



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**



VALORACIÓN DE METOTREXATE Y FOSFATO DE CLOROQUINA COMO UNA  
MODALIDAD DE TRATAMIENTO EN LA EXOCRINOPATÍA MOSTRADA EN EL  
RATÓN CD1 et/et.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA DE LA CARRERA DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA

MARISOL FALCÓN GARCÍA.

AGOSTO 2005



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**



**VALORACIÓN DE METOTREXATE Y FOSFATO DE CLOROQUINA COMO UNA  
MODALIDAD DE TRATAMIENTO EN LA EXOCRINOPATÍA MOSTRADA EN EL  
RATÓN CD1 et/et..**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA DE LA CARRERA DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.**

**PRESENTA**

**MARISOL FALCÓN GARCÍA.**

**DIRIGIDO POR:**

**D. en C. RUBEN MARROQUÍN SEGURA.**

**SINODALES**

**PRESIDENTE D. en C. RUBEN MARROQUÍN SEGURA.**

**VOCAL M. C. MAURILIO FLORES PIMENTEL**

**SECRETARIO Dra. MA. TERESA CORONA ORTEGA**

**SUPLENTE Q.F.B. GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ.**

**SUPLENTE M. en C. CLAUDIA FABIOLA MARTÍNEZ RODRÍGUEZ.**

## DEDICATORIAS.

### **A MI PADRE.**

Quien a base de sacrificios y sabios consejos alentó mi camino hacia la meta, espero que éste trabajo, te llene de orgullo y satisfacción, aunque nunca me cansaré de agradecerte el apoyo tan grande que me diste, tú eres el ejemplo a seguir, puesto que a mi me convertiste en un ser de provecho, espero que siempre estés orgulloso de mis logros, y nuevamente gracias papá, sabes que siempre estás en mi corazón y en mi mente.

### **A MI MADRE.**

Todo lo que pueda yo expresar en éstas líneas es poco para demostrarte el profundo agradecimiento por haberme dado la vida, y ayudarme a levantarme ante los momentos difíciles, ante los cuales era prácticamente imposible reponerse, gracias a ustedes mis padres, me encuentro en la cima hoy, tu sufriste a mi lado, tu me ayudaste a salir adelante y me impulsaste para que culminara mi carrera. Espero que mi trabajo te llene de orgullo y satisfacción, gracias por todo.

### **A MIS AMADOS HERMANOS.**

Monica, Claudia, Diana y Miguel Angel, quiero aprovechar este momento de júbilo para expresarles, mi más profundo y sincero agradecimiento por vivir a su lado todos estos años llenos de amor, de alegrías, y de tristezas, siempre he contado con ustedes en las buenas y en las malas, a ustedes debo la terminación de mi tesis que con regaños benevolentes, me incitaban a finalizarla, gracias hermanos por ser un motivo para seguir superándome, y ser mejor día a día.

### **A LUIS ANGEL.**

Mi pequeño hermanito, ojalá este trabajo te sirva como un ejemplo, para que siempre el camino que tomes, lo enfrentes con la mejor de las determinaciones, y con las decisiones apropiadas, recuerda que si tu tienes una equivocación, tienes una segunda oportunidad para lograr componer la situación, que en un momento dado estés enfrentando, porque en la vida siempre existen obstáculos que vencer y por difíciles que parezcan, trata siempre de salir avante, lucha por lo que quieres y pese a las vicisitudes no te decaigas, tú siempre fuerte y adelante, sabes que puedes contar conmigo siempre.

### **A MI QUERIDO ESPOSO.**

Israel, tu has sido la fuerza que me ha impulsado a salir adelante, has estado conmigo en las buenas y en las malas, con tu amor he logrado superar todos los obstáculos que se han atravesado en mi camino, gracias por todo este cariño, comprensión y sobretodo por tu sublime apoyo.

### **A MI HIJO IVAN.**

Amado hijo mío, espero que este trabajo te haga sentir orgulloso pero sobretodo te sirva como un aliciente para que en un futuro, comprendas que siempre lo que se comienza debe de terminarse de la mejor manera posible para que después puedas sentirte satisfecho, aunque para lograr tus metas tengas que sufrir, recuerda que la mejor recompensa viene después, y que tu mismo cosecharás lo que hayas sembrado.

### **A MIS FAMILIARES, Y AMIGOS.**

Un agradecimiento sincero a todos mis familiares, amigos, a mis suegros, a mis cuñados Carlos y Asael, y muy especialmente a mis primos, que siempre han sido como mis hermanos, a mi primo David que ya no está con nosotros en el mundo terrenal, pero que siempre está presente en mi alma y mi corazón, este trabajo se los dedico a todos ustedes.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Al Dr. Rubén Marroquín**

Por brindarme parte de sus conocimientos, de su tiempo y por haberme dado la oportunidad de trabajar en uno de sus proyectos, gracias por su paciencia y apoyo.

### **Al M.C. Mauricio Flores Pimentel**

Gracias por haberme impulsado a terminar mi tesis, sin su ayuda no hubiera podido lograr mi objetivo, con sus conocimientos, su enorme paciencia, y sus buenos consejos, que lograron que pudiera abrirme paso hacia la meta.

### **AL JURADO DE SINODALES.**

Gracias a mis sinodales, Dr. Rubén Marroquín Segura, M.C. Maurilio Flores Pimentel, a la M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez, a la Q.F.B. Graciela Vázquez Rojas y especialmente a la Dra. Ma. Teresa Corona Ortega por haber hecho posible este trabajo, puesto que me guió de una excelente forma para que mejorara la redacción y presentación de mi tesis, gracias por su dedicación y su tiempo.

### **A TODOS LOS PROFESORES DE LA CARRERA.**

Que participaron en mi desarrollo profesional, sin su ayuda y conocimientos no gozaría de tal beneplácito, gracias por haberme acompañado hasta el final, y guiarme con sus consejos y sus enseñanzas, momentos que fueron muy gratos e inolvidables.

# ÍNDICE

GLOSARIO

ABREVIATURAS

1. RESUMEN
2. INTRODUCCIÓN
3. MARCO TEÓRICO
  - 3.1 Síndrome de Sjögren
  - 3.2 Exocrinopatía
  - 3.3 Epidemiología
  - 3.4 Etiopatogenia
  - 3.5 Factores predisponentes
  - 3.6 Factores externos
  - 3.7 Manifestaciones clínicas
    - 3.7.1 Manifestaciones músculoesqueléticas
    - 3.7.2 Manifestaciones respiratorias
    - 3.7.3 Manifestaciones renales
    - 3.7.4 Manifestaciones gastrointestinales
    - 3.7.5 Manifestaciones hepatobiliares
    - 3.7.6 Compromiso vascular
    - 3.7.7 Manifestaciones hematológicas
    - 3.7.8 Manifestaciones neurológicas
  - 3.8 Respuesta inmune
    - 3.8.1 Compromiso linfoproliferativo
  - 3.9 TRATAMIENTO

- 3.9.1 Tratamientos utilizados actualmente
4. Modelo de ratón utilizado para el tratamiento
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
6. OBJETIVOS
7. HIPÓTESIS
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL
9. Diagrama de flujo y estrategia experimental
10. MATERIALES Y MÉTODOS
11. Anticuerpos y otros reactivos utilizados
12. Análisis por citometría de flujo
  - 12.1 Inmunofenotipo
  - 12.2 Apoptosis
13. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS PARA HISTOLOGÍA
14. Análisis estadístico
15. RESULTADOS
16. CORTES HISTOLÓGICOS
17. ANÁLISIS DE RESULTADOS
18. CONCLUSIONES
19. BIBLIOGRAFÍA
20. ANEXO
  - 20.1 Preparación de soluciones

## TABLAS

Número	Tabla
1	Índice renal; estadística descriptiva
2	Índice renal; ANOVA
3	Índice renal; Comparación múltiple Tukey HSD
4	Correlación de Spearman
5	Peso; estadística descriptiva
5	Índice renal; estadística descriptiva
5	Linfocitos B-220; estadística descriptiva
6	Peso, índice renal, y Linfocitos B-220; ANOVA
7	Comparaciones múltiples de Tukey HSD, Peso, índice renal, Linf. B-220
8	Correlación de Spearman
9	Comparación de índice renal entre entre las diferentes cepas de ratones CD1, et/+ y et/et.
10	Índice renal; ANOVA
11	Comparación múltiple Tukey HSD; índice renal

## **FIGURAS**

Letra y  
número

Figura

- a) Corte de glándula lagrimal de ratón CD1 eutímico +/+
- b) Corte de glándula lagrimal de ratón et/et, con infiltrado linfocitario
- c) Glándula lagrimal de ratón et/et, con infiltrado celular importante
- d) Glándula lagrimal de ratón et/et, con infiltración linfocítica abundante
- 1a) Corte histológico de riñón ratón CD1 +/+, observado a 400X
- 1b) Corte histológico de riñón ratón et/et, observado a 400 X
- 1c) Corte histológico de riñón ratón CD1 +/+, observado a 1000 X
- 1d) Corte histológico de ratón et/et, observado a 1000X

## 1. RESUMEN

El síndrome de Sjögren (SS)<sup>(1,2,4)</sup> es una enfermedad crónica autoinmune, presente principalmente en mujeres en edad avanzada (alrededor de los 50 años) o denominadas comúnmente como “menopáusicas”<sup>(4,19)</sup>. Aunque diversos autores consideran que la edad y el sexo, no son motivo de exclusión, ya que se han presentado casos en mujeres jóvenes menores de 30 años, así como también en hombres, la proporción de los casos es de 9:1<sup>(20)</sup>, es decir que un 90% sucede más comúnmente en mujeres y un 10 % en hombres.

Bloch y colaboradores propusieron subdividir al SS en primario y secundario, el SS primario (SSp) presenta síntomas sicca (así denominada a la sequedad bucal y ocular) y no muestra asociación con alguna enfermedad en específico, aunque en estudios recientes, ya se le asocia con ciertas manifestaciones extraglandulares y sistémicas bien definidas. Mientras que el SS secundario (SSs) incluye a los pacientes con síntomas sicca<sup>(2,25,29)</sup>, asociados con una enfermedad en particular; ya sea, artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia o dermatomiositis.

Los dos tipos tienen aproximadamente la misma frecuencia pero con una mayor significancia sintomatológica el síndrome de Sjögren primario (SSp).

El objetivo del presente trabajo fue observar y obtener, cambios favorables al administrar los medicamentos en estudio; metotrexate<sup>(5,9,10)</sup> y fosfato de cloroquina<sup>(6,8,9,10,11)</sup>, los cuales se observaron a nivel glandular exócrino y sistémico (órganos afectados) así como también cambios físicos, con referencia a diferencias en los ojos, tales como desarrollo de glaucoma, cataratas u opacidad córnea y cambios neuropatológicos<sup>(4,19)</sup>, como el estrés, fatiga, ó depresión.

Para cumplir dicho fin, se utilizaron 36 ratones de la cepa CD1 et/et denominados pelones o desnudos, de 4 a 6 semanas de edad, los cuales presentan los síntomas de la enfermedad. Se realizaron dos experimentos; en el primero se utilizaron 16 ratones separados en 3 grupos, al primer grupo se le administró placebo (agua destilada) de lunes a viernes, al grupo 2 metotrexate administrado cada tercer día o sea (L, M y V), al grupo 3 se le administró fosfato de cloroquina (aralen) de lunes a viernes. Se utilizaron también ratones testigos, a los cuales no se les administró nada, y sirvieron como referencia para comparación de resultados. Los medicamentos se administraron por vía oral con sonda gástrica y fueron preparados a una dilución 1:10, para el primer experimento y 1:100 para el segundo, en el que se utilizaron 20 ratones.

Al finalizar los experimentos se analizaron diferencias significativas utilizando ANOVA<sup>(52)</sup> de una vía y la correlación no paramétrica de Spearman<sup>(52)</sup> dichas diferencias se observaron en los índices renales, hepáticos y esplénicos comparados con el tratamiento, y con diferentes tipos celulares participantes en la defensa del organismo y en la generación del proceso autoinmune, tales como las células CD4+, CD8+, linfocitos B, células necróticas, apoptóticas los cuales se correlacionaron con los resultados de las glándulas.

De esta manera se encontró que los medicamentos empleados en este estudio, funcionaron a nivel celular, ya que mediante el estudio estadístico llevado a cabo, se encontraron diferencias significativas que revelaron el funcionamiento de los fármacos a nivel organoléptico y glandular, evitando la proliferación de células CD8+ citotóxicas, así como la disminución de células CD4+, que es un marcador de superficie de los linfocitos T, y que está presente en enfermedades tales como VIH, o enfermedades autoinmunes, además de proporcionar un control en la inflamación provocada por mecanismos de defensa<sup>(5)</sup>, y el cual actúa al inhibir a mensajeros que inducen a la inflamación en diversos órganos afectados entre los cuales fueron evaluados, el bazo, el hígado y los riñones.

## 2. INTRODUCCIÓN.

El síndrome de Sjögren (SS)<sup>(2,3,4,15,19,20)</sup>, es una enfermedad crónica autoinmune caracterizada por la disfunción y destrucción de las glándulas lagrimales y salivales, asociadas con la presencia de infiltrado mononuclear linfocitario y la generación de autoanticuerpos.

La afección más importante se presenta en las glándulas lagrimales y submaxilares<sup>(2,4,7)</sup>, con la infiltración linfocítica que invade a dichas glándulas, aunque también puede tener presentación clínica extensa con compromiso sistémico extraglandular<sup>(19)</sup>. Los pacientes presentan frecuentemente fatiga, malestar general, febrículas, mialgias, artralgias y disnea. Existen manifestaciones características a nivel musculoesquelético<sup>(19)</sup>, respiratorio, gastrointestinal, hepatobiliar, renal, vascular, hematológico y neurológico. La irregularidad inmunológica predispone para el desarrollo de linfomas.

Esta patología compromete a todas las razas, la proporción de los casos se observa (9:1) en mujeres menopáusicas y el resto corresponde a hombres o a jóvenes de uno u otro sexo.

Actualmente se divide al síndrome de Sjögren en dos tipos<sup>(4,19,20)</sup>:

- Primario: No se asocia con ninguna enfermedad en específico.
- Secundario: Se asocia a otras enfermedades a saber; artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia o dermatomiositis, aparición de linfoma.

Los dos tipos tienen aproximadamente la misma frecuencia pero con una mayor significancia sintomatológica el síndrome de Sjögren primario (SSp).

En México el síndrome de Sjögren no es reconocido como tal, ya que los síntomas pueden ser insidiosos y sutiles y considerados triviales por familiares y médicos o “secundarios a la edad”.

La presencia de sequedad bucal, ojos irritados y fatiga severa, suelen ser atribuidos a “depresión” o “psiconeurosis”.

Debido al escaso reconocimiento o a la ausencia de análisis complementarios que sugieren el diagnóstico de SS, en algunos pacientes no se detectan los llamados “autoanticuerpos”, con la detección de linfocitos B-220. Así como la determinación cuantitativa de anticuerpos específicos, anti Ro(ss-A) y anti La(ss-B), y de otras pruebas determinantes que ayuden a la evaluación del estudio como, anticuerpos antinucleares (ANA), anticardiolipinas, anticuerpos anti-retina, perfil hepático y renal, determinación de complemento, electroforesis de proteínas, principalmente gama-globulinas que representan la manifestación fehaciente de la anormalidad inmunológica del SS, esta ausencia no invalida el diagnóstico.

En este contexto se optó por experimentar un tratamiento que consiste en la administración de dos medicamentos; metotrexate<sup>(5,9,10)</sup> y fosfato de cloroquina (Aralen)<sup>(5,6,8,9,10,11,42)</sup>, utilizando ratones CD1 et/et hipotímicos, una cepa que muestra cierta relación sintomatológica, con la enfermedad en la raza humana. Con el fin de tenerlos en observación durante el tiempo determinado para el estudio, se mantuvieron en nuestro laboratorio, tomando nota en la bitácora, de los cambios presentados tanto físicos, como de comportamiento, con referencia a los síntomas neuropatológicos, para después continuar con los propósitos del estudio, que fueron la realización de la citometría de flujo<sup>(40)</sup>, para obtener resultados cuantitativos de los parámetros concernientes, entre los cuales se encuentran, células apoptóticas, necróticas, linfocitos B-220, células CD4+, y CD8+; así como la determinación de índices glandulares y organolépticos, a base de la relación del peso de las glándulas / peso del ratón x 10,000 y del peso del órgano / peso del ratón x 1000.

Se realizaron cortes histológicos para comprobar si el tratamiento había eliminado o disminuido la exocrinopatía<sup>(19)</sup> mostrada en algunos de los animales, que presentan el cuadro clínico afín con el síndrome de Sjögren, sufrido principalmente en mujeres adultas.

### 3. MARCO TEÓRICO.

#### 3.1 Síndrome de Sjögren.

En el siglo XIX, (1883) Fisher<sup>(1,2)</sup> publicó un caso de queratopatía filamentosa bilateral, asociada a artritis deformante. Los antecedentes del síndrome de Sjögren (SS) se remontan hasta 1892 cuando Mikulicz Radecki<sup>(1,2,18)</sup> describió a un paciente con crecimiento bilateral de las glándulas salivales y lagrimales. El examen con microscopía mostró la existencia de atrofia del parénquima acinar e infiltrado difuso por linfocitos; con el tiempo fueron identificados nuevos casos con crecimiento de las glándulas salivales debido al infiltrado ya mencionado, denominándose a este mal “enfermedad de Mikulicz”. La mayoría de estos casos se asociaron a patologías que en la actualidad se identifican como tuberculosis, sarcoidosis, linfoma e infecciones por microorganismos piógenos que pueden afectar los conductos salivales; otros se vincularon con alteraciones autoinmunes como la existencia de hipergammaglobulinemia y de autoanticuerpos. Frase en 1893<sup>(1,2)</sup>, describe un caso de sequedad de ojos, nariz y boca en una mujer de 27 años con síntomas similares. Gougerot en 1925 publicó la asociación sindrómica de sequedad ocular, bucal y vaginal. En 1927 Houwer comunicó nueve casos de queratitis filamentosa bilateral asociada a artritis crónica, de los nueve casos, siete se daban en mujeres adultas, la mayoría de ellas menopáusicas.

