



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

Correlación entre nitritos, ceruloplasmina y complemento
en un modelo de ratones

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

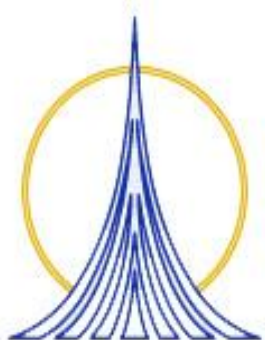
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MORENO GONZÁLEZ LUCIA

DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

ASESOR: MC. MAURILIO FLORES PIMENTEL



MÉXICO D.F., 2013.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna MORENO GONZÁLEZ LUCIA con número de cuenta 303104450 de la carrera de Q. F. B. se le ha fijado el día 10 del mes de Junio de 2013 a las 09:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE DR. JOSÉ LUIS A. MORA GUEVARA
VOCAL DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
SECRETARIO M. C. MAURILIO FLORES PIMENTEL
SUPLENTE M. en C. ARACELI GARCÍA DEL VALLE
SUPLENTE DRA. MA. ISABEL SOTO CRUZ

Handwritten signatures of the jury members on a set of lines.

El título de la tesis que se presenta es : Correlación entre nitritos, Ceruloplasmina y complemento en un modelo biológico de ratones

Opción de titulación: Tesis Experimental

ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU" México, D.F. a, 17 de Junio de 2013.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ DIRECTOR DIRECCION DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

DEDICATORIAS:

A ti omnipresente por la fortuna de disfrutar cada día, por levantarme en los momentos más difíciles y por darme la oportunidad de superarme día a día.

A mis padres:

Mario Moreno Gutiérrez y Verónica González Piña:

Por ser los padres protectores y ejemplos que me guían para demostrarme que trabajando con esfuerzo y amor se logra propuesto, pero sobre todo por la confianza depositada en mí.

A mis abuelos:

Norberto González Cruz y Consuelo Piña Moreno:

Por brindarme todo el apoyo, confianza y ese amor consentidor, a lo igual, el ejemplo de que con esfuerzo y dedicación se llega hasta donde se quiere.

A mis hermanos:

Mario y Alejandro

Hermanos he aquí un ejemplo de que se pueden cumplir los sueños, aspiraciones e ilusiones, con esfuerzo, amor pero sobre todo con persistencia, las metas se logran cumplir.

Hugo Rojas y Catalina Jesús:

Son un claro ejemplo que para ser familia no es necesario tener la misma sangre ni los mismos genes, a ustedes por ser los hermanos mayores dispuestos a ayudar y a apoyar, por ese cariño inmenso y la confianza depositada.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM:

Por brindarme la oportunidad de pertenecer a la máxima casa de estudios

A mi director de tesis Dr. Rubén Marroquín Segura: Por brindarme la confianza para depositar un trabajo en mis manos así como la paciencia pero sobre todo por siempre mostrar una sonrisa y disposición para guiarme en esta investigación.

A mi asesor M.C Maurilio Flores Pimentel: Por el apoyo así como el tiempo brindado para la elaboración y desarrollo de esta investigación

A mi sinodal Dr. José Alfredo Mora: Por siempre mostrar disponibilidad para la resolución de dudas y compartir sus conocimientos.

A mis sinodales M en C. Araceli García, Dr. Ma. Isabel Soto: Por el tiempo empleado para las revisiones en la mejora del presente trabajo.

A mis amigos Fátima, Tania, Ángel, Edgar, Sofía, Italia, Gerardo, Lulú, Lalo, Claudia, Rodrigo Víctor, Yazmin, Abel, Anel, Karina por la confianza, el cariño así como el apoyo y todas las aventuras y diversiones.

A Luis por ser ese brillo radiante que le da a mi existencia día a día con su compañía y amor.

IMPOSIBLE es solo una palabra que usan los hombres débiles para vivir fácilmente en el mundo que se les dio, sin atreverse a explorar el poder que tienen para cambiarlo. Imposible no es un hecho, es una opinión. Imposible no es una declaración, es un reto. Imposible es potencial. Imposible es temporal. Imposible es **NADA**.

