. Existen claras lesiones renales tanto en los ratones  $et/et$  como en los  $et/+$ ; no así en los  $+/+$ . Lo que nos indica la predisposición que existe por parte de los portadores del gen a padecer este tipo de alteraciones.

---

## 2. INTRODUCCIÓN

El complemento es el principal efector del mecanismo de defensa humoral. Hay tres vías principales de activación del complemento: la vía clásica, que se activa por ciertos isotipos de Ac unidos al Ag; la vía alternativa, que se activa sobre las superficies de las células microbianas en ausencia de Ac, y la vía de la lectina fijadora de manosa (MLB, del inglés, *mannan-binding lectin*), que se activa por la lectina plasmática que se une a residuos de manosa sobre los microorganismos (MO); es decir, se desencadena por una lectina de unión a mananos, un miembro del grupo de proteínas colectinas que reconocen patrones de azúcares repetidos. Las etapas finales que conducen a un ataque de membrana son las mismas en todas las vías. La activación de la cascada del complemento y la estabilidad de las proteínas del complemento activas se encuentran reguladas estrechamente para evitar la activación de éste en las células normales del huésped y limitar la duración de su activación. En diversas enfermedades autoinmunes se han observado deficiencias de los componentes iniciales de la vía clásica del complemento, que han sido asociadas con la posible participación del complemento en la inducción y/o en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica.

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida, que afecta principalmente a mujeres, entre la cuarta y la quinta década de la vida. Se clasifica en dos tipos: SS primario, se presenta solo; y el secundario, generalmente asociado a otra enfermedad autoinmune. El síndrome de Sjögren (SS) describe sequedad ocular (xeroftalmia) y orofaríngea (xerostomía) se caracteriza por infiltración de linfocitos en glándulas lagrimales y salivales y presenta lesiones a nivel cutáneo, glandular y sistémico. Entre los daños a nivel sistémico se encuentran el nervioso, cardiovascular, músculo esquelético, gastrointestinal y genitourinario. La acidificación urinaria es una característica encontrada en cerca de un tercio de los pacientes con SS. La glomerulonefritis es una complicación con mayor frecuencia en los pacientes con SS primario.

Una herramienta de vital importancia en el estudio de las enfermedades son los modelos biológicos de animales, en nuestro caso empleamos los ratones CD1 et/et, los cuales, (gracias a diversas investigaciones realizadas en el laboratorio de Inmunología, FES Zaragoza) han demostrado ser un modelo biológico del SS primario.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la asociación existente entre las lesiones histopatológicas a nivel renal en el ratón CD1 et/et y la actividad del complemento, tanto por la vía clásica como por las vías alternas; así como el dilucidar el mecanismo etiológico del SS.



### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1. AUTOINMUNIDAD

El sistema inmune (SI) tiene como función primordial la defensa del organismo frente a agentes patógenos externos, a través del reconocimiento de antígenos (Ag) ajenos al huésped mediante dos mecanismos efectores: la inmunidad humoral y la celular. El organismo dispone de unos mecanismos de autotolerancia que le permiten identificar a los Ag propios de los extraños y así evitar la autorreactividad. Existen tres mecanismos que explican la tolerancia y el reconocimiento de los Ag propios, éstos son: la delección clonal, la anergia clonal y la mutación somática. Sin embargo cualquier mecanismo puede fallar en un momento dado. Los mecanismos de reconocimiento de lo propio no constituyen una excepción a esta regla, y se conocen una serie de enfermedades debidas a fenómenos autoinmunitarios en las que se producen cantidades masivas de autoanticuerpos y células T autorreactivas.<sup>1,2</sup>

Los fenómenos autoinmunes pueden presentarse en sujetos normales o pueden acompañar a algunas enfermedades infecciosas y sólo bajo ciertas circunstancias evolucionaran a enfermedad, encontrando que la autoinmunidad de individuos sanos, aumenta con frecuencia al avanzar la edad.

Los criterios para clasificar las enfermedades autoinmunes fueron propuestos desde 1962 por Milgron y Witbesky

#### **Cuadro 1. Criterios para clasificar las enfermedades autoinmunes<sup>2</sup>**

##### **Criterios mayores:**

La presencia en los pacientes (pero no en los individuos normales) afectados por un proceso patológico "bien definido" de un autoanticuerpo, o respuesta mediada por células contra uno o mas componentes propios relacionados directamente con el tejido afectado, o capaces de formar complejos inmunes que induzcan al daño tisular a distancia.

Ausencia de un agente infecciosos en las lesiones (en fase crónica)

Demostración de la respuesta inmune en el proceso patológico por:

- a) Reproducción de la enfermedad en un modelo experimental mediante transferencia pasiva de autoanticuerpos o linfocitos T autorreactivos.
- b) Mejoría o desaparición de los síntomas después de la remoción selectiva de la autorrespuesta.

##### **Criterios menores:**

1. Mejoría o remisión del proceso patológico mediante el uso de terapia con esteroides y/o inmunosupresores.
2. Presencia de infiltrado inflamatorio en sitios afectados.
3. Depósitos de anticuerpos o linfocitos T en lesiones.
4. Hipergammaglobulinemia.
5. Otros autoanticuerpos relacionados o no con el proceso patológico.

Los órganos afectados con más frecuencia en las enfermedades autoinmunitarias específicas son el tiroides, las glándulas suprarrenales, el estómago y el páncreas. Las

enfermedades que no presentan especificidad de órganos, entre las que se encuentran las enfermedades reumáticas, suelen afectar a la piel los riñones, las articulaciones y los músculos.

Las enfermedades autoinmunes no órgano-específicas, también llamadas sistémicas se caracterizan por la presencia de auto-anticuerpos circulantes. La presencia de uno o más auto-anticuerpos contra auto-antígenos nucleares (ANAs) es la característica de las enfermedades reumáticas sistémicas. Este grupo de enfermedades no presenta manifestaciones clínicas homogéneas, sino graduaciones en la variedad y severidad de los multisistemas involucrados. En este grupo se encuentran el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR), la esclerodermia (Scl), la enfermedad mixta de tejido conectivo (MCTD) y el síndrome de Sjögren.<sup>2</sup>

El conjunto de trastornos reumáticos muestran un considerable solapamiento. Por ejemplo, en algunos casos de LES se observan signos de AR. En estas enfermedades se producen depósitos de inmunocomplejos a nivel sistémico, especialmente en riñones, las articulaciones y la piel, que dan lugar a lesiones diseminadas. En la autoinmunidad sistémica el depósito de inmunocomplejos provoca procesos inflamatorios mediante diversos mecanismos, entre los cuales encuentran la activación de complemento y la acumulación de fagocitos.<sup>1,2</sup>

### 3.2.1. SÍNDROME DE SJÖGREN.

El síndrome de Sjögren (SS) describe sequedad ocular (xeroftalmia) y orofaríngea (xerostomía) caracterizado por infiltración de linfocitos en glándulas lagrimales y salivales, la falta de lubricación vaginal y por lo que las relaciones sexuales pueden ser dolorosas (dispareunia), de hecho la dispareunia puede ser el primer síntoma y preceder en meses o años a la xeroftalmia y a la xerostomía. Se estima que el SS afecta al 0.4 % de la población general, 9 de cada 10 pacientes son mujeres.<sup>3,4,5</sup> Generalmente afecta a pacientes en edad al rededor de los 40 años, sin embargo se ha reportado en pacientes pediátricos.<sup>6,7</sup>

Se clasifica en dos tipos:

- SS primario: se presenta solo, espontáneamente.
- SS secundario: asociado a otras enfermedades autoinmunes como AR, LES, esclerodermia, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, enfermedades crónicas del hígado.

La clínica involucra una gran cantidad de órganos, incluidos, pies, ojos, cavidad oral y glándulas salivales, y sistemas como el nervioso, musculoesquelético, vascular y el genitourinario.<sup>3,5</sup>

Existen la presunción de que un porcentaje indeterminado de pacientes comienza con síntomas antes de la menopausia, pero que los mismos son minimizados por los pacientes, y a veces por los médicos, por intermitentes o por atribuirse erróneamente a otra causa. Estas causas pueden llegar a retrasar su diagnóstico entre 4 y 12 años.<sup>5</sup> Se estima que una de cada cinco pacientes con AR presenta simultáneamente SS. El colegio Mexicano de Reumatología llevo a cabo un estudio denominado COPCORD, del que se desprende que

actualmente en México hay más de 700 mil personal con AR. Su prevalencia según el estudio COPCORD se estima que es entre 0.5 a 0.7 % de la población actual.<sup>8</sup>

### 3. 2. 2. DIAGNOSTICO.

Existen diversos criterios para el diagnostico del SS:

#### **Cuadro 2. Criterios de San Francisco para el SS primario y secundario.<sup>3</sup>**

##### **SS primario**

1. Sialiditis linfocitaria focal en biopsia de glándula salival (GS) menor con muestra de focos  $>1$  foco/  $4 \text{ mm}^2$  o lesión linfoepitelial benigna en GS mayor
2. Queratoconjuntivitis seca:
  - a) Características de epitelio corneal y conjuntival, en tinción con rosa de bengala, ver opacidad con lámpara simple
  - b) Reducción de secreción lagrimal y acortamiento de tiempo
  - c) Resultado del test de Schirmer (sin anestesia)  $\leq 5 \text{ mm} / 5$  minutos.

##### **SS secundario**

1. AR u otra enfermedad del tejido conectivo diagnosticada con criterios establecidos
2. Uno o dos de los criterios para SS primario descritas anteriormente

##### **Posible SS**

1. Un componente del SS primario descrito anteriormente
2. Presencia de alguno de los siguientes :
  - Infiltrado linfocitario en el intersticio pulmonar
  - Nefritis intersticial y/o acidosis tubular renal
  - Púrpura (con hipergammaglobulinemia o vasculitis)
  - Enfermedad crónica del hígado
  - Neuropatía periférica
  - Hipergammaglobulinemia (poli- o monoclonal) con anti-Rho/SSA anti-La/SSB

---

**Cuadro 3. Criterios europeos para la clasificación del SS<sup>9, 10</sup>**

---

**Síntomas oculares de sequedad.**

Es positivo con una respuesta afirmativa a una de las tres preguntas siguientes:

- ¿ha tenido usted la sensación de tener secos los ojos cada día los últimos tres meses?
- ¿tiene usted sensación de tener arenilla o tierra en sus ojos?
- ¿precisa ponerse cada día tres o más veces lagrimas artificiales?

**Síntomas de sequedad oral**

Respuesta afirmativa a una de las tres preguntas siguiente:

- ¿tiene usted sensación a diario de boca seca los últimos tres meses?
- ¿recuerda usted que se le hayan hinchado las parotidas ya adulto?
- ¿tiene usted que beber líquidos para digerir alimentos secos?

**Signos oculares**

Se confirma a una de los dos siguientes pruebas:

- un test se Schirmer de  $\leq 5$  mm/ 5 minutos
- una puntuación de cuatro o más en el Rosa de Bengala en la escala de Bijsterveld

**Alteraciones objetivas de las glándulas salivales**

Objetivación de la sequedad oral por medio de una de las tres pruebas siguientes:

- gammagrafía de las glándulas salivares con déficit difuso de captación
- sialografía con alteraciones difusas acinares y ductales
- flujo salivar sin estimular de 1,5 mL o menos en 15 minutos

**Datos histopatológicos**

Es positivo ante la presencia de uno o más focos /  $4 \text{ mm}^2$  (cada foco corresponde al infiltrado de 50 células mononucleadas en esos  $4 \text{ mm}^2$ )

**Presencia de autoanticuerpos**

Este criterio requiere al menos la presencia de uno de los siguientes autoanticuerpos: anticuerpos anti-Ro, anticuerpos anti-La, AAN y factor reumatoide

Un paciente tiene SS primario si reúne 4 de los 6 criterios. Si a estos se le suman los de otra enfermedad autoinmune sistémica (LES, AR esclerodermia, dermatitis o enfermedad mixta) el paciente padece SS secundario.

---

---

**Cuadro 4. Criterios de San Diego para el síndrome de Sjögren según Fox RI<sup>10</sup>**


---

**SS primario**

1. Síntomas y signos de sequedad ocular
  - Prueba de Schirmer positiva (menor de 9 mm a los 5 minutos)
  - Tinción positiva a la prueba con rosa de bengala o fluoresceína que demuestre afección corneal (queratoconjuntivitis seca)
- a) Síntomas y signos objetivos de sequedad oral
  - Disminución del flujo de saliva usando copas de Lashley u otro método
  - Biopsia de glándula salival menor anormal (más de 2 focos linfocitarios por área)
  - Presencia de trastornos autoinmunitarios (uno o más)
  - Factor reumatoide elevado ( $>1/320$ )
  - AAN a título alto ( $>1/320$ )
  - Anticuerpos anti-SSA o anti-SSB

**SS secundario**

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

**Exclusiones**

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

---

Para un diagnóstico y un tratamiento correcto del SS se requiere la consideración de varios especialistas, para que sea correcto se debe tomar en cuenta efectos adversos de algunas drogas, sarcoidosis, lipoproteinemias, atrofas relacionadas con la edad, efectos de enfermedades crónicas, linfomas, amiloidosis e infección por virus de la inmunodeficiencia humana.<sup>11</sup>

**3.2.3. PATÓGENIA.**

El SS es una enfermedad inflamatoria crónica, sistémica, de progresión lenta, etiología desconocida y patógena autoinmune, que se caracteriza por la existencia de un proceso inflamatorio constituido predominantemente por linfocitos T CD4 activados que destruyen progresivamente las glándulas exocrinas, con pérdida del parénquima glandular y la consiguiente hipofunción de la glándula, también se pueden encontrar linfocitos B activados.<sup>3, 4, 5, 12, 13, 14</sup>

Las manifestaciones extraglandulares más frecuentes son las artralgias o artritis (60%), el fenómeno de Raynaud (40%), las linfadenopatías (20%) y las alteraciones pleuropulmonares, renales o hepáticas con alrededor de un 10 % de cada una de ellas. Con respecto a las manifestaciones gastrointestinales están descritas alteraciones a nivel hepático, ya sea a nivel de pruebas hepáticas, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria (CBP) o fibrosis portal. En un 20-30% de pacientes con SS primaria existe una leve hepatomegalia, con o sin elevación de enzimas obstructivas o autoanticuerpos antimitocondriales.<sup>9</sup>

En los datos de laboratorio, se aprecia elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG) y de la proteína C reactiva (PCR), leucopenia, plaquetopenia, anemia, aumento de transaminasas y gamma-GT (GGT) o fosfatasa alcalina (FA). También aparecen una hipergammaglobulinemia, complejos inmunes en la circulación, y múltiples autoanticuerpos tanto órgano como no-órgano específicos: ANAs, anti-Ro, anti-La y factor reumatoide, la crioglobulinemia es una complicación del SS.<sup>3,8,14,15</sup>

### 3.2.4. ETIOLOGÍA

De acuerdo al teorema fundamental de la genética la cual nos dice; Genotipo + Ambiente = individuo (G + A = I), de semejante manera el SS se manifiesta gracias a tanto factores internos como externos.

Dentro de los factores internos podemos mencionar; 1) fallas en la remoción de células T autoinmunes a nivel del timo selectores, 2) expresiones aberrantes del incremento de moléculas de adhesión en epitelio celular de las glándulas resultando en infiltración de linfocitos autoinmunes a glándulas, 3) concordancia con reguladores del HLA-DR, 4) activación policlonal de linfocitos B, 5) secreción de citocinas pro-inflamatorias por linfocitos y células epiteliales, 6) decremento en la secreción de residuos acino glandular y 7) resistencia de las células T dentro de las glándulas a sufrir apoptosis.<sup>3</sup>

Los estudios de tipificación de HLA sugieren una predisposición genética para el desarrollo de dicha enfermedad. Con frecuencia los antígenos B8, DR5, DR3, DR2, DQ1, DQ2 y más notablemente la HLA-DRw52, del sistema HLA, que están aumentadas en el síndrome primario. Aberraciones e incremento en las moléculas de adhesión las células del epitelio de glándulas salivales, resultando en la infiltración de linfocitos T autoinmunes a las glándulas, secreción de citocinas proinflamatorias por los linfocitos que se encuentran dentro del epitelio de la mucosa y resistencia de estos para entrar en apoptosis, activación policlonal de linfocitos B expresándose en una hipergammaglobulinemia. Se encuentran múltiples autoanticuerpos órgano y no-órganoespecíficos, generando inmunocomplejos con los auto-antígenos que se encuentran en circulación.<sup>3,15,16</sup>

Los factores externos que se han implicado en el SS son: citomegalovirus, herpes virus humano tipo 6, virus C de la hepatitis y virus de Epstein-Barr (VEB). Las glándulas salivales son un reservorio para VEB, esto induce a una alteración linfoproliferativa, lo cual explica en hecho de que las regiones más afectadas en el SS son las mucosas de ojos y garganta. Estudios realizados por Matsumura *et. al.*, han demostrado que el daño tisular se ve favorecido por diversos factores como el interferón  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), estimulan la infiltración de células que presentan las moléculas CD28, CD80 y CD86. Las moléculas CD28 se han reportado en linfocitos T, las CD80 y CD86 en células presentadoras de Ag incluidos monocitos, macrófagos células dendríticas, y células B activadas. La infiltración de linfocitos T a las glándulas lagrimales y salivales se caracteriza, en orden creciente, por linfocitos CD3, CD8 y CD4. De estos últimos se ha determinado la relevancia del receptor V $\beta$  en el reconocimiento de los autoantígenos.<sup>17-23</sup>

### 3.3. MODELO BIOLÓGICO.

En año de 1985 en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, fue observada una anomalía espontánea en una cepa aislada de ratones CD1, en los cuales existía alopecia, dichos ratones fueron denominados "et" por su apariencia extraterrestre. Con el transcurso del tiempo se observó que presentaban daño ocular. Estudios realizados a estos ratones demostraron: que son hipotímicos, presentan anticuerpos antifosfolípidos de tipo IgA, IgG e IgM, autoanticuerpos (anti-Ro y anti-La), factor reumatoide, daños histopatológicos en glándulas lagrimales y salivales. Dichos hallazgos sustentaron evidencia suficiente de que los ratones CD1 et/et son un modelo biológico adecuado para el estudio del SS primario.<sup>12, 13, 24, 25</sup>

Los ratones CD1 et/et, en comparación con la cepa CD1 +/+, presentan un incremento significativo en hematocrito, leucocitos (concretamente linfocitos, monocitos y eosinófilos), así como de linfocitos T totales. Las lesiones en ojo muestran mayor cantidad de células CD3+ y CD8+, comparando con los ratones et/+ y +/+. La concentración media de proteínas es significativamente menor en los ratones et/et con relación a los ratones et/+ y +/+.<sup>24, 25</sup>

#### 3.4.1. COMPLEMENTO.

El sistema del complemento es el principal efector de la rama humoral del sistema inmunitario. La investigación del complemento se inició en la década de 1890, por Butchner y Pfeiffer, y estudiada después con más detalle por Jules Bordet (1899), del Instituto Pasteur en París demostró que el antisuero de oveja a la bacteria *Vibrio cholerae* la lisaba, Bordet descubrió que la propiedad lítica del suero dependía de dos factores, una que era termoestable y otro que era inactivo si el suero se calentaba a 56 °C durante 30 minutos; el factor termoestable del suero pronto se identificó como anticuerpo. Paul Erlich, en Berlín, llevó a cabo de manera independiente experimentos similares e ideó el término complemento y lo definió como "la actividad del suero sanguíneo que completa la acción del anticuerpo".<sup>26, 27</sup>

#### 3.4.2. FUNCIONES DEL COMPLEMENTO.

El sistema del complemento actúa al menos en cuatro funciones:

- Lisis de células bacterias y virus recubiertos; la envoltura viral deriva en buena proporción de la membrana plasmática de célula del huésped infectado y, por consiguiente, es proclive en la formación de poros por el complejo de ataque de membrana. Entre los virus patógenos susceptibles de lisis mediada por el complemento se encuentran el virus del herpes, ortomixovirus, paramixovirus y retrovirus. Las proteínas que adquieren la actividad enzimática proteolítica mediante la acción de otras proteasas se llaman zimógenos. Las cascadas proteolíticas permiten una amplificación tremenda, ya que cada molécula de enzima activada en un escalón puede provocar la activación de múltiples moléculas de enzimas en el escalón siguiente.