Al paso del tiempo el término “enfermedad de Mikulicz” resultó ser difuso, carente de significado terapéutico y diagnóstico. Hasta el año de 1933 cuando Henrick Sjögren, un oftalmólogo sueco, describió la asociación de sequedad de boca (xerostomía) y sequedad de ojos (xeroftalmia) como síndrome sicca, y a dicha asociación la denominó como síndrome de Sjögren (SS).

Eliminado:

Ellman y Parkes Weber en 1949<sup>(19)</sup>, hicieron la primera descripción clínica del síndrome seco traqueobronquial (xerotráquea)<sup>(17,24)</sup>, caracterizado principalmente por la presencia de tos seca.

Posteriormente Morgan y Castleman<sup>(19)</sup> en 1953 demostraron que el tipo de infiltrado encontrado en el SS y el descrito en la “Enfermedad de Mikulicz” eran similares.

Bloch<sup>(19,20)</sup> y colaboradores propusieron subdividir al SS en primario y secundario; el SS primario (SSp) no muestra asociación con ninguna otra manifestación extraglandular bien definida, o alguna enfermedad en específico, sin embargo actualmente, se ha encontrado que con cierta frecuencia, el SSp puede tener algunas manifestaciones extraglandulares sistémicas, en las cuales varios sistemas u órganos pueden ser blanco de un proceso inmunológico similar al de las glándulas salivales y lagrimales, y algunos compromisos son sucedidos en el músculo esquelético, en la región orofaríngea, renal, o hepatobiliar<sup>(19)</sup>.

El síndrome de Sjögren secundario (SSs) incluye a los pacientes con síntomas sicca asociados con una enfermedad en particular como artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia o dermatomiositis.

Los dos tipos tienen aproximadamente la misma frecuencia pero con una mayor significancia sintomatológica el síndrome de Sjögren (SS) primario.

Bunim y Talal<sup>(15,18)</sup> en 1963, realizaron la primera descripción de linfoma no Hodgkin asociado a SSp, en donde se plantea además como una causa patogénica, la posible estimulación crónica inmunológica. El riesgo relativo para presentarse esta neoplasia en pacientes con SSp, la calcularon Kassan<sup>(18)</sup> et al.. En 1978, el cual puede ser del orden de las 44 veces, comparado con la población general. Puede desarrollarse hasta 20 años después de diagnosticado el SSp. El promedio de tiempo entre el diagnóstico del SSp y el desarrollo de linfoma está alrededor de los 7.2 años.

El sustrato fisiopatológico del SS implica la infiltración linfocítica crónica de las glándulas salivales y lagrimales mediada por mecanismos relacionados con la autoinmunidad.

### **3.2 Exocrinopatía.**

El síndrome de Sjögren<sup>(15)</sup> es una enfermedad crónica autoinmune caracterizada por la disfunción y destrucción de las glándulas exócrinas, asociadas con la presencia de infiltrado mononuclear linfocitario y la generación de autoanticuerpos.

La afección más importante se presenta en las glándulas salivales y lagrimales, pero también puede tener presentación clínica extensa con compromiso sistémico extraglandular. Los pacientes presentan frecuentemente fatiga, malestar general, febrículas, mialgias y artralgias. Existen manifestaciones características a nivel músculo esquelético, respiratorio, gastrointestinal, hepatobiliar, renal, vascular, hematológico y neurológico<sup>(19)</sup>. La irregularidad inmunológica predispone para el desarrollo de linfomas.

El Síndrome de Sjögren primario (SSp), es una enfermedad sistémica crónica de carácter autoinmune, caracterizada por la infiltración linfoplasmocítica de las glándulas exocrinas, resultando en una hiperactividad de los linfocitos B con la consecuente producción de autoanticuerpos y complejos inmunes. Predominantemente afecta las glándulas salivales y lagrimales, cuya expresión clínica es la sequedad de boca y ojos..

La existencia aislada de síndrome seco con algunas características histológicas (infiltrado linfocitario en biopsia de glándula salival menor) e inmunológicas (factor reumatoide, anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti-Ro y anti-La positivos), con la presencia de manifestaciones extraglandulares bien definidas, o sin estas, se conoce como SS primario (SSp); y la existencia del síndrome seco asociado a la presencia de criterios clasificatorios de otras enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico(LES), escleroderma, dermatomiositis, cirrosis biliar primaria o vasculitis sistémica), se conoce como SS secundario (SSs).

### **3.3 Epidemiología.**

El SS afecta en mayor proporción a mujeres en edad madura o menopáusicas<sup>(4,19)</sup>, aunque no se descartan los hombres y mujeres menores de 30 años en las que también se ha presentado este síndrome.

La diferencia de criterios diagnósticos modifican los resultados de las investigaciones epidemiológicas y muchos pacientes con procesos leves no se diagnostican, los familiares de estos pacientes tienen mayor predisposición a padecer de enfermedades autoinmunes, como el propio SS o el LES. La distribución geográfica de esta enfermedad es universal, el SS secundario aparece en el 30% de los pacientes con AR, en el 10 % de los pacientes con LES y en un 1% de los pacientes con esclerodermia.

Los dos tipos tienen aproximadamente la misma frecuencia pero con una mayor significancia sintomatológica el síndrome de Sjögren primario (SSp).

Esta patología compromete a todas las razas, el 90% de los casos se observa en mujeres menopáusicas y el 10% corresponde a hombres o a jóvenes de uno u otro sexo<sup>(19,20)</sup>. Por lo tanto, siendo una de las enfermedades reumáticas más comunes, el SS es sorprendentemente, una de aquellas enfermedades diagnosticadas con menor frecuencia.

Algunas causas de este escaso reconocimiento son:

- Escasa difusión pública. A pesar de su frecuencia, el SS es poco conocido por el “ciudadano promedio”.
- Escaso o nulo conocimiento por parte de los médicos no especializados del abanico de síntomas de la afección y de las técnicas para su diagnóstico.
- La noción de que SS sólo afecta a mujeres “menopáusicas “. Con menor frecuencia puede observarse también en mujeres menores de 30 años y aún en hombres.
- Los síntomas pueden ser insidiosos y sutiles y considerados triviales por familiares y médicos o “secundarios a la edad”.
- La presencia de sequedad bucal, ojos irritados y fatiga severa, suelen ser atribuidos a “depresión” o “psiconeurosis”.
- Ausencia de los análisis complementarios que sugieran el diagnóstico de SS.

En algunos pacientes no se detectan los llamados “autoanticuerpos” que representan la manifestación fehaciente de la anormalidad inmunológica del SS. Esta ausencia no invalida el diagnóstico.

### **3.4 Etiopatogenia.**

Las enfermedades autoinmunes son producto de una respuesta inmune celular y/o humoral contra constituyentes propios con presencia de daño, se conocen al menos 4 factores que deben coincidir para que ocurra este tipo de enfermedades; la predisposición genética, factores externos desencadenantes (radiaciones, virus, fármacos, etc.), la influencia hormonal, pues se sabe que los estrógenos son inmunopotenciadores mientras que los andrógenos son inmunosupresores y factores psiconeuroinmunológicos como el estrés<sup>(15,41)</sup>. La etiología del SS es desconocida, sin embargo actualmente, se dispone de información sumamente notable y permite aventurar que el SS es consecuencia de la interacción de algún factor ambiental con factores genéticos, esto provoca una respuesta inmune alterada que se perpetúa por diversos mecanismos, y que produce los fenómenos autoinmunes del SS junto con todo el daño provocado a tejidos y órganos.

### **3.5 Factores predisponentes.**

Se ha descrito la asociación del SS primario con los antígenos B8, DR2, DR3, DR5, DQ1, DQ2 y DRw53 del HLA<sup>(28)</sup>, mientras que el SS secundario se ha asociado al DR4 ( en AR)<sup>(28)</sup>; en diversos estudios se ha comprobado la expresión de antígenos del grupo HLA-DR, tanto en el acino, como en el epitelio de las glándulas salivales.

### **3.6 Factores externos:**

El factor ambiental etiológico más importante son los virus; en algunos casos, la enfermedad comienza con una infección vírica aguda y en otros con la reactivación de un proceso vírico latente; como es el caso del virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, herpes virus humano tipo 6, virus C de la hepatitis y a los retrovirus en la patogenia del SS<sup>(46)</sup>, aunque los datos de los que se dispone no son concluyentes. En varios pacientes con SS se han detectado partículas retrovíricas de tipo A que tienen importante parecido con las partículas de HIV (Virus de Inmunodeficiencia

Humana), y en algunos estudios un 30% de los enfermos poseen anticuerpos contra la glucoproteína p24 de la cápside vírica del HIV, se ha observado también la presencia del gen tax del HTLVI en glándulas salivales menores de pacientes con SS, en ratones transgénicos portadores de este gen presentan una exocrinopatía autoinmune que asemeja a la del humano con la enfermedad del SS.

### 3.7 Manifestaciones clínicas.

En las manifestaciones sistémicas del SSp<sup>(4,19,20)</sup>, varios sistemas u órganos pueden ser blanco de un proceso inmunológico similar al de las glándulas salivales y lagrimales. En la tabla 1 se resumen los tipos de compromiso más comunes asociados con el SSp.

Tabla 1. Manifestaciones sistémicas en el síndrome de Sjögren primario.

SISTEMA COMPROMETIDO	MANIFESTACIONES
MÚSCULO ESQUELÉTICO	Artralgias Mialgias Artritis Miositis Fibromialgia
RESPIRATORIO	Sequedad nasal Xerotráquea Enfermedad pulmonar Intersticial Enfermedad obstructiva Pseudolinfoma Linfoma
RENAL	Nefritis intersticial Glomerulonefritis
GASTROINTESTINAL	Disfunción esofágica Gastritis crónica atrófica Linfoma gástrico Síndrome de mala absorción Disfunción pancreática
HEPATOBILIAR	Cambios histológicos compatibles con cirrosis biliar primaria estadio I Hepatitis autoinmune.
VASCULAR	Vasculitis leucocitoclástica Vasculitis visceral
NEUROLÓGICO	Neuropatía periférica Vasculitis sistema nervioso central Mielitis-esclerosis múltiple
HEMATOLÓGICO	Anemia Leucopenia Gamapatía monoclonal Crioglobulinemia
LINFONODULAR	Linfadenopatía Esplenomegalia Pseudolinfoma Linfoma

Compromisos más frecuentemente asociados al síndrome de Sjögren.

### **3.7.1 Manifestaciones musculoesqueléticas.**

Los pacientes con SSp, pueden presentar artralgiás, mialgiás, rigidez matinal, oligoartritis e incluso poliartritis simétrica intermitente o crónica similar a la artritis reumatoide. Se han descrito casos con artropatía de Jaccoud. En contraste con la artritis reumatoide, puede presentar estrechamiento del espacio articular pero sin erosiones.

En cuanto al compromiso muscular, lo más común son las mialgiás con enzimas musculares normales o ligeramente elevadas. La miositis como tal es muy rara, entre el 9 y el 20% de los pacientes cursan con criterios de fibromialgia.

La frecuencia de las manifestaciones músculo esqueléticas antes descritas son variadas, sin embargo se encuentran entre el 53 y 87.5% de los casos.

### **3.7.2 Manifestaciones respiratorias.**

Los informes sobre la prevalencia de enfermedades respiratorias en pacientes con SSp, varían ampliamente, con un rango que va desde el 75 al 95%, dependiendo de las modalidades diagnósticas utilizadas.

Varios estudios han sugerido que el compromiso subclínico es bastante frecuente, principalmente el relacionado con alveolitis. El 55% de pacientes con SSp, presentan anomalías en el recuento celular del lavado bronco-alveolar (LBA).

El compromiso de las vías aéreas superiores, ocasionan sequedad de la mucosa nasal la cual conlleva a rinitis atrófica con sensación dolorosa, presencia de costras, alteración del gusto y el olfato, epistaxis, perforación del tabique y disfunción tubárica que puede acompañarse de otitis media y sordera secundaria.

La primera descripción clínica del síndrome seco traqueobronquial (xerotráquea)<sup>(17,23,24)</sup>, se caracterizó principalmente por la presencia de tos seca, este síntoma puede presentarse hasta en el 17 % de los casos de SSp. Secundariamente se aprecian procesos infecciosos recurrentes del tipo bronquitis o neumonía. El sistema mucociliar se encuentra alterado debido a la disfunción glandular. El compromiso bronquial puede ir acompañado de disnea asociada a un proceso obstructivo, este tipo de pacientes presentan un infiltrado linfocítico peribronquial y periglandular, lo que histológicamente se conoce como bronquiolitis folicular. Diversos estudios han informado la presencia de componente obstructivo de las vías aéreas en los pacientes con SSp basados en estudios espirométricos. El pulmón puede ser blanco de cambios linfoproliferativos como linfomas.

La pleuritis con derrame en los pacientes con SSp es rara, tiende a ocurrir más en los pacientes con SS secundario. Se presenta en menos del 1% de los casos, y se debe sospechar de la presencia de enfermedad linfoproliferativa, más aún si se asocia a infiltrado parenquimatoso y a linfadenopatías hiliares en los estudios radiológicos.

### **3.7.3 Manifestaciones renales**

Entre el 23 y 50 % de los pacientes con SSp pueden presentar en algún momento de su enfermedad, alteraciones a nivel renal, las cuales son en la mayoría de los casos de importancia clínica, apreciables en análisis especializados de laboratorio (test de acidificación anormal), o en estudios de anatomía patológica (Ej: infiltrados periepiteliales, como parte del compromiso tubulointersticial).

Diferentes síndromes renales se han descrito asociados al SSp como son: insuficiencia renal aguda o rápidamente progresiva, nefritis aguda, insuficiencia renal crónica, síndrome nefrótico, glomerulonefritis (GMN), defecto tubular renal, nefrolitiasis, alteraciones del sedimento urinario asintomáticas, compromiso vascular, vasculitis, cuadro clínico similar a la del tipo IgM kappa, sugiriéndose la presencia de un antígeno, con el cual existe una reacción cruzada, con la probable participación de un proceso dependiente de los linfocitos T. Desde el punto de vista clínico de estos pacientes, presentan un síndrome nefrótico, con diversos tipos de hallazgos en el sedimento urinario, y en la histología renal.

#### **3.7.4 Manifestaciones gastrointestinales**

La disfagia alta es un síntoma común en los pacientes con SSp, se debe a la reducción en la producción de saliva, y probablemente a alteraciones en la motilidad esofágica. Estas últimas, han sido motivo de diferentes estudios de electrofisiología, y radiología, al igual que se han tratado de realizar correlaciones con estudios de anatomía patológica. Lo más prominente de estos estudios es que se han encontrado ya sea ausencia o disminución en la contractilidad, principalmente en el tercio superior esofágico.

Síntomas como el dolor epigástrico, náuseas o dispepsia prolongada, son comunes en los pacientes con SSp. Desde el punto de vista endoscópico el hallazgo más común es la gastritis.

La anatomía patológica demuestra gastritis atrófica con o sin metaplasia. Los estudios bioquímicos demuestran acloridia o hipocloridia, hipergastrinemia e hipopepsinogenemia. Se han informado además casos con disminución de la producción de factor intrínseco y bajos niveles séricos de vitamina B12 al igual que la presencia de niveles altos de anticuerpos anti-célula parietal.

En el estómago se pueden desarrollar también trastornos linfoproliferativos como los linfomas no Hodgkin.

#### **3.7.5 Manifestaciones hepatobiliares**

Se observaron alteraciones en algunas de las pruebas de función hepática en el 25% de los casos de SSp, sin mayor connotación clínica. Menos del 2% de los casos de SSp tienen síntomas relacionados con disfunción hepática como son el prurito, ictericia o eritema palmar. Lo más común es un incremento leve benigno de las ALT (L-alanina-2-oxoglutarato aminotransferasa), AST (L-aspartato-2-oxoglutarato aminotransferasa) y ALP (fosfatasa alcalina).

Estudios de anatomía patológica de estos pacientes revelan características histológicas de cirrosis biliar primaria (CBP), en estadio 1. Algunos casos pueden tener incremento de los anticuerpos anti-mitocondriales, anti músculo liso y anti piruvato deshidrogenasa, lo que sugiere una posible relación con CBP o con hepatitis autoinmune (HA).

Se trata de casos más comúnmente ligados a SSp. La asociación de SSp con cirrosis está prácticamente descartada.

### **3.7.6 Compromiso vascular.**

La vasculitis de pequeños vasos puede presentarse hasta en el 30% de los casos. La piel es el sitio más frecuentemente comprometido con la presencia de púrpura palpable de localización primordial en miembros inferiores. También se encuentran casos con urticaria vasculítica. El compromiso visceral puede presentarse en el riñón, pulmón, sistema nervioso y a nivel gastrointestinal.

Lo usual es que los pacientes con vasculitis presenten hipergamaglobulinemia, altos títulos de factor reumatoide, anticuerpos anti Ro e hipocomplementemia. El depósito de complejos inmunes es uno de los componentes patogénicos.

El fenómeno de Raynaud se presenta entre 38 y 64 % de los casos, a diferencia del asociado con esclerodermia.

### **3.7.7 Manifestaciones hematológicas**

El 6% de los pacientes con SS cursan con anemia leve normocítica normocrómica. En un 22% se aprecia leucopenia, que es debida a la reducción de linfocitos T CD4+ circulantes y con menor frecuencia, se aprecia neutropenia. El mecanismo es desconocido, pero se involucran los anticuerpos anti Ro, la apoptosis linfocítica periférica y el secuestro en el bazo de eritrocitos. El 70 % de los pacientes tienen una velocidad de sedimentación globular elevada. La trombocitopenia es rara, la esplenomegalia se puede encontrar hasta en el 14% de los casos y linfadenopatías hasta en el 20%.

### **3.7.8 Manifestaciones neurológicas**

Se han presentado casos de algunas manifestaciones a nivel neurológico: en un 8.4 % en el sistema nervioso periférico, 5 % con síndrome de túnel del carpo, y 3.2 % en el sistema nervioso central (migraña complicada, esclerosis múltiple con vasculitis y neuritis óptica con epilepsia). Una posible asociación de los casos con afección del sistema nervioso central se observó con la presencia del antígeno HLA-DQB1\*0303.