CONTENIDO:

Resumen.....	1
1. Introducción	2
2. Marco teórico.....	4
2.1 Inmunidad.....	4
2.1.1 Diferencias entre inmunidad innata y adaptativa.....	4
2.1.2 Mecanismo de la respuesta inmune natural.....	5
2.2 Autoinmunidad	5
2.3 Síndrome de Sjögren	6
2.3.1 Características clínicas.....	6
2.3.2 Genética en SS.....	7
2.3.3 Epidemiología	8
2.3.4 Diagnostico.....	8
2.4 Inflamación	9
2.4.1 Mediadores proinflamatorios.....	10
2.5 Ceruloplasmina.....	10
2.6 Oxido nítrico.....	11
2.7 Sistema Complemento.....	12
2.7.1 Funciones del complemento.....	12
2.7.2 Componentes del complemento.....	13
2.7.3 Activación del complemento.....	13
2.7.4 La vía clásica.....	14
2.7.5 La vía alterna.....	15
2.7.6 La vía de la lectina.....	16
2.7.7 Complejo de ataque a la membrana.....	16
2.8 Regulación del sistema complemento.....	18

[Escribir el título del documento]

2.9 Consecuencias biológicas de la activación del complemento.....	20
2.9.1 Los productos de escisión de componentes del complemento median la inflamación.....	20
2.9.2 La unión de C3b y C4b facilita la opsonización.....	21
2.10 El riñón y sus funciones.....	21
3. Modelo experimental	24
4. Planteamiento del problema.....	25
5. Objetivos.....	25
6. Hipótesis.....	25
7. Diseño experimental.....	26
8. Diagrama de flujo.....	28
9. Material, reactivos y equipo.....	29
10. Métodos.....	31
11. Resultados.....	35
12. Análisis de resultados.....	43
13. Conclusiones.....	45
14. Referencias.....	46

1. RESUMEN

Las enfermedades autoinmunes son crónicas e incurables, su impacto social, morbilidad y mortalidad es enorme deteriorando la calidad de vida de los pacientes, afectando de un 3 a un 5% de la población general. Para el presente trabajo se realizó un estudio observacional, transversal, prospectivo, con una población de 214 ratones de tres tipos: et/et, et/+ y CD1 los cuales se clasificaron en dos grupos, jóvenes y viejos con la finalidad de comparar si los ratones et/et presentan deficiencias ocasionadas por la presencia de autoanticuerpos relacionadas con el SS, con los ratones CD1 y et/+. Se determinaron los niveles de nitritos mediante el método de Griess, ceruloplasmina por el método de Mancini, se determinó la presencia de lesiones oculares, así mismo se llevó a cabo la determinación de complemento mediante el porcentaje de actividad lítica. Los resultados muestran la asociación con la activación de la cascada de complemento por la vía clásica y la vía alterna. No obteniendo resultados esperados en cuanto a la determinación de ceruloplasmina y nitritos. Por lo tanto se concluye que se presenta un consumo de las unidades de complemento por la activación de ambas vías, asociado con las lesiones oculares presentadas en la población de los ratones et/et. Indicando la predisposición genética que existe en los ratones et/et con la presencia de autoanticuerpos que activan la cascada de complemento.

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune sistémica de evolución crónica, que consiste en una infiltración linfocítica de las glándulas exocrinas del organismo. Estos infiltrados provocan la destrucción progresiva de las glándulas exocrinas, con la consiguiente disminución de las secreciones glandulares y la aparición de síntomas relacionados con la sequedad de las mucosas afectadas. El SS se caracteriza fundamentalmente por el desarrollo de xeroftalmía y xerostomía, aunque lo más frecuente es que se presente como un proceso sistémico con distintas manifestaciones extraglandulares más activas y graves que condicionan el pronóstico de la enfermedad a largo plazo. La etiopatogenia de la enfermedad es multifactorial, se involucran factores ambientales, inmunológicos, serológicos, histopatológicos y predisposición genética. Actualmente, está bien aceptada la teoría que explica la infiltración de glándulas salivales y lagrimales por células linfoplasmocitarias. Además hay infiltración de las glándulas exocrinas por linfocitos T, aunado a una hiperestimulación de linfocitos B. Se han planteado diferentes teorías, que justifican una alteración de respuesta autoinmunitaria. Las manifestaciones sistémicas de la enfermedad son consecuencia de la intensidad del estado inflamatorio de la enfermedad, del estímulo y activación del linfocitos B, del infiltrado linfoplasmocitario local y de su repercusión sistémica mediada por autoanticuerpos y otros mediadores solubles.¹⁸