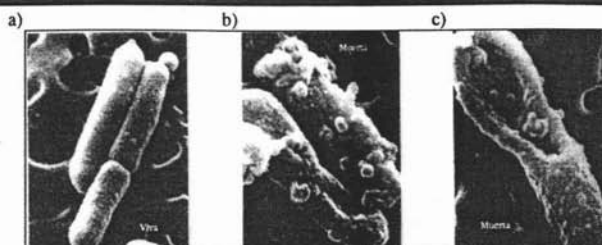


Imagen 1. a) Células bacterianas de *Escherichia coli* intacta; *E. coli* muerta por lisis mediada por complemento; c) obsérvese la vesícula de la membrana en células lisadas.<sup>29</sup>

- Oponización, que promueve la fagocitosis de Ag particulados; C3b es la principal opsonina del sistema del complemento, aunque C4b e iC3b poseen actividad opsonizante, se unen específicamente a receptores de los neutrófilos y los macrófagos. Se ha demostrado que la activación de células fagocíticas por diversos agentes, incluida la anafilatoxina C5a, aumenta el número de CR1 de 5 000, en fagocito enredoso, a 50 000, en células activadas, y facilita en forma considerable su fagocitosis de Ag recubiertos con C3b

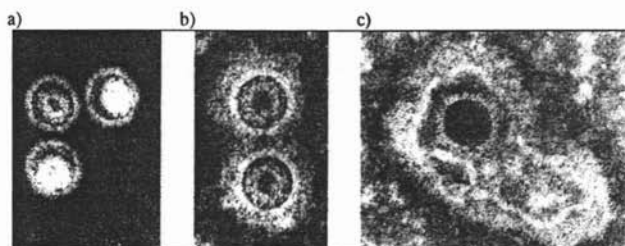
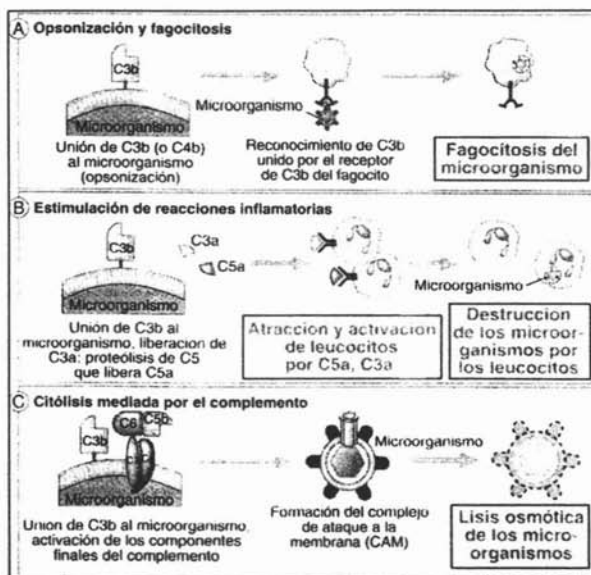


Imagen 2. a) Virus de Epstein-Barr intacto; b) virus Epstein-Barr recubierto por anticuerpos; c) virus Epstein-Barr recubierto con C3b, la cual facilita la opsonización.<sup>29</sup>

- Unió a receptores de complemento específicos en células del sistema inmunitario, lo que desencadena funciones características de dichas células, inflamación y secreción de moléculas inmunorreguladoras. Los fragmentos proteolíticos del complemento C5a, C4b y C3a inducen la inflamación aguda mediante la activación de los mastocitos y neutrófilos. En los neutrófilos, C5a estimula su movilidad, su adhesión firme a las células endoteliales y, en dosis altas, el estallido respiratorio con síntesis de intermediarios reactivos de oxígeno. Además C5a puede actuar directamente sobre células endoteliales vasculares y provocar un aumento de la permeabilidad vascular y la expresión de selectina P que estimula la unión de los neutrófilos. Esta combinación de acciones de C5a sobre los mastocitos, los neutrófilos y las células endoteliales contribuye a la inflamación en las zonas de activación del complemento y al final, la eliminación de agentes infecciosos del cuerpo. Depuración inmunitaria, que elimina complejos inmunitarios de la circulación y los deposita en el bazo y el hígado. El recubrimiento de complejos inmunitarios solubles con C3b facilita su unión con CR1 en eritrocitos. Aunque los glóbulos rojos expresen concentraciones más bajas de CR1 ( $5 \times 10^2$  por célula) que los granulocitos ( $5 \times 10^4$  por célula), hay alrededor de  $10^3$  glóbulos rojos por cada leucocito. Por esta razón, los eritrocitos pueden tener un papel importante en la unión de complejos inmunitarios cubiertos con C3b y el transporte de estos



complejos al hígado y el bazo. En estos órganos se eliminan los complejos inmunitarios de los glóbulos rojos y se fagocitan



**Figura 1.** Las tres funciones principales del complemento son:

- a) opsonización y fagocitosis; b) estimulación de reacciones inflamatorias; c) lisis de células mediante el CAMP.<sup>28</sup>

- Ayuda a regular la actividad biológica de las células. La fijación del complemento a las células puede causar su activación e incluso su división. La unión de complemento a Ag puede facilitar su fijación a los receptores localizados en las células presentadoras de Ag, confiriéndoles así aún más "capacidad antigénica". Se cree que la fijación del complemento a Ag facilita la fijación del Ag a las células presentadoras de Ag, incrementando su antigenicidad. Se reportó que ratones que carecen de C4 o CR1 y CR2 padecen enfermedades autoinmunitarias con mucha más frecuencia, por lo que se sugirió que el complemento es un factor importante para la selección negativa de células T autorreactivas.<sup>27, 28, 29, 30</sup>

En diversas enfermedades autoinmunes se han observado deficiencias de los componentes iniciales de la vía clásica del complemento, que han sido asociados con la posible participación del complemento en la inducción y/o mantenimiento de la tolerancia inmunológica, casos de glomerulonefritis en diabetes mellitus tipo I, tiroiditis posparto y en el daño ocular en enfermedades autoinmunes.<sup>31, 32, 33</sup>

### 3.4.3. COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.

Las proteínas y glucoproteínas que componen el sistema del complemento se sintetizan sobre todo en los hepatocitos, aunque también se producen cantidades de importancia en monocitos sanguíneos, macrófagos tisulares y células epiteliales del aparato digestivo y genitourinario. Estos componentes constituyen el 5% (por peso) de la fracción de la globulina sérica.

Los componentes del complemento se designan con numerales (C1-C9), letras (p. ej., factor D) o nombres comunes (como factor de restricción homólogo). Los fragmentos peptídicos se que se forman por activación de un componente se indican con letras pequeñas. En la mayor parte de los casos, los fragmentos más pequeños que resultan de la segmentación de un componente se designan "a" y el fragmento más grande "b" (p. ej., C3a, C3b; cabe señalar que C2 es una excepción: C2a es el fragmento de segmentación más grande). Los fragmentos más grandes se unen al blanco cerca del sitio de activación y los más pequeños se difunden desde el sitio y pueden precipitar reacciones inflamatorias localizadas por unión a receptores específicos. Los fragmentos del complemento interactúan entre sí para formar complejos funcionales.

#### 3.4.4.1. ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO.

Hay tres vías principales de activación del complemento: la vía clásica, que se activa por ciertos isotipos de Ac unidos a Ag; la vía alternativa, que se activa sobre las superficies de las células microbianas en ausencia de Ac, y la vía de la lectina fijadora de manosa (MLB, del inglés, *mannan-binding lectin*), que se activa por la lectina plasmática que se une a residuos de manosa sobre los MO; es decir, se desencadena por una lectina de unión a mananos, un miembro del grupo de proteínas colectinas que reconocen patrones de azúcares repetidos. Las etapas finales que conducen a un ataque de membrana son las mismas en todas las vías.<sup>27, 28, 29</sup>

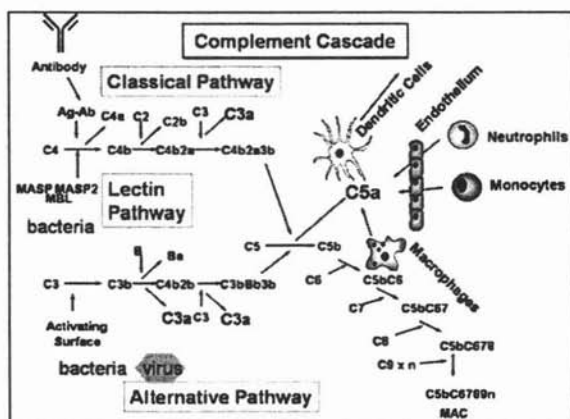


Figura 2. Las tres vías de activación del complemento generan la escisión de C5. C5b desencadena la formación del CAM, mientras que C5a estimula a neutrófilos y mastocitos, células endoteliales vasculares y contribuye con la inflamación en la zona donde se activo el complemento.<sup>30</sup>

## 3.4.4.2. VÍA CLÁSICA (O COMÚN).

La activación del complemento por la vía clásica comienza casi siempre con la formación de complejos Ag-Ac solubles (complejos inmunitarios) o con la unión de Ac a Ag en un blanco conveniente, por ejemplo una célula bacteriana. Una molécula IgM o bien dos moléculas de ciertas subclases de IgG (IgG1, IgG2 e IgG3 humanas. No une IgG4, IgE, IgA ni IgD, por lo cual estas clases de Ac no pueden activar la vía clásica) pueden unir y activar el primer componente de la vía, C1. La etapa inicial de la activación incluye C1, C2, C3 y C4.

La formación de un complejo de Ag-Ac induce cambios de conformación en la porción Fc de la molécula de IgM que expone un sitio de unión para el componente C1 del sistema del complemento. El C1 en suero es un complejo macromolecular que consiste en C1q y dos moléculas C1r y C1s cada una, unidas entre sí en un complejo (C1q<sub>2</sub>r<sub>2</sub>s<sub>2</sub>) estabilizado por iones Ca<sup>2+</sup>. La molécula de C1q se compone de 18 cadenas polipeptídicas que se relacionan para formar seis brazos helicoidales triples parecidos a colágena, cuyas puntas se unen a sitios de unión de C1q expuestos en el dominio C<sub>H</sub>2 de la molécula de Ac.

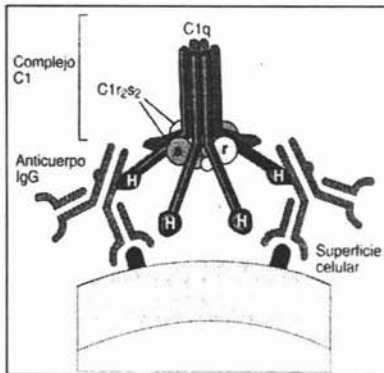


Figura 3. Una molécula de C1q posee 18 cadenas polipeptídicas dispuestas en 6 tripletos. Las cabezas globulares en los extremos de estos brazos, denominadas H, son las regiones de contacto con las inmunoglobulinas. Cada dominio C1r y C1s contiene un dominio catalítico con actividad enzimática y un dominio de interacción que facilita la unión con C1q o entre sí.<sup>28</sup>

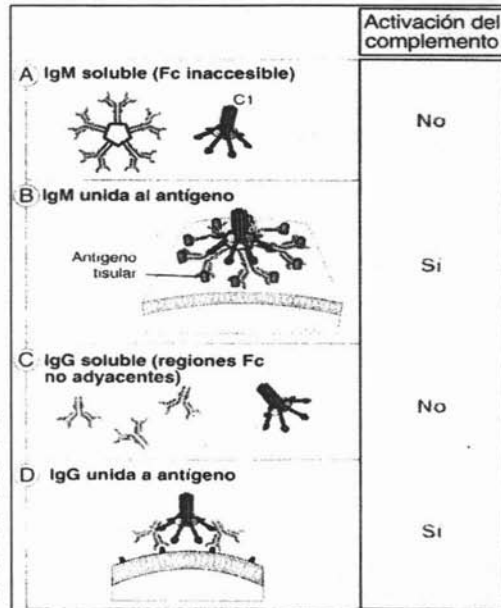


Figura 4 A) IgM en forma plana no muestra ningún sitio de unión; B) varios sitios de unión C1q en la región Fc son accesibles en la forma de grapa; C) dos moléculas adyacentes IgG unidas a un Ag en la superficie celular, la región Fc se puede unir a C1q y activar al complemento.<sup>28</sup>

Cada molécula C1 debe unirse mediante sus cabezas globulares C1q cuando menos a dos sitios Fc para que suceda una interacción estable de C1 con anticuerpos. Cuando se une IgM pentamérica a Ag en una superficie blanco asume la llamada configuración en "grapa", en la cual se exponen cuando menos tres sitios de unión para C1q. Sin embargo la IgM circulante existe en una configuración plana en la cual no están expuestos los sitios de

unión C1q y por consiguiente no puede activar la cascada del complemento. Por otra parte, una molécula de IgG solo contiene un sitio de unión de C1q en el dominio C<sub>H</sub>2 del Fc, de tal manera que la unión firme de C1q sólo se logra cuando se encuentran dos moléculas de IgG a 30 a 40 nm una de la otra en una superficie blanco o en un complejo, lo que proporciona dos sitios de inserción para C1q. Esta diferencia explica la observación de que una molécula aislada de IgM unida a un glóbulo rojo puede activar la vía común del complemento y lisar glóbulos rojos en tanto que se requieren al rededor de 1000 moléculas de IgG para asegurar que dos moléculas se encuentren lo bastante cerca una de la otra en la superficie celular para iniciar la unión de C1q.<sup>27,28,29</sup>

La unión de C1 al Ac pone en marcha las actividades enzimáticas proteolíticas de C1r y subsecuentemente C1s. Se considera que la función de enzima C1r activada. Consiste en escindir C1s, que luego desarrolla actividad enzimática. A continuación, la C1s escinde al siguiente componente de la vía, C4.

El C4 es una molécula de tres cadenas polipeptídicas. La más grande de las tres cadenas, la cadena  $\alpha$ , se escinde en un solo sitio por C1s con la liberación de un pequeño péptido, C4q. El péptido más grande, C4b, que consiste en la mayor parte de la cadena  $\alpha$  junto con las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  de C4, se unen a la célula blanco para continuar la cascada del complemento. En presencia del ión magnesio, el C4b sobre una célula blanco puede interactuar y unirse con el siguiente componente de la serie, una molécula de cadena única, denominada C2. El C2 se une a C4b, y se corta en presencia de C1s. El fragmento mayor de la rotura de C2 (C2a), que contiene un sitio enzimático, permanece en el complejo con C4b para continuar la cascada del complemento. El complejo C4b y C2a desarrolla una nueva propiedad: la de unir y escindir el siguiente componente de la serie, el C3. Por esta razón, se denomina convertasa C3 de la vía clásica.

El C3 es una glucoproteína presente con una concentración de al rededor de 1,2 g/L de plasma. El C3 está constituido por dos cadenas unidas por puentes disulfuro llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Cuando C3 se activa por la convertasa, se escinde un péptido C3a (PM 9000) de la cadena  $\alpha$ . Como resultado, el tioéster interno del fragmento C3b restante queda expuesto al medio circundante. Este tioéster sumamente reactivo tiene una vida media aproximada de 30 a 60 mseg.

Si C3b se une covalentemente al fragmento C4b adyacente en la superficie del blanco, los dos (junto con C2a) forman un complejo que puede continuar la cascada del complemento. Además, la presencia de C3b unido opsoniza en gran medida la partícula blanco y aumenta su fagocitosis por células que portan receptores C3b. Por otra parte, si el tioéster no encuentra un aceptor apropiado, reacciona con agua para formar la especie inactiva conformacionalmente alterada C3b(H<sub>2</sub>O); esta inactivación rápida ayuda a asegurar que la variedad reactiva de C3b se destruye y no produce activaciones indeseables.

El complejo sobre una superficie blanco C4b2a3b, tiene actividad enzimática de nueva expresión puede coordinarse con C5 y escindirlo, y por tal razón se llama convertasa C5 de la vía clásica. De nuevo se forman dos fragmentos, C5a y C5b. El fragmento C5b permanece asociado de modo no covalente al complejo C4b2a3b. Es el C5b el que inicia aquel segmento de la cascada del complemento que genera el ataque de la membrana.

En resumen los primeros pasos de la cascada del complemento generan una serie de péptidos con actividad enzimática y complejos peptídico. Cada enzima interactúa con múltiples moléculas de la siguiente proteína sustrato en la cascada de reacciones, ya sea hasta que se agota, como sucede en la convertasa C3 o C5 o hasta que se inhibe por proteínas reguladoras presentes en las células o en el plasma. Una cantidad limitada de complejos Ag-Ac lleva a la activación de gran cantidad de moléculas del complemento.

Algunas bacterias (p. ej., ciertas cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* de poca virulencia) y virus (p. ej., virus de parainfluenza, VIH) e igualmente células apoptóticas interactúan de manera directa con C1q, ocasionando activación de la vía clásica en ausencia de Ac. Otras estructuras como la superficie de cristales de urato, proteína básica de mielina, DNA desnaturalizado, endotoxina bacteriana y polianiones (como la heparina) también pueden activar de modo directo la vía clásica.