### **3.8 Respuesta inmune.**

Entre los mecanismos implicados en la respuesta inmune alterada de estos pacientes se han propuesto tres líneas principales: anomalías en la regulación linfocitaria periférica y en la selección del repertorio de células T, alteraciones en la proliferación de células B y finalmente, la expresión de autoantígenos.

Para algunos autores, en la patogénesis del SS parece ser relevante la existencia de errores en la selección tímica de clonas de células T potencialmente autorreactivas; existe evidencia de que estas células T autorreactivas pueden progresar hacia la anérgia o apoptosis al reconocer en ciertas circunstancias a los antígenos propios en la superficie celular.

En los lugares de infiltración glandular y tisular, en general se produce acumulación de linfocitos, la mayoría son linfocitos T CD4+<sup>(43,44,45)</sup> entre un 40 y 50% y en menor cantidad linfocitos T CD8+<sup>(40,41)</sup> en un 10-20%. Algunos trabajos sugieren que el interferón  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ )<sup>(40)</sup> es una citocina relevante en la patogénesis del SS. Se ha encontrado tanto en los conductos excretores, como en el infiltrado linfocitario y en los vasos sanguíneos de biopsias de glándula salival de pacientes con SS, existe una fuerte correlación con la expresión de DR y la distribución del

infiltrado linfocitario, estos datos apoyan la hipótesis de que el IFN-  $\gamma$ , segregado por los linfocitos que infiltran el tejido glandular, se une a receptores de las células epiteliales, esto da como resultado, un aumento de la expresión de antígenos de clase II del sistema HLA con la facilitación de la interacción con linfocitos T CD4<sup>+</sup> (40,41). La activación de los linfocitos B es una característica típica del SS, recientemente se ha considerado que esta activación policlonal de los linfocitos B es una consecuencia inespecífica de la interacción en la regulación del funcionamiento linfocitario, pero actualmente esta idea está siendo sustituida por la hipótesis de que dicha activación está dirigida por determinados antígenos.

Se ha postulado que la activación de linfocitos B empieza siendo policlonal y se localiza en los tejidos glandulares, posteriormente pasa a ser oligoclonal-monoclonal apareciendo la enfermedad sistémica, y finalmente es preferentemente monoclonal, apareciendo la transformación maligna. Entre los autoanticuerpos encontrados frecuentemente en el síndrome de Sjögren destaca, el factor reumatoide (FR) (19,53,54), son inmunoglobulinas con especificidad para el fragmento Fc de la IgG, están presentes en niveles elevados (60-70 %), con la presencia de artritis reumatoide (AR), o sin la presencia de ésta enfermedad. En la separación de proteínas en un campo eléctrico, los niveles de gammaglobulina son elevados. La crioglobulinemia (31) es la complicación del síndrome de Sjögren, estas también están presentes en linfomas y mieloma múltiple. Los anticuerpos antifosfolípidos (AFL), incluyen varios tipos como los descubiertos inicialmente en las enfermedades infecciosas, actualmente se conocen otros AFL como los reactivos contra cardiolipina o los denominados anticoagulante de lupus; estos AFL pueden ser de los isotipos IgG, IgM o IgA, actualmente la más relevante es la del isotipo IgG.

Los autoanticuerpos (26) característicos del SS son los denominados anti-Ro y anti-La (denominados también anti-SSA y anti-SSB respectivamente), estos autoanticuerpos están fuertemente asociados a las formas severas de SS y con manifestaciones clínicas más precoces. Los anticuerpos antinucleares (ANA) van dirigidos contra constituyentes nucleares, de ordinario a la nucleoproteína; están presentes en una proporción de 50-90% y los anticuerpos contra antígenos nucleares ribonucleicos como Ro (SSA) en un 40-50%, los anticuerpos La (SSB) aparecen en un 50%, estos últimos están presentes con mayor frecuencia en el SS primario, siendo menos frecuentes en la forma secundaria. Los anticuerpos anti-La (SSB) son los más específicos, ya que son raros en otras enfermedades autoinmunes, exceptuando el lupus eritematoso sistémico (LES), en el que pueden aparecer en el 10 % de los casos. Los anticuerpos anti Ro (SSA) son más frecuentes en el SS, pero pueden aparecer también en el LES (en un 40 %) o en el lupus cutáneo sub-agudo. Los ANA se han mencionado fundamentalmente en el SSs, con la presencia de artritis reumatoide (AR). También es frecuente la aparición de anticuerpos organoespecíficos, como los antitiroideos, anti-célula parietal gástrica, antimitocondriales, anti-músculo liso o anti-glándula salival. Como consecuencia de la hiperactividad de los linfocitos B, es frecuente encontrar hipergammaglobulinemia policlonal (50-80%), elevación de los niveles de IgM, inmunocomplejos circulantes, crioglobulinemia y gammapatía monoclonal.

### **3.8.1 Compromiso linfoproliferativo**

Algunas condiciones han sido asociadas a un mayor riesgo para desarrollar linfomas como son: la parotidomegalia, esplenomegalia, linfadenopatías, crioglobulinemia mixta monoclonal (31) (tipo II) y la presencia del factor reumatoide monoclonal.

Los órganos afectados por el SSp, cursan con infiltración de poblaciones de linfocitos activados tanto de tipo T como B, los cuales pueden llegar a tener comportamiento proliferativo de características incluso monoclonales que pueden en un espectro de evolución, conducir al

desarrollo de linfomas. Existe un espectro de cambios linfoproliferativos, que como en el caso del pulmón, puede presentarse desde una situación benigna a una maligna: neumonitis intersticial linfocítica, pseudolinfoma y linfoma.

En la situación más benigna existe la poliarteritis nodosa, compromiso de vías urinarias (cistitis intersticial) o fenómeno linfoproliferativo (pseudolinfoma, linfoma renal).

Sin embargo las condiciones patológicas más prevalentes son la nefritis intersticial (NI), con los defectos tubulares asociados y la glomerulonefritis (GMN), debida primordialmente a la presencia de complejos inmunes.

La NI en el SSp, se define histológicamente por la presencia de un infiltrado en el intersticio renal de linfocitos pequeños, células plasmáticas y monocitos, combinado con atrofia tubular y fibrosis. Se diferencia de otras formas crónicas de NI, como las ocasionadas por drogas o infecciones por la escasa presencia de tubulitis, además de observarse infiltrados eosinofílicos y neutrofílicos.

El compromiso tubulointersticial del SSp, es una manifestación extraglandular de la epitelitis<sup>(53,54)</sup> autoinmune, en la cual existe infiltrado linfocítico autorreactivo contra el epitelio tubular renal.

Se postula que los mediadores de inflamación<sup>(5)</sup> descritos y los autoanticuerpos, causan defectos de voltaje transepitelial, en parte debido a alteraciones en el H(+)-ATPasa. Se han descrito anticuerpos anti H(+)-ATPasa y antianhidrasa carbónica. En los pacientes con NI, se ha encontrado un aumento de la frecuencia de crioglobulinemia.

Los túbulos renales en consecuencia presentan alteraciones funcionales, siendo la más común la de los túbulos contorneados distales, el resultado es el desarrollo de acidosis metabólica con brecha aniónica normal (anion gap), e hipercloremia. Podemos apreciar además hipostenuria (disminución de la excreción de amonio en la orina), aumento de la excreción urinaria de potasio la cual conlleva a hiperpotasemia, aumento de la excreción de calcio por disminución de la reabsorción, esta última alteración lleva a un hiperparatiroidismo secundario, a hipercalcemia que puede expresarse clínicamente con la presencia de litiasis renal por cálculos de fosfato cálcico y nefrocalcinosis, raquitismo u osteomalacia. Estas alteraciones del túbulo contorneado distal se definen como el síndrome de la acidosis tubular renal tipo I (ATR tipo I), forma más común del daño tubular observado en SSp.

La disfunción de los túbulos contorneados proximales, puede ser manifestada como un defecto de la reabsorción que lleva a hipopotasemia, aminoaciduria, glicosuria, fosfaturia, uricosuria, o bicarbonaturia. Este último es el responsable de la acidosis metabólica. Así se conforma el síndrome de la ATR tipo II o de Fanconi. La excreción de proteínas es usualmente modesta, y raramente excede de 2 g al día. La medición urinaria de  $\alpha$ -1 microglobulina es útil para definir la presencia de proteinuria de origen tubular.

En cuanto al tratamiento de la ATR, se indica bicarbonato potásico oral. Si existe crioglobulinemia, se ha indicado la plasmaféresis o ciclofosfamida en pulsos.

En contraste con la Nefritis intersticial (NI), la patogénesis de la GMN en el SSp, es atribuida al depósito de complejos inmunes los cuales son formados por factor reumatoide (FR), IgM kappa monoclonal junto con IgG e IgA policlonal, en una manera similar a lo observado en el compromiso renal de la crioglobulinemia monoclonal asociada a hepatitis C. Las manifestaciones del síndrome seco siempre preceden a la aparición de GMN.

La mayoría de estos pacientes tienen crioglobulinemia mixta monoclonal y bajos niveles de complemento C4. La presencia de dicha crioglobulinemia denota la activación de linfocitos B tanto en forma monoclonal como policlonal. Esta expansión monoclonal de células B es caracterizada por la producción de FR de la cual se deriva la proliferación linfocítica en forma

difusa, con células pequeñas y bien diferenciadas, y en las formas más malignas se presenta una infiltración de tipo nodular, desordenado, infiltrativo con daño en la arquitectura de sitios adyacentes, aparición de imágenes mitóticas, monoclonalidad al igual que la capacidad de diseminación hacia nódulos linfáticos vecinos o distantes.

Para algunos autores, a los linfomas de bajo grado los clasifican como pseudolinfomas, los cuales son fundamentados en estudios inmunohistoquímicos, moleculares y de DNA .

Característicamente los linfomas asociados a SS<sub>p</sub>, son del tipo no Hodgkin, de células B, de grado bajo de malignidad, de origen tanto nodal como extranodal, con una distribución marginal. Estas células B pueden producir anticuerpos y desarrollar incluso una crioglobulinemia, con títulos altos de factor reumatoide monoclonal. Algunos autores del tema denominan a estas neoplasias como inmunocitomas.

Los sitios más frecuentes de inicio del proceso neoplásico son las glándulas parótidas, siguiendo en frecuencia sitios extranodales como el pulmón o el estómago.

El inicio del proceso linfoproliferativo a nivel histológico son los tejidos linfoides asociados a las mucosas o MALT (mucosa associated lymphoid tissues)<sup>(40)</sup>, los cuales tienen la función primordial de proteger las “puertas de entrada” o sea los epitelios. Los tumores derivados de los sistemas MALT, ocasionalmente son referidos como “maltomas”.

En forma ocasional, se informan casos de linfoma de células T, presentándose una condición de alta malignidad.

La clasificación y el tratamiento de los linfomas asociados a SS<sub>p</sub>, se enfocan en forma similar a los otros tipos de linfoma no Hodgkin.

### 3.9 TRATAMIENTO.

#### FOSFATO DE CLOROQUINA.

Se ha encontrado que el **fosfato de cloroquina (Aralen)**<sup>(5,6,8,9,10,11,42)</sup> tiene un efecto benéfico en artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico las 4- aminoquinolinas, fueron sintetizadas en Alemania en 1934.

**Mecanismo de acción:** las 4 y 8-aminoquinolinas, como cloroquina, actúan por intercalación (inserción entre pares de bases) en el ADN del parásito. En el caso del SS, el mecanismo de acción exacto no está totalmente comprendido, sin embargo se ha sugerido que se debe a la activación de los macrófagos en el procesamiento de antígenos y la interacción con células T activadas y como las células T producen citocinas, que son requeridas por las células B para promover la síntesis de IgM a IgG, la suposición es que la cloroquina puede disminuir la hiperglobulinemia IgG y el rango de sedimentación eritrocítica. Los investigadores guiaron el uso de esta droga en SS con la creencia en la reducción de los procesos inflamatorios de las glándulas exócrinas, y por lo tanto una mejoría en la sequedad, verificándose ésta, al realizar estudios en el suero de pacientes con la enfermedad examinando los efectos en los resultados de los marcadores salivales (IL6, IL2, células T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub>)<sup>(3,6,40,41)</sup>. Sus patrones divergentes de expresión de linfocinas, a su vez, permiten que cada uno de estos subgrupos T<sub>H</sub> promueva los diferentes tipos de reacciones inmunitarias que sean más apropiados para eliminar tipos particulares de microorganismos.

**Metabolismo:** La cloroquina es absorbida rápida y casi completamente en el tracto gastrointestinal. Su distribución es un tanto particular ya que se concentra en algunos tejidos; debe administrarse una dosis de carga.

El fosfato de cloroquina (Aralen) se encuentra en tabletas de 250 y 500 mg (150 y 300 mg de base). Para el tratamiento se administra una dosis total de 2.5 g en 2 días. La cloroquina en forma de clorhidrato se inyecta por vía intramuscular en casos de paludismo cerebral o cuadros graves, en dosis de 250 mg. Para la supresión crónica de cepas sensibles en un área endémica, se toma una tableta de 500 mg por semana por un tiempo de 2 semanas, antes de la exposición y hasta 6 semanas después de abandonar el área. La dosificación administrada a lactantes y niños por vía oral o intramuscular no debe superar los 10 mg de cloroquina base por kg de peso por día; la dosis usual es de 5 mg de base por kg.

**Toxicidad:** La toxicidad de la cloroquina es muy baja cuando se administra una dosis total de 2.5g. Raramente, se producen mareos, visión borrosa, cefalea, diarrea y malestar epigástrico. El compuesto debe ser administrado con precaución a personas con problemas hepáticos pero es seguro para mujeres gestantes y madres no en lactación, la medicación prolongada con fines supresores produce efectos indeseables poco significativos y rara vez debe discontinuarse por intolerancia. Los síntomas desaparecen fácilmente cuando se suspende el fármaco. La cloroquina puede causar coloración del lecho ungueal y las mucosas.

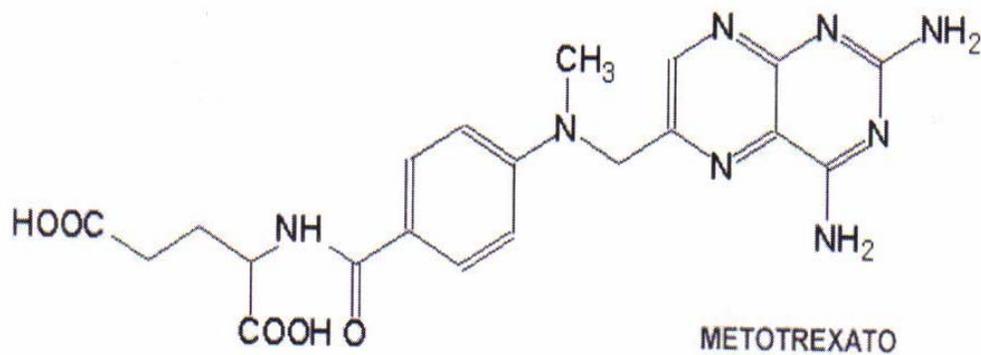
**Farmacocinética:** Debido a su amplia captación por los tejidos, se debe reforzar la dosis para lograr concentraciones efectivas en plasma. Después de la administración parenteral, la entrada rápida junto con la relativamente lenta eliminación de la cloroquina de la masa tisular puede dar lugar a concentraciones transitorias altas y aún tóxicas en el plasma. Por lo tanto, el fármaco se administra lentamente por infusión intravenosa continua o por vía intramuscular o subcutánea dividida en pequeñas dosis a intervalos frecuentes.

Si después de una dosificación diaria durante 2 semanas se discontinúa el tratamiento, las concentraciones plasmáticas y la excreción urinaria disminuyen, con una vida media de alrededor de 9 días durante las siguientes 4 semanas; posteriormente se prolonga en forma notable el

tiempo medio de la excreción urinaria y durante varios años pueden encontrarse pequeñas cantidades en la orina. En adultos la dosificación diaria oral de 300 mg de cloroquina da lugar a una concentración estable en el plasma de alrededor de 125  $\mu\text{g}$  por litro. Con una dosis semanal de 0.5 g, el pico de concentración en el plasma varía entre 150 y 250  $\mu\text{g}$  por litro; inmediatamente antes de la dosis posterior, el nivel se encuentra entre 20 y 40  $\mu\text{g}$  por litro.

#### METOTREXATE.

El **metotrexate** (Ledertrexate)<sup>(5,9,10)</sup> también llamado ametofterina es un antimetabolito de la familia de los folatos análogo de la aminopterina, producto que también deriva del ácido fólico.



**Mecanismo de acción:** es un antagonista, competidor del ácido fólico, pertenece a la clase de agentes citotóxicos conocidos como antimetabolitos. Actúa principalmente durante la fase “S” de la división celular, por inhibición competitiva de la enzima dihidrofolato reductasa, impidiendo así la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato, un paso necesario en el proceso de la síntesis de DNA y replicación celular<sup>(5,9,10)</sup>.

El metotrexate es un antimetabolito usado en el tratamiento de ciertas formas de cáncer, psoriasis severa y en artritis reumatoide en adultos. Interfiere en la síntesis y reparación del DNA y en la replicación celular. El antimetabolito se pega a los cromosomas y detiene la replicación del DNA la cual impide que se lleve a cabo la mitosis.

En tejidos en proliferación activa, en células malignas, en la médula ósea, en células fetales, en mucosa intestinal y bucal el metotrexate ejerce su máximo efecto<sup>(9)</sup>.

Cuando la proliferación de células en el tejido maligno es mayor que en los tejidos normales, el metotrexato impide el crecimiento maligno sin daño reversible a los tejidos normales. Además posee efectos inmunosupresores, y previene la enfermedad injerto contra huésped.

**Farmacocinética:** El metotrexate se administra por vía oral, intravenosa, intramuscular o intratecal. Cuando se administra por vía oral, el metotrexate se absorbe en el tracto digestivo mediante un mecanismo de transporte activo, que puede saturarse si las dosis del fármaco son muy elevadas. Las dosis orales de 30  $\text{mg}/\text{m}^2$  muestran una biodisponibilidad del 60%, reduciéndose esta si las dosis son  $> 50 \text{ mg}/\text{m}^2$ . En estos casos se aconseja dividir las dosis para evitar los procesos de saturación.