El complemento es el principal efector del sistema de mecanismo humoral, para el cual existen tres vías para su activación; la vía clásica que comienza su activación con la formación de complejos de antígeno y anticuerpo (Inmunocomplejos); la vía alterna es activada por la superficie de las células microbianas en ausencia de algún anticuerpo, mientras que la vía de la lectina fijadora de manosa, se activa por la lectina plasmática que se une a residuos de manosa en las glucoproteínas o carbohidratos que se encuentran presentes sobre la superficie del microorganismo.²

Las tres vías del complemento convergen en el ataque a membrana, el cual forma un conducto a través de la membrana ocasionando lisis celular. Este sistema se encuentra regulado por proteínas de membrana y factores solubles que inhiben su activación espontánea. La activación del sistema se traduce en funciones biológicas como: opsonización a través de los fragmentos de C3, inflamación, producida por anafilotoxinas ocasionando la degranulación de célula cebada, quimiotaxis, inducida por C5 promoviendo la fagocitosis así como la eliminación de inmunocomplejos.^{4,5}

Para la activación de la cascada de complemento así como su estabilidad y tiempo de actividad este es regulado debido a que amplifica la lisis celular por medio del complejo de ataque a la membrana perjudicando células sanas del huésped.

En las enfermedades autoinmunes se identifican deficiencias del sistema inmunológico en el cual el sistema del complemento hace aparición en los componentes iniciales de la vía clásica, que se

encuentra asociada en la participación del complemento induciendo el mantenimiento de la tolerancia inmunológica.⁶

Se han reportado estudios en donde los ratones se emplean como modelos biológicos del SS, para lo cual en este proyecto se emplearán ratones de la cepa CD1 clasificados como: CD1 +/+, CD1 et/+ y CD1 et/et, para la comparación de niveles de ceruloplasmina, nitritos y unidades de complemento en el suero de los ratones.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Inmunidad

La inmunidad es un estado de resistencia que tienen ciertos individuos o especies frente a la acción patógena de microorganismos o sustancias extrañas. Dicho estado puede ser natural o adquirido.

El sistema inmune, es el conjunto de estructuras y procesos biológicos de un organismo que supone una protección contra las enfermedades, ya que logra identificar y eliminar las células patógenas.

La inmunidad se divide en inmunidad innata, inmunidad adaptativa, en la que participa la inmunidad humoral.

2.1.1 Diferencias entre la inmunidad innata y la adaptativa³

Inmunidad	
Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
No existe fase lag (adaptación)	Existe fase lag
Actúa rápidamente	Tarda tiempo en actuar
No es antígeno específica	Es antígeno específica
No existe memoria inmunológica	Se desarrolla memoria inmunológica

Entre las defensas innatas del huésped se encuentran las barreras anatómicas en donde intervienen factores mecánicos, factores químicos, factores biológicos; Entre los componentes humorales se encuentran el sistema complemento, el sistema de coagulación así como las citocinas; Los componentes celulares, son los principales defensores en el organismo, son neutrófilos, monocitos, macrófagos, células asesinas (células NK) y eosinófilos.

El sistema inmune innato se basa en la participación de mecanismos de defensa inespecíficos externos (barreras físico-químicas y biológicas) que tienden a evitar la infección. Cuando los microorganismos consiguen contrarrestar estos mecanismos de defensa externos, actúan los mecanismos de defensa inespecíficos internos (moléculas y células) para la destrucción del patógeno.