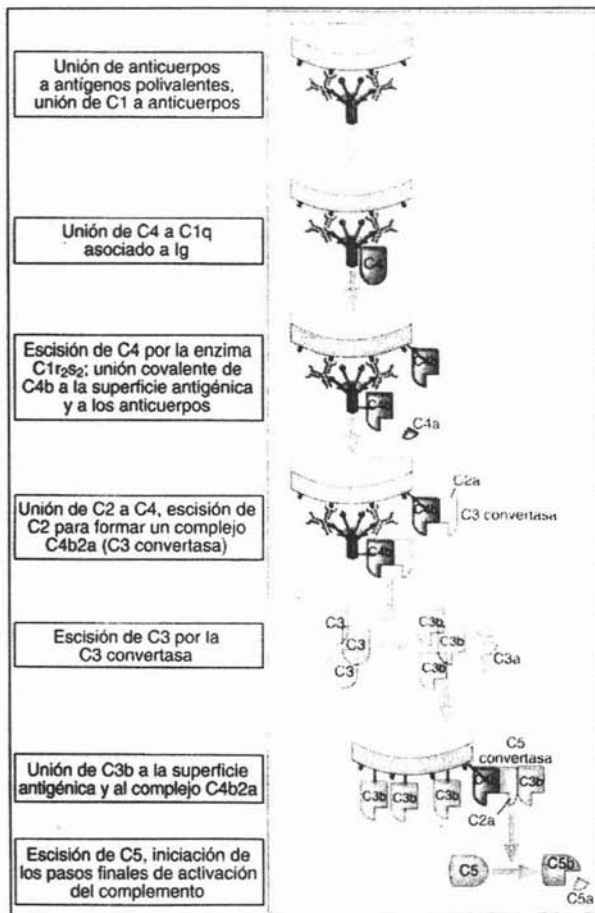


Figura 5. Un par de moléculas IgG sobre una superficie puede unir y activar C1. La porción globular reconoce y se une a los fragmentos Fc de la IgG. Después de activarse el C1 se enlaza y corta a C4. Se libera el fragmento más pequeño, C4a. El fragmento más grande, C4b, se une al blanco y continúa la cascada. En presencia Mg<sup>2+</sup>, C2 reconoce y se une a C4b. Se libera un pequeño fragmento, C2b, y el fragmento mayor C2a permanece unida a C4b, complejo denominado C3 convertasa. Está puede unirse y escindir a C3. Esta molécula, a su vez se corta en dos fragmentos C3a y C3b. Se libera el fragmento más pequeño C3a y el mayor C3b puede unirse covalentemente con un aceptor adecuado. Las moléculas de C3b que se unen directo al C4b continúan la cascada. El complejo formado por C2a, C4b y C3b, se denomina C5 convertasa, puede unirse y escindir a C5, para empezar los pasos finales de la activación del complemento.<sup>28</sup>

### 3.4.4.3. VÍA ALTERNATIVA.

La vía alternativa de activación del complemento da lugar a la proteólisis de C3 y la unión estable de su producto de degradación, C3b, a las superficies microbianas, sin participación de Ac. Debido a que no requiere Ac, la vía alternativa es un componente de del sistema inmunitario innato. Esta vía mayor de activación del complemento incluye cuatro proteínas séricas: C3, factor B, factor D y properdina. La vía alternativa se inicia en la mayor parte de los casos por constituyentes de superficie celular que son extraños huéspedes. Por ejemplo, las bacterias gramnegativas y grampositivas tienen constituyentes en la pared celular que pueden activar la vía alterna.

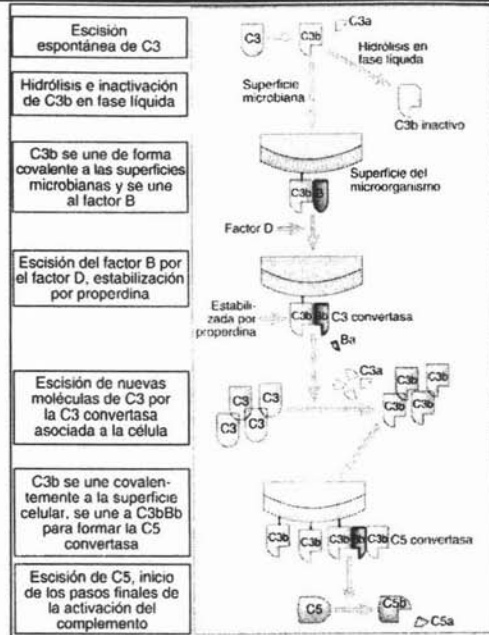
Normalmente, C3 se escinde constantemente en el plasma en tasas bajas para generar C3b en un proceso que recibe el nombre de "ralentí de C3". La molécula circulante en plasma sufre hidrólisis de su unión tioéster, generando una especie con una conformación alterada llamada C3(H<sub>2</sub>O). Una vez abierto el grupo tioéster, C3(H<sub>2</sub>O) actúa como C3b. En presencia de iones magnesio, C3(H<sub>2</sub>O) puede unirse a la proteína tipo C2, factor B, e interactuar con proteínas de tipo C1, factor D y así producir la enzima convertasa de la vía alterna que lisa C3, justo de la misma forma como la convertasa clásica y lisa C3. Una pequeña cantidad de C3b puede unirse de forma covalente a la superficie de las células, incluidos los microorganismos. El complejo C3bBb es la C3 convertasa de la vía alternativa y su función es escindir más moléculas de C3, consiguiendo así una amplificación secuencial, de tal modo que pueden depositarse más de  $2 \times 10^6$  moléculas de C3b en una superficie antigénica en menos de cinco minutos. Un enlace tioéster interno de C3 se vuelve inestable cuando se escinde la molécula y reacciona con los grupos amino o hidroxilo de las proteínas o polisacáridos de la superficie de la célula para formar enlaces amida o éster. Si no se forman estos enlaces C3b permanece en la fase líquida, su tioéster se hidroliza rápidamente e inactiva y cesa la activación del complemento. El C3b unido se fija a continuación a una proteína plasmática denominada factor B y, a continuación, el factor B se escinde por una serina proteasa plasmática denominado factor D, lo que genera un fragmento Bb que permanece unido a C3b.

Algunas de las moléculas C3b generadas por la C3 convertasa de la vía alternativa se unen a la properdina convertasa, una proteína llamada properdina, se une a esa convertasa y la estabiliza, eso da lugar a la formación de complejos C3bBb3b, que actúa como C5 convertasa de la vía alternativa, análoga al complejo C4b2a3b en la vía común, para escindir C5 e iniciar los pasos finales de la activación del complemento. La actividad de la convertasa de C3 C3Bb tiene una vida media de solo cinco minutos, a menos que se una a él la proteína sérica properdina, lo que la estabiliza y extiende la vida media de esta actividad de convertasa a 30 minutos.

La activación estable de la vía alternativa ocurre sobre la superficie de las células de microorganismos y no sobre las células de mamíferos. Las membranas de la mayor parte de las células de mamíferos tienen concentraciones altas de ácido siálico, que contribuye a la inactivación rápida de moléculas C3b unidas en células huésped. Debido a que muchas superficies antigénicas extrañas (p. ej., paredes de células bacterianas, paredes de células de levaduras y ciertas envolturas virales) solo tienen concentraciones bajas de ácido siálico, el C3b que se une a estas superficies permanece activo más tiempo.



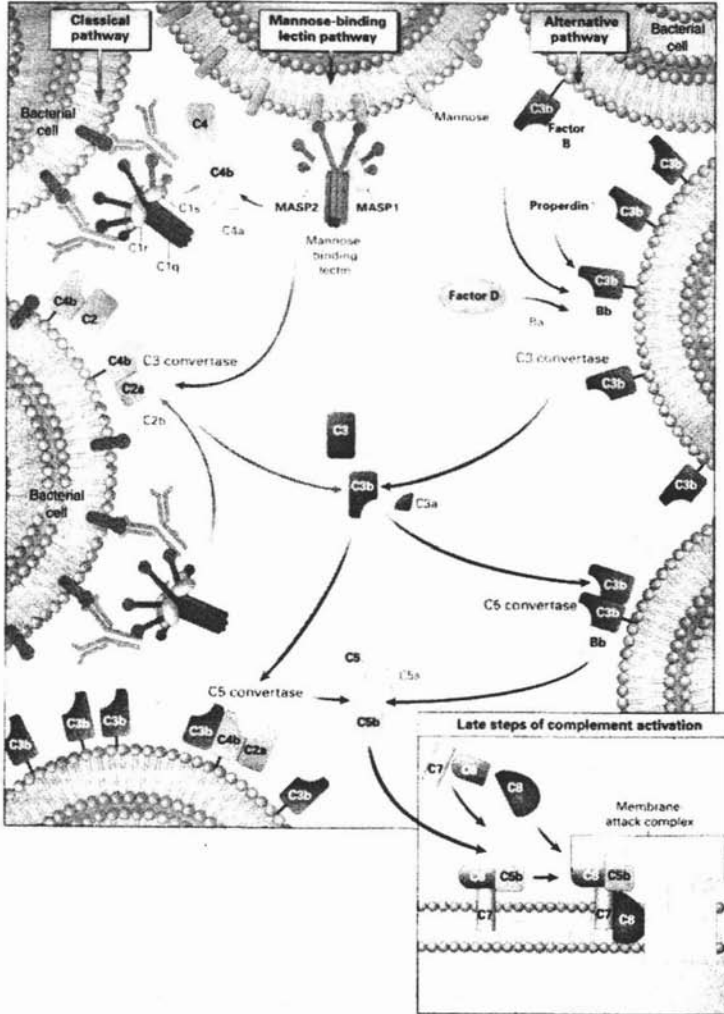
Figura 6. El C3 soluble en el plasma experimenta una hidrólisis espontánea lenta de su enlace tioéster interno, el C3b de superficie se une al factor B, que es escindido y libera al pequeño fragmento Ba. El fragmento mayor, Bb, permanece unido formando C3bBb (C3 convertasa). Este complejo transforma más C3, generando un circuito de retroalimentación positiva. Las superficies activadoras, por ejemplo la de los MO, estabilizan C3b, al facilitar su unión al factor B, participando en la formación de C5 convertasa. Esta activa al siguiente componente del sistema del complemento C5.<sup>28</sup>



#### 3.4.4.4. VÍA DE LA LECTINA DE UNIÓN A MANOSA (MBL)

Las lectinas son proteínas que reconocen blancos de carbohidratos específicos y se unen a ellos. Al igual que la vía alternativa, la activación de la vía de la lectina no depende de Ac. Sin embargo, el mecanismo es más similar al de la vía común, porque después de iniciarse prosigue a través de la acción de C4 y C2 para producir una convertasa de C5.

La vía de la lectina se activa por la unión de lectina que une manosa (MBL) a residuos de manosa en glucoproteínas o carbohidratos en la superficie de microorganismo, incluidas ciertas cepas de *Salmonella*, *Listeria* y *Neiseria*, además de *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*. La MBL es una proteína de fase aguda que se produce en respuestas inflamatorias. Una vez fijada a una superficie, la MBL puede activar dos serina-proteasas relacionadas con MBL: MASP-1 y MASP-2 (del inglés *MBL-associated serine proteases*). Estas proteasas comparten homología estructural con C1r y C1s. La MASP-2 activada lisa C4 y así genera una convertasa de C3: C4b2a. Esto significa que la activación de los componentes C2-C4 para formar una convertasa C5 sin necesidad de la unión de Ac específicos representa un mecanismo innato de defensa importante comparable a la vía alternativa, pero que utiliza los elementos de la vía común, excepto las proteínas C1. Se piensa que MASP-1 lisa C3 y puede activar la vía alterna directamente. Los componentes terminales de esta cascada del complemento posteriormente proceden como la vía clásica.



**Figura 7.** La lectina que se une a manosa (MBL) se parece estructuralmente y funcionalmente al subcomponente C1q y es un miembro de la familia de las lectinas calcio-dependiente. Esta proteína activa al complemento a través de dos proteasas con serina conocidas como MASP1 y MASP2 (Manose Associated Serine Proteases 1 and 2) las cuales a su vez funcional y estructuralmente son similares a C1r y C1s, respectivamente. Estas proteínas, unidas a azúcares actúan sobre C4 y C2 para formar C3 convertasa. Continuando de igual modo que la vía clásica. Las tres vías de activación del complemento terminan en la formación del complejo de ataque de membrana.<sup>34</sup>

Parecen existir métodos adicionales de activación de la vía MBL a través de complejos Ag-Ac y moléculas IgG que carece de residuos galactosa terminales, como se observa en pacientes con artritis reumatoide. La vía MBL es regulada por el inhibidor C1 y por la alfa2-macroglobulina.

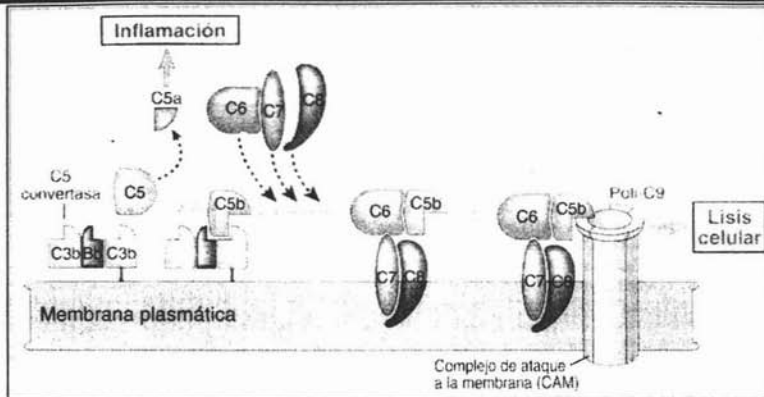


### 3.4.5. COMPLEJO DE ATAQUE DE MEMBRANA (MAC; MEMBRA ATTAACK COMPLEX)

Las C5 convertasas generadas por las vías alternativa, clásica o de la lectina inician la activación de los componentes finales del sistema del complemento, que culminan en la formación del complejo de ataque de membrana (CAM) capaz de destruir células. Está enzima segmenta C5, que contiene dos cadenas proteínicas, alfa y beta. Después de la unión de C5 al componente C3b no enzimático de la convertasa se segmenta la terminal amino de la cadena alfa. Esto crea un fragmento pequeño C5a, que se difunde, y el fragmento C5b grande, que se une a la superficie de la célula blanco y proporciona un sitio de unión para los componentes subsecuentes del CAM. El componente C5b es en extremo lábil y se inactiva en el transcurso de dos minutos a menos que se una a C6 y se establezca su actividad.

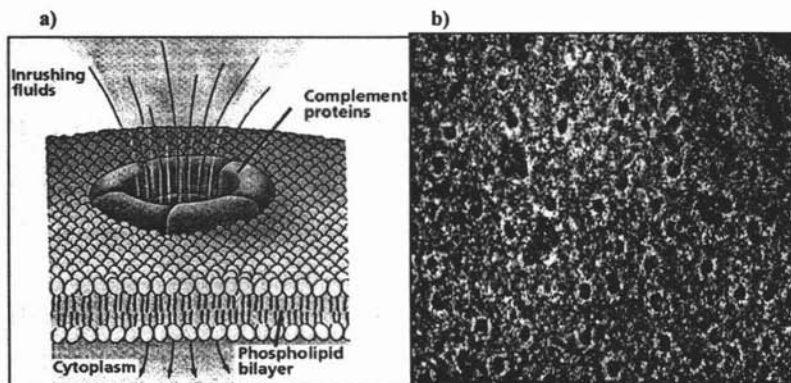
A medida que se une C5b6 a C7, el complejo resultante experimenta una transición estructural hidrófila-anfifila que expone regiones hidrófobas, que sirven como sitios de unión para fosfolípidos de membrana. Si la reacción ocurre en la membrana de una célula blanco, los sitios de unión hidrófobos permiten que se inserte el complejo C5b67 dentro de la bicapa fosfolípida. Sin embargo, si la reacción tiene lugar en un complejo inmunitario u otra superficie de actividad no celular, entonces los sitios de unión hidrófobos no pueden fijar el complejo y se libera. Los complejos C5b67 liberados pueden insertarse en la membrana de células cercanas y mediar lisis "de testigo virgen". El componente C7 del complejo C5b67 resultante se inserta en la doble capa lipídica de las membranas celulares, donde se convierte en un receptor de alta afinidad para una molécula de C8. La proteína C8 es un trímero compuesto de tres cadenas, una de las cuales se une al complejo C5b67; otra se inserta dentro de la doble capa lipídica de la membrana.

El complejo C5b678 crea un poro pequeño de 10 Å de diámetro; la formación de este poro puede conducir a lisis de glóbulos rojos pero no de células nucleadas. La etapa final de la formación del MAC es la polimerización y unión de C9, una molécula parecida a la perforina, una proteína citolítica de los gránulos que existen en los linfocitos T citotóxicos (LTC) y NK, al complejo C5b678 puede unirse y polimerizarse hasta 10 a 17 moléculas de C9 por un solo complejo C5b678. Durante la polimerización, las moléculas C9 experimentan una transición hidrófila-anfifila, de tal forma que también pueden insertarse en la membrana. El MAC terminado que tiene una forma tubular y un tamaño de poro funcional de 70 a 100 Å, consiste en un complejo C5b678 rodeado por un complejo poli-C9. Debido a que los iones y las moléculas pequeñas pueden difundirse con libertad a través del conducto central del MAC, las células no pueden conservar su estabilidad osmótica y se destruye por la entrada de agua y la pérdida de electrolitos.



**Figura 8.** Al ser escindido C5 se libera un pequeño fragmento, C5a, el fragmento mayor, no se une de manera covalente. Se estabiliza al unirse a C6. Cuando el C7 se une, el complejo C5b, C6 y C7 se hace hidrofóbico. Es en parte soluble en lípidos y puede insertarse en la bicapa de la membrana celular. Cuando C5b67 se une a C8, se forma un pequeño canal en la membrana celular. Se pueden unir múltiples moléculas de C9 e incrementar en gran parte el canal.<sup>28</sup>

Las células con estructuras metabólicas más complejas, hasta cierto grado pueden internalizar y distribuir complejos del complemento que se forman en la superficie celular o dispersarlos como vesículas a partir de la superficie celular y de esta forma proporcionar cierta protección contra el ataque del complemento.



**a) Figura 9.** El canal formado por el MAC tiene una superficie hidrofóbica externa y un canal hidrofílico que permite el paso de agua e iones. **b) Imagen 3.** fotomicrografía de lesiones inducidas por complemento en la membrana de un glóbulo rojo. Estas lesiones resultan de la formación del MAC.<sup>31</sup>

### 3.4.6. REGULACIÓN DEL COMPLEMENTO.

La activación de la cascada del complemento y la estabilidad de las proteínas del complemento activas se encuentran reguladas estrechamente para evitar la activación de esté en las células normales del huésped y limitar la duración de su activación, incluso en las células microbianas y los complejos Ag-Ac. Cuando el complemento participa como causa de enfermedad, por lo general funciona normalmente, pero en dirección equivocada daña los tejidos del huésped.

Los distintos mecanismos reguladores inhiben la formación de las C3 convertasas en los pasos iniciales de la activación del complemento, escinden e inactivan las C3 y C5 convertasas e inhiben la formación del CAM en los pasos finales de la vía del complemento

- La primera de estas proteínas, el inhibidor C1 (C1INH), es un inhibidor de la serina proteasa (serpina) que reconoce C1r y C1s activados y destruye su actividad. El C1INH se convierte en diana de la actividad enzimática del complejo C1r<sub>2</sub>-C1s<sub>2</sub>. El C1INH es escindido por estas proteínas del complemento, a las que se une covalentemente y, por consecuencia, el tetrámero C1r<sub>2</sub>-C1s<sub>2</sub> se disocia de C1q, deteniéndose así la activación por la vía clásica. Ya que C1INH se consume cuando actúa como inhibidor, se necesita el producto de síntesis de dos genes para obtener una concentración plasmática relativamente grande del producto proteínico de este gen. Se presenta una deficiencia relativa en pacientes con angioedema hereditario, quienes tienen defecto en uno de los genes causantes de la formación de C1INH, y padecen ataques frecuentes de angioedema, acumulación aguda e intermitente de edema líquido en la piel y las mucosas.