**Efectos adversos:** Los efectos adversos son: pelo quebradizo o más delgado de lo usual, ampollas en la piel o acné, pérdida del apetito o de peso, ampollas en la boca, fatiga, sangrado, moretones inusuales, congestión, fiebre, mareos, escalofríos, disnea (dificultad para respirar), dolor de garganta, inflamación en los pies o tobillos, vómitos, artralgias (dolor en las articulaciones).

### **3.9.1 Tratamientos utilizados actualmente:**

Actualmente, la terapia inmunosupresora establecida en casos de enfermedades autoinmunes no es específica, es decir que no está dirigida a la causa de la enfermedad y puede inhibir las respuestas inmunológica e inflamatoria normales. Los agentes como mercaptopurina, azatioprina, y ciclofosfamida son citotoxinas<sup>(5)</sup>. Interfieren con la replicación y metabolismo celular en diversas formas, pero el resultado es la alteración de la función normal de las células. La interferencia en la replicación de células en rápida división provoca diversos efectos indeseables, como la inmunosupresión general. Otro inconveniente, para el uso de agentes citotóxicos en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, es que se desconocen los riesgos de desarrollo de neoplasmas o de alteraciones cromosómicas.

La ciclosporina A<sup>(5,12)</sup>, posee la especificidad adecuada, inhibiendo la producción o actividad de interleucina-2, y aborta la señal para la producción de células T efectoras, un inconveniente importante es su nefrotoxicidad.

La globulina antilinfocítica; contribuye al ataque inmunológico pero está dirigida contra células B y T, con los consiguientes riesgos de infección. Además de que estos medicamentos se reservan para aquellos pacientes que no responden a medicamentos inmunosupresores.

Los glucocorticoides como la prednisona<sup>(5)</sup> ejercen acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras, puesto que la lesión inmunológica causa una respuesta inflamatoria y activa células que producen mediadores de la inflamación. Como alternativa, los glucocorticoides pueden inhibir la producción de mediadores, como metabolitos de ácido araquidónico, lo cual aumenta la inflamación y activa las células del sistema inmunológico. Existen fuertes evidencias que señalan que los productos de oxidación del ácido araquidónico están implicados en ambos mecanismos. Algunos productos de la lipoxigenación del ácido araquidónico, los mono-HETES y HPETES, son quimiotácticos para los fagocitos, y algunos experimentos realizados con linfocitos in vitro indican que los productos de la lipoxigenación afectan las respuestas proliferativa y citotóxica, a través de la producción de interleucina-2 ó INF- $\gamma$ .

#### 4. Modelo de ratón utilizado para el tratamiento.

El modelo animal utilizado para este estudio fue el ratón hipotímico alopécico (CD1 et/et)<sup>(50,51)</sup>, derivado de una mutación espontánea descendiente de la cepa albina CD1, como resultado de un gen recesivo autosómico simple, surgido en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. Los animales se originan al aparear machos y hembras CD1 et/+, a la cuál se les denominó como “portadores”, es decir a los hijos de los ratones de la cepa albina original CD1, también se originan al aparear machos y hembras et/et.

A este ratón se le nombró CD1 et/et, el símbolo “et” se adoptó para mencionar a la forma mutante, una de las características anatómicas principales que muestran los ratones macho, de ésta cepa, es que presentan un timo rudimentario, el cuál es aproximadamente la mitad del peso comparado con el del ratón eutímico CD1 et/+, mientras que las hembras CD1 et/et, presentan una estructura parecida a un nódulo linfático en lugar del timo, y el peso de ésta estructura, es menor al peso de las hembras eutímicas CD1 et/+.

Las crías CD1 et/et se separan de sus hermanos con pelo, de los cuales se diferencian al nacer por la ausencia de vibrisas (vibrissae), crecen por separado y se mantienen bajo condiciones de bioterio, es decir se les acondiciona una cama de aserrín esterilizado, para evitar que estén expuestos a cualquier microorganismo, por su condición de susceptibilidad que los caracteriza, por ser hipotímicos, y se les proporciona libre acceso a alimento y agua la cuál preferentemente debe ser purificada (electropura).

Este ratón mutante muestra las siguientes características: desnudo ó pelón, fertilidad baja, mortalidad alta, existencia corta con un promedio de 2 años de vida, son hipotímicos, y algunos desarrollan aproximadamente a las 20 semanas de edad, síntomas característicamente semejantes al cuadro clínico sucedido en el síndrome de Sjögren en humanos, por lo regular a temprana edad no hay presencia de lesiones.

Estos ratones suelen presentar también el cuadro clínico de uveorrenitis espontánea crónica a anticuerpos contra antígeno S de retina, posee un mayor número de células CD3 en comparación al ratón eutímico CD1.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México el síndrome de Sjögren todavía no es reconocido como tal a pesar de su frecuencia<sup>(4)</sup>, debido a que es poco conocido por el ciudadano promedio, y al presentarse en mayor proporción en mujeres adultas, ó menopáusicas<sup>(4,19)</sup>, suelen confundirse los signos y síntomas, con enfermedades propias de la edad, o por causas derivadas de la menopausia; por otra parte, por la escasez de reconocimiento dentro del abanico de médicos no especializados y de las técnicas para su diagnóstico, no se le brinda la debida importancia, y por lo tanto un tratamiento adecuado.

Hasta la fecha, se han utilizado una serie de medicamentos inmunosupresores, como es el caso de la prednisona, mercaptopurina, azatioprina, ó ciclofosfamida<sup>(5,21,57)</sup>, que actúan sobre las células citotóxicas, inhibiendo el mecanismo normal de las células, y provocando alteraciones a nivel cromosómico, y la creación de anomalías por detener la proliferación celular en un ambiente de replicación continua.

Los medicamentos en estudio fueron propuestos con el fin de evaluar la posibilidad de erradicación o disminución en la infiltración linfocítica ocurrente en algunos órganos que resultan afectados por la diseminación y el descontrol de células inmunitarias entre los que se encuentran el hígado, los riñones, pulmones, el bazo, las glándulas submaxilares y lagrimales, lo cuál es de suma importancia ya que hasta ahora no existe un tratamiento que suprima la proliferación celular, y la consecuente destrucción tisular. Al utilizar 2 dosis distintas se puede prever la tolerancia hacia el medicamento, sin provocar una toxicidad que cause daño a los órganos.

Como alternativa se optó por utilizar metotrexate<sup>(5,9,10)</sup> un medicamento antineoplásico, que reduce la proliferación linfocítica, inhibiendo la multiplicación celular durante la etapa de replicación en la fase S del ciclo celular, y fosfato de cloroquina (Aralen)<sup>(5,6,8,9,10,11)</sup>, un medicamento utilizado en el tratamiento contra el paludismo, y que posee efectos inhibidores a nivel de IL-2 interleucina involucrada en las funciones efectoras de las células TH1<sup>(40,41)</sup>, que provoca la producción de células citotóxicas. Dichos medicamentos son elementos en estudio para evaluar si existe una alternativa a nivel sistémico y glandular, que ayude a prevenir ó disminuir eficazmente la invasión y la infiltración mononuclear linfocítica, la cual se lleva a cabo tanto en las glándulas salivales y lagrimales como en riñones, hígado, y bazo, principalmente, órganos que juegan un papel importante en las funciones de excreción, metabolismo, y maduración de células linfocíticas. Entre los posibles factores que desencadenan el síndrome se encuentran los factores genéticos, inmunológicos, ambientales y externos, aunque no se sabe con certeza si son todos estos factores en conjunto los que ocasionan el síndrome, o sea una causa en particular todavía desconocida.

Independientemente de las causas que lo originan, el presente trabajo pretende evaluar una mejor alternativa de tratamiento, que permita incluso la prevención de la aparición de la enfermedad, la suavización de los síntomas y además la disminución de los efectos tóxicos de los tratamientos antes usados.

## **6. OBJETIVOS.**

1. Observar los cambios físicos que se presenten en los ojos de los ratones, durante el transcurso del tratamiento, y llevar un control de peso para verificar si los medicamentos ocasionan disminución de peso o hiporexia.
2. Observar si la infiltración linfocítica a nivel glandular disminuye después de haber terminado el tratamiento, realizando índices glandulares y obteniendo las glándulas afectadas (lagrimales y submaxilares) para la realización de cortes histológicos.
3. Observar cortes histológicos de hígado, riñón y bazo, con el fin de verificar si existe algún cambio en la estructura del tejido.
4. Observar si hubo cambios con las diferentes dosis.

## **7. HIPÓTESIS.**

Se espera que conforme los ratones CD1 et/et, sean tratados con los medicamentos, metotrexate y fosfato de cloroquina (Aralen), durante el tiempo determinado para el estudio, se pueda prevenir la enfermedad, en caso de no lograrse la prevención y presentarse dicha patología, la sintomatología sea de menor intensidad y por lo tanto disminuya la inflamación y la consecuente infiltración linfocítica.

**TIPO DE ESTUDIO:** Descriptivo, prospectivo, observacional, longitudinal.

**POBLACIÓN:** 36 Ratones hembra de la cepa CD<sub>1</sub> et/et, de 4 a 6 semanas de edad, criados en el bioterio de la FES Zaragoza campus II, a los que con objeto del estudio se trasladarán y mantendrán durante el tiempo requerido en el lugar de experimentación, laboratorio de Inmunología L - 313 de dicha institución.

**CRITERIOS DE INCLUSIÓN:** Ratones hembra de 4 a 6 semanas de edad, denominados pelones ó desnudos de la cepa CD<sub>1</sub> et/et.

**CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:** Ratones machos pelones ó desnudos de la cepa CD<sub>1</sub> et/et.

**VARIABLE DEPENDIENTE:** Dosis de los medicamentos empleados y tiempo estipulado para el estudio.

**VARIABLE INDEPENDIENTE:** La variabilidad sintomatológica de la población manejada.

## 8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Se seleccionaron aleatoriamente tres grupos de ratones, de un total de 16, todas hembras de la cepa CD<sub>1</sub> et/et (pelones ó desnudos) provenientes del bioterio de la FES Zaragoza campus II. El grupo 1 contenía 5 ratones, los otros dos grupos 4 ratones respectivamente, y se utilizaron además 3 ratones que sirvieron como referencia, a los que se les denominó como testigos, a los ratones de los grupos 1, 2 y 3 se les marcaron con muescas permanentes en las orejas, y con líneas en las colas, de distintos colores para diferenciar a los 3 grupos de cada uno y de los testigos.

Se realizaron los cálculos pertinentes para la preparación de una solución de metotrexate y fosfato de cloroquina (aralen), a una dilución 1:10 determinando la dosis a administrar a cada ratón de acuerdo a su peso corporal utilizando la relación mg de fármaco / g de ratón.

Se llevó a cabo la misma línea de investigación con otro grupo de 20 ratones hembra desnudos ó pelones de la cepa CD<sub>1</sub> et/et, llevando a cabo la misma secuencia de trabajo se seleccionaron aleatoriamente a 3 grupos, el primer grupo contenía 5 ratones, el segundo grupo contenía 7 ratones y el tercero 5 ratones, y se utilizaron 3 ratones más como testigos, adecuando la dosis a cada ratón de acuerdo a su peso corporal considerando la relación mg de fármaco / g de ratón, después para calcular en mililitros la cantidad de fármaco que se administró, se utilizó la relación 0.3 mL / 30 g de ratón y con una regla de tres se obtuvo la equivalencia considerando el peso del ratón, ya que se pesaba a los animales cada lunes y viernes antes de cada dosificación.

A los tres grupos se les administró por vía oral, con ayuda de sondas gástricas, placebo (agua destilada), metotrexate y fosfato de cloroquina, respectivamente.

Al grupo número 1, se les administró una dosis de 0.25 mL de placebo (agua destilada).

Al grupo 2 se les administró una dosis calculada de metotrexate de acuerdo a la relación, 0.3 mL de fármaco / 30 g de ratón y la equivalencia con el peso de cada ratón integrante del grupo.

Al tercer grupo se le administró una mezcla, así denominada porque consistía de fosfato de cloroquina (aralen) y metotrexate, se dejó transcurrir 5 minutos entre la primera dosificación con aralen y la segunda con metotrexate, se utilizó la cantidad de mL de fármacos siguiendo la misma relación 0.3 mL de fármaco/ 30 g de ratón determinando la equivalencia con el peso de cada ratón.

Al grupo de testigos simplemente se les mantenía en un ambiente pulcro, con su alimento y agua, porque sirvieron como referencia, para la comparación de resultados, entre ratones tratados y sin tratamiento.

El placebo y el fosfato de cloroquina se administraban diariamente (L a V), y el metotrexate cada tercer día (L, M, y V).

Se dejó descansar a los ratones el fin de semana (sin administración de fármacos) con la finalidad de no provocarles una toxicidad acelerada por el uso de metotrexate principalmente, y evitar un poco el factor estrés provocado al inocularlos. Se llevó a cabo un registro de cambios, observados principalmente en los ojos y en el peso.

Se observaron los cambios en los ojos de los ratones durante el tratamiento, que de acuerdo a los sucesos ocurridos en la exocrinopatía, se reportaron de acuerdo al avance obtenido, como: sano, inflamado, catarata ó perdido.

Terminado el tiempo estipulado para el estudio, que tuvo una duración de 4 meses, para cada experimento; los ratones se pesaron, se sangraron a blanco, para la obtención de las muestras de sangre, y se sacrificaron, posteriormente por centrifugación y separación se

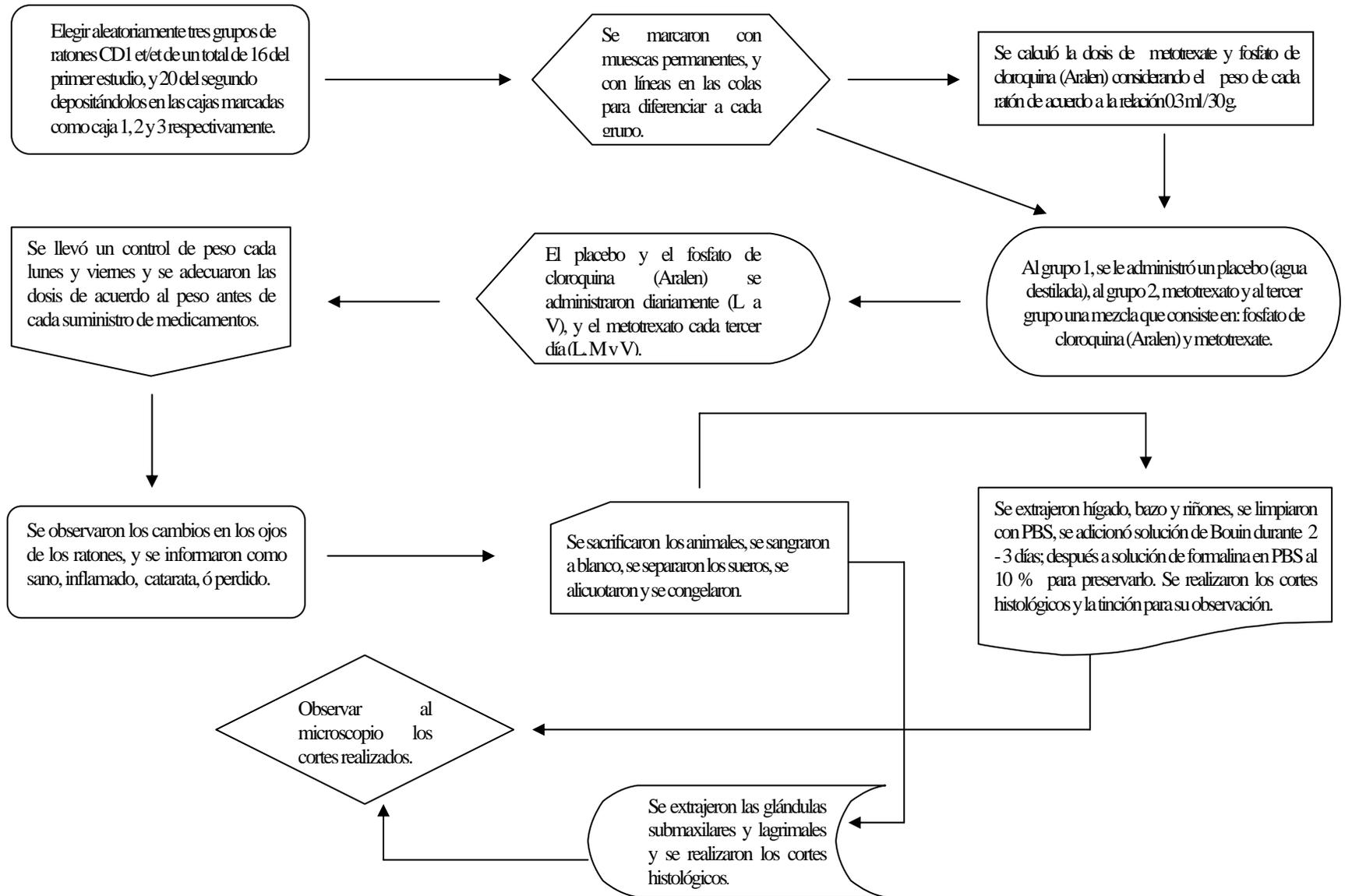
obtuvo el suero, que se mantuvo en refrigeración para los estudios concernientes posteriores.

Se extirparon el hígado, los riñones, el bazo, y las glándulas submaxilares y salivales, se pesaron los órganos y las glándulas y se calcularon los índices organolépticos de hígado (hepático) de riñones (renal) y de bazo (esplénico), determinados en porcentaje, con la relación peso del órgano / peso del ratón X 1000.

Para la determinación del porcentaje de los índices glandulares. Se utilizó la relación peso de las glándulas / peso del ratón X 10,000<sup>50</sup>.

Los órganos y las glándulas, se mantuvieron en formalina en PBS al 10 %, hasta realizar los cortes histológicos; al extraer los órganos, se lavaron con PBS para eliminar la sangre adherida a los órganos. Se introdujeron en frascos debidamente etiquetados con el número del grupo y del ratón, los órganos se dejaron sumergidos de 2 a 3 días, en una solución de Bouin, después se transfirieron a la solución de formalina en PBS al 10%, posteriormente, se realizaron los cortes histológicos y se observaron al microscópio.