2.1.2 Mecanismos de la respuesta inmune natural

- Endocitosis: ingestión de material soluble (macromoléculas) del fluido extracelular por medio de invaginación de pequeñas vesículas endocíticas, pinocitosis, endocitosis mediada por receptor así como la formación de lisosomas para digestión y eliminación.
- Fagocitosis: unión del agente particulado a la superficie de una célula fagocítica, emisión de pseudópodos y englobamiento ocasionando la formación de un fagosoma y su destrucción mediado por: mecanismos dependientes de oxígeno por formación de radicales tóxicos mecanismos dependientes de óxido nítrico, mecanismos independientes de oxígeno como enzimas hidrolíticas

La activación del complemento por la vía alternativa y vía de las lectinas la cual se define como el conjunto de proteínas del plasma que interactúan entre sí y con otros elementos de los sistemas inmunitarios innato y adquirido su activación enzimática en cascada origina una respuesta rápida y amplificada desde el estímulo inicial hasta el complejo de ataque a la membrana (MAC) causando lisis del microorganismo mediada por opsonización: C3b, quimiotaxis y las anafilotoxinas: C3a, C4a y C5a (respuesta inflamatoria).

2.2 Autoinmunidad

Es un trastorno del sistema inmunológico asociado a la incapacidad de éste para reconocer los antígenos del organismo como propios, lo que obliga al sistema a producir una respuesta inmune errada.

Esto ocurre, en gran medida, debido a que los mecanismos de autotolerancia, encargados de proteger al individuo contra linfocitos autorreactivos, operan de manera deficiente. La pérdida de la tolerancia central y periférica ocasiona una respuesta inmune contra lo propio se desencadenan enfermedades autoinmunes, las que se presentan en un 5 a 10% de la población general.

La mayoría de las enfermedades autoinmunes ocurren en MUJERES, sobre todo durante sus años de maternidad. Estas son más comunes en personas de raza blanca con edades promedio entre los 24 y los 50 años.⁴

Una enfermedad autoinmune es una enfermedad en el que el sistema inmunitario se convierte en el agresor y ataca a partes del cuerpo en vez de protegerlo. Existe una respuesta inmune exagerada contra sustancias y tejidos que normalmente están presentes en el cuerpo. Las causas son un tanto desconocidas, pero están relacionadas con el reconocimiento proteico entre las superficies de las membranas celulares del sistema inmunitario y las que forman el organismo. Así, cuando las glucoproteínas de reconocimiento no coinciden, el sistema inmunitario comienza a atacar al propio organismo.

La causa por tanto, tiene que ver a veces con la predisposición o mutaciones genéticas que codifican proteínas diferentes bien en las células inmunitarias o en las orgánicas.¹

Estas enfermedades autoinmunes se logran dividir en:

-
- Enfermedades autoinmunes sistémicas (no órgano específicas): se producen cuando los anticuerpos atacan antígenos no específicos en más de un órgano en particular. Así, existe un grupo de enfermedades que a pesar de tener algunos antígenos específicos de algunos órganos no presentan exclusividad para estos, el mejor ejemplo para este tipo de enfermedades es el lupus eritematoso sistémico, que tiene una mayor frecuencia en mujeres en la mitad de su vida.
 - Síndromes locales (órgano específicas): puede ser de carácter endócrino (diabetes mellitus, enfermedad de Addison, tiroiditis de Hashimoto etc.), dermatológico (pemphigus vulgar), o hematológico (anemia hemolítica autoinmune), e involucra un tejido en particular.

2.3 Síndrome de Sjögren (SS)

El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune caracterizada por la infiltración de células mononucleares a glándulas exocrinas y la presencia de autoanticuerpos. Generalmente se manifiesta con sequedad de boca y ojos a lo igual que puede afectar cualquier tejido exocrino, así como una amplia variedad de órganos y sistemas.

Las glándulas salivares y lagrimales son un principal objetivo, mediado por células T de inflamación crónica, causando atrofia glandular y una deficiente función. Una teoría deriva a un ataque autoinmune que se encuentra dirigido por un mecanismo responsable en la formación de células mononucleares acumuladas en las glándulas exocrinas.^{16, 17}

Este síndrome puede presentarse como una enfermedad primaria o en ocasión con otras enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, cirrosis biliar, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, entre otros. El síndrome de Sjögren secundario es considerado como de las enfermedades autoinmunes comunes.