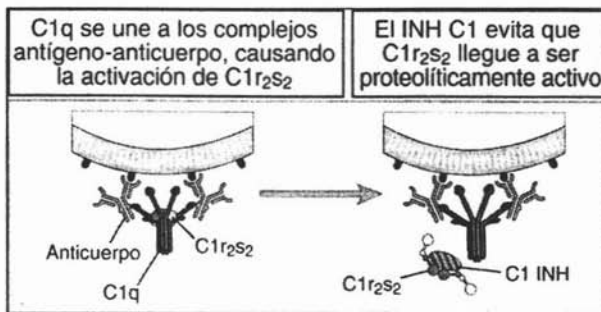


Figura 10. La glucoproteína inhibidora de C1, INH, puede formar un complejo con C1r<sub>2</sub>s<sub>2</sub>, determinar que se disocie de C1q y prevenir la activación adicional de C4 o C2.<sup>28</sup>

- La proteína unida a C4 (C4bp; *C4-binding protein*) y una segunda proteína, el factor, se encargan de la regulación de C4b. El C4bp se une a C4b y facilita su escisión por medio de la enzima proteolítica factor I. En la superficie del blanco, no se requiere C43bp para la escisión de C4b por el factor I, pero su presencia puede acelerar el proceso.
- El factor I también actúa de modo proteolítico para inactivar C3b y C3(H<sub>2</sub>O). está actividad requiere un factor denominado H. El factor H actúa como un factor obligado en la fase líquida. En presencia de los factores H e I, la cadena  $\alpha$  de C3b o C3(H<sub>2</sub>O) se escinde en dos sitios, para formar los fragmentos iC3b, C3d y C3dg que no participan en la activación del complemento, pero pueden ser reconocidos por los receptores de los fagocitos.

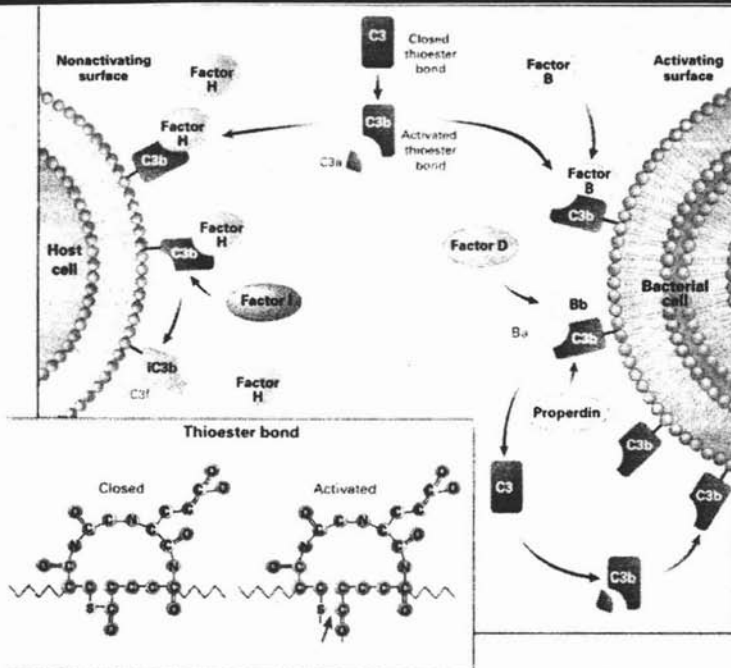


Figura 11. La actividad enzimática del C3b está regulada por el factor I, y otras tres proteínas: el factor H, que es una proteína plasmática y dos proteínas de membrana celular, receptor del complemento tipo I (también llamada CD35) y la proteína cofactor de membrana (también llamada CD46). El factor H es la proteína reguladora del complemento dominante.<sup>34</sup>

- El ensamblaje de los componentes de las C3 y C5 convertasas se inhibe mediante la unión de proteínas reguladoras al C3b y C4b depositados en las superficies celulares. Cuando se deposita C3b sobre las superficies celulares normales de los mamíferos, puede unirse a varias proteínas de membrana, como la proteína cofactor de membrana (MPC o CD46), el receptor de complemento de tipo I (CR1) y el factor desacelerador (DAF), así como una proteína plasmática denominada proteína de unión a C4 (C4BP). Mediante la unión de C3b o C4b, estas proteínas inhiben competitivamente la fijación de otros componentes de la C3 convertasa, como la Bb de la vía alternativa y el C2a de la vía clásica, bloqueando así una mayor progresión de la cascada del complemento. Además, las superficies celulares ricas en ácido siálico favorecen la unión de la proteína H sobre el factor B de la vía alternativa.

DAF es una proteína de membrana unida a glucofosfatidilinositol que se expresa en las células endoteliales y en los eritrocitos. La deficiencia de una enzima necesaria para formar dichas uniones entre proteínas y lípidos ocasiona una incapacidad para expresar muchas proteínas de membrana asociadas a glucofosfatidilinositol, tales como DAF y CD59, y produce una enfermedad denominada hemoglobinuria paroxística nocturna. Esta enfermedad se caracteriza por brotes recurrentes de hemólisis intravascular, atribuibles al menos parcialmente a una activación del complemento no regulada en la superficie de los eritrocitos.

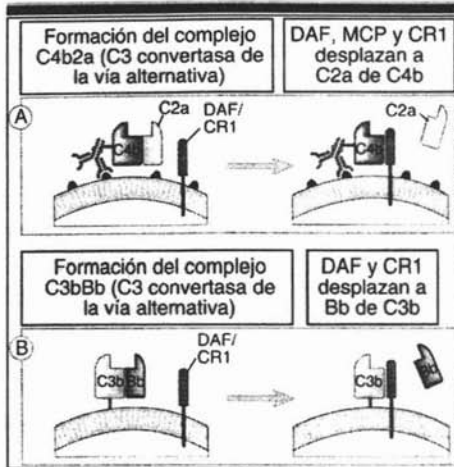
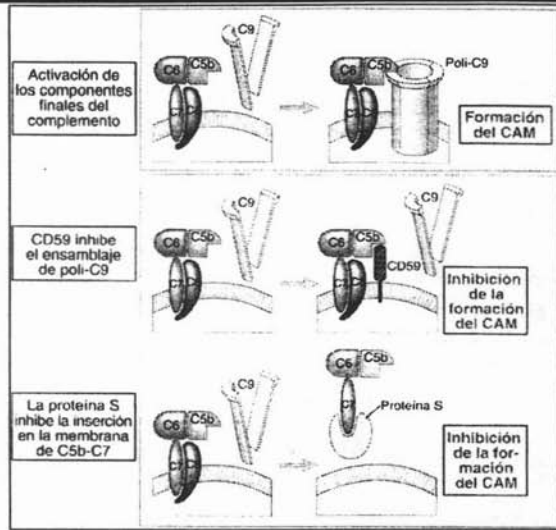


Figura 12. Tanto DAF como Cr1 aceleran la disociación del C3bBb localizado sobre las membranas de células antígenas, promoviendo la disociación de C3b del complejo. CR1 y MCP actúan como cofactores en la escisión del factor C3b por parte del factor I. Estas reacciones son exactamente iguales a las actividades de control que ejercen DAF, MCP y CR1 sobre el complejo C4b2a de la vía clásica cuando este se encuentra unido a las membranas celulares.<sup>28</sup>

- Otra proteína de control, la proteína S (llamada también vitronectina), interactúa con el complejo C5b67 al formarse en la fase líquida, y se une al sitio de enlace de membrana para evitar la unión de C5b67 a las membranas biológicas. Después de la unión de la proteína S al C5b67 en la fase líquida, puede proceder la unión de C8 y C9 al complejo de la fase líquida, pero el complejo no se inserta en la membrana lipídica y no lisa células.
- La clusterina y el factor J son dos reguladores del complemento de fase líquida descritos recientemente. La clusterina actúa evitando la inserción del complejo C5b67 en la membrana celular. Los niveles bajos de clusterina se relacionan con algunas manifestaciones de lupus eritematoso sistémico.
- La formación de CAM se inhibe por una proteína de membrana denominada CD59. Está es una proteína unida a glucofosfatidilinositol. Actúa incorporándose al los CAM en crecimiento tras la inserción en la membrana de C5b-8, lo que inhibe la unión posterior de las moléculas de C9.

Figura 13. CD59 es una proteína que se une a las membranas a través de un pie naturaleza glucosfolipídica. Esta ampliamente distribuida en las membranas celulares, se une a las moléculas C8 que se encuentran formando parte de complejos C5-8 e inhibe la inserción y el desplegado de C9 en las membranas celulares. La formación del CAMP ytambien se inhibe por proteínas plasmáticas, como la proteína S, que actúa al fijarse a complejos C5b67 solubles y evitar su inserción en las membranas celulares cerca del lugar donde se inició la cascada del complemento.<sup>29</sup>



Se cree que hay una jerarquía a la hora de inhibir la activación del complemento (Cd59 > DAF > MCP).

La función de las proteínas reguladoras puede ser superada al aumentar el grado de activación del complemento. La fagocitosis y la lesión de las células normales mediadas por el complemento son mecanismos patogénicos importantes en muchas enfermedades inmunológicas. En estas enfermedades, pueden depositarse grandes cantidades de anticuerpos sobre las células huésped, lo que genera suficientes proteínas del complemento activadas para que las moléculas reguladoras sean incapaces de controlar la activación del complemento.

Tabla 5 Reguladores del complemento<sup>31</sup>

Proteína	Componente regulado	Función
<b>Proteínas reguladoras solubles</b>		
C1 inhibidor	C1r, C1s	Inhibidor de serin-proteasas que se une covalentemente a C1r y C1s bloqueando su capacidad de participar en la vía clásica
C4bp (une a C4)	C4	Acelera la destrucción de la convertasa de C3 (C4b2a) de la vía clásica. Actúa como cofactor para la proteólisis de C4b por el factor I.
Factor H	C3b	Acelera la destrucción de la convertasa de C3 (C3b8b) de la vía alternativa. Actúa como cofactor para la proteólisis de C3b por el factor I.
Factor I	C4b, C3b	Rompe o inactiva proteolíticamente C3b y C4b usando C4bp, factor H, CR1 o MCP como cofactores
Proteína S (Vitronectina)	C5b-C7	Se une al complejo C5b-C7 e impide la inserción del MAC en la membrana
SP-40, 40 (clusterina)	C5b-C7	Similar a la anterior. También llamado CLI ( <i>complement lysis inhibitor</i> )
<b>Proteínas reguladoras de membrana</b>		
CR1 (CD35) Receptor del complemento tipo 1	C3b, C4b	Acelera la disociación de la convertasa de C3. Actúa como cofactor en la proteólisis de C4b y C3b por el factor I. Distribución tisular amplia
MCP (CD46) Proteína cofactor de membrana	C4b, C3b	Actúa como cofactor en la proteólisis de C4b y C3b por el factor I. Distribución tisular amplia. Inhibe la lisis de células propias.
DAF (CD55) Factor acelerador de membrana	C4b2a C3bBb	Acelera la disociación de la convertasa de C3. Distribución tisular amplia. Inhibe la lisis de las células propias
CD59 (pronectina) Y HRF	C8, C9	Distribución tisular amplia. Inhibe la lisis de células propias. Bloquean la unión de C8 y C9, impidiendo la unión del MAC a membranas propias y su posterior lisis. Están restringidos a C8 y C9 de la misma especie.



### 3.4.7. COMPLEMENTO E INFLAMACIÓN.

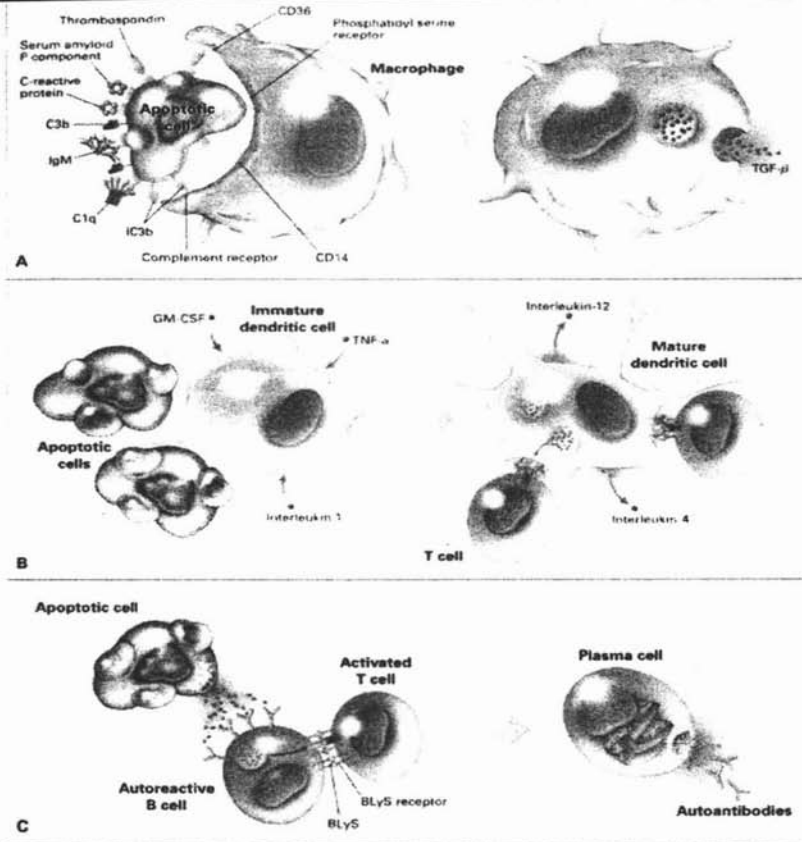
Los fragmentos proteolíticos del complemento C5a, C4a y C3a inducen la inflamación aguda mediada por la activación de los mastocitos y neutrófilos. Estos tres péptidos se unen a los mastocitos e inducen su desgranulación, con liberación de los mediadores vasoactivos como la histamina. Estos péptidos también se llaman anafilotoxinas porque las reacciones de mastocitos que desencadenan son características de la anafilaxia; originan contracción del músculo liso y desgranulación de células cebadas y basófilos, con liberación consecuente de histaminas y otras sustancias vasoactivas que inducen salida de líquido por los capilares.<sup>28, 29</sup>

En los neutrófilos, C5a estimula su movilidad, su adhesión firme a las células endoteliales y, en dosis altas, al estallido respiratorio; estimula drásticamente el metabolismo oxidativo de los neutrófilos y la producción de especies reactivas del oxígeno, y desencadena liberación de enzimas lisosomales de diversas células fagocíticas. Además, C5a puede actuar directamente sobre células endoteliales vasculares y provocar un aumento de la permeabilidad vascular y la expresión de selectina P que estimula la unión de los neutrófilos. Esta combinación de acciones de C5a contribuye a la inflamación en las zonas donde se activó el complemento.

### 3.4.8. COMPLEMENTO Y AUTOINMUNIDAD

El complemento juega un rol muy importante en la inducción de la respuesta humoral. La activación de las células B está mediada por receptores tipo 2. Cuando un Ag se encuentra a una célula B en presencia de complemento, el umbral de activación de las células B es disminuido. Finalmente, cuando el Ag es afianzado por moléculas C3dg (C3dg es el principal fragmento del ligando covalente C3, este puede ser ligado con el receptor del complemento tipo 2) mucho menos antígenos (y puede ser acoplado por un pequeño factor por debajo de los 10 000) son requeridos para generar los niveles de Ac contra los Ag nativos. Para generar una importante cantidad de autoanticuerpos y amplificar la respuesta son necesarias dosis pequeñas de Ag.





**Figura 14.** Tres posibles vías de generación de autoinmunidad; A) el complemento tiene la función de eliminar inmunocomplejos de la circulación y removerlos de los tejidos. El complemento también se une a células que se encuentran bajo apoptosis y ayuda a eliminarlas de los tejidos. Si el complemento falla en este punto, tal material residual (consistente en componentes parcialmente degradados de citoplasma y núcleo) frío se acumula y provoca una respuesta autoinmune. En tales casos las deficiencias del complemento juegan un rol muy importante en la patología, B) la captación de autoantígenos por células dendríticas inmaduras en presencia de citocinas inflamatorias. Estas causan que las células maduren a células presentadoras de antígeno, presentando luego, estos autoantígenos a las células T; C) la posible tercer vía es la combinación de células T con la ayuda de células autorreactivas B, las cuales toman el autoantígeno del medio o por receptores de inmunoglobulinas.<sup>35</sup>

### 3.4.9. RECEPTORES DEL COMPLEMENTO.

- Las moléculas C1q de unión celular incluyen a C1qRp, C1qR02, CR1, gC1qR y cC1qR. C1qRp se encuentra en las células mieloides, células endoteliales, plaquetas y células de la microglia. C1qRp se une a C1q, así como a MBL y proteína surfactante pulmonar A (SP-A). La activación de este receptor permite la fagocitosis mediada por los receptores CR1 y Fc. La actividad de C1qR02- desencadena la generación de radicales de oxígeno tóxicos por parte de neutrófilos, eosinófilos y células del músculo liso. El gC1qR se localiza en fagócitos, plaquetas y células endoteliales y, en neutrófilos, induce quimiotaxia, la producción de Ac y la secreción de citocinas.