## 9. DIAGRAMA DE FLUJO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL







## 10. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se seleccionaron 36 ratones de la cepa CD<sub>1</sub> et/et (desnudos ó pelones) todas hembras, de 4 a 6 semanas de edad, criadas en el bioterio de la FES Zaragoza campus II, los ratones fueron seleccionados aleatoriamente, para lograr la constitución de 6 grupos, 3 grupos utilizados en el primer experimento y 3 grupos para el segundo. Cada ratón fue enumerado con una o varias líneas en la cola dependiendo del número correspondiente a cada ratón, también se les hicieron muescas para lograr diferenciar a los ratones de cada grupo para que no existiera ninguna confusión al formar los mismos, y para saber a cual de éstos pertenecía cada ratón.

Los ratones se depositaron en jaulas de plástico provistas de una reja metálica especial en donde se les depositaba comida y agua (electropura) diariamente, se les acondicionaron las jaulas con una “cama” de aserrín esterilizado, el cuál se les cambiaba cada tercer día.

Los ratones se pesaban cada lunes y viernes en una balanza granataria provista de una canastilla metálica con tapa y se reportaban todos los registros con fecha en la bitácora de trabajo.

Posteriormente se les administró oralmente con sondas gástricas las dosis calculadas de los medicamentos en estudio.

Los medicamentos se calcularon en base a la dosis en un humano adulto con un peso corporal de 70 kg , adecuando dichas dosis al peso aproximado de un ratón de 30 g de peso.

### 11. Anticuerpos y otros reactivos utilizados en la citometría de flujo.

Los anticuerpos utilizados en la citometría de flujo fueron de la marca Beckton Dickinson; anti-CD4+ de ratón marcado con isotiocinato de fluoresceína (FITC)<sup>(38,40)</sup>, anti-CD8+ de ratón unido a ficoeritrina (PE)<sup>(38,40)</sup>, anti-B 220 de ratón unido a PE. La anexina-V se utilizó acoplada a FITC.

El amortiguador salino de fosfatos PBS pH = 7.2 (PBS: 8g NaCl, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g/L) fue preparado y filtrado en el laboratorio en donde se llevaron a cabo todas las determinaciones.

### 12. Análisis por citometría de flujo.

El equipo utilizado para trabajar la citometría de flujo<sup>(38,40)</sup> fue un FACS calibur (Beckton – Dickinson, San José California), con el programa cellQuestPRO. En el diagrama de puntos vs. Granularidad, se delimitó la región correspondiente a los linfocitos, y se adquirieron 10,000 eventos de ésta región para cada muestra.

#### 12.1 Inmunofenotipo.

Las muestras fueron analizadas en un intervalo de tiempo menor a una hora.. El conjugado con fluorocromo FITC (isotiocinato de fluorocromo) fue analizada en el canal FL1, y la tinción con yoduro de propidio (PI) se analizó en el canal FL2. Los resultados se presentan como el porcentaje de linfocitos T y B presentes en la muestra<sup>(40)</sup>.

#### 12.2 Apoptosis.

Para la determinación de apoptosis se utilizó Anexina V<sup>(33,34,35)</sup>, una proteína de unión a fosfolípido dependiente de Ca<sup>+2</sup>, que tiene la capacidad de unirse a la fosfatidilserina<sup>(35,38)</sup>, la cual es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la membrana celular, y cuando la célula entra en el proceso de muerte celular programada (apoptosis), uno de los eventos

tempranos es la exposición de fosfatidilserina hacia el exterior de la membrana celular. Debido a este cambio en la simetría de la célula<sup>(38)</sup>, se ha desarrollado un método que permite detectar la presencia de dicha unión por el método de citometría de flujo, la Anexina V es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana, y que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, por lo que aquellas células que se encuentran marcadas con anexina V, serán las que se encuentran en apoptosis<sup>(36,39)</sup>. La detección de anexina V se puede acompañar de una tinción con yoduro de propidio, lo cual nos permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido. Esto permite conocer si la célula se encuentra en una etapa temprana de la muerte celular, o si se encuentra en una etapa tardía en la cual ya se encuentra presente la necrosis secundaria.

La anexina V puede ser acoplada a fluorocromo, y de esta manera puede usarse en citometría de flujo<sup>(40)</sup>. Las células de bazo fueron teñidas con Anexina V – FITC, de acuerdo con las especificaciones del fabricante; se tomaron  $4 \times 10^5$  células de bazo, se les agregó 100  $\mu$ L de amortiguador de unión 1x (10mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>), posteriormente se les añadieron 3  $\mu$ L de anexina V unida a FITC, y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la obscuridad. Transcurrido el tiempo se resuspendieron con 300  $\mu$ L de amortiguador de unión 1x, y se les adicionó 3  $\mu$ L de yoduro de propidio (PI) a una concentración de 1  $\mu$ g / mL, para excluir a las células necróticas (anexina – positivas, PI- positivas).

Las muestras fueron analizadas inmediatamente dentro de un intervalo de 30 minutos, en el citómetro de flujo. La tinción de anexina – V unida al conjugado fotocromático FITC fue analizada en el canal FL1<sup>(40)</sup> y la tinción con PI (yoduro de propidio) fue analizado en el canal FL2<sup>(40)</sup>, después de la compensación electrónica para evitar sobreposición de los espectros de emisión. Los resultados se presentan como el porcentaje de células linfoides apoptóticas presentes en la muestra, así como también un porcentaje de células necróticas secundarias.

### **13. Preparación de los tejidos para histología.**

Primero se llevó a cabo la fijación<sup>(48,50,51)</sup>, utilizando una porción de los órganos extraídos, se etiquetaron y se fijaron con formalina al 10 % en PBS, durante un tiempo mínimo de 1 semana. Para la deshidratación<sup>(51)</sup>, primero se extrajo el 75 % del agua del tejido, para lo cual las muestras se sometieron a concentraciones gradualmente crecientes de etanol (70°, 96°) se mantuvieron dentro de cada solución a temperatura ambiente, durante un lapso de 50 minutos, hasta obtener su deshidratación total<sup>(48)</sup>.

En el proceso de inclusión<sup>(50,51)</sup>, ya terminada la deshidratación, los tejidos se colocaron en parafina, la cuál se mantuvo durante todo el proceso a temperatura de fusión, la cual osciló entre 56 - 60° C. Una vez embebidos los tejidos de parafina, se colocaron en moldes, a los cuales se les vació más parafina, para terminar el rellenado del molde, y por último se les permitió su solidificación.

Posteriormente se llevó a cabo la microtomía, ya que había endurecido la parafina, se separaron los bloques del molde y se recortaron para exponer el tejido embebido; se montaron en el microtomo, y se obtuvieron cortes finos con un espesor de 3-4  $\mu$ m, dichos cortes tienen cierta tendencia a pegarse en una banda continua, de modo que el borde posterior de una sección se adhiere al interior de la siguiente banda; las bandas obtenidas se hacen flotar en agua tibia con un poco de gelatina, lo que ejerce un efecto de planchado y entonces pueden recogerse perfectamente extendidas sobre un portaobjetos, finalmente se colocaron dentro de la estufa a 30°C, con la finalidad de que el corte tuviera una mucho mayor adherencia al portaobjetos.

En el siguiente paso perteneciente a la tinción y montaje, se eliminó el agente de inclusión, y posteriormente se pasaron dentro de etanol absoluto por concentraciones decrecientes de (96°, 70°) para permitir nuevamente su hidratación. Por último se realizó su tinción con hematoxilina (H) y eosina (E) y una vez más se deshidrataron, aclararon y montaron.

Para el estudio histopatológico<sup>(48,49)</sup>, se utilizaron las glándulas salivales y lagrimales obtenidas de los ratones tratados CD1 et/et, que fueron preservadas en formalina al 10 % en PBS, a continuación de la fijación del tejido, este es deshidratado en soluciones de etanol a distintas graduaciones y empotrado en parafina, las secciones se cortaron para lograr laminillas de 5 µm, utilizando un microtomo rotatorio, posteriormente se tiñeron con eosina y hematoxilina y finalmente las secciones obtenidas de los tejidos se observaron al microscopio, para su evaluación.

#### **14. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SPSS para windows<sup>(52)</sup> 10.0, aplicando estadística descriptiva, análisis de varianza (**ANOVA de una vía**), utilizando las pruebas post-Hoc de **tukey –HSD**, y prueba no paramétrica de **Spearman** considerando un nivel de significancia de ( $p \leq 0.05$ ).

## 15. RESULTADOS

Utilizando el programa SPSS<sup>(52)</sup> para windows 10.0 se obtuvieron los siguientes resultados del análisis estadístico para el cuál se utilizó; estadística descriptiva, ANOVA de una vía (análisis de varianza), comparación múltiple de Tukey HSD y Correlación no paramétrica de Spearman.

Al llevar a cabo la estadística descriptiva del parámetro de índice renal que presentó diferencia significativa, se observó que el grupo que mostró menor valor de media, fue el de los ratones inoculados con placebo, y el mayor valor, lo obtuvo el del grupo inoculado con la mezcla como se muestra en la tabla 1 (ver anexo).

En los resultados de índice renal, se muestra que existe una diferencia significativa entre el grupo de placebo y en el grupo de la mezcla, esto indica que el tamaño de los riñones de los ratones inoculados con placebo fue menor que el de los ratones inoculados con la mezcla como se observa en la tabla 2.

Posteriormente se observaron las diferencias significativas de ambos parámetros ya mencionados, comparativamente el placebo y la mezcla tabla 3.

Se llevaron a cabo las correlaciones no paramétricas de Spearman, en las cuales se asociaron los parámetros estudiados en pares o binomios con el fin de encontrar diferencias significativas que ayudarán a explicar la teoría de Spearman que explica que cuando existe una diferencia significativa y ésta resulta positiva hay un incremento tanto de este parámetro como del correlacionado. y cuando existe una diferencia significativa negativa aumenta la que resultó con la diferencia significativa mientras que el parámetro correlacionado disminuye, o en otros términos, dicha disminución se aprecia en el número de células presentes en los órganos y glándulas en estudio, así como en el tamaño de los mismos, que al correlacionarse se encontrara alguna relación celular con el órgano o la glándula afectada. Dichas correlaciones son mostradas en la tabla número 4.

En lo que respecta al tratamiento 2, se llevó a cabo la misma dinámica, al realizar la estadística descriptiva, ANOVA de una vía, comparación múltiple de Tukey HSD, y correlación no paramétrica de Spearman.

Se puede apreciar que la media más alta en lo referente al parámetro de peso, pertenece al grupo de los ratones testigos, siguiendo con el grupo de los ratones tratados con metotrexate, después a los que se les administró placebo y finalmente los ratones tratados con la mezcla, observándose que los ratones que presentaron mayor peso en el transcurso del tratamiento fueron los ratones testigos y los que sufrieron mayor decremento en peso fueron los ratones tratados con la mezcla, como puede observarse en la tabla 5.

Se estudió el índice renal, puesto que se observó una diferencia significativa al realizar el análisis estadístico, en lo referente a las medias resultantes en el parámetro de este índice, se observa que la media más alta se encuentra en los índices renales de los ratones tratados con la mezcla, siguiendo los ratones testigos, posteriormente los ratones inoculados con metotrexate y por último se encuentran los ratones administrados con placebo.

Se llevó a cabo la técnica de citometría de flujo, para obtener resultados cuantitativos en porcentaje de las células estudiadas en la exocrinopatía, entre los que se encuentran los linfocitos B-220, las células CD4+ y CD8+, apoptosis y células necróticas, después se realizó la estadística descriptiva para el parámetro de linfocitos B-220, resultando que la media de los ratones tratados con metotrexate fue la más alta, continuando la media de los ratones placebo, detrás los ratones tratados con mezcla y por último los ratones testigo.

Al realizar el análisis de varianza se obtuvieron las diferencias significativas de los parámetros de peso, índice renal, y linfocitos B-220, mostrados en la tabla 6.

Se llevaron a cabo las comparaciones múltiples a través de los grupos, del parámetro de peso, encontrando diferencias significativas entre los ratones testigos contra cada uno de los grupos contenidos en el estudio, esto es testigo contra placebo, testigo contra metotrexate, y testigo contra mezcla.

En el caso de índice renal las diferencias significativas estuvieron dadas entre el placebo y metotrexate, placebo contra mezcla y placebo contra testigos.

Para el caso de linfocitos B la diferencia significativa se encontró entre el grupo de ratones inoculados con metotrexate y los ratones testigos. (ver anexo tabla 7).

En lo referente a la correlación de Spearman, se encontraron diferencias significativas al comparar a los parámetros en pares ó binomios, con el fin de obtener y analizar dichas diferencias resultantes ya sean positivas o negativas, para distinguir el aumento o decremento de uno de los 2 parámetros a correlacionar, que ayudará a deducir lo ocurrido durante el tratamiento dentro de los órganos y glándulas afectados por la enfermedad. Se encontró que el tratamiento influyó en el índice renal, el índice esplénico, y en los linfocitos B-220, como puede verificarse en el anexo (tabla 8).

En lo que respecta al parámetro de peso, se obtuvieron diferencias significativas al correlacionarlo con el índice renal, y el índice de glándulas lagrimales.

Las glándulas submaxilares presentaron diferencia significativa al compararlas con las células CD4+.

En lo referente a glándulas lagrimales se obtuvieron diferencias significativas al compararlas con los parámetros de células CD4+, CD8+, y linfocitos B-220.

Por último se llevaron a cabo los pares conformados por linfocitos B-220 y las células CD8+, las cuales también mostraron diferencias significativas, así como el par índice esplénico y las células CD4+.

Posteriormente se llevó a cabo para el parámetro de índice renal, una comparación entre las tres diferentes cepas de ratón CD1, portadores et/+ y ratones pelones et/et, Al realizar la estadística descriptiva, se obtuvieron las medias para cada una de las cepas en estudio, la media más alta fue la obtenida por los ratones et/et, continúa por orden decreciente, la cepa de los ratones portadores et/+ y finalmente la cepa de los ratones CD1 (ver tabla 9).

Consecutivamente se muestra el análisis de varianza (anova), que indica la diferencia significativa de éste parámetro analizado de índice renal. (tabla 10).

Para el análisis de la comparación múltiple con el parámetro de índice renal, se observaron diferencias significativas al comparar las cepas de ratones et/+ (portadores) con las cepas de ratones et/et (pelones) y las cepas de ratones CD1 con las cepas de los ratones et/et, dichas diferencias reflejan el deterioro organoléptico sufrido principalmente por los ratones et/et, en comparación con las otras dos cepas (ver anexo, en la tabla 11).

**16. Comparación de cortes histológicos de glándulas lagrimales y de riñón observados a diferentes objetivos entre ratones CD1, y ratones CD1 et/et.**

**Cortes histológicos de glándulas lagrimales.**

Fig. a)

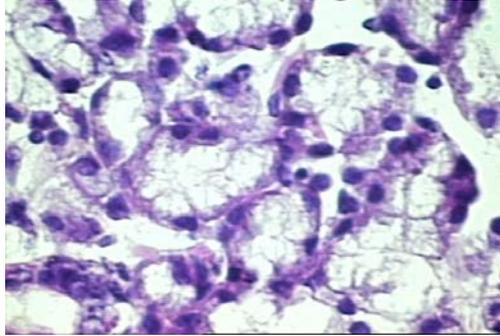


Fig. b)

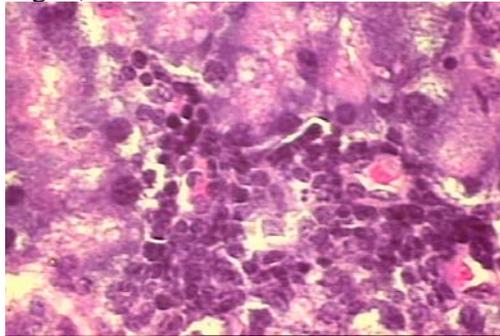


Fig. c)

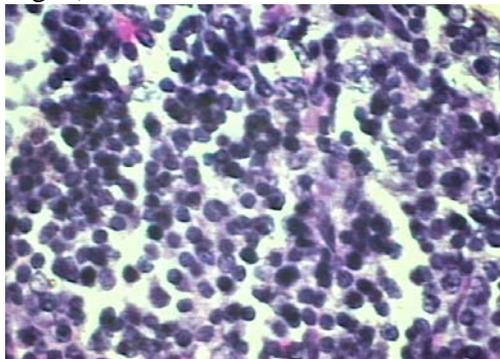
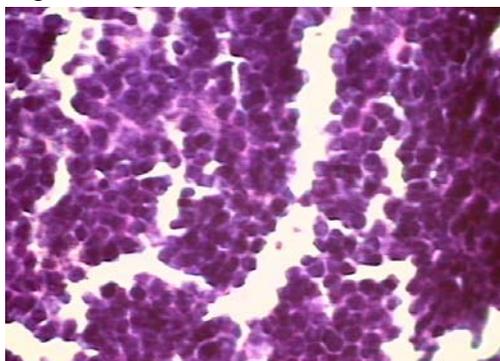


Fig d)



**Cortes histológicos de riñón.**

Fig. 1a)

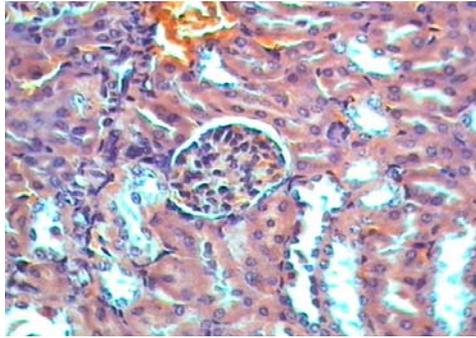


Fig. 1b)

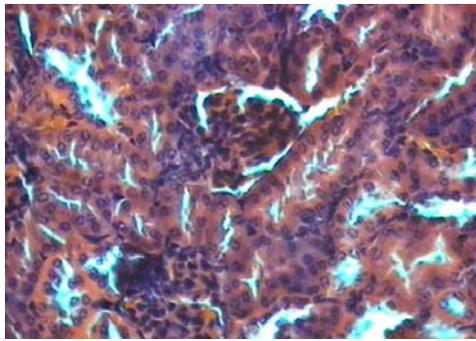


Fig. 1c)

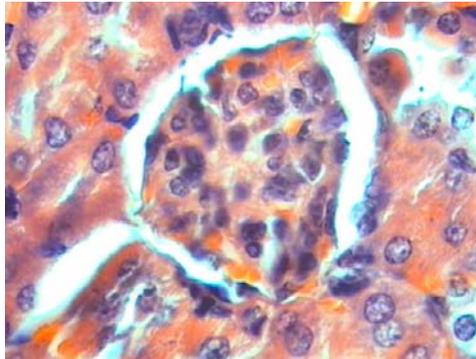
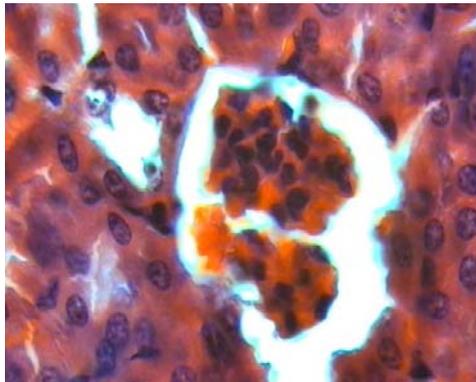


Fig. 1d)



**Figura a).** Corte de glándula lagrimal de un ratón CD1 eutímico +/+(50).

Teñidos con hematoxilina (H) y eosina (E) observados al microscopio a 1000 X. Se distingue adecuadamente la estructura glandular, los acinos bien conformados y delimitados, con una estructura bien definida.