El SS se activa al igual que muchas otras enfermedades autoinmunes por un mosaico de factores genéticos, ambientales e incluso factores hormonales, induciendo en última instancia la desregulación inmune así como la pérdida de la tolerancia.

2.3.1 Características clínicas

El sello distintivo de SS, se reduce en la función de las glándulas exocrinas denominado “síndrome seco”. La combinación de xeroftalmía (ojos secos), y xerostomía (boca seca) son manifestaciones comunes tanto para Síndrome Sjögren primario (SSP) como para Síndrome Sjögren secundario (SSS). La xerostomía puede resultar en dificultad de deglución, así como la pérdida de propiedades protectoras antimicrobianas de la saliva ocasionando complicaciones dentales, caries, candidiasis oral, queilitis angular, ampliación de la parotiditis y bilateral de las glándulas parótidas.^{17,18}

La participación de otras glándulas exocrinas (como tracto espiratorio, gastrointestinal y piel) es menos común pudiendo aparecer como costras nasales, hemorragias, inflamación de la parótida o

submandibular, orofaringe seca, tos, atrofia de la mucosa esofágica, gastritis atrófica y dispareumia.

Los síntomas constitucionales como fatiga crónica, fiebre de bajo grado, mialgias frecuentes son síntomas que pueden limitar la actividad del paciente.

El prurito causado por la sequedad en piel afecta al 55% de los pacientes con SSP y el 25% en los pacientes con SSS. Pueden presentar erupciones cutáneas, asemejando lupus eritematoso sistémico. La vasculitis es una manifestación cutánea común en SS, asociado a manifestaciones extra-glandulares en presencia de autoanticuerpos y crioglobulinas.¹⁶

La artritis y las artralgiás son diagnosticadas hasta en un 50% de los pacientes, las articulaciones afectadas frecuentemente son los tobillos, hombros y muñecas. Las manifestaciones neurológicas son comunes y pueden proceder al diagnóstico de SS o aparecer en una etapa posterior. Los trastornos linfoproliferativos son complicaciones más graves que se llegan a producir en un 5% de los pacientes. En 20% de los pacientes se presenta acidosis tubular renal (tipo I distal), posiblemente se observe nefritis intersticial crónica ocasionando alteración de la función renal, rara vez ocurre lesión glomerular que posiblemente se presenta de forma secundaria a la crioglobulinemia adjunta.

2.3.2 Genética en SS

Es complejo implicar a los genes HLA y no-HLA. De los genes HLA, DR y DQ cuentan principalmente para el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de genes asociados. Un reciente meta-análisis informó que DQA-1 05:01, DQB-1 y DQR-1 02:01 03:01 alelos resultaron ser factores de riesgo de SS. En otro estudio HLA-DQ-2 y HLA-B8 se relacionan con pacientes caucásicos en SS considerando a HLA-DR-5 se relacionan con la presencia de anti-anticuerpos Ro y anti-La.

Los genes implicados en los polimorfismos de no-HLA en el interferón ($\text{INF-}\alpha$), como vía de interferón transductor y activador de la señal de transcripción se encuentra asociado con la susceptibilidad a SS así como la producción e inducción de un estado pro-inflamatorio. Estos genes que codifican para las interleucinas IL-6 y la IL-10 se encuentran vinculados a SS.

Se puede suponer que la predilección femenina está mediada por las hormonas ya que los estrógenos y andrógenos tienen un efecto protector, es por tal que la disminución de estas hormonas se encuentra relacionado para el desarrollo de SS ya que la incidencia máxima para SS es en el periodo premenopáusico.^{16, 18, 19.}

Los virus son considerados como candidatos potenciales para desencadenar la respuesta inmune en SS, a través de la invasión local o la inducción en la migración de linfocitos algunos informes han encontrado asociación entre SS y el virus de Epstein-Barr y los virus de la hepatitis C.