- El receptor del complemento 1 o CR1 (CD35), se expresa en eritrocitos, fagocitos mononucleares, eosinófilos, linfocitos B, algunos linfocitos T, podocitos glomerulares, células dendríticas foliculares y astrocitos. El CR1 es el receptor de C3b y C4b. El CR1 participa en la opsonización y fagocitosis de partículas cubiertas con C3b. El CR1 permite la fagocitosis de IgG y partículas cubiertas con C3b a través de monocitos y neutrófilos. Aquí la fagocitosis requiere de el desencadenamiento simultáneo de dos receptores localizados en la superficie del fagocito. El CR1 se expresa en eritrocitos, donde contribuye al transporte de complejos inmunitarios hacia el hígado para la degradación de células de Kuffer.
- El receptor de complemento 2, o CR2 (CD21), es un receptor de C3d y C3dg y se localiza en linfocitos B, células dendríticas foliculares, algunos linfocitos T, timocitos y astrocitos. La proteína C3d que surge de C3 se une a CR2 de los linfocitos B y sirve de señal para inicio de la respuesta inmunitaria humoral. Los linfocitos B pueden unirse al Ag mediante sus receptores Ig y unirse simultáneamente a C3d a través del CR2. Las señales combinadas provocan la activación del linfocito B. Los Ag opsonizados también son captados por las células dendríticas foliculares de los centros germinales de los órganos linfáticos. La células dendríticas foliculares presentan los Ag a los linfocitos B en los centros germinales y este proceso es importante para la selección de linfocitos B de alta afinidad
- El receptor de complemento 3 o CR3 (CD11b/CD18, Mac-1), es miembro de la familia de las integrinas  $\beta 2$  leucocitarias de las moléculas de adhesión. El CR3 principalmente es un receptor de iC3b y se localiza en fagocitos mononucleares, granulocitos, células asesinas naturales y células de la microglia. Al igual que el CR1, el CR3 permite la fagocitosis de partículas cubiertas con IgG e iC3b.
- El receptor de complemento 4 o CR4 (CD11c/CD18), es también una integrina  $\beta 2$  y un receptor de iC3b. Se localiza en las células mieloides, células dendríticas, células asesinas naturales, células B activas, algunos linfocitos T activados, plaquetas y células de la microglia. Al igual que CR3, CR4 ayuda a la adhesión de neutrófilos al endotelio durante el proceso inflamatorio<sup>27, 28</sup>

Tabla 6 Receptores del complemento<sup>31</sup>

Receptor	Ligandos principales	Función	Distribución tisular
CR1 (CD35)	C3b, C4b, C1q	Transporta inmunocomplejos para su eliminación	Todas las células de la sangre salvo plaquetas
CR2 (CD21)	C3dg, iC3b, C3d	Activación de linfocitos B por inmunocomplejos	Linfocitos B y células dendríticas foliculares
CR3 (CD11b/CD18)	iC3b, LPS, fibrinógeno	Estimula fagocitosis	Fagocitos
CR4 (CD11c/CD18)	iC3b	Estimula la fagocitosis	Fagocitos
C1qR	C1q	Estimula la fagocitosis y la eliminación de inmunocomplejos	Monocitos, macrófagos, plaquetas y células endoteliales
C5aR (C4aR, C3aR)	C5a (C4a, C3a)	Activación y quimiotaxis	Fagocitos, mastocitos y basófilos

### 3.4.10. DEFICIENCIAS DEL COMPLEMENTO.

En los seres humanos se han descrito deficiencias hereditarias y espontáneas de muchas proteínas del complemento. Las deficiencias homocigóticas en cualquiera de los componentes tempranos de la vía común (C1q, Cr, C1s, C4, C2 y C3), los pacientes con deficiencia de estos componentes muestran síntomas similares, en especial un incremento notable de enfermedades por complejos inmunitarios como lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis y vasculitis. Estas deficiencias destacan la importancia de las reacciones tempranas del complemento en la generación de C3b y la función crítica de este último en la solubilización y depuración de complejos inmunitarios. Si los inmunocomplejos que se generan normalmente no se eliminan de la circulación se pueden depositar en las paredes de los vasos sanguíneos y los tejidos, donde activan a los leucocitos por las vías dependientes del receptor Fc y producen una inflamación local. Las proteínas del complemento regulan las señales mediadas por los Ag recibidas por los linfocitos B; en su ausencia, los autoantígenos pueden no inducir la tolerancia en los linfocitos B y se produce autoinmunidad. La deficiencia de C3 se asocia a infecciones bacterianas piógenas (que forman pus), como estreptococos y estafilococos. La deficiencia de C3 se asocia a infecciones bacterianas piógenas graves que pueden ser mortales, lo que confirma la función central de C3 en la activación de C5, la formación del MAC y su importancia en la opsonización, la potenciación de la fagocitosis y la destrucción de estos microorganismos.<sup>27, 28, 31, 32</sup>

La deficiencia de proteínas activadoras del complemento se asocian a una activación anómala del complemento y varias alteraciones clínicas relacionadas.

Las deficiencias de los receptores del complemento incluyen la ausencia del receptor del complemento tipo 3 (CR3) y CR4. Se han informado asimismo deficiencias congénitas de proteínas reguladoras del complemento inhibitor. La deficiencia de C1nh es

un padecimiento autosómico dominante con una frecuencia de en 1 en 1000. La deficiencia del inhibidor de C1 asociada a linfoproliferación.

### 3.5.1. FUNCIÓN RENAL

Los riñones son órganos excretores y reguladores. Al excretar agua y solutos, libran al organismo de un exceso de agua y de productos de desecho. Junto a los sistemas cardiovascular, endocrino y nervioso, regulan el volumen y la composición del líquido extracelular (plasma y líquido intersticial) dentro de límites muy estrechos. Eso se logra mediante la formación de la orina, que es un filtrado modificado del plasma. En el proceso de la formación de la orina, los riñones regulan: 1) el volumen del plasma sanguíneo (y de ese modo contribuyen significativamente a la regulación de la presión arterial); 2) la concentración de los productos de desecho de la sangre; 3) la concentración de electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y otros iones) del plasma; y 4) el pH plasmático.<sup>38,39</sup>

### 2.5.2. ELEMENTOS DE LA FUNCIÓN RENAL

Los riñones son órganos que tienen forma de frijol y están situados a ambos lados de la columna vertebral por debajo del diafragma y el hígado. Cada riñón adulto pesa unos 160 g y mide unos 11 cm de longitud y 5 – 7 cm de anchura (aproximadamente el tamaño de un puño). En un corte sagital los riñones revelan tres regiones principales; a) la corteza es la región más externa y se localiza justo por debajo de la cápsula renal; b) la médula es la región central dividida en médula externa e interna; la externa posee una exterior y una interior, y c) la papila que es el extremo más interno de la médula interna y desemboca en unas bolsas llamadas cálices (mayores y menores), que son prolongaciones del uréter. La orina de cada riñón drena en un uréter y llega a la vejiga para ser almacenada y eliminada posteriormente.

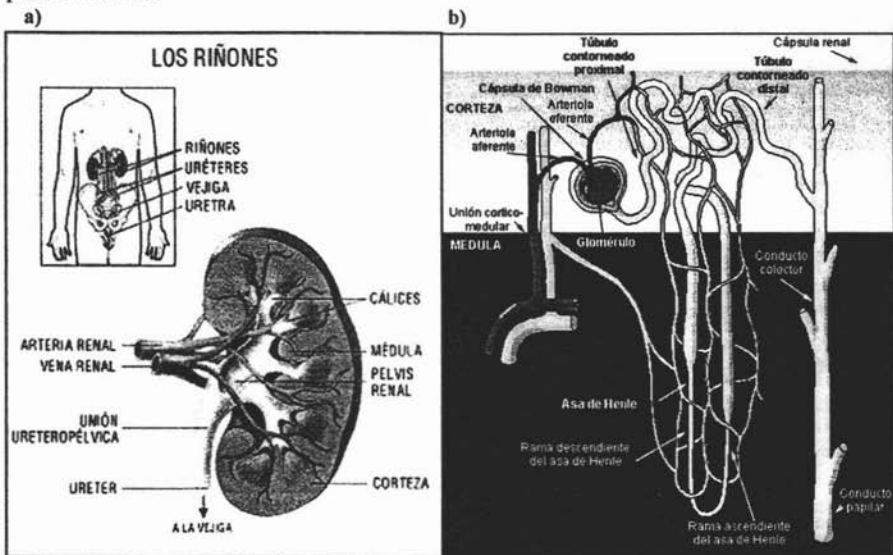


Figura 15. a) Se muestran los órganos del aparato urinario, así como un corte coronal de un riñón. b) Diagrama esquemático de nefrona. La nefrona consta de un corpúsculo renal, un túbulo proximal, un asa de Henle, un túbulo distal y un sistema de conductos conectores.<sup>38,39</sup>

La nefrona es la unidad funcional del riñón, cada riñón contiene más de un millón de nefronas. La nefrona o túbulo renal está integrado por: túbulo contorneado proximal, túbulo recto proximal, asa de Henle (con una rama descendente delgada, una ascendente delgada y una ascendente gruesa), túbulo contorneado distal y conductos colectores. Cada segmento de la nefrona es funcionalmente distinto y las células epiteliales que revisten cada segmento poseen una ultraestructura diferente.

Existen dos tipos de nefrona: superficiales corticales y yuxtamedulares, distinguibles por la localización de sus glomérulos. Las nefronas superficiales corticales tienen sus glomérulos en la corteza externa, estas nefronas poseen asas de Henle relativamente cortas que sólo descienden hasta la médula externa. Los glomérulos de nefronas yuxtamedulares se encuentran cerca del bode corticomedular. Los glomérulos de las nefronas yuxtamedulares son más largos comparando la superficie externa con los de las nefronas corticales superficiales y, por consiguiente, muestran mayor tasa de filtración glomerular.

La cápsula glomerular (de Bowman) rodea al glomérulo. La cápsula glomerular y el glomérulo asociado a ella están localizados en la corteza del riñón y en conjunto forman el corpúsculo renal. La cápsula glomerular contiene una capa visceral interna del epitelio, que envuelve los capilares glomerulares, y una capa parietal externa.

Las células endoteliales de los capilares glomerulares están rodeadas por una membrana basal, rodeada por podocitos. El endotelio capilar, la membrana basal y las prolongaciones de los podocitos constituyen la denominada barrera de filtración. El endotelio está perforado (es decir, contiene orificio de  $700 \text{ \AA}$ ;  $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ ) y su permeabilidad es absoluta para el agua, los solutos pequeños (como  $\text{Na}^+$ , urea y glucosa) e incluso para pequeñas proteínas, pero es impermeable para las células. Como las células endoteliales expresan en su superficie glucoproteínas con carga negativa, pueden retrasar filtración de proteínas aniónicas grandes. La membrana basal que se une a la matriz porosa con carga negativa; constituye una importante barrera para la filtración de las proteínas plasmáticas.



**A** Figura 16. A, Microfotografía electrónica de barrido de la superficie externa de capilares glomerulares. Ésta es la imagen que se observaría desde el espacio de Bowman. Las prolongaciones (*P*) de los podocitos se dirigen desde el cuerpo celular (*CC*) hacia los capilares, donde acaban dividiéndose. Su interdigitación crea las hendiduras de filtración. **B**, Microfotografía electrónica de barrido de la superficie interna (lado sanguíneo) de la luz capilar. Las perforaciones de las células endoteliales se ven como pequeños orificios de 700 Å.<sup>40</sup>

**B**

La sangre penetra a los riñones a través de la arteria renal que se ramifica en arterias interlobulares, arterias arqueadas y por último en arterias radiales corticales. Las arterias de menor calibre se subdividen en el primer conjunto de arteriolas, las arteriolas aferentes. Estas llevan sangre a la primera red capilar, los capilares glomerulares, a través de los cuales tiene lugar la ultrafiltración. La sangre abandona los capilares glomerulares por vía de un segundo conjunto de arteriolas, las arteriolas eferentes, que suministran sangre a una segunda red capilar, los capilares peritubulares. Estos rodean las nefronas. En los capilares peritubulares se resorben solutos y agua y se secretan unos cuantos solutos. La sangre de los capilares peritubulares fluye hacia el interior de venas de pequeño calibre y después hacia la vena renal.

Los podocitos, que son endocitos, poseen grandes prolongaciones digitiformes que rodean completamente la superficie externa de los capilares. Estas prolongaciones están interdigitadas para cubrir la membrana basal y se encuentran separadas por huecos, denominados hendiduras de filtración. Cada hendidura tiene poros con unas dimensiones de 40 X 140Å. Por tanto, estas estructuras retrasan la filtración de algunas proteínas y macromoléculas que atraviesan el endotelio y la membrana basal.

Otro componente importante del corpúsculo renal es el mesangio, que consta de células mesangiales y de matriz mesangial. Las células mesangiales rodean a los capilares glomerulares, les proporcionan un soporte estructural, segregan la matriz extracelular, muestran actividad fagocítica y producen prostaglandinas y citosinas. Las células

meseniales localizadas fuera del glomérulo (entre las arteriolas aferente y eferente) se denominan células meseniales extraglomerulares.

En diversas enfermedades autoinmunes se han observado deficiencias de los componentes de la vía clásica del complemento, que han sido asociados con la posible participación del complemento en la inducción y/o mantenimiento de la tolerancia inmunológica.

Las células meseniales participan en la aparición de enfermedades glomerulares mediadas por complejos inmunitarios. Dado que la membrana basal glomerular no rodea completamente a todos los capilares del glomérulo, algunos complejos inmunitarios pueden penetrar en el área mesengial sin tener que atravesarla. Su acumulación provoca una infiltración del mesangio con células inflamatorias y favorece la producción de citocinas y autoacoides en las células del mesangio. Estas sustancias refuerzan la respuesta inflamatoria, que puede ocasionar una cicatrización celular, y finalmente, la obliteración del glomérulo.<sup>40</sup>

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SS es una enfermedad autoinmune, inflamatoria crónica, sistémica, que se caracteriza por la presencia de un proceso inflamatorio, con infiltración linfocitaria y destrucción progresiva de glándulas exocrinas. Existe hipergammaglobulinemia, complejos inmunes en la circulación, y múltiples autoanticuerpos; anti-Ro, anti-La, FR.

Los autoanticuerpos y los complejos inmunes presentes en la circulación de individuos con SS (u otra enfermedad autoinmune) pueden activar al complemento por la vía clásica, provocando una activación excesiva e incontrolable por los mecanismos reguladores, lo que genera lesiones a nivel glandular e incluso sistémico. Se ha determinado que las células mesangiales, que rodean al glomérulo, participan en la aparición de enfermedades glomerulares mediadas por complejos inmunitarios.

Tomando en cuenta lo anteriormente descrito, nos hacemos el siguiente cuestionamiento:

¿Existe asociación entre la actividad del complemento y el daño histopatológico renal en los individuos con SS?

#### 5. OBJETIVOS

1. Determinar unidades 50 % hemolíticas de complemento por vía clásica y vías alternas.
2. Analizar el daño histopatológico renal en ratones CD1 et/et y su relación con el complemento.
3. Determinar el factor reumatoide en ratones.
4. Determinación de parámetros bioquímicos de perfil renal: urea y creatinina.
5. Observar mediante cortes histológicos la existencia de daño renal.

#### 6. HIPOTESIS

Al existir hipergammaglobulinemia y autoanticuerpos presentes en la circulación sanguínea de los individuos con SS, se generaran depositos a nivel renal, los cuales activaran al complemento, generando daño a este nivel. Por lo que al realizar una determinación in vitro de unidades de complemento, en un modelo biológico, estas estarán disminuidas, por el gasto sufrido en el proceso de la patología.



---

## 7.1. POBLACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Serán empleadas tres cepas de ratones de la raza CD1 clasificados como: CD1 +/-, CD1 et/+y CD1 et/et. De los cuales todos los miembros serán de la misma edad (+/- 1 semana).

Se realizará un estudio transversal, retrospectivo, observacional..

## 7.2. CRITERIOS

### INCLUSIÓN

- CD1 +/- hembra, con pelo, albino, de una misma cepa
- CD1 et/+ hembra, con pelo, albino, de una misma cepa
- CD1 et/et: hembra, alopécico, de una misma cepa

### EXCLUSIÓN

- Machos
- CD1 +/-y et/+, con manchas en pelaje

### ELIMINACIÓN

- Preñadas
- Presencia de alguna tumoración
- Muerte natural

## 7.3. VARIABLES

Variables independientes:

1. Edad
2. Peso del animal
3. Peso riñón
4. Concentración de FR
5. Unidades de complemento

Variable dependiente

1. Índice renal
2. Grado de lesión ocular
3. Daño histopatológico renal

---

## 7.4. MATERIAL Y MÉTODO

Biológico:

- a) 30 ratones CD1 +/+
- b) 30 ratones CD1 et/+
- c) 35 ratones CD1 et/et: 25 viejos (50 semanas de edad), 10 jóvenes (12 semanas de edad)
- d) Glóbulos rojos de carnero conservados en solución Alsever.
- e) Glóbulos rojos de conejo conservados en solución Alsever.

Reactivos:

- Buffer TBS

a) Trietanol amina	2,8 mL
b) Cloruro de sodio	7,5 g
c) Cloruro de magnesio	0,1 g
d) Cloruro de calcio	0,22 g
e) Agua destilada	800 mL
f) Ácido clorhídrico 0,1 N	100 mL

Llevar a pH 7,4 con el HCl 0,1 N y aforar a 1 L con agua destilada.

- Buffer TBS libre de calcio

a) Trietanol amina	2,8 mL
b) Cloruro de sodio	7,5 g
c) Cloruro de magnesio	1,423 g
d) EGTA	3,8 g
e) Agua destilada	600 mL
f) Ácido clorhídrico 0,1 N	100 mL

Llevar a pH 7.4 con el HCl 0,1 N y aforar a 1000 mL.

- Solución Alsever

a) Glucosa	20 g
b) Citrato de sodio. 2H <sub>2</sub> O	8,0 g
c) Ácido cítrico. H <sub>2</sub> O	0,55 g
d) Cloruro de sodio	4,5 g
e) Agua destilada	1000 mL

Se esteriliza con autoclave a 100 libras durante 15 minutos, ó mediante filtración al vacío. La sangre de carnero se recibe en esta solución, volumen a volumen, se mantiene en refrigeración hasta 4 semanas para su uso.

- Formalina: dilución de formol al 10 % en TBS
- Hemolisina (2U 50% hemolíticas) en solución TBS.

---

Material de vidrio

- a) Tubos de ensayo 13 X 100
- b) Pipetas Pasteur
- c) Matraz balón 50 mL
- d) Matraz Erlenmeyer 100 y 250 mL
- e) Matraz aforado 1000 mL
- f) Vaso de precipitados 250 mL
- g) Pipetas graduadas 2, 5 y 10 mL

Material de plástico

- a) Tubos Eppendorf
- b) Tapones para tubos de ensayo

Equipo

- a) Equipo de disección
- b) Balanza analítica
- c) Centrífuga
- d) Espectrofotómetro
- e) Pipetas semiautomáticas: 2 - 20  $\mu$ L, 5 - 40  $\mu$ L, 10 - 100  $\mu$ L
- f) Microscopio

MÉTODO

1. Obtención de muestras.

- a) Pesar a cada ratón y sangrarlo mediante el corte de vena axilar: Se anestesia al animal, colóquelo en posición ventral y con un bisturí realice la incisión e el área axilar, colecte la sangre con una pipeta Pasteur. Mantener la sangre obtenida en baño de hielo.
- b) Una vez formados los coágulos centrifugar a 3500 rpm / 5 min. Los sueros obtenidos se colocan en los Eppendorf y se mantienen a  $-20^{\circ}$  C hasta su utilización.
- c) Mediante disección extraer ambos riñones, pesarlos y colocarlos en formalina dentro de un tubo de ensayo, la cual debe cubrirlo aproximadamente tres veces la altura de los riñones, cubrirlos con los tapones y dejarlos reposar. Posteriormente se colocaran en parafina dentro de bloques de plástico, para poder obtener cortes con micrótopo, por último serán teñidos con hematoxilina.

2. Solución de glóbulos rojos de carnero.

- a) Lave los glóbulos rojos por centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos con solución de TBS
- b) Ajuste la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2 % en TBS.
- c) Coloque en un tubo 13 X 100 0,3 mL de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% adicione 1,7 mL de agua destilada. Lea la densidad óptica en un espectro a 500 nm, usando como blanco agua destilada.