**Figura b).** Corte de glándula lagrimal de ratón et/et, con infiltrado linfocítico.

Teñidos con hematoxilina (H) y eosina (E), observados al microscopio a 1000 X.

Se observa un foco con infiltrado linfocítico, con un contenido aproximado de 50 células linfocitarias por foco.

**Figura c).** Corte de glándula de ratón et/et, con infiltrado celular importante.

Teñido con hematoxilina (H) y eosina (E) observado a 1000X.

Glándula con gran infiltración celular sin apreciación de focos cuantificables, es mayor el tejido atrofiado, con pérdida de estructura.

**Figura d).** Glándula de ratón et/et con infiltración linfocítica abundante.

Teñidos con hematoxilina (H) y eosina (E) observados a 1000 X.

Abundante infiltración linfocítica, se aprecian aglomeraciones de linfocitos en toda la estructura, con atrofia total del tejido, y consecuente pérdida de estructura.

**Figura 1a).** Corte histológico de riñón ratón CD1 +/.

Teñidos con hematoxilina (H) y eosina (E) observado al microscopio a 400 X.

La nefrona que es la unidad anatómica del riñón se muestra bien delimitada, pueden observarse claramente los acinos, los 2 polos; el vascular y urinario, túbulos contorneado distal y proximal bien definidos, así como la cápsula de Bowman en condiciones normales, en general se muestra una estructura bien conformada.

**Figura 1b).** Corte histológico de riñón ratón et/et.

Teñidos con hematoxilina (H) y eosina (E) observados al microscopio a 400 X.

Se observan focos de infiltrado linfocítico en diferentes regiones, como en la cápsula de Bowman, túbulos proximal y distal, con observación difusa de los 2 polos, vascular y urinario, sin pérdida aún total de la estructura del órgano.

**Figura 1c).** Corte histológico de riñón ratón CD1 +/.

Teñidos con hematoxilina (H) y eosina (E) observados a 1000 X.

Como se mencionó anteriormente en la fig. 5, se observa la anatomía normal del riñón, con un enfoque detallado de la estructura acinar que reproduce el funcionamiento normal de ésta estructura.

**Figura 1d).** Corte histológico de riñón ratón et/et.

Teñido con hematoxilina (H) y eosina (E) observados a 1000 X.

Se observa una atrofia en los polos vascular y urinario con una infiltración linfocítica abundante, músculo degenerativo, cápsula de Bowman rota, túbulos proximal y distal con un área invadida por linfocitos, acinos delimitados con infiltrado linfocitario.

## 17. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

De acuerdo a los resultados obtenidos, al realizar la estadística descriptiva<sup>(52)</sup> se muestran las medias de cada grupo utilizado en el tratamiento, estas fueron determinadas por los datos derivados de los índices renales, para corroborar los sucesos ocurridos durante el estudio, se muestra en la tabla que la media de los ratones tratados con la mezcla en el parámetro del índice renal, es la más alta, lo que explica que éstos ratones pudieron haber sufrido edematización, e inflamación, por la presencia de complejos inmunes<sup>(31)</sup>, y los sucesos producidos por la enfermedad, continúa la media de los ratones testigos lo que supone que estos ratones desarrollaron el síndrome, aunque no mostraron reducción en peso y tamaño de dicho órgano, puesto que el riñón al deteriorarse se comprime y se observa necrosis.(ver tabla 1 del anexo).

En el análisis de varianza (ANOVA)<sup>(52)</sup> se detectó una diferencia significativa de 0.025 ( $P < 0.05$ ) en el parámetro de **índice renal**, dato importante para realizar el análisis ya que en base a este resultado se logró verificar el funcionamiento del tratamiento (tabla 2). En lo que respecta a la comparación múltiple se detectó específicamente entre los ratones a los que se les administró **placebo y mezcla** la diferencia significativa mostró un valor de 0.037 ( $P < 0.05$ ). El efecto del tratamiento se verifica con este resultado ya que se evitó la constricción del órgano, aunque el tamaño de los riñones en estos ratones tratados es mayor lo que precisa que presentaron inflamación a consecuencia del progreso de la enfermedad.

En cuanto a los resultados obtenidos en la correlación no paramétrica de Spearman<sup>(52)</sup>, se obtuvieron diferencias significativas en algunos de los parámetros; en el caso de la correlación entre las células apoptóticas, y glándulas lagrimales, no se obtuvo diferencia significativa.

En el binomio de **índice hepático y linfocitos B**, no se observó diferencia significativa.

En la correlación dada entre **índice hepático y las células CD4+**<sup>(41)</sup>, existe una diferencia significativa negativa, que indica que mientras aumenta el índice hepático el número del marcador CD4+ disminuye<sup>(52)</sup>, puesto que las células CD4+, están siendo destruidas, por el efecto del tratamiento<sup>(43,44,45)</sup>. Entonces el hígado continua con sus funciones metabólicas normales, sin que se hallan observado alteraciones importantes, como necrosis, y por lo tanto disfunción hepática.. En relación al binomio **linfocitos B y células necróticas** no existe una diferencia significativa entre ambos parámetros, lo mismo sucede con el par **tratamiento y células apoptóticas**.

En el binomio **tratamiento e índice hepático**<sup>(48,55,56)</sup> se observó una diferencia significativa positiva entre ambos parámetros, lo que indica que mientras continúe el tratamiento el índice hepático aumenta<sup>(52)</sup>, esto podría deberse a que los medicamentos a nivel orgánico generan una disminución en la infiltración celular en el órgano, sin embargo el hígado no mostró daño severo, aunque la inflamación recurrente tiende a ocasionar edematización, el aumento de el índice hepático mostró que los medicamentos controlan la inflamación evitando que los órganos entren en necrosis perdiendo su forma y su tendencia a comprimirse<sup>(54)</sup>, perdiendo con esto su funcionamiento total.

En cuanto al resultado de la correlación de **tratamiento e índice renal** se observó una diferencia significativa positiva<sup>(52)</sup>, lo que significa que el tratamiento influyó para que existiera un aumento en el índice renal, ya que los ratones testigos (sin/tratamiento) presentan en comparación con los ratones tratados una funcionalidad paulatinamente deteriorada, ya sea por que dichos órganos se ven severamente afectados por la infiltración linfocítica<sup>(53,54)</sup> recurrente, a tal grado que los órganos al sufrir un deterioro en su estructura tienden a comprimirse o a hacerse más pequeños y desencadenar problemas tales como la destrucción de la estructura acinar<sup>(56)</sup>, consecuente

destrucción del glomérulo, así como una total disfunción renal con sus implicaciones como regulador de todos los fluidos corporales y la homeostasis<sup>(51,55,56)</sup>. Se demuestra con la comparación anterior entre los ratones tratados y los testigos que al metabolizarse los medicamentos en el hígado, y después excretarse a nivel renal, se notó una mejoría en el funcionamiento endocrino.

En cuanto a la correlación dada entre **tratamiento y edad** no existe una diferencia significativa en ambos parámetros.

Al correlacionar la **edad con el peso**, se obtuvo una diferencia significativa positiva que indica que a mayor edad, el peso de los ratones aumenta, obviamente en el caso de animales sanos<sup>(50)</sup> que no mostraron signos y síntomas de la enfermedad, algunos ratones al inicio del tratamiento, presentaban un peso bajo, que después se iba incrementando, y viceversa algunos de los ratones lucían mayor peso al inicio del tratamiento, el cuál decrecía paulatinamente al transcurrir el mismo, o bien otros presentaron aumento y disminución de peso, o sea altas y bajas súbitas, ya sea por hiporexia o por estrés<sup>(4,15,19)</sup>.

El **índice renal en correlación a las células CD4+**<sup>(3,41)</sup>, mostró una diferencia significativa negativa, que indica que el índice renal aumenta mientras que el porcentaje de células de superficie CD4+ disminuye, lo que indica que dichas células CD4+, están siendo destruidas, al llevarse a cabo la muerte de los linfocitos T, por los medicamentos empleados, lográndose una mejoría a éste nivel, puesto que disminuye la infiltración que como consecuencia destruye a los órganos.

En la correlación de **glándulas submaxilares con células CD8+**, se puede observar una disminución en el número de células CD8 citotóxicas<sup>(40,41)</sup>, al obtenerse un coeficiente de correlación negativo, lo que indica que al existir un aumento en el tamaño de la glándula disminuye el número de células citotóxicas, quizás porque al tratarse con fosfato de cloroquina (aralen)<sup>(6,8)</sup>, las interleucinas 4,5,6,10 y 13(subtipo T<sub>H</sub>1)<sup>(40)</sup>, inhiben la producción de IL-2 (incluso IFN- $\gamma$  y TNF) que a su vez se encargan de aumentar el número de células CD8+ citotóxicas, mostrándose con esta inhibición de células citotóxicas, uno de los efectos producidos por el tratamiento empleado, al reducirse la destrucción acinar<sup>(47)</sup> y estructural de las glándulas, evitando con esto la constricción glandular.

En lo que respecta a la correlación de **índice renal y células apoptóticas**<sup>(35,36)</sup> se obtuvo una diferencia significativa negativa que indica que mientras el índice renal aumenta el número de células apoptóticas disminuye, debido a que el proceso de muerte celular programada se lleva a cabo sin alteraciones que aceleren este proceso normal. (Las correlaciones de Spearman se presentan en la tabla 4 del anexo).

En lo concerniente al **experimento 2.-** se muestra la estadística descriptiva<sup>(52)</sup> de 3 parámetros de los cuales se obtuvieron diferencias significativas, estos son; peso, índice renal y linfocitos B, en esta tabla se denotan las medias para cada uno de los grupos contenidos en el tratamiento, la media más alta es la obtenida con los pesos de los ratones testigos, lo cual indica que estos ratones no se vieron tan afectados por la enfermedad que también no se presenta en todos los animales en estudio, pero que como se observó en el experimento anterior éstos si sufrieron altas y bajas de peso, continúan en media decreciente los ratones tratados con metotrexate, los ratones inoculados con placebo y los que más sufrieron de cambios en el peso fueron los ratones tratados con la mezcla.(tabla 5 del exp.2 del anexo)

En lo referente al índice renal las medias de los ratones testigo, mezcla y metotrexate se muestran muy equivalentes en sus resultados, lo que indica que el tamaño de los órganos de estos animales son comparativamente muy similares, las diferencias en los resultados estriban en cantidades

decimales, que no afectan las diferencias de los grupos, la media de los ratones placebo fue la más baja y se encuentra por debajo de la mitad de los demás grupos, por lo que se deduce que sufrieron una determinada disminución en el tamaño de estos órganos, con lo que se corrobora que la enfermedad conlleva a una disfunción y consecuente destrucción organoléptica reflejada en la reducción de los órganos.(resultados en la tabla 6).

En lo que respecta a las medias obtenidas al estudiar el parámetro de linfocitos B-220, la media más elevada se observó en el grupo de los ratones administrados con metotrexate, estos resultados están basados en lo obtenido en la técnica de citometría de flujo<sup>(40)</sup>, como porcentaje de linfocitos B-220, se deduce que el proceso de proliferación celular, con la infiltración, y la activación de células T cooperadoras para la diferenciación<sup>(40,41)</sup>, y estimulación de células B, aunado a la gamaglobulinopatía recurrente en el síndrome, se localiza más alto en los ratones medicados con metotrexate, ya que con la eliminación de células CD4+, da la impresión de que los linfocitos B disminuyen, aunque esa destrucción celular lo que provoca es que aumente la respuesta humoral.(tabla 6)

Se realizó el análisis de varianza ANOVA<sup>(52)</sup>, obteniéndose diferencias significativas en los parámetros de: **peso, índice renal y linfocitos B 220**. Posteriormente se realizó una prueba entre grupos para analizar el parámetro de **peso**, de los cuales se obtuvo que las diferencias significativas se encontraban específicamente, entre los ratones **testigo y placebo, testigo y metotrexate, testigo y mezcla**, denotándose estas diferencias, ante los resultados obtenidos en los ratones testigos (sin tratamiento) deduciendo que la inoculación por vía oral, causa un grado de estrés<sup>(4,19)</sup> en los animales a los que se les administró tanto medicamento como placebo, comparativamente entre los grupos placebo y metotrexate al inocular agua y el fármaco dio el mismo resultado en los pesos de ambos, y al inocular la mezcla fue más fuerte el grado de estrés sufrido por los ratones, por las dos inoculaciones consecutivas llevadas a cabo, otro factor influyente fue la edad de los ratones testigos que en principio, eran mayores que los utilizados en el tratamiento, y los ratones empleados para este estudio, tenían entre 4 y 6 semanas de edad.

En el caso del **índice renal** en las comparaciones múltiples<sup>(52)</sup>, se obtuvo diferencia significativa entre los grupos **placebo y metotrexate, placebo y mezcla, y entre placebo y testigo**, indicando con esto que los ratones inoculados con placebo, presentaron un daño mayor, que los ratones tratados y los ratones testigos, quizá a consecuencia de factores neuropatológicos y de estrés.

En lo que respecta a la diferencia significativa obtenida en el parámetro de **linfocitos B 220**, esta diferencia está dada entre los grupos a los que se les administró **metotrexate y los ratones testigos**, quizá por la presencia de gamaglobulinopatía, ocurrente en el desarrollo de la enfermedad, marcada con mayor fuerza en los ratones testigos.(estos resultados pueden observarse en la tabla 7 del anexo).

En cuanto a la correlación no paramétrica de Spearman<sup>(52)</sup>, en el binomio conformado por **tratamiento e índice renal**, se detectó una correlación positiva<sup>(52)</sup>, deduciendo que mientras el tratamiento continúe, el índice renal aumenta, esto quiere decir que a medida que transcurre el tiempo con la administración del tratamiento, existe una mejoría a nivel renal, entre los diferentes grupos; puesto que bajo las condiciones del propio síndrome la infiltración linfocítica destruye la arquitectura misma del órgano<sup>(55,56)</sup>, provocando una disfunción paulatina de éstos mismos, encargados de la regulación y el equilibrio de todos los fluidos corporales. Como se observa en la figura n° 6 y 8 del apartado sobre cortes histológicos de riñón, la infiltración linfocítica en éste órgano, y la pérdida constante de la estructura, así como también la pérdida consecuente de las funciones principales<sup>(48,51,54,56)</sup>; tales como: 1) la formación de la orina, 2) la regulación del equilibrio hidroeléctrico, 3) regulación del equilibrio ácido – base, 4) excreción de los productos

de desecho del metabolismo proteico, 5) función hormonal y 6) conservación proteica; se derivan del mal funcionamiento de riñones afectados por el síndrome.

De acuerdo con lo obtenido en relación a la diferencia significativa para este par de parámetros se mencionaba un índice renal aumentado, lo que induce a pensar que el riñón se mantuvo en mejores condiciones durante el transcurso del tratamiento, al no sufrir constricción.

En la correlación conformada por **tratamiento e índice esplénico** no existe diferencia significativa, entre ambos parámetros.

En relación al binomio **tratamiento y linfocitos B**, existe una correlación negativa, lo que implica que el porcentaje de linfocitos B disminuye con respecto al tratamiento, tal vez porque de acuerdo a lo observado, el porcentaje de linfocitos B<sup>(40)</sup> se nivela en número con los marcadores CD4, y por lo tanto hay una disminución en los sucesos inmunológicos por parte de las células T cooperadoras, con la intervención de la inhibición de las células T<sub>H</sub>1<sup>(40)</sup>, principalmente de la IL-2<sup>(6,8)</sup>, para lograr la disminución de linfocitos B, aunque existe el antecedente de que el síndrome resulta en una hiperactividad de los linfocitos B con la consecuente producción de autoanticuerpos y complejos inmunes. Por lo que con este antecedente de hipergamaglobulinemia<sup>(19)</sup>, y ante esta disminución de linfocitos B, se puede precisar el funcionamiento de los medicamentos a nivel orgánico sistémico.

En el par **peso e índice renal** no hay diferencia significativa entre ambos parámetros, en cuanto al binomio **peso y glándula lagrimal** tampoco existe diferencia significativa, lo mismo ocurre con el binomio **glándula submaxilar y células CD4+**, y con los pares **glándula lagrimal y células CD4+**, y **glándula lagrimal y células CD8+**.