La activación del sistema inmune innato con la secreción de citocinas, IL-6, IL-12, IL-17 e IL-21 se encuentran relacionados con la presencia de anticuerpos anti-Ro, el papel de la IL-12 es poner en marcha la migración los linfocitos T y B a la glándula salival. La mayoría de las células invasoras son células T CD4 y algunas células secretoras de anticuerpos son células B. La activación de células T se encuentra estrechamente asociado con el aumento de IL-6 logrando aumentar el número de un subconjunto de células T pro-inflamatorias a las glándulas salivales.¹⁷

Otro jugados clave en la interacción de los sistemas inmune innata y adaptativa de SS es el factor activador de células B, producida por los monocitos y las células epiteliales que estimulan la supervivencia de células B ya que estos se encuentran aumentados en SS.

2.3.3 Epidemiología

Existe un gran predominio en mujeres con una proporción de mujer: hombre alrededor de 9:1, generalmente comienza en edades de 40 y los 60 años rara vez en niños y adolescentes.²⁰

2.3.4 Diagnostico

El diagnostico es una tarea compleja que no puede ser fácilmente realizado, no hay ningún signo o síntoma propio para este síndrome.

Los criterios de clasificación europeos y los criterios revisados propuestos en 2002 por el Grupo de Consenso Estadounidense de origen Europeo (AECC), establecen que se requiere presencia de síntomas orales y oculares así como exámenes serológicos, histológicos y estudios funcionales de de las glándulas exocrinas. Las pruebas objetivas para confirmar la xeroftalmia consisten en la prueba de Schimer que evalúa la cantidad de producción lagrimal en 5 min. La prueba de rosa de Bengala para la detección del tejido dañado del epitelio en los ojos. Para la xerostomía mediante la gammagrafía, sialografía, glándula parótida y biopsia de glándulas salivares.¹⁹

2.4 Inflamación

La inflamación es un mecanismo de respuesta inmunitaria se describen en signos: rubor, tumor, calor, dolor y pérdida de la función, descubierto en la década cristiana por Cornelius Celsus. En 1793 John Hunter aprecia la respuesta inflamatoria, como mecanismo fisiológico de defensa contra diversas agresiones, determinando que la inflamación es un proceso fisiológico vascular y celular por el cual los tejidos responden ante una lesión.

La inflamación es sin duda uno de los fenómenos clínicos más observados, las manifestaciones en el proceso inflamatorio local repercutiendo sistemáticamente como en el síndrome de respuesta inflamatoria, observado en pacientes con infecciones severas.¹¹

Los procesos inflamatorios se pueden clasificar en localizados o sistémicos, para que pueda existir una u otra es necesario un estímulo inflamatorio, la respuesta a dicho estímulo puede ser benéfica al huésped ya que la inflamación es un mecanismo fisiológico por el cual el cuerpo busca la homeostasis durante una agresión. El objetivo de la inflamación es controlar y erradicar el agente infeccioso mediante el reclutamiento de elementos celulares del sistema inmunitario, evitando la diseminación más allá del sitio de infección. Si el estímulo persiste, la inflamación se perpetúa, trayendo consecuencias deletéreas para el huésped.^{6,1}

El proceso inflamatorio agudo es caracterizado por cambios vasculares que implican incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos permitiendo la salida de plasma, proteínas plasmáticas y elementos celulares a los tejidos. Se conocen eventos en la trans migración leucocitaria en la inflamación como:

- Adhesión celular al endotelio vascular
- Diapédesis
- Quimiotaxis
- Reclutamiento de células fagocíticas

Los cambios vasculares comienzan a nivel poscapilares en donde se observa una vasoconstricción seguida de una vasodilatación vascular, favoreciendo la salida del plasma a los tejidos en donde se produce la fase de estasis sanguínea por lo que el movimiento celular a través del capilar se ve frustrado a falta del plasma. El contacto entre leucocitos y células endoteliales es gracias a moléculas de adhesión celular (las selectinas, integrinas, inmunoglobulinas). Los estímulos inflamatorios son muy potentes debido a la liberación de mediadores químicos a los tejidos. En muchas situaciones es más el daño que induce la inflamación que el beneficio que puede ofrecer.

Durante la inflamación células que en su mayoría son polimorfonucleares son guiadas por un gradiente químico táctico generado por mediadores proinflamatorios como citocinas y quimiocinas constituyentes de la respuesta inflamatoria.⁸

En una inflamación crónica los cambios se hacen más evidentes tal es el caso en los procesos autoinmunitarios.