Ajuste la densidad óptica a 0,5 con la ecuación  $D. O. 1 X V. 1 = D. O. 2 X V. 2$

3. Solución de glóbulos rojos de conejo.

- d) Lave los glóbulos rojos por centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos con solución de TBS libre de calcio.
- e) Ajuste la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2 % en TBS libre de calcio.
- f) Coloque en un tubo 13 X 100 0,3 mL de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% adicione 1,7 mL de agua destilada. Lea la densidad óptica en un espectro a 500 nm, usando como blanco agua destilada.

Ajuste la densidad óptica a 0,5 con la ecuación  $D. O. 1 X V. 1 = D. O. 2 X V. 2$

## 7.5. TECNICAS

1. Determinación de complemento vía clásica<sup>41, 42</sup>

Método:

- a) Colocar en cada tubo de 10 X 75 mm 25 $\mu$ L de cada suero de ratón ,75 $\mu$ L de TBS y 50 $\mu$ L de glóbulos rojos de carnero sensibilizados al 1%.\*
- b) Incubar a 37°C 30 min. Con agitación cada 5 min. Detener la reacción con 1 mL de TBS frío.
- c) Centrifugar a 3500 rpm / 10min. Eliminar el sobrenadante y el paquete se lisa con 1 mL de agua destilada.
- d) Leer en el espectrofotómetro a 500 nm.

Testigo positivo 50  $\mu$ L de glóbulos rojos de carnero + 1mL de agua destilada  
Blanco 50  $\mu$ L de glóbulos rojos de carnero sensibilizados + 1 mL de TBS.

\*Para sensibilizar los glóbulos rojos de carnero se diluye la hemolisina 1:10 (previamente descomplementada; calentarla durante 30 minutos a 56 °C) y se mezclan con un volumen de GRC al 2% v/v. Incubar 30 min., a 37°C con agitación cada 5 min.

---

## 2. Determinación de complemento vía alterna.<sup>41,42</sup>

Método:

- a) Colocar en cada tubo de 10 X 75 mm 50 $\mu$ L de cada suero de ratón, 50 $\mu$ L de TBS libre de calcio y 50 $\mu$ L de glóbulos rojos de conejo al 1 % sin sensibilizar.
- b) Incubar a 37°C 30 min. Con agitación cada 5 min. Detener la reacción con 15 $\mu$ L de EDTA 0.2 M.
- c) Centrifugar a 3500 rpm / 10min. Eliminar el sobrenadante y el paquete se lisa con 1 mL de agua destilada.
- d) Centrifugar a 3500 rpm / 5 min.
- e) Leer el sobrenadante en el espectrofotómetro a 500 nm.

Testigo positivo 50  $\mu$ L de glóbulos rojos de conejo + 1mL de agua destilada  
Blanco 50  $\mu$ L de glóbulos rojos de conejo +200 $\mu$ L mL de TBS libre de calcio.

## 3. Prueba de Rose-Waaler

Prueba de hemoaglutinación pasiva para detección de FR. Los eritrocitos de camero se recubren con cantidades subaglutinantes de anticuerpo IgG de conejo, específico para eritrocitos de camero. El factor reumatoide aglutina estos eritrocitos.<sup>43</sup>

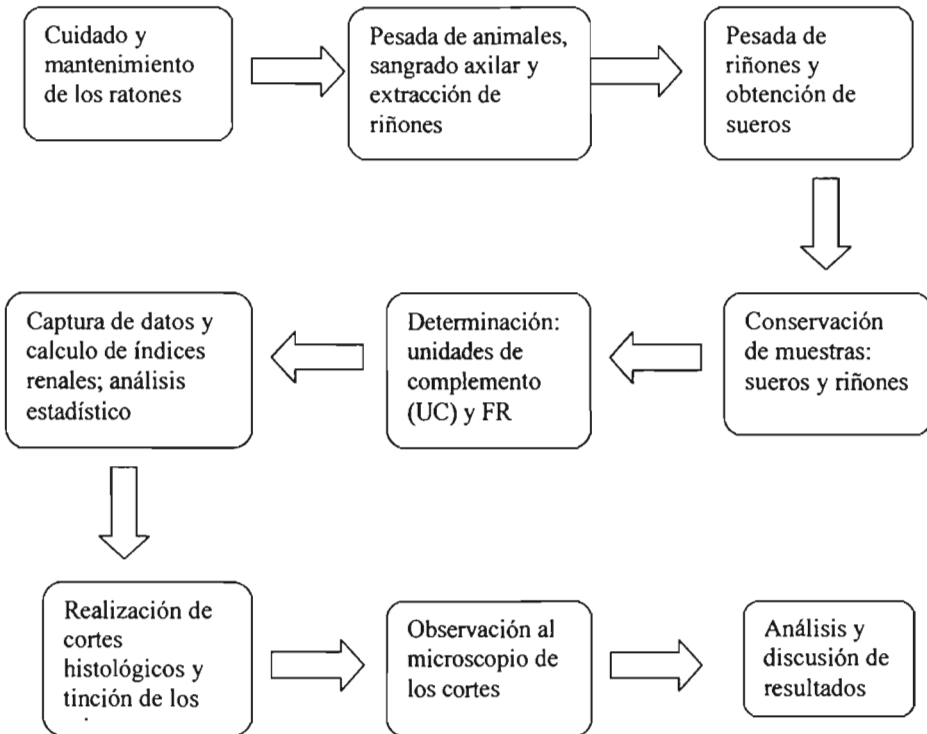
- a) Los glóbulos rojos de camero se colocan en solución Alsever estéril para su conservación.
- b) Se lavan dos veces en solución salina, por centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos, para la solución al 2 %
- c) Tomar 5 mL de la suspensión al 2% y mezclar con 5 mL de hemolisina a una unidad subaglutinante, incubar a 37 °C/ 30 minutos
- d) Lavar dos veces en solución salina, por centrifugación 3500 rpm durante 5 minutos, y ajustar la solución al 1 %
- e) Los sueros se descomplementan incubándolos a 56 °C en baño María
- f) Se realizan diluciones 1:2, 1:4 y 1:8... etc., en placa de poliestireno
- g) Agregar 50  $\mu$ L de la solución de glóbulos rojos de camero-hemolisina
- h) Incubar a 37 °C durante 60 minutos
- i) Hacer la lectura

4. Urea: estuche comercial para la determinación de urea (Weiner-Lab). El método empleado fue ureasa-Berthelot modificado. Iones amonio producidos por acción enzimática reaccionan con salicilato de hipoclorito sódico para formar un complejo verde que se lee a 600 nm. Muestras y patrón se mezclan con ureasa por 5 minutos a 37 °C y posteriormente con hipoclorito sódico, incubandolo durante 5 minutos a 37 °C, se lee contra el blanco de reactivo.

5. Creatinina: estuche comercial para la determinación de creatinina (SPINREACT Ltd. D-125, Cod. 1001111) La creatinina en solución alcalina reacciona con ácido pícrico para formar un complejo coloreado, en cantidad proporcional a la concentración de creatinina. La muestra y el patrón se mezclan con el reactivo de color y se lee la absorbancia  $A_1$  al cabo de 30 segundos y exactamente después de 90 segundos se lee la

absorbancia  $A_2$ , se obtiene la diferencia y se calcula la concentración comparando con el estándar.

## 7.6. DIAGRAMA DE FLUJO



## 7.7. DISEÑO ESTADISTICO

Los resultados obtenidos serán analizados mediante el programa SPSS versión 10.0 para Windows; empleando las pruebas de ANDEVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon y correlación de Pearson.

## 8. RESULTADOS

Las cepas se mantuvieron bajo condiciones de bioterio, con ciclos naturales de luz/oscuridad, libre acceso de agua y alimento. Se eliminó un sujeto del grupo et/+ debido a la presencia de tumoraciones.

Primeramente fueron pesados los animales y registrado el grado de lesión ocular, asignándoles el nivel máximo presentado; ejemplo: derecho inflamado, izquierdo catarata = ratón con catarata.

Los ratones fueron colocados en una cámara con formol para, una vez anestesiados, realizar el corte axilar y obtener la sangre, terminada la sangría se sacrificados mediante dislocación. Inmediatamente procedimos a la extracción y pesado de los riñones, para finalmente colocarlos en formalina.

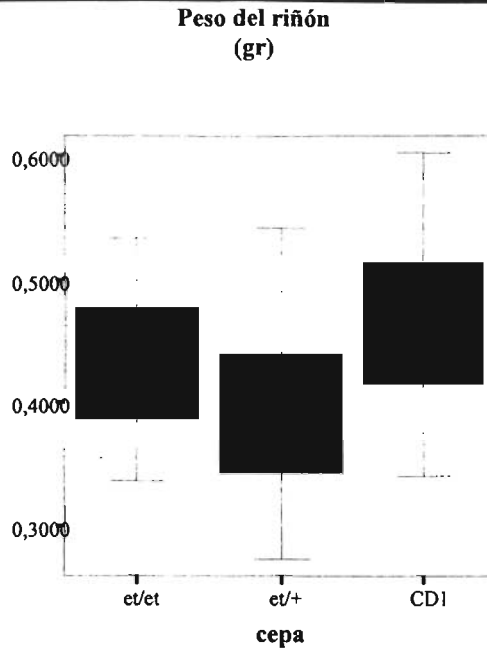
La sangre fue centrifugada a 3000 rpm / 5 minutos, colocando el suero en tubos eppendorf y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Una vez sacados los sueros del congelador se colocaron el baño de hielo para la determinación de complemento, vía clásica y alternas. Posteriormente se determino el factor reumatoide con la técnica de Rose-Waaler., tomando como lectura la inversa de la última dilución donde la reacción da positiva

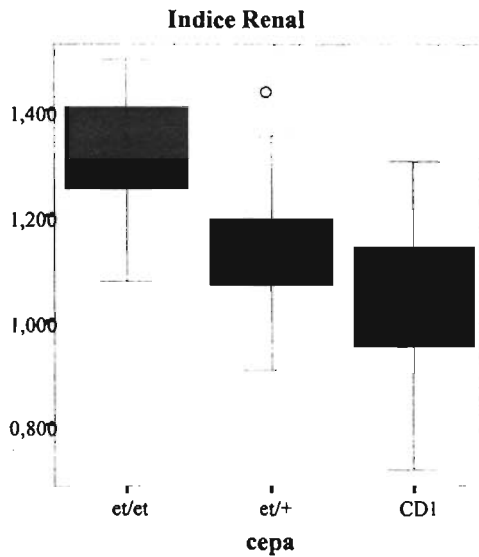
**Tabla 8. Parámetros determinados en la población de ratones**

	+/+	et / +	et / et
Peso del riñón (g)	0.46453 +/- 0.06751 *	0.399417 +/- 0.06935	0.428291 +/- 0.06216
Índice renal	1.02083 +/- 0.14087	1.13698 +/- 0.114153	1.32123 +/- 0.12115
Vía clásica (% de unidades)	66.4511 +/- 12.56083	56.3311 +/- 12.53247	54.4267 +/- 4.39626
Vía alterna (% de unidades)	84.5805 +/- 8.25994	83.3347 +/- 6.28507	72.9560 +/- 14.82281
Urea (g/L)	0.291080 +/- 0.09655	0.44875 +/- 0.14515	0.33928 +/- 0.070904
Creatinina (g/L)	0.705176 +/- 0.25322	0.751814 +/- 0.20545	0.807467 +/- 0.34989
Factor reumatoide (moda)	0	4	0
Daño Ocular (moda)	0	0	2

Media  $\pm$  desviación estándar

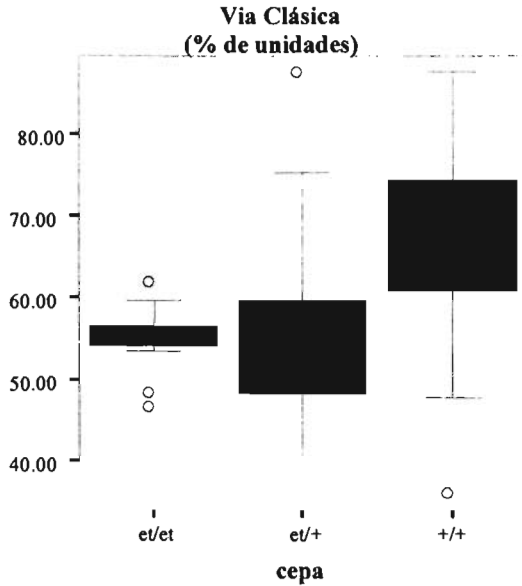


**Gráfica 1.** Se encontró diferencia significativa del peso de riñón entre los grupos,  $p=0.002$ . En análisis por cepas solo se encontró diferencia entre las  $+/+$  y  $et/+$ ,  $p=0.001$ .

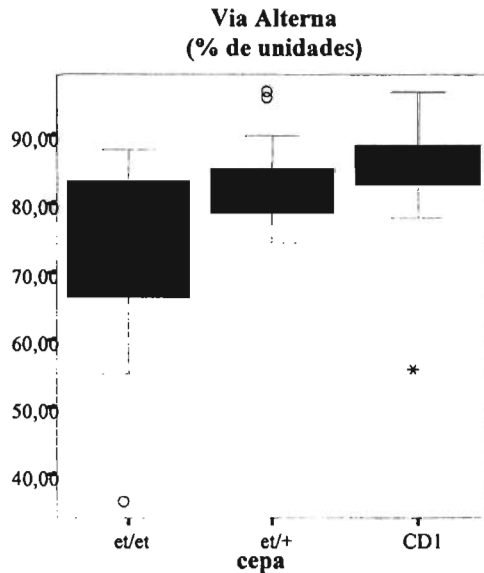


**Gráfica 2.** En el índice renal existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p<0.0001$ . La cepa  $et/et$  con respecto a la  $et/+$  y  $+/+$ , presentó una diferencia con  $p<0.0001$  mientras que entre las cepas  $et/+$  y  $+/+$  fue de 0.003.





**Gráfica 3.** En la actividad de la vía clásica existe diferencia entre los grupos con  $p = 0.004$ . Entre la cepa  $+/+$  con las  $et/et$  y  $et/+$  se halló diferencia estadística con significancia de 0.007 y 0.017 respectivamente. Sin encontrarse entre las cepas  $et/et - et/+$ .



**Gráfica 4.** En lo concerniente en la actividad del complemento por la vía alterna existe diferencia entre los grupos con  $p=0.003$ . La cepa  $et/et$  presenta diferencia con los ratones  $+/+$  y  $et/+$ , con  $p=0.004$  y 0.011 respectivamente. Mientras que entre los grupos  $+/+$  y  $et/+$  no existe diferencia estadísticamente significativa.

Al analizar los resultados de la determinación del factor reumatoide por medio de la prueba de Kruskal-Wallis encontramos diferencia entre los grupos; con una  $p = 0.009$ .

Los resultados de urea y creatinina fueron analizados mediante la prueba de Wilcoxon hallándose diferencia estadística con  $p < 0.0001$  en ambos marcadores.

**Tabla 9. Correlación de Pearson**

variables	Correlación	Significancia
Vía alterna-daño ocular	-0.452	0.001
Índice renal-daño ocular	0.380	<0.0001

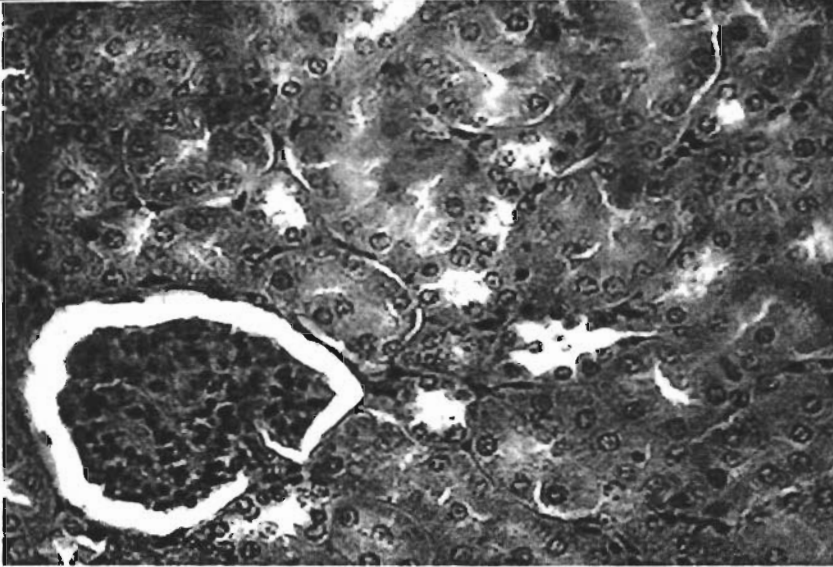
No se halló correlación significativa con respecto al resto de los factores determinados.

**Tabla 10. Diferencias entre ratones viejos y jóvenes, Prueba Wilcoxon**

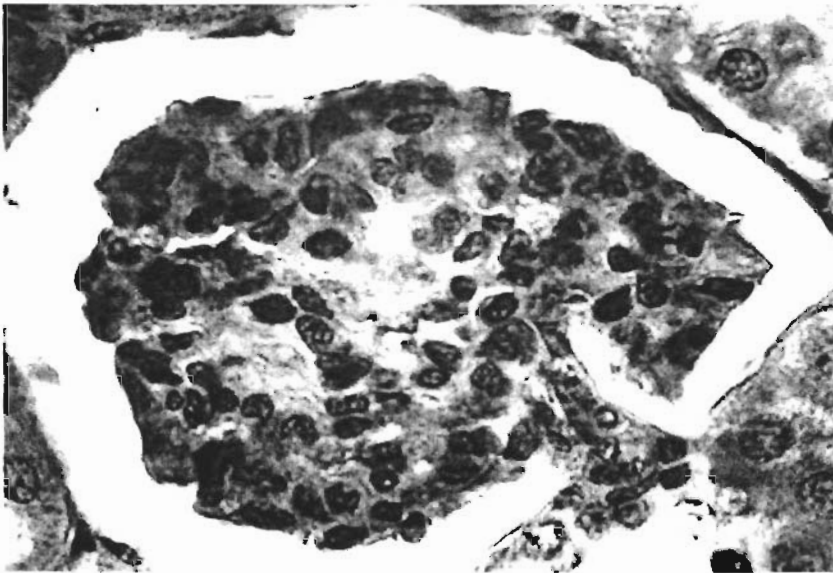
Parámetro	Viejos	Jóvenes	Significancia
Peso de riñón (g)	0.42829 +/- 0.06216*	0.40590 +/- 0.037870	<0.0001
Índice renal	1.32165 +/- 0.12091	1.28051 +/- 0.25969	0.741
Urea (g/L)	0.33928 +/- 0.07090	0.39583 +/- 0.04618	0.000
Creatinina (g/L)	0.80697 +/- 0.35019	0.763083 +/- 0.25626	0.002

\* +/- desviación estándar

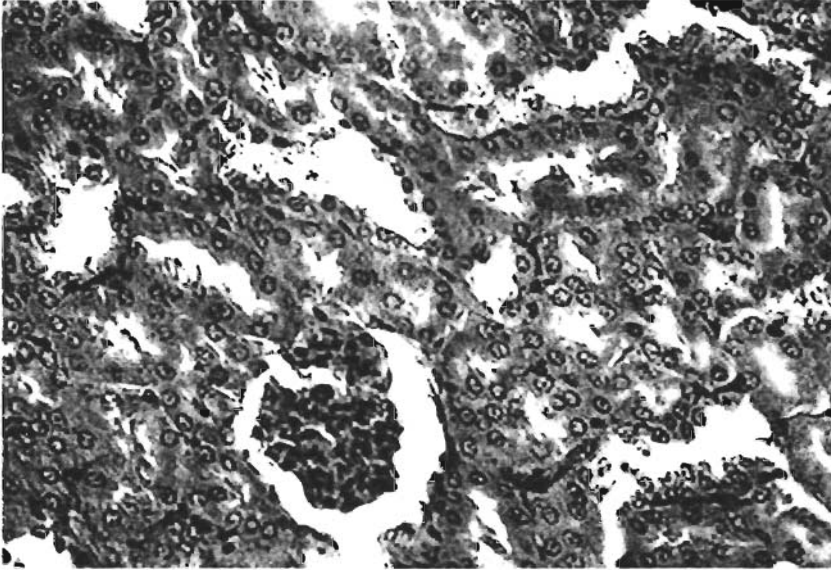
De acuerdo a los resultados observados se realizaron cortes histológicos de los ratones que presentaron una actividad disminuida del complemento de las cepas et/+ y et/et, así como de algunos que se encontraban dentro de la media de actividad de los ratones +/- como controles. Se realizó la interpretación a doble ciego de los cortes por el M. C Ricardo Calvillo Esparza.