En el par **glándula lagrimal y linfocitos B** existe una diferencia significativa positiva<sup>(52)</sup>, que indica que mientras la glándula lagrimal aumenta en proporción (tamaño) el porcentaje de linfocitos B aumenta, esto debido a que la glándula se encuentra inflamada por la infiltración linfocítica recurrente, y los anticuerpos estén tratando de contrarrestar a los autoanticuerpos, y esto se vea reflejado en el porcentaje aumentado de los mismos linfocitos B, aunque para este fin hay una respuesta positiva por parte de los medicamentos ya que experimentalmente una glándula que sufre destrucción por este tipo de enfermedades autoinmunes tiende a presentar compresión física o disminución de tamaño por la afección, así como una disfunción exócrina<sup>(54)</sup>, como se ha mencionado anteriormente.

De acuerdo a los resultados obtenidos del binomio **Linfocitos B y células CD8+**, existe una diferencia significativa positiva que precisa que al aumentar el porcentaje de linfocitos B aumenta el porcentaje de células CD8+<sup>(41)</sup>, esto quizás debido a que al activarse las células T cooperadoras producen linfocinas solubles que pueden regular las actividades de los linfocitos B<sup>(40)</sup>, de los monocitos-macrófagos y de otras células del sistema inmunitario. La célula T coopera para producir la diferenciación de la célula B a través del contacto directo entre los dos tipos de células que da como resultado la estimulación directa de los receptores en las células B y expone a la célula B a grandes concentraciones locales de linfocinas derivadas de T<sub>H</sub><sup>(40)</sup>. En su encuentro inicial con el antígeno las células T cooperadoras producen IL-2, y esta interleucina 2 aumenta la proliferación de células CD8+<sup>(40)</sup>.

En lo que se refiere al binomio **índice esplénico y células CD4+**<sup>(43,44,45)</sup>, se obtuvo una diferencia significativa negativa, lo que explica que mientras aumenta el índice esplénico hay una disminución en el porcentaje de células CD4+, esto debido a que dichas células CD4+, están siendo destruidas por el tratamiento, el bazo filtra la sangre y reacciona inmunológicamente frente a los antígenos transportados en el torrente sanguíneo<sup>(55,56)</sup>, debido a la presencia de autoanticuerpos, linfocitos, y neutrófilos (infiltración linfocítica) presentes en la exocrinopatía, existe una diseminación a nivel sistémico, el bazo<sup>(55)</sup>, es un órgano importante que funciona como

reservorio de linfocitos T y hematíes que terminan de madurar en este sitio, y están preparados para cuando exista el ataque del antígeno. (resultados de la correlación de Spearman, ver tabla 8). De acuerdo a los resultados obtenidos en la comparación de las tres diferentes cepas de ratones, derivadas de los ratones eutéimicos CD1, las cuales se denominan la cepa de ratones CD1, ratón portador et/+ y ratones pelones et/et, se obtuvieron las medias de cada cepa, logradas con los índices renales, lo cual indica que los ratones et/et fueron los que mostraron un mayor tamaño y contenido en peso, demostrando que la inflamación ocasionada por la infiltración linfocítica, originó que sufrieran edematización, y aumento de tamaño, así como un peso mayor por la disfunción, y la consecuente destrucción renal.(como puede observarse en los resultados de la tabla 9 del anexo).

Al comparar a las tres diferentes cepas se obtuvo que existe una diferencia significativa al llevar a cabo las comparaciones múltiples, dichas diferencias están definidas entre la cepa et/et y la cepa et/+, así como también fueron observadas las diferencias significativas entre los ratones CD1 y los ratones et/et, claramente puede demostrarse que los ratones et/et, son los más afectados por las enfermedades de tipo autoinmune ya que carecen de un timo normal, y por lo tanto tienden a ser inmunosuprimidos, y blanco de cualquier microorganismo patógeno que los infecte.

## **18.CONCLUSIONES.**

En base a los resultados obtenidos en la experimentación farmacológica en la que se evaluó a los medicamentos metotrexate y fosfato de cloroquina (Aralen), se encontró que los medicamentos destruyen células citotóxicas CD8+, y marcadores celulares como es al caso de las células CD4+, y controlan la proliferación linfocítica, los objetivos del experimento fueron cumplidos en su totalidad, aunque no se logró prevenir la enfermedad, ni tampoco erradicarla, puesto que los ratones presentaron los síntomas del SS, hasta el fin de su existencia, los hallazgos encontrados fueron los mencionados anteriormente, al atacar a nivel celular el descontrol total de los mecanismos de autoinmunidad, a nivel de órganos, como los analizados en este estudio, se demostró que el tratamiento influyó para que los mismos no perdieran su forma sufriendo constricción, aunque antes de presentar el encogimiento se inflaman, se edematizan y consecuentemente se destruyen hasta llegar a la pérdida de funcionalidad, sin embargo los medicamentos actuaron de manera que se controlara esa inflamación destruyendo a las células encargadas de segregar agentes mediadores de la inflamación.

Los resultados no son tan variables en lo referente a los dos experimentos utilizando diferentes dosis, aunque no existe una erradicación de la enfermedad, el tratamiento desacelera los procesos de proliferación linfocítica, y citotoxicidad celular; a nivel de destrucción glandular no se lograron diferencias con los ratones testigos sin tratamiento, esto se demuestra en los cortes histológicos realizados, la infiltración sigue invadiendo a las glándulas y las destruye, con lo que se concluye que los medicamentos pueden utilizarse para tratar la enfermedad, pero tal vez podría probarse el tratamiento por un mayor tiempo, y con un número mayor de ratones, para probar y demostrar otros efectos que tal vez no fueron visualizados por que fue corto el tiempo para este estudio.

## 20. ANEXO:

Se obtuvieron los siguientes **resultados para el tratamiento 1.**

Tabla 1 Estadística descriptiva , ANOVA de una vía y Comparación múltiple TUKEY HSD.

IND.RENAL

	N	Media	Desv. Std	Error std	Intervalo de confianza 95 % para media.	
					Valores inferiores	Valores superiores
et/et placebo	5	1.2420	.1662	7.432E-02	1.0356	1.4484
metotrexate	3	1.3000	.1127	6.506E-02	1.0201	1.5799
mezcla	3	1.6133	.2146	.1239	1.0804	2.1463
et/et testigo	3	1.5500	9.539E-02	5.508E-02	1.3130	1.7870
Total	14	1.4000	.2157	5.766E-02	1.2754	1.5246

\*Medias obtenidas en promedio a los pesos de cada ratón, con respecto al grupo al que pertenecen ya sea placebo, metotrexate, mezcla y testigos.

	Minimo	Máximo
et/et placebo	1.14	1.53
metotrexate	1.23	1.43
mezcla	1.47	1.86
et/et testigo	1.44	1.61
Total	1.14	1.86

Tabla 2. de ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Media cuadrada	F	Sig.
IND. RENAL					
Entre grupos	.359	3	.120	4.860	.025*
Dentro de los grupos	.246	10	2.461E-.02		
Total	.605	13			

\*Se encontró una diferencia significativa en el parámetro de índice renal con una ( $P < 0.05$ ), en el análisis de varianza.

Tabla 3. Comparaciones múltiples **Tukey HSD.**

Variable dependiente	(I) Trat.	(J) Trat.	Diferencia de medias (I-J)	Error Std.	Sig.
IND. RENAL	et/et placebo	mezcla	-.3713	.1146	.037*
	mezcla	et/et placebo	.3713	.1146	.037*

\*De acuerdo a la comparación entre grupos, y dentro de los grupos se encontró la diferencia significativa entre los ratones a los que se les administró placebo y a los que se les administró mezcla, con una ( $P < 0.05$ ).

Tabla 4. Correlación de Spearman.

			<b>*GLANLAG</b>	<b>CEL.APOP</b>
Spearman	GLANLAG	Coefficiente de correlación Sig. ( 1- cola) N	1.000 14	.033* .455 14
	CEL.APOP	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	.033* .455 14	1.000 14
			<b>*IND.HEP</b>	<b>LINF B220</b>
	IND.HEP	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 14	-.011* .485 14
	LINF B220	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	-.011* .485 14	1.000 14
			<b>IND.HEP</b>	<b>CD4+</b>
Spearman	IND.HEP	Coefficiente de correlación Sig. ( 1- cola) N	1.000 14	-.767 .001* 14
	CD4+	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	-.767 .001* 14	1.000 14
			<b>LINF B220</b>	<b>*CÉL.NECR</b>
	LINF B220	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 14	-.046* .438 14
	CÉL.NECR	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	-.046* .438 14	1.000 14
			<b>*TRAT.</b>	<b>*CEL.APOP</b>
Spearman	TRAT.	Coefficiente de Correlación Sig. ( 1- cola) N	1.000 14	.016* .478 14
	CEL.APOP	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	.016* .478 14	1.000 14
			<b>TRAT.</b>	<b>IND.HEP</b>
	TRAT.	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 14	.718 .002* 14
	IND.HEP	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	.718 .002* 14	1.000 14
			<b>TRAT.</b>	<b>*IND.RENAL</b>
Spearman	TRAT.	Coefficiente de Correlación Sig. ( 1- cola) N	1.000 14	.706 .002* 14
	IND.RENAL	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	.706 .002* 14	1.000 14

\*= indica las diferencias significativas menores a 0.05 obtenidas al realizar la correlación no paramétrica de Spearman, con una (P < 0.05).

\*cel. apop = células apoptóticas. índ. hep = índice hepático. Glan lag = glándula lagrimal. índ. renal = índice renal. Trat = tratamiento.

cél. necr. = células neuróticas.

			TRAT.	EDAD
	TRAT.	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 11	.000* .500 11
	EDAD	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	.000* .500 11	1.000 11
			EDAD	PESO
Spearman	EDAD	Coefficiente de correlación Sig. ( 1- cola) N	1.000 11	.635 .018* 11
	PESO	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	.635 .018* 11	1.000 11
			IND.RENAL	CD4+
	IND.RENAL	Coefficiente de correlación Sig. ( 1- cola) N	1.000 14	-.482 .040* 14
	CD4+	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	-.482 .040* 14	1.000 14
			*GLANDSM	CD8+
Spearman	GLANDSM	Coefficiente de correlación Sig. ( 1- cola) N	1.000 14	-.638 .007* 14
	CD8+	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	-.638 .007* 14	1.000 14
			IND.RENAL	CEL.APOP
	IND.RENAL	Coefficiente de correlación Sig. ( 1- cola) N	1.000 14	-.522 .028* 14
	CEL.APOP.	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	-.522 .028* 14	1.000 14

\*Diferencias significativas con una ( $P < 0.05$ ), al obtener los resultados con la correlación no paramétrica de Spearman, realizando combinaciones de 2 parámetros, de acuerdo a los resultados obtenidos tanto de peso, índices organolépticos, índices glandulares y citometría de flujo de las células involucradas en el estudio.

\*Glandsm = glándula submaxilar

## Resultados para el tratamiento 2.

Tabla 5. Estadística descriptiva , ANOVA de una vía y Comparación múltiple TUKEY HSD.

### PESO

	N	Media	Desv. Std	Error std	Intervalo de confianza 95 % para media.	
					Valores inferiores	Valores superiores
et/et placebo	5	28.0800	2.5371	1.1346	24.9297	31.2303
metotrexate	7	28.5286	1.4396	.5441	27.1972	29.8600
mezcla	5	26.7800	2.3328	1.0433	23.8834	29.6766
et/et testigo	3	35.0333	4.6544	2.6872	23.4712	46.5955
Total	20	28.9550	3.5753	.7995	27.2817	30.6283

\*Medias obtenidas en promedio a los pesos de cada ratón, con respecto al grupo al que pertenecen ya sea placebo, metotrexate, mezcla y testigos.

	Minimo	Máximo
et/et placebo	25.30	32.20
metotrexate	26.20	30.70
mezcla	24.00	30.00
et/et testigo	30.50	39.80
Total	24.00	39.80

### IND.RENAL

	N	Media	Desv. Std	Error std	Intervalo de confianza 95 % para media.	
					Valores inferiores	Valores superiores
et/et placebo	5	6.5800	.5450	.2437	5.9033	7.2567
metotrexate	7	14.0286	.6370	.2407	13.4395	14.6177
mezcla	5	14.8200	1.4096	.6304	13.0697	16.5703
et/et testigo	3	14.4667	1.7786	1.0269	10.0484	18.8849
Total	20	12.4300	3.6121	.8077	10.7395	14.1205

\*Medias obtenidas a partir de los índices renales pertenecientes a los diferentes grupos en estudio.

	Minimo	Máximo
Et/et placebo	5.80	7.30
metotrexate	13.20	15.10
mezcla	13.10	16.70
et/et testigo	13.20	16.50
Total	5.80	16.70

LINFB220

	N	Media	Desv. Std	Error std	Intervalo de confianza 95 % para media.	
					Valores inferiores	Valores superiores
et/et placebo	5	41.9260	4.6151	2.0639	36.1956	47.6564
metotrexate	7	46.0829	7.7663	2.9354	38.9003	53.2655
mezcla	5	37.2820	7.6863	3.4374	27.7382	46.8258
et/et testigo	3	28.6533	3.6459	2.1049	19.5965	37.7101
Total	20	40.2290	8.6136	1.9260	36.1977	44.2603

\*Medias obtenidas de los resultados obtenidos en la citometría de flujo realizada para obtener los valores de linfocitos B-220 pertenecientes a cada grupo en específico.

	Minimo	Máximo
et/et placebo	35.19	47.04
metotrexate	35.68	56.32
mezcla	28.68	46.89
et/et testigo	24.55	31.52
Total	24.55	56.32

Tabla 6. de ANOVA.

	Suma de cuadrados	df	Media cuadrada	F	Sig.
PESO					
Entre grupos	139.593	3	46.531	7.209	0.003*
Dentro de los grupos	103.277	16	6.455		
Total					
IND.RENAL					
Entre grupos	230.005	3	76.668	68.542	0.000*
Dentro de los grupos	17.897	16	1.119		
Total					
LINFB220					
Entre grupos	699.685	3	233.228	5.256	0.010*
Dentro de los grupos	709.987	16	44.374		
Total					

\*Se obtuvieron las siguientes diferencias Correlaciones entre grupos por análisis de varianza ANOVA con una (P<0.05) en los parámetros de peso, índice renal, y linfocitos B 220.

Tabla 7. Correlaciones múltiples **Tukey HSD**.

Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error Std.	Sig.
	(I) Trat.	(J) Trat.			
PESO	et/et placebo	testigo	-6.9533	1.8554	.009*
	metotrexate	testigo	-6.5048	1.7532	.009*
	mezcla	testigo	-8.2533	1.8554	.002*
IND.RENAL	et/et placebo	metotrexate	-7.4486	.6193	.000*
	et/et placebo	mezcla	-8.2400	.6689	.000*
	et/et placebo	testigo	-7.8867	.7724	.000*
LINF.B220	metotrexate	testigo	17.4295	4.5968	.008*

\*Diferencias significativas obtenidas con una ( $P < 0.05$ ) en los parámetros de peso, índice renal, y linfocitos B 220, Correlación entre los grupos resultantes.

Tabla 8. Correlación de **Spearman**.

			TRAT.	IND.RENAL
Spearman	TRAT.	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	1.000 20	.634 .001* 20
	IND.RENAL	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	.634 .001* 20	1.000 20
			TRAT.	*IND.ESPLÉ
	TRAT.	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 20	-.005* .492 20
	IND.ESPLÉ	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	-.005* .492 20	1.000 20
			TRAT.	*LINF.B220
Spearman	TRAT.	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	1.000 20	-.546 .006* 20
	LINF.B 220	Coefficiente de correlación Sig. (1- cola) N	-.546 .006* 20	1.000 20
			PESO	IND.RENAL
	PESO	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 20	.031* .449 20
	IND.RENAL	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	.031* .449 20	1.000 20
			PESO	GLAND LAG
Spearman	PESO	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 20	-.027* .454 20
	GLAND LAG	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	-.027* .454 20	1.000 20
			GLAND SM	CD4+
	GLANDSM	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 20	-.027* .455 20
	CD4	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	-.027* .455 20	1.000 20
			GLAND LAG	CD4+
Spearman	GLAND LAG	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 20	-.029* .452 20
	CD4	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	-.029* .452 20	1.000 20

\*Diferencias significativas resultantes al realizar la correlación no paramétrica de Spearman, con una ( $P < 0.05$ ), en las combinaciones relacionadas en pares ó binomios.

\*Ind. esplé = índice esplénico (de bazo). Linf. B 220 = linfocitos B-220 reactivo utilizado en citometría de flujo.

			GLANDLAG	CD8+
	GLAND LAG	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 20	.005* .492 20
	CD8	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	.005* .492 20	1.000 20
			GLANDLAG	LINF B220
Spearman	GLAND LAG	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 20	.481 .016* 20
	LINF B220	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	.481 .016* 20	1.000 20
			LINF B220	CD8+
	LINF B220	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 20	.436 .027* 20
	CD8	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	.436 .027* 20	1.000 20
			IND.ESPLÉ	CD4+
Spearman	IND.ESPLÉ	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	1.000 20	-.594 .003* 20
	CD4	Coefficiente de correlación Sig. (1-cola) N	-.594 .003* 20	1.000 20

\*Diferencias significativas con una ( $P < 0.05$ ), al obtener los resultados con la correlación no paramétrica de Spearman, realizando combinaciones de 2 parámetros, de acuerdo a los resultados obtenidos tanto de peso, índices organolépticos, índices glandulares y citometría de flujo de las células involucradas en el estudio

**Resultados estadísticos obtenidos de la comparación entre las diferentes cepas de ratones CD1, et/+, y et/et.**

Tabla 9. Estadística descriptiva, ANOVA de una vía y Comparación múltiple Tukey HSD.

**ÍNDICE RENAL**

	N	Media	Desv. Std	Error std	Intervalo de confianza 95 % para media.	
					Valores inferiores	Valores superiores
et/et	15	1.29553	.10984	2.0639	1.23470	1.35636
et/+	19	1.13622	9.9918E-02	2.9354	1.08806	1.18437
CD1	17	1.07976	2.757E-02	3.4374	1.02131	1.13822
Total	51	1.16426	1.930E-02	1.9260	1.12548	1.20303

Medias obtenidas después de promediar los índices renales, de cada una de las cepas en estudio.

	Minimo	Máximo
et/et	1.076	1.489
et/+	.906	1.351
CD1	.879	1.303
Total	.879	1.489

Tabla 10. ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Media cuadrada	F	Sig.
IND.REN Entre grupos	.395	2	.197	17.059	0.000*
Dentro de los grupos	.555	48	1.157E-02		
Total	.950	50			

\*Se observó una significancia entre grupos en el índice renal con una ( $P < 0.05$ ) en el análisis de varianza ANOVA.