2.4.1 Mediadores proinflamatorios

Los mediadores proinflamatorios se clasifican por: aminas vasoactivas, péptidos vasoactivos, fracciones del complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas

Los mediadores de suma importancia son la anafilotoxinas de complemento, estas proteínas se liberan en dos fracciones de mayor tamaño (C3b) esta permanece unida a la célula en donde se activo el complemento y de menor tamaño (C5a) que es liberada para estimular a las células más cercanas. Los fragmentos C3a, C4a y C5a, son los principales mediadores inflamatorios.

Los fragmentos C3a y C5a poseen gran actividad quimiotáctica para neutrófilos actuando sobre receptores específicos en células, así como en células endoteliales, monocitos y macrófagos induciendo su activación, esta activación implica la síntesis de citocinas proinflamatorias.^{1,5,8}

Los reactantes de fase aguda, fibrinógeno, proteína C reactiva, proteína amiloide, ceruloplasmina, entre otros, participan directamente en la respuesta inmunitaria innata y exacerban la inflamación. Su determinación se considera de valor pronóstico y evolutivo de los procesos inflamatorios, así como el seguimiento de enfermedades inflamatorias sistémicas como en la autoinmunidad. Durante el curso de algún proceso inflamatorio las proteínas de fase aguda se incrementan como producto de las citocinas proinflamatorias.⁶

2.5 Ceruloplasmina (Cp)

Las denominadas proteínas de fase activa, muestran un notable aumento de concentración a mediadores como la IL-1 derivada de macrófagos y liberada como consecuencia de infección o daño tisular. Estas proteínas son: proteína C reactiva (CRP), proteína fijadora de manosa (MBP) y el componente P de amiloide sérico. Otras proteínas de fase aguda cuya concentración se ve alterada de forma moderada son: fibrinógeno y ceruloplasmina.

La ceruloplasmina Cp se sintetiza principalmente en hígado como una cadena polipeptídica simple y se secreta como una α 2-glicoproteína a nivel plasmático. Pertenece a la familia de las multicuprooxidasa. Estas enzimas constituyen un grupo de proteínas evolutivamente conservado. Se caracterizan desde el punto de vista estructural por presentar tres tipos de sitios de unión para el cobre con características espectroscópicas diferentes y, desde el punto de vista funcional, por catalizar la reducción de una molécula de oxígeno con formación de una de agua, sin la liberación de intermediarios potencialmente tóxicos (O_2^- , H_2O_2).

La Ceruloplasmina (Cp) es la principal proteína transportadora de cobre en circulación con actividad ferroxidasa. Su concentración es abundante en plasma; se considera un reactante de fase aguda.

La Cp es una proteína multifuncional. La función que la misma cumpla dependerá de los cambios en las condiciones fisiológicas y patológicas presentes en el organismo frente a una situación determinada.

Aunque su aumento después de procesos inflamatorios y traumáticos se usó para clasificarla como proteína de fase aguda, su función fisiológica puede ser amplia y variada. Además de participar en la homeostasis del hierro, se le reconocen propiedades antioxidantes contra la peroxidación lipídica y oxidantes frente a varias aminos.

En circulación, la proteína se encuentra como apoceruloplasmina y holoceruloplasmina. La primera de estas formas corresponde a la enzima sin actividad, mientras que la segunda corresponde a la enzima activa. La apoceruloplasmina contribuye aproximadamente en un 10% a la concentración proteica total de Cp en adultos presumiblemente sanos. Este porcentaje puede variar en algunas situaciones patológicas.²

2.6 Oxido nítrico

El oxido nítrico (NO), es un radical libre, potencialmente toxico que puede difundir libremente a través de las membranas celulares. Es un potente vasodilatador formado por las células endoteliales, inicialmente fue denominado como factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Tiene una vida media de 3-50 segundos y su labilidad es debida a su rápida conversión a nitritos y nitratos por el oxígeno. El NO se sintetiza por acción de la oxido nítrico-sintetasa (NOS, del ingles nitric oxide syntethase) que actúa sobre la L-arginina. Se han descrito dos formas de distintas de la enzima, una forma constitutiva y otra inducible.