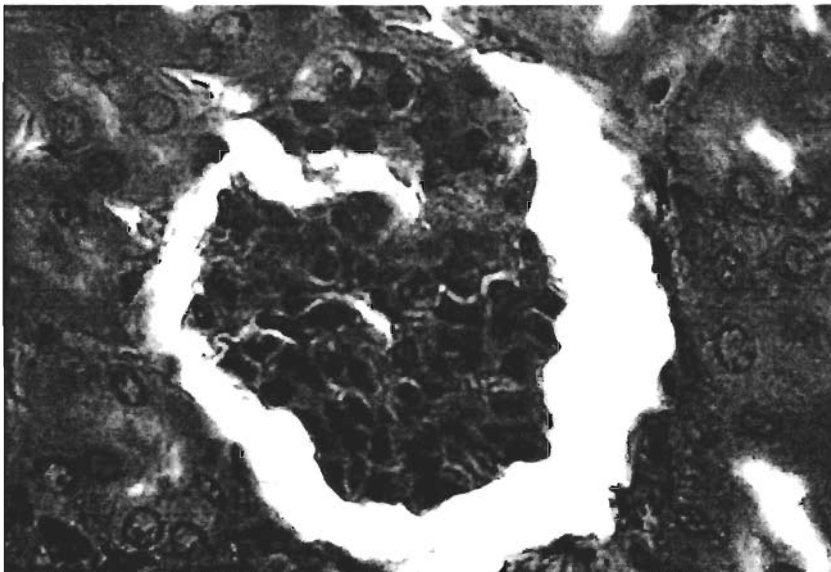
**Figura 17.** Glomérulo renal normal así como túbulos proximales íntegros. Riñón de ratón CD1 +/+ observado a 40X.



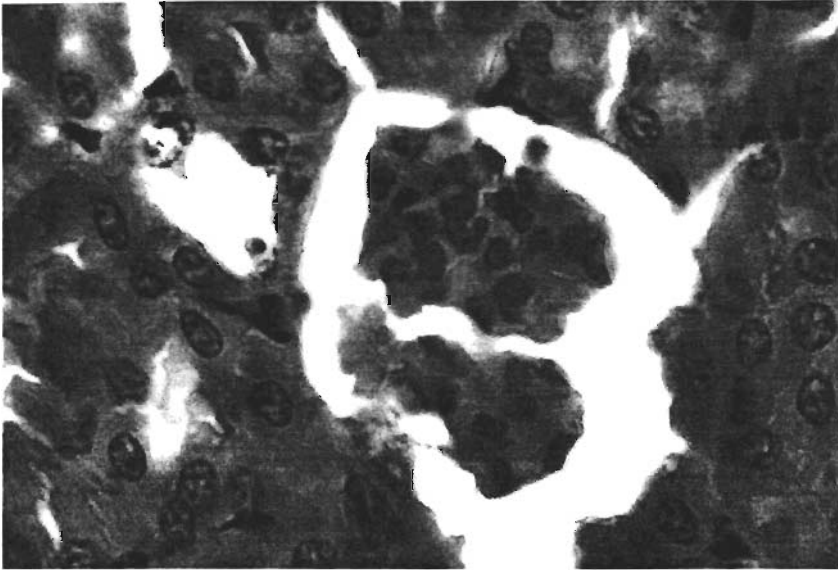
**Figura 18.** Estructura de glomérulo íntegra. Riñón ratón CD1 +/+, observado a 100 X



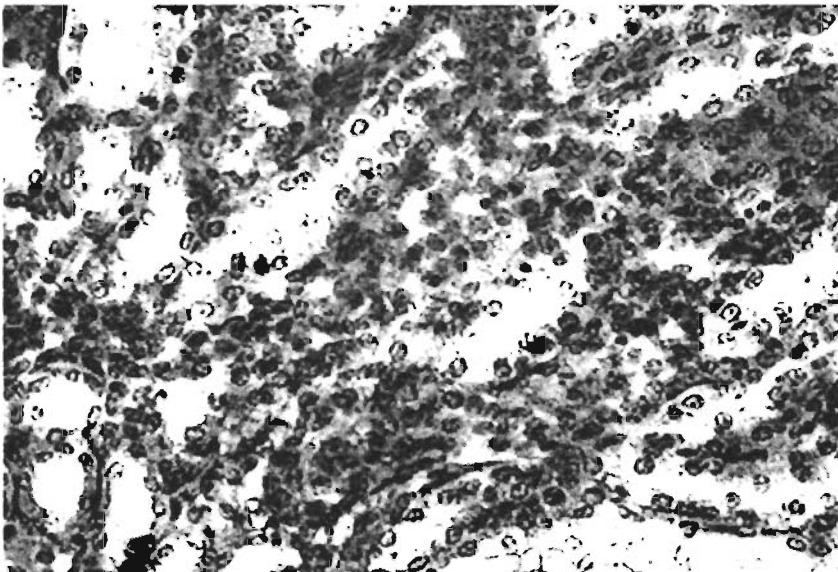
**Figura 19.** Glomérulo definido, incipiente daño así como túbulos renales definidos. Riñón ratón CD1 et/+ observado a 40X.



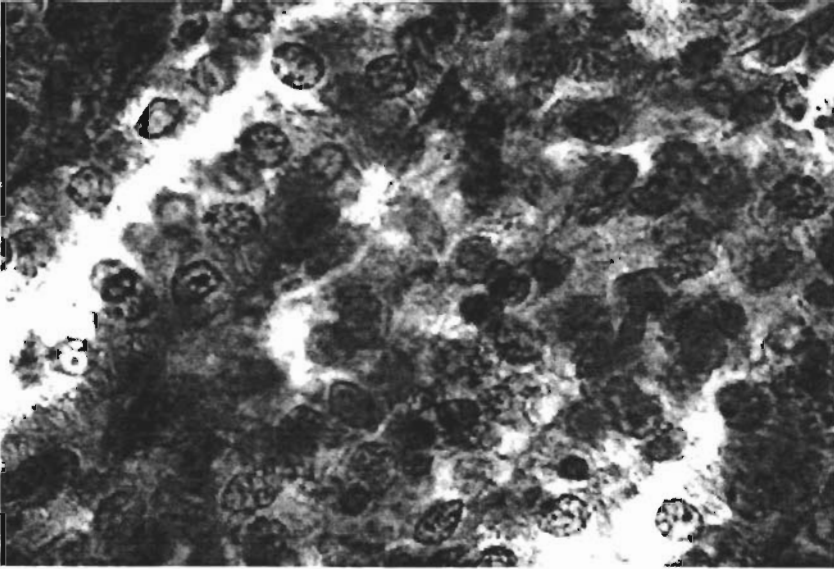
**Figura 20.** Glomérulo definido, aunque se observa incipiente daño. Riñón ratón CD1 et/+ observado a 100X



**Figura 21.** Glomérulo destruido con pérdida de la estructura de los túbulos contorneados proximales y distales. Riñón ratón CD1 et/et observado a 100X



**Figura 22.** Infiltrado de mononucleares entre los tubulos contorneados proximales y distales con perdida estructural de los mismos. Riñón ratón CD1 et/et observado a 40X.



**Figura 23.** Pérdida de la estructura tubular con infiltrado de mononucleares. Riñón de ratón CD1 et/et observado a 100X.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## 9. ANALISIS DE RESULTADOS.

De acuerdo con los datos obtenidos del peso del riñón disminuido en las cepas *et/et* y *et/+* y la reducción de las unidades de la vía clásica del complemento en estas cepas con respecto al grupo testigo, podemos decir que la hipocomplementemia es una consecuencia del daño renal en nuestros animales. También se ha demostrado que el complemento se ve involucrado en el mantenimiento de la autoinmunidad. En los ratones hipotímicos *et/et* existe una selección clonal negativa, que se efectúa en el timo, generando una excesiva cantidad de células T, entre las cuales pudiera haber clonas autorreactivas y en presencia de citocinas inflamatorias y células B autorreactivas, generar la producción de los autoanticuerpos.<sup>35,44</sup> Lo cual tiene relación con los hallazgos en suero de pacientes con SS, de niveles altos de remanentes de receptores CD5 y CD6 (presentes en linfocitos T y B).<sup>45</sup>

Los resultados obtenidos en la determinación de la activación de la vía clásica del complemento corroboran la hipótesis establecida, al encontrarse disminuidas las unidades de complemento en los ratones *et/et* y *et/+* con respecto a los *+/+*, la disminución puede ser debida a la activación del complemento por los autoanticuerpos, los inmunocomplejos o por la hipergammaglobulinemia presente en la circulación de ratones *et/et*.<sup>12, 13, 25</sup> En los cortes histológicos realizados en nuestros animales de estudio, encontramos un claro daño tanto a nivel glomerular como en los túbulos, mostrándose severo en los ratones *et/et* y moderado en los *et/+*, entre los glomerulos dañados se también se observa pérdida de tubulos proximales y distales con infiltrados de mononucleares, manifestándose como una nefritis intersticial, los ratones *+/+* no mostraron alteraciones. Varios autores han implicado a los depósitos de inmunocomplejos en el daño renal en pacientes con SS y las lesiones renales mas comunes están a nivel glomerular y tubular.<sup>46, 47, 48</sup> La mayoría de los pacientes con glomerulonefritis (80%) tiene una mezcla de crioglobulina monoclonal IgMk (tipo II) y niveles bajos de C4 del complemento.<sup>49</sup> Cuando hay un exceso de Ag o de Ac, se forman complejos inmunes en la circulación y son atrapados por la membrana de filtración glomerular a medida que se filtran a través de las paredes capilares que se han hecho permeables por acción de las aminas vasoactivas. Los complejos de Ag-Ac inducen la activación del complemento por la vía clásica, el complemento activado genera factores que atraen leucocitos polimorfonucleares que mueren in situ y sus enzimas lisosómicas inician la lesión de los glomérulos.<sup>50</sup> la cual ocurre aproximadamente en el 10% de los pacientes con SS primario, histológicamente existe un infiltrado de linfocitos CD4+, similares a los encontradas en las glándulas salivales, algunos pacientes con SS primario presentan nefritis con una IgG-Kappa, producto de una proliferación de linfocitos B en los riñones. En biopsias de riñón se observa infiltrado en el intersticio tubular, constituido generalmente por células plasmáticas y linfocitos CD3+.<sup>51, 52, 53</sup> En el SS primario se presenta una complicación de acidosis de los tubulos distales ésta acidosis se caracteriza por la deficiencia en la excreción de H<sup>+</sup> en el túbulo colector por lo que el pH en este segmento disminuye de 5.3, en condiciones normales, a 4.5-5.0, presentándose una disminución de Ca<sup>++</sup> sérico, generando complicaciones a nivel óseo.<sup>54, 55, 56</sup> De Franco et. al., en biopsias de pacientes diagnosticados con SS primario y acidosis tubular distal, determinaron la completa ausencia de la bomba H<sup>+</sup>-ATPasa en los tubulos colectores, la deficiencia de esta bomba impide la reabsorción de Ca<sup>++</sup>, colaborando de este modo con los problemas óseos.<sup>57, 58</sup> Otro trastorno por afección a nivel tubular es la retención de Na<sup>+</sup>, causada por la deficiencia de la enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, localizada en los conductos colectores corticales, característica presentada en la glomerulonefritis.<sup>59</sup> El mecanismo causante del daño renal es muy similar al ocurrido en las glándulas exocrinas, por un

proceso inflamatorio crónico progresivo. En la adición de células epiteliales del túbulo renal asociadas a nefritis túbulo-intersticial de clase CD86, una molécula coestimuladora que pueda inducir la infiltración de linfocitos T (actuando en este punto el complemento) finalmente causa la destrucción de los tejidos.<sup>58</sup> Se ha determinado que niveles altos en suero de gamma-globulina, proteínas séricas y proteína beta2m pueden ser un indicador de acidosis tubular renal en pacientes con SS. Niveles altos en el suero de beta2m es asociado a la subsiguiente aparición de proteinuria e incremento de la excreción de alfa1m en pacientes con SS.<sup>60</sup> Para la generación de las lesiones, además de la activación del complemento, están las deficiencias de algunos reguladores de este, como es el caso del inhibidor de C1, el cual se ve afectado su correcto funcionamiento en presencia de un desorden linfoproliferativo,<sup>49</sup> desorden que muestra también el ratón *et/et*.<sup>24</sup> La glomerulonefritis linfoproliferativa es usualmente asociada a niveles muy bajos de C3, niveles normales de C1, C4 y C2, y la presencia de autoanticuerpos para C3 convertasa.<sup>61</sup> Esta condición es caracterizada por depósitos glomerulares de C3, alta proteinuria y pérdida progresiva de la función renal.<sup>46</sup> En nuestros animales de estudio la determinación de proteínas en orina (empleando tiras reactivas) no mostró diferencias entre las cepas, posiblemente debido a la sensibilidad del método. En la vía alterna del complemento no se encontró diferencia significativa entre los grupos, se encontró una correlación positiva entre el daño ocular y el índice renal lo que nos sugiere que ambos parámetros pudieran estar afectados por complejos inmunes ya que tanto en ojo como en riñón existen plexos donde se depositan estos. De lo anteriormente expuesto se deduce que en la disminución del peso del riñón se ven implicadas ambas vías, siendo los ratones *et/et* los más afectados, debido, tanto a la activación de la vía clásica, como a las fallas en los mecanismos reguladores de ambas vías. Tanto el peso del riñón como el índice renal de los ratones *et/et*, no presenta variación significativa debido a que la pérdida de la constitución en el tejido renal se ve compensada por la gran infiltración de linfocitos, claramente demostrado en los resultados. Estas lesiones afectan en gran medida a la función renal, en nuestro caso se observa un incremento en los niveles séricos de urea en los ratones *et/et*, con respecto a los *et/+* y *+/+*. La creatinina no se encuentra elevada, sin embargo se debe tomar en cuenta que el peso de los ratones *et/et* es menor a los *+/+* y a los *et/+*, y tomando en cuenta que la eliminación de creatinina se ve relacionada directamente por la masa muscular, la excreción de creatinina será menor en los ratones con SS. Al comparar estos marcadores entre los grupos *et/et*, viejos contra jóvenes, se halló un incremento en los niveles séricos de ambos marcadores en el grupo de ratones viejos, por lo que podemos decir que el grado de daño está relacionado con la edad.

En el caso de las lesiones oculares se encontró una correlación negativa entre estas y la vía alterna del complemento. De acuerdo con estos resultados y al observar los tipos de lesiones, nos indican que estas no están generadas directamente por la actividad de la vía clásica del complemento, pero tomando en cuenta que defectos en los primeros componentes de la vía clásica de la activación del complemento (C1q, C1r, C2 y C4) llevan a patología autoinmune inflamatoria, y la vía clásica activa a la vía alterna la cual amplifica el daño por medio de anafilotoxinas como C3a, que causan atracción y activación de células inflamatorias, observadas en daños oculares.<sup>28, 29, 63, 64, 65</sup>

En los ratones *et/et* se ha determinado la presencia de anticuerpos anti-Ro mismos que no se encontraron en los *et/+* ni los *+/+* (datos no mostrados).<sup>13</sup> Los Ac anti-Ro constituyen un indicador de manifestaciones extraglandulares, principalmente vasculitis tanto cutáneas como sistémicas<sup>66</sup>. La vasculitis es una de las mayores características



extraglandulares del SS, y, se presenta de muchas formas clínicas, afectando arterias de diferentes sitios, venas y/o capilares de varios órganos, usualmente aparecen lesiones en la piel. En condiciones normales el C1 está controlado por el inhibidor C1 INH, que también controla la actividad factor de Hageman (factor XII). Puesto que el C1 INH es compartido por el C1 y el factor de Hageman, la activación de C1 trae como consecuencia un gasto de C1 INH y una caída de sus niveles circulantes que es proporcional a la cantidad de C1 activado. Esto propicia la activación del factor de Hageman, el cual a su vez activa a la calicreína, una enzima que actúa sobre los cininógenos del plasma y los transforma en cininas (bradicinina, lisil, bradicinina o kalidina y metionil-lisil-bradicinina), las cuales tienen efecto sobre los vasos sanguíneos, incrementando su permeabilidad y permitiendo la salida del líquido.<sup>34, 62</sup> La mayoría de los sistemas de vasculitis involucran varias neuropatías, pulmonares y renales, asociada con crioglobulinemia en la mayoría de los casos.<sup>67</sup> Enfermedades neurológicas ocurren, en 22% de los pacientes con SS primario,<sup>58</sup> manifestaciones cardiovasculares se ven muy implicadas en disfunción del sistema parasimpático, aproximadamente en el 15% de los pacientes con SS, patologías relacionadas con hipergammaglobulinemia, la cual es causada directa o indirectamente por la actividad del complemento. Se han reportado alteraciones del sistema nervioso central, probablemente debida a la existente facilidad de activación agonista de los receptores muscarínicos de acetil-colina M<sub>1</sub> y M<sub>3</sub> iniciada por la persistente actividad de anticuerpos perseverando en la activación de los receptores colinérgicos del cerebro frontal. Después, la actividad agonista es desplazada por estos autoanticuerpos para poder inducir desensibilización, internalización y/o degradación intracelular de receptores muscarínicos de acetil-colina, conduciendo a degradación progresiva de expresión y actividad de receptores muscarínicos de acetil-colina M<sub>1</sub> y M<sub>3</sub> del cerebro. Después los anticuerpos IgG ligan a los receptores muscarínicos de acetil-colina pudiendo modificar los receptores restantes en afinidad, sensibilidad y expresión en otros tejidos.<sup>68</sup> El C3a del complemento está involucrado en diversas afecciones del sistema nervioso central (SNC). En el SNC, el receptor de C3a (C3aR) es expresado en microglia, astrositos y neuronas, experimentos han comprobado que C3aR y el C3a juegan un papel muy importante en los procesos inflamatorios del SNC, como en la enfalomielitis autoinmune y la desmielinización, directa o indirectamente por la quimioatracción hacia células encefalomielíticas, de infiltración masiva de macrófagos y linfocitos T CD4<sup>+</sup>, de igual modo se ha determinado la participación de C5a y su receptor en este tipo de padecimientos.<sup>69, 70, 71</sup> Deficiencias de reguladores del complemento, como el CD59 se ven implicados en diversas patologías (encefalomielitis, angioedema, LES, etc.) dichas deficiencias bien pueden ser defectos genéticos en su síntesis o por agotamiento por el exceso de activación del complemento.<sup>72</sup>

Finalmente los niveles bajos de complemento pueden ser empleados como un marcador bioquímico en manifestaciones clínicas, rasgos inmunológicos, desórdenes linfoproliferativos y mortalidad. La hipocomplementemia es detectada en el 84 % de los pacientes con SS primario, disminución de CH50 en 51 %, niveles bajos de C3 en 42%, y niveles bajos de C4 en 39%. Pacientes con niveles bajos de C4 presentan una alta prevalencia de neuropatía periférica.<sup>73</sup>

## 10. CONCLUSIONES

- Existe una disminución de las unidades 50% hemolíticas del complemento en los ratones CD1 *et/et*, con respecto al grupo control CD1 *+/+*.
- El gasto presentado de las unidades de complemento de las vías alternas en los ratones *et/et* es a consecuencia de la sobreactivación de la vía clásica por los complejos inmunes.
- Las lesiones encontradas son generadas por la activación del complemento y las deficiencias en sus mecanismos reguladores.
- El complemento no sólo está involucrado en el daño histopatológico renal, también se relaciona de forma importante con otras alteraciones patológicas en el SS.