Tabla 11. Comparaciones múltiples **Tukey HSD**.

Variable dependiente: IND. RENAL

Variable dependiente (I) CEPA (J)CEPA	Diferencia de medias (I-J)	Error Std.	Sig.	Intervalo de confianza 95% para media	
				Valores inferiores	Valores superiores
et/et	.15932*	3.715E-02	.000*	6.9459E-02	.24918
et/+	.21577*	3.811E-02	.000*	.12361	.30793
CD1					
et/+ et/et	-.15932*	3.715E-02	.000*	-.24918	-6.94588E-02
CD1	5.6451E-02	3.591E-02	.268	-3.04036E-02	.14331
CD1 et/et	-.21577*	3.811E-02	.000*	-.30793	-.12361
et/+ et/+	-5.6451E-02	3.591E-02	.268	-.14331	3.0404E-02

\*Diferencias significativas entre las diferentes cepas con una ( $P < 0.05$ ) en la comparación entre grupos empleando Tukey HSD, para índice renal.

## **20.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:**

### **PBS amortiguador de fosfatos pH = 7.4**

Para 1L.

NaCl-----	8.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	0.2 g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O-----	2.9 g
KCl-----	0.2 g

Se pesaron las cantidades especificadas anteriormente para la preparación de un litro de solución, y se aforaron en un litro de agua bidestilada.

### **Formalina en PBS al 10 %.**

El PBS se prepara en la misma forma que la ya escrita anteriormente, añadiendo la formalina que como reactivo analítico se encuentra a una concentración de 37 %, haciendo los cálculos necesarios para obtener la solución al 10 % con una cantidad de 27 mL de formalina y 73 mL de PBS, para obtener 100 mL de solución.

### **Solución de BOUIN.**

El fijador de Bouin es un fijador basado en ácido pícrico, usado en procedimientos de fijación, para estudios embrionicos y de piel así como histopatológicos, debido a su excelente preservación del núcleo y cromosomas, también es altamente compatible con la tinción de tricromo debido a su efecto mordente en el tejido.

Preparación:

Solución para preparar 100 mL de fijador de Bouin.

- Se hace una soln. saturada de ácido pícrico con 75 mL de agua destilada.
- Formol al 37 - 40 % se usaron 25 mL.
- ácido acético glacial 5 mL.

### **Preparación de Aralen y metotrexate.**

Se preparó fosfato de cloroquina adicionando 28.56 mg a una dilución 1:10 y 1:100 obtenidos de una tableta molida en un mortero hasta convertirla en un polvo fino y ésta se aforó en 50 mL de agua destilada.

Para la preparación del metotrexate se pesaron 17.85 mg del mismo y se aforaron en 50 mL de agua destilada de ésta solución se tomó un mL y se realizó una dilución 1:10 y 1:100 obteniéndose una concentración de 0.0035 mg / mL.

## GLOSARIO

**Síndrome de Sjögren:** Enfermedad autoinmune de causa desconocida, caracterizada por la infiltración linfocítica de glándulas lagrimales y salivales, síntomas sicca referentes a la sequedad bucal (xerostomia) y ocular (xeroftalmia), así como también sequedad de otras mucosas tales como la faríngea y la vaginal.

**Marcador de superficie CD4+:** células cooperadoras que están restringidas por las moléculas de clase II del MHC, puesto que estas células CD4+ se unen a las moléculas de clase II, la mayoría son células cooperadoras, aunque también existen LTC (linfocitos T citotóxicos) CD4+, (de nuevo restringidos por la clase II del MHC).

**Marcador de superficie CD8+:** glucoproteínas de la superficie de la célula T que se expresan en subgrupos con diferentes patrones de restricción por el MHC, moléculas accesorias que facilitan las interacciones de las células T con las APC (células presentadoras de antígeno) y de las células diana con los LTC.

**Dermatomiositis:** enfermedad de origen desconocido que ataca a la piel y a los músculos estriados.

**Esclerodermia:** enfermedad de las fibras colágenas de la dermis, que endurece la piel y reduce su flexibilidad y movilidad.

**Esclerosis:** endurecimiento patológico de un tejido o un órgano debido al aumento anormal y progresivo de células de tejido conjuntivo que forman su estructura.

**Esclerosis múltiple:** enfermedad crónica del sistema nervioso que provoca trastornos sensoriales y motores (marcha inestable, movimientos poco firmes, temblores, alteración en la pronunciación).

**Exocrinopatía:** patología que afecta principalmente a las glándulas exócrinas.

**Oligoartritis:** reumatismo propio de una región articular.

**Plasmaféresis:** acción de separar el plasma de los glóbulos rojos de la sangre.

**Poliartritis:** reumatismo simultáneo o sucesivo en varias articulaciones.

**Artralgias:** dolor en articulaciones.

**Mialgias:** dolores musculares.

**Linfoma:** tumor maligno desarrollado en los ganglios linfáticos.

## ABREVIATURAS.

**SS:** síndrome de Sjögren.

**SSp:** Siglas que se refieren al denominado síndrome de Sjögren primario, que se caracteriza por los síntomas sicca, y que está asociado a ciertas manifestaciones sistémicas, que pueden afectar a diversos órganos como el hígado, riñones, pulmones, y cerebro.

**SSs:** Siglas que denominan al síndrome de Sjögren secundario, caracterizado por los síntomas de sequedad ocular, bucal (síntomas sicca), vaginal y de mucosas, y que está asociado a otras enfermedades como: artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, o dermatomiositis.

**Ig:** Inmunoglobulina presente en la superficie de los linfocitos, en su mayoría son receptoras de reconocimiento del antígeno, existen tres categorías de receptores; las Ig de membrana, los receptores para el complemento, y los receptores para el fragmento Fc de las IgG.

**IFN- $\gamma$ :** citocina activadora de macrófagos, e inductora de la formación de óxido nítrico sintetasa y de otras enzimas metabólicas que aumentan la actividad microbicida.

**Células T<sub>H</sub>:** células vírgenes que al activarse dan origen a células T efectoras y productoras de un conjunto considerable de linfocinas.

**Células T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub>:** células efectoras T<sub>H</sub> maduras pertenecientes a 1 de 2 subgrupos distintos, los cuales se diferencian por las linfocinas particulares que producen.

**IgM e IgG:** inmunoglobulinas presentes en la superficie de los linfocitos B, una de sus funciones específicas es la de actuar como anticuerpos en la respuesta humoral.

**LTC:** linfocito T citotóxico.

## 19.BIBLIOGRAFÍA

1. Akizuki, M, M.J. Boehm-Tritt, S.S. Kasson, A.D. Steinberg and T.M. Chused, 1977, J. Immunology. 119,932.
2. Alspaugh, M.A. N. Talal and E.M. Tan, 1976, Arthritis Rheum. 19; 216.
3. Helen Chapel, Meusen Haeney; Inmunología clínica. Editorial Manual moderno S.A. México D.F. 1989. pp. 238 – 249.
4. Dr. Osvaldo Hubscher; jefe de la unidad de reumatología CEMIC Buenos Aires; El síndrome de Sjogren ya no es considerado una rareza médica. Asociación Síndrome Sjogren, Argentina.
5. Wesley G. Clark, D. Craig Brater, Alice R. Johnson; Farmacología clínica; 12ª edición. Editorial médica panamericana. México D.F. 1990. pp. 558-561.
6. Tishler, Moshe; Yaron, Ilana; Shirazi, Idrit; Yaron, Michael. Hydroxychloroquine treatment for primary Sjogren's syndrome: its effect on salivary and serum inflammatory markers. (An Rheum Dis 1999;58:253-256).
7. Skopouli FN, Fox PC, Galanopoulou V, Atkinson JC, Jaffa ES, Moutsopoulos HM. T-cell subpopulation in labial minor salivary gland histopathologic lesion of Sjogren's syndrome. J Rheumatol 1991;18:210-14.
8. Grisius M, Bermudez D, Fox PC. Salivary and serum interleukin-6 in Sjogren's syndrome. J Rheumatol 1997;24:1089-91.
9. Vademecum farmacéutico; Información Especializada, S.A de C.V. 47ª Edición, 200. pp 375-376 y 1372-1374.
10. Susan Budavari; The merck index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and Biologicals. Merck and Co. Inc. 1996. pag. 2220.
11. Fox RI, Dixon R, Guarrasi V, Krubel S. Treatment of primary Sjögren's syndrome with hydroxychloroquine: A retrospective, open-label study. Lupus 1996;5 Suppl 1:S31-6.
12. Cyclosporine therapy suppresses ocular and lacrimal gland disease in MRL/Mp-Ipr/Ipr mice. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 37(2):377-83,1996 Feb.
13. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of cevimeline in Sjogren's syndrome patients whit xerostomia and keratoconjunctivitis sicca. Arthritis and Rheumatism. 46(3):748-54,2002 Mar.
14. Reddy, R., D. Henning, E.M. Tan and H. Busch, 1983, J. Biol. Chem. 258, 8352.
15. Manoussakis MN, Talal N, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome. En Rose NR, Nackay IR (Editores): The autoimmune diseases. Third edition. San Diego, California. Academic press, 1998; 381-404.
16. Fox R.I., Konttinen Y., Fisher A. Use of muscarinic agonists in the tratment of Sjogren's syndrome. Clinical Immunology 101(3): 249-63, 2001 Dec.
17. Constantopoulos SH, Papadimitrio CS, Moutsopoulos HM. Respiratory manifestations in primary Sjogren's syndrome. Chest 1985; 88: 226-229.
18. Alspaugh, M.A., N. Talal and E.M. Tan, 1976, Arthritis Rheum. 19, 216.
19. Cañas C, Jiménez C, Restrepo JF, Rondón F, Peña M, Sánchez A, Iglesias A. Síndrome de Sjögren primario (estudio prospectivo para conocer las características clínicas en nuestro medio) Rev. Col Reum 1997;4:126-130.
20. Anaya JM, Correa PA, Mantilla RD. Síndrome de Sjögren primario. Características clínicas e inmunogenéticas. Acta Med Col 1999;24:127-136.
21. Leroy JP, Dorsos AA, Yannopoulos D, Youinou P, Moutsopoulos HM. Intravenous pulse cyclophosphamide therapy in myositis and Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1990;33:1579-1581.

22. Anaya JM, Talal N. Sjögren's síndrome and connective tissue diseases associated with other immunologic disorders. En Koopman WJ (Editor): Spondylitis and allied conditions. 13<sup>th</sup> Edition Baltimore, William & Wilkins, 1997;1561-1580.
23. Cain HC, Noble PW, Matthay RA. Pulmonary manifestations of Sjögren's syndrome. Chest 1976;70:354-361.
24. Constantopoulos, SH, Papadimitriou CS, Moutsopoulos HM. Respiratory manifestations in primary Sjögren's syndrome. Chest 1985;88:226-229.
25. Moutsopoulos HM, Webber BL, Vlagopoulos TP, et al: Differences in the clinical manifestations of sicca syndrome in the presence and absence of rheumatoid arthritis. Am J Med 66:733-736,1979.
26. Alsbaugh MA, Talal N, Tan EM: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 19:216-222, 1976.
27. Akizuki M, Powers R Jr, Holman HR: A soluble acidic protein of the cell nucleus which reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. J Clin Invest 59:264-272, 1979.
28. Chused TM, Kassan SS, Opelz G, et al: Sjögren's syndrome associated with HLA-Dw3. N Engl J Med 296:895-897, 1977.
29. Sjögren H. Keratoconjunctivitis sicca. Hygiea (Stockholm) 1930;92:829.
30. Manthorpe R, Prause JU (Eds): Proceedings of the first International seminar on Sjögren's syndrome 1986. Scand J Rheumatol 1986;61 Suppl:1-291.
31. Konishi M, Ohosone Y, Matsumura M, Oyamada Y, Yamaguchi K, Kawahara Y, et al. Mixed cryoglobulinemia associated with cutaneous vasculitis and pulmonary symptoms. Intern Med 1997;36:62-7.
32. Navarro M, Cervera R, Font J, Reverter JC, Monteagudo J, Escolar G, et al. Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases: Prevalence and clinical significance. Lupus 1997;6:521-6.
33. Zhang G, V. Gurtu, S. R. Kain and G. Yan. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescence conjugate of annexin V. BioTechniques 23:525-531.
34. Li Zhu and Jerold Chun. Apoptosis Detection and Assay Methods. 1998, BioTechniques Books, Natick, MA. Eaton Publishing. Lab. Manual.
35. Ernesto Alfaro Moreno, Claudia García Cuellar, Alfonso Dueñas González. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Revista del Instituto Nacional de Cancerología. Vol.46, Núm. 4. Octubre-Diciembre 2000. pp 275-280.
36. Schwartzman R, Cidlowski A. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Rev. 1993;14:133-51.
37. Evan G, Littlewood T. A matter to life and cell death. Science 1998; 281: 1317-22.
38. Van Engeland M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. Cytometry 1996; 24: 131-39.
39. Wals GM, Dewson G, Wardlaw AJ, Levi-Schaffer F, Moqbel R. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. J Immunol Methods 1998; 217: 153-63.
40. Tristram G. Parslow, Daniel P. Stites, Abba I. Terr, John B. Imboden; Inmunología básica y clínica. Edit. Manual moderno. 10<sup>a</sup>. Edición. Año 2002; pags: 156-175, 269-278, 486-493.
41. Abul K. Abbas, Andrew H. Litchman, Jordan S. Pober. Inmunología celular y molecular. Editorial Americana McGraw-Hill. 2<sup>a</sup>. Edición. Año 1995. pags: 128-137, 148-49, 166-169, 179-181.

42. Alfred Goodman Gilman, Theodore W. Rall, Alan S. Nies, Palmer Taylor. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª edición. Editorial médica panamericana. México D.F. Año 1991. pags:956-959.
43. G. Henriksson, R. Manthorpe and A. Bredberg. Antibodies to CD4 in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 2000;39:142-147.
44. Kirtava Z, Blomberg J, Bredberg A, Henriksson G, Jacobsson L, Manthorpe R. CD4+ T-lymphocytopenia without HIV infection: increased prevalence among patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:609-16.
45. Laurence J. T-cell subsets in health, infectious disease, and idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. *Ann Intern Med* 1993;119:55-62.
46. Venables PJW, Rigby SP. Viruses in the etiopathogenesis of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1997;24 (50 Suppl). 3-5.
47. Robert K. Murray, MD. PhD Daryl K. Granner y cols. Bioquímica de Harper. Edit. Manual moderno S.A de C.V. México D.F. 1994. pags:729-742.
48. Michael H. Ross, Ph.D. Lynn J Romrell, Ph.D Gordon I. Kaye, Ph.D. Histología texto y atlas color. Edit. Médica Panamericana. 3ª. Edición. México D.F. 1997; págs: 104-113.
49. Jean Francois Bach. Inmunología; Edit. Limusa S.A de C.V. México D.F. 1984; 1ª. Edición; págs:154-310.
50. Banks, W.J. Histología Veterinaria Aplicada. Edit. El manual moderno. México. 1996: 33-66.
51. Boya V.J. Atlas de histología y organografía microscópica. Edit. Interamericana. España, 1996: 255-256, 262-263.
52. Magdalena Ferrán Aranaz, SPSS para Windows programación y análisis estadístico. Edit. McGraw-Hill. Interamericana. España, 1996. pp:95-120, 162-163.
53. Jinich H. Tratado de medicina interna. México: Manual moderno, 1987.
54. Kaplan L y Pesce A. Química clínica , teoría, análisis y correlación. Buenos Aires- México: Médica Panamericana, 1986.
55. L.C. Junqueira, J. Carneiro. Histología básica; Edit. Salvat. 3ª. Edición. México D.F. 1991; págs: 339-367.
56. Arthur C. Guyton; Tratado de fisiología médica. Edit. Interamericana McGraw-Hill España 1996. pags: 491-495.
57. Janssen Research Foundation Series. Toxicology and reference data-Wistar rat. Amsterdam: Elsevier/NorthHolland Biomedical Press;1981.
58. Haralampos M. Moutsopoulos, M.D., Dean L. Mann, M.D., Armead H. Johnson, PH.D., and Thomas M. Chused, M.D. Genetic differences between primary and secondary sicca syndrome. *Medical intelligence*. 1979 vol. 301. No. 14: 761-763.
59. Yoko Ogawa, Masataka Kuwana, Kazuto Yamazaki, Yukihiro Mashima, Masakazu Yamada, Takehiro Mori, Shinichiro Okamoto, Yoshihisa Oguchi, and Yutaka Kawakami. Periductal area as the primary site for T-cell activation in lacrimal gland chronic graft-versus-host disease. *IOVS*, May 2003, Vol. 44, No. 5. pp: 1898-1896.
60. Ogawa Y, Okamoto S. Kuwana M, et al. Successful treatment of severe dry eye associated with chronic graft-versus-host disease with systemic administration of FK506 and corticosteroid. *Cornea*. 2001; 20: 430-434.
61. Parkman R. Clonal analysis of murine graft-vs-host disease. I. Phenotypic and functional analysis of T lymphocyte clones. *J Immunol*. 1986;136:3543-3548.
62. Enestrom S, Denneberg T, Eriksson P. Histopathology of renal biopsies with correlation to clinical findings in primary Sjögren's syndrome. *Clinical Exp Rheumatol* 1995; 13: 697-703.

63. Dussol B., Tsimaratos M, Crescentic glomerulonephritis and primary Gougerot-Sjögren syndrome. *Nephrologie* 1994; 15: 295-298.
64. Serge D. Steinfeld, MD,PhD., Thierry Appelboom, MD,PhD., Christine Delporte, PhD., 2-chloro-2'-deoxyadenosine in the treatment of Sjögren's syndrome-associated B cell lymphoproliferation. *Arthritis and rheumatism*. Vol. 46; No.8, August 2002, pp 2248-2251.
65. Serge D. Steinfeld, Paul Demols, and Thierry Appelboom. Infliximab in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis and Rheumatism*. Vol. 46; No.12, December 2002, pp: 3301-3303.