## 11. GLOSARIO

AAN	Anticuerpos Antinucleares
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AR	Artritis Reumatoide
B	Factor "B" del complemento
C1, C2, C3, ...	Factor del complemento 1, 2, 3, ...
CBP	Cirrosis Biliar Primaria
CRSC	Creatinina
C1INH	C1 Inhibidor
CR 1, 2,...	Receptor del Complemento 1, 2, ...
D	Factor "D" del complemento
DAF	Factor Desacelerador
EDTA	Etilendiaminotetra acético
EGTA	Etilenbis(oxietilen-N-nitrilo)tetra acético
FA	Fosfatasa Alcalina
GS	Glándula Salival
GGT	Gamma Glutamyltranspeptidasa
H	Factor H del complemento
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
J	Factor J del complemento
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
MAC	Complejo de Ataque de Membrana ( <i>Membrana Attack Complex</i> )
MLB	Lectina Fijadora de Manosa ( <i>Mannan-Binding Lectin</i> )
MO	Microorganismos
MPC	Proteína Cofactor de Membrana
PCR	Proteína C reactiva
S	proteína S del complemento
Scl	Esclerodermia
SP-A	Proteína Surfactante Pulmonar
SS	Síndrome de Sjögren
UC	Unidades de complemento
VEB	Virus de Epstein-Barr
VSG	Velocidad de Sedimentación Glomerular

---

**12. BIBLIOGRAFIA**

1. Roitt Ivan, Brostoff Jonathan, Male David. Inmunología. 5ª edición. Harcourt. España; 2000: 43-59, 367-379.
2. Sánchez- Rodríguez S H, Barajas-Vásquez G E, Ramírez E D, Moreno-García A, Barbosa-Cisneros O Y. El fenómeno de autoinmunidad: enfermedades y antígenos relacionados. *Rev Biomed* 2000; 15: 49-55
3. Habib-ur Rehman. Sjögren Síndrome. *Yonsey Medical Journal* 2000; 6: 947-954
4. Sjögren Syndrome Foundation. USA 2004: <http://www.sjogren.org>
5. ASSA Asociación Síndrome de Sjögren Argentina 2004: <http://www.drwebsa.com.ar/assa/>
6. Baar Z A, Harris D Paul, Talesnik G E, Duarte G de C I. Hepatitis inmune temprana en el curso del síndrome de Sjögren en pediatría. *Rev chil pediatr* 1999; 70: 491-497
7. Bartunková D, Sedivá A, Vencovsky J, Tesar V. Primary Shögren síndrome in children and adolescent: proposal for diagnostic criteria. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 381-6
8. Medina Rodríguez Francisco. Reumatismo y artritis reumatoide. *Salud IMSS* 2004: 33-39
9. Mengual Pavia J A, Oltra Masanet J A. Síndrome de Sjögren asociado a alteraciones hepáticas: a propósito de dos casos de atención primaria. *Medifam* 2003; 13: 56-60
10. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Coll J, Gerdi R, Hatron PY, et al. Assessment of the European clasification criteria for Sjögren`s syndrome in series of clinically defined cases: results of s perspective multicentre study. The European Study Group on Diagnostiv Criteria for Sjögren`s syndrome. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 116-21
11. Manoussakis MN, Moustsopoulos HM. Sjögren`s syndrome: autoimmune epithelitis. *Baillierest Best Pract Rst Clin Rheumatol* 2000;14(1): 73-95.
12. Lara Hernández Ma. de los Ángeles. Hallazgos clínicos asociados al síndrome de Sjögren en el ratón hipotímico alopecico CD1 et/et. UNAM FES Zaragoza México 2000: 2-35, 68-72
13. Márquez Plaza C. Determinación de anticuerpos anti-Ro y anti-La en ratones CD1 et/et y su relación con el estudio histopatológico en glándulas lagrimales y submaxilares. UNAM FES Zaragoza México 2004: 1-13, 56-59
14. Rivas L, Murube J, Toledano A. Inervación de las glándulas lagrimales en pacientes con síndrome de Sjögren primario. Estudio inmunohistopatológico. *Archivos de la sociedad española de oftalmología* 2002;77: 623-29
15. Lash A A. Sjögren síndrome: patogenesis, diagnosis and tratament. *Nurse Pract* 2000; 50: 53-8
16. Tzofas, A G, Wassmuth R, Dafni U G, A. Clinical immunological, and immunogenetic aspect of autoautoantibody production against Ro/SSA, La/ssB and their linear epitopes in primari Sjögren`s (pSS): a European multicentre study. *Annals of the rehumatic diseases* 2002; 61(5): 398-404
17. Carlos Madrid, Bruno Courtois, Demien Duran. Sialodentitis crónica revelando una hepatitis: a propósito de un caso. *Medicina oral, Patología oral y Cirugía Bucal* 2004; 9: 328-32

18. Haddad Joel, Deny Paul, Muñiz-Gothel C, Ambrosini Jean-Claude, Trianchet Jean-Claude, Pateron Dominique, Mail Frederick, Callard Patrick, Beaugrand Michel. Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associate with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 1992; 339: 321-23
19. Belgodere Xavier, Viraben Roland, Gorguet Bernadette, Allaouchiche Bernard, Lieutaud Olivier, Maestracci Dominique. Cutaneous sarcoidosis, Sjögren's syndrome and autoimmune thyroiditis associated with hepatitis C virus infection. *European journal of dermatology* 1999; 9: 235-36
20. Newkirk M M, Shiroky J B, Jhonson N, Danoff D, Insenberg D A, Shutik C, Pearson G R. Rheumatic disease patients, prone to Sjögren's syndrome and/or lymphoma, mount and antibody response to BHRF1, the Epstein-Barr viral homologue of BCL-2
21. Matsumura R, Umemiya K, Goto T, Nakazawa T, Kagami M, Tomioka H, Tanabe E, Sugiyama T, Sueishi M. Glandular and extraglandular expression of costimulatory molecules in patients with Sjögren's syndrome.
22. Katayama Ichiro, Nishioka Kiyoshi. Analysis of T cell receptor V repertoires of annular erythema associated with Sjögren's syndrome. *European journal of dermatology* 1998; 8: 248-51
23. Matsumoto Isao, Tsubota Kazuo, Stake Yoshiyuke, Kita Yasuhiko, Matsumura Ryutaro, Hideyuki Murata, Namekawa Takashi, Nishioka Kusuki, Iwamoto Itsuo, Sumida Takayuki. Common T cell receptor clonotype in lacrimal gland and labial salivary glands from patients with Sjögren syndrome. *J Clin Invest* 1996; 97: 1969-77
24. Basurto Alcantara F J, Mondragon Vargas R L, Atilano-López D, Montaraz Crespo D, Marques Dos Santos M J, Rosas Saucedo P, Marroquín Segura R. Comparaciones de las constantes fisiológicas sanguíneas de los ratones CD1, heterocigóticos et/+y desnudos et/et. *Vet Méx* 2000; 31:209-15
25. Marroquín Segura R, Martínez Rodríguez C F, García Burciaga M M, Calvillo Esparza R, Flores Pimentel M. Exocrinopathy in the CD1 et/et hypotymic mouse resembling Sjögren syndrome. *Vet Mex* 2003; 34 (2): 129-141
26. Rojas-Espinosa Oscar. Inmunología (de memoria). 2ª edición. Editorial medica panamericana México 2001: 173-84
27. Goldsby Richard A, Kindt Thomas J, Osborne Barbara A, Kuby Manis. Inmunología. 5ª edición. Mc Graw Hill México 2004: 316-336
28. Abbas Abil K, Lichtman Andrew H. Inmunología celular y molecular. 5ª edición. Elsevier España 2004: 275-95, 318-44
29. Parslow Tristram G, Suites Daniel P. Inmunología básica y clínica. 10ª edición. El manual moderno México 2002: 199-213
30. Roitt Ivan M, Delves Peter J. Inmunología fundamentos. 10ª edición. Editorial medica panamericana Argentina 2003: 10-15
31. Regueiro González J R, López Larrea C, González Rodríguez S, Martínez Naves. Inmunología biología y patología del sistema inmune. 3ª edición. Editorial medica panamericana España 2003: 21-27
32. O'Hara A M, Moran A P, Würzner, Orren A. Complement-mediated lipopolysaccharide release and outer membrana damage in *Escherichia coli* J5: requirement for C9. *Immunology*; 102(3): 365-72

33. Merlin Linares J C, Villaescusa Blanco R, Morera Barrios L A, Guerreiro Hernández A M, Arce Hernández A A, Arce Bustabad 2 S, Ballester Santovienal J M. Alteraciones del sistema del complemento en pacientes con nefropatía diabética. *Rev Cubana Hematol Inmunol Memoter* 2003; 19: 0-0
34. Walport Mark J. Complement: first of two parts. *The new England journal of medicine*. Boston 2001; 344 (14): 1058-9.
35. Walport Mark J. Complement: second of two parts. *The new England journal of medicine*. Boston 2001; 344 (15): 1140-5.
36. Goules A, Masouridi S, Tzioufas AG, Ioannidis JP, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Clinically significant and biopsy documented renal involvement in primary Sjögren syndrome. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79: 241-9
37. Rogoz S, Avramescu C, Silosi I, Drakckoulogona O, Badea P, State A. Immunopathologic mechanism in some ocular disease. *Oftalmologia* 2002; 54: 51-55
38. Stuard Ira Fox. *Fisiología humana*. 7ª edición. McGraw-Hill interamericana España 2003:246-53
39. Constanzo Linda S. *Fisiología*. McGraw-Hill interamericana México 2004:228-33
40. Berne Robert M, Levy Mattheww N. *Fisiología*. 3ª edición. Elsever Science España 2002:408-13
41. Servais J, Walmagh J, Duchateau. Simple cuantitativa microassay for determination of complement alternative pathway activation (AP50). *Journal of immunological methods* 1991; 140: 93 – 100
42. Rojas-Espinosa O, Oltra Antonia, Arce Patricia, Mendez Patricia. Inhibition of complement activity in murine leprosy. *International Journal of leprosy* 1991; 59: 605-612
43. Stites Daniel P, Terr Abba I, Tristram G, Parslow MD. *Inmunología básica y clínica*. 9ª edición. El manual moderno México 2000: 282
44. Marroquín Segura Rubén. Estudios inmunológicos en ratones hipotímicos CD1 et/et que desarrollan oftalmología espontánea. *Escuela nacional de ciencias biológicas IPN*. México 1996: 50-55.
45. Ramos-Casals M, Font J, García-Carrasco M, Calvo J, Places L, Padilla O, Cervera R, Bowen M A, Lozano F Ingelmo M. High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjögren syndrome. *Rheumatology* 2001; 40: 1056-59
46. Trouw L A, Seelen M A, Daha M R. Complement and renal disease. *Molecular immunology* 2003; 40: 125-34
47. Stuard S, Kassan, MD, Haralampos M, Moutsopoulos, MD. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome. *Arch intern med* 2004; 164: 1275-84.
48. Fulop Milford, Makay Meggan. Renal tubular acidosis, Sjögren syndrome, and bone disease. *Arch intern med* 2004; 164: 905-9
49. Goules A, Masouridi S, Tzioufas A G, Ioannidis J P, Skopouli F N, Moutsopoulos H M. Clinically significant and biopsy-documented renal involvement in primary Sjögren syndrome. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79(4): 241-9.
50. Steven A, Schroeder, Krupp Marcus A, Terney Lawrence M. Jr, McPhec Stephen J. *Diagnóstico clínico y tratamiento*, 27ª edición. El manual moderno México 1992: 616-20
51. Pijpe J, Vissink A, Van der Wai J E, Kellenberg C G M. Interstitial nephritis with infiltration of IgG-kappa positive plasma cells in patient with Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 2004; 43: 108-110

52. Hu Daniel C, Cathro Helen p, Okusa Mark. Polomorphoneutrophilic infiltration in Acute Interstitial Nephritis of Sjögren syndrome. American journal of the medical science 2004; 327 (5): 278-280
53. Watanabe M, FGujimoto T, Iwano M, Shiki H, Nakamura S. Report of patient of primary Sjögren syndrome, IgA nephropathy and choronic thrombocytopenic pupura. Nihon rindho meneki gakkai kaishi 2002; 25(2): 191-8
54. Gorriz L, Molino M, Arjona D, Estripeaut D. Sj[ogren s índrome associated with renal tubular acidosis type II. Departamento de medicina, hospital de Santo Tomas. Rev med Panama 2000; 25: 30-33
55. Fracchia M, Galatola G, Corradi F, Dall'Omo AM, Rovera L, Pera A, Vitale C, Bertero MT. Coeliac disease associated with Sjögren síndrome, renal tubular acidosis, primary biliary cirrhosis and autoimmune hyperthyroidism. Dig liver dis 2004; 36(7): 489-91
56. Litiasis urinaria múltiple y nefrocalcinosis secundaria a síndrome de Sjögren primario. Actas urológicas españolas 2002; 26(3): 235-8.
57. De Franco PE Haragisim L, Schmitz PG, Bastani B. Absence of vacuolar H<sup>+</sup> -ATPase pump in the collecting duct of a patient with hypokalcemic distal renal tubular acidosis and Sjögren's syndrome. J Am Soc Nephrol 1995; 6: 295-301.
58. Rodríguez C Díaz, González Rivero C, Trinidad San José JC, Del Río Romero D, Moreno Fernández A, Granja Romero E. Osteal complications as first manifestation in patient with primary Sjögren syndrome and with associated distal tubular acidosis (type 1) and chronic renal insufficiency. Therapeutic apheresis and dialysis 2004; 8(2): 160-63
59. Zolty Einath, Ibnou-Zekri Nabila, Izui Shozo, Féraille Eric, Favre Hervé. Glomerulonephritis and sodium retention: enhancement of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in the collecting ducts is shared by rats with puromycin induced nephrotic syndrome and mice with apontaneous lupus-like glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant 1999; 14: 2192-95.
60. Pertovaara M Korpela M, Psternack A. Factors predictive of renal involvement in patients with primary Sjögren's syndrome. Clin Nephrol 2001; 56(1): 10-18
61. Bibi-Triki T, Eclache V, Frylay J, Stirnemann J, Frémeaux-Bacchi V, Fain O. Acquired C1 inhibitor deficiency associated with lymphoproliferative disorders: quatre cases. La reve de medicine interne 2004; 25(9): 667-72
62. Glosvky M Michael, Ward Peter A, Jhonson Kent J. Complement determinations in human disease. Annals of allergy, asthma and immunology 2004; 93: 513-23
63. Elliot Margaret K, Jarmi Tambi, Ruiz Phil, XuYuanyuan, Holers Michel Gilkeson Gary S. Effects of complement factor D deficiency on renal disease of MRL/lpr mice. Kedney international 2004; 65: 129
64. Berrón-Pérez R, Penagos -Paniagua M J, Zaragoza-Benítez J M, Rodríguez-Álvarez J, Blancas Galicia L. El sistema del complemento. Vías clásica y de la lectina que se une a la monosa. Alergia, asma e inmunologías pediátricas 2003; 12(2): 46-52
65. Méndez de Inocencio J M, Huerta López J, Belanti Joseph A. Mecanismos inmunomoduladores de la gammaglobulina intravenosa (IGIV) en alteraciones del complemento. Alergia, asma e inmunología pediátricas 2003; 12(3): 75-81
66. Krishna Changati R, Moyer Darrilyn. Complement deficiencies. Medecine instant access to mind of medecine 2004. <http://www.emedecine.com/>
67. Orozco La Roche E, Jurado Santa Cruz F. Utilidad de los anticuerpos anti-Ro/SSA en dermatología. Rev cent dermatol pascua; 9: 81-85

68. Ramos-Casals M R, Anaya J M, García-Carrasco M, Rosas José, Bové Albert, Claver Gisela, Diaz L A, Herrero Carmen, Fond Joseph. Cutaneous vasculitis in primary Sjögren syndrome, classification and clinical significance of 52 patients. *Medicine*; 83(2): 96-106
69. Delalande Sophie, Seze de Jérôme, Fuachais Anne-Laure, Hachulla Eric, Stojkovic Tanya, Feriby Didier, Dubucquoi Sylvain, Pruvo Jean-Pierre, Vermresch Patrick, Hatron Pierre-Yves. Neurologic manifestation in primary Sjögren syndrome, a study of 82 patients. *Medicine* 2004; 83 (5): 280-91
70. Reina Silvia, Sterin-Borda Leonor, Orman Betina, Borda Enri. Autoantibodies against cerebral muscarinic cholinergic receptors in Sjögren syndrome: functional and pathological implications. *Journal of neuroimmunology* 2004; 150: 107-15.
71. Boos Laura, Campbell Iain L, Ames Robert, Wetsel Rick A, Barnum Wetsel and Scott R. Deletion of the complement anaphylotoxin C3a receptor attenuates, whereas ectopic expression of C3a in the brain exacerbates, experimental autoimmune encephalomyelitis. *The journal of immunology* 2004; 173: 4708-14.
72. Morgan B P, Griffiths M, Khanom H, Taylor S M, Neal J W. Blockade of the C5a receptor fails to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Clin exp immunol* 2004; 138: 430-38.
73. Baalashramanian Sivasankar, Harris Claire L, Donev Rossen M, Mizuno Masashi, Omidvar Nader, Song Wen-Chao, Morgan b Paul. CD59 is the primary regulator of membrane attack complex assembly in the mouse. *The journal of immunology* 2004; 173: 3684-92.