La forma constitutiva de NOS es calcio-calmodulina dependiente que actúa como la responsable del aumento del NO por el endotelio vascular, plaquetas, tejido nervioso, células mesangiales de la médula adrenal y de las células de la macula densa. Se activa por aminoácidos excitatorios, por la acetilcolina y calcio. La NOS constitutiva proporciona con rapidez unas cantidades relativamente pequeñas de óxido nítrico durante cortos periodos de tiempo.

La forma inducible no es dependiente de calcio-calmodulina produciendo la liberación de grandes cantidades de NO de forma prolongada por macrófagos, neutrófilos, endotelio vascular y células microgliales. Los inductores más importantes de la forma inducible de la NOS son el LPS o endotoxinas, el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α), IL-1 y INF γ . Esta activación de la forma inducible por citocinas proinflamatorias implican el mecanismo por el cual el tono del NO se encuentra elevado en la reacción inflamatoria.

El NO ejerce sus acciones vasodilatadoras por difusión local desde las células endoteliales a las células del musculo liso vascular donde estimula la guanilato-ciclase y provoca un aumento de la formación de 3'-5'-monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), así como la relajación del músculo liso vascular, probablemente por alteración de la concentración de calcio intracelular. La interacción del NO con enzimas microbianas que contienen Fe-S puede ser la causa de su efecto bactericida. Otro mecanismo de citotoxicidad se debe a la nitrosilación de los ácidos nucleicos causando ruptura del ADN.

El NO provoca daño tisular debido a productos como el peroxinitrilo (ONOO-), generado por la interacción del NO con otras especies de oxígeno reactivo. El efecto fisiológico más importante del NO, es el actuar como vasodilatador, esta propiedad y su capacidad de inducir a la COX-2 hacen que sea un importante mediador del proceso inflamatorio.

El NO puede ser cuantificado por métodos directos (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detectores electroquímicos, resonancia electrónica paramagnética, quimioluminiscencia) y por métodos indirectos, (espectrometría de UV-Vis, y métodos electrométricos), las concentraciones de este compuesto se encuentran entre 10nM a 1µM y su vida media en disolución acuosa (entre 3.8 a 6.2 s), reducen la aplicabilidad de estos métodos para la evaluación de muestras biológicas.

Las dificultades inherentes a la cuantificación del NO pueden ser reducidas cuantificando a sus metabolitos estables NO₂ y NO₃, pero en muestras plasmáticas, el NO es oxidado completamente a NO₃ el cual es estable durante varias horas. En contraste, el NO₂ es convertido rápidamente a NO₃ en la sangre mediante la oxidación de la hemoglobina por el NO₂, bajo condiciones aeróbicas mediante la transferencia de un electrón del NO₂ hacia la oxihemoglobina unida.

Se han reportado varias técnicas para la detección de los metabolitos estables del NO (NO₃ y NO₂), siendo la más utilizada la detección colorimétrica con reactivos de Griess. Esta reacción involucra la formación de un cromóforo mediante la diazotación de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguido de un acoplamiento con una amina biccíclica. Debido a que la reacción de Griess no detecta el anión NO₃, se ha propuesto la reducción de NO₃ a NO₂ con metales reductores tales como el cadmio.

2.7 Sistema Complemento

Paul Ehrlich define el término complemento como la actividad del suero sanguíneo que completa la acción del anticuerpo.

La activación del sistema complemento se inicia por proteínas denominadas proteínas de fase aguda, que experimentan cambios de concentración durante la inflamación, las diversas acciones del sistema complemento pueden ser desencadenadas no solo por anticuerpos, sino también por componentes de la inmunidad innata.^{2,3}

2.7.1 Funciones del complemento

Las actividades biológicas de este sistema afectan las inmunidades innatas y adaptativa, la interacción de receptores celulares con proteínas del complemento controla algunas actividades de las células B, revelando que este sistema participa en el sistema inmunitario adaptativo.

Las funciones básicas del sistema implican

- lisis de células, bacterias y virus
- Opsonización, promoviendo la fagocitosis de antígenos particulados
- Unión a receptores del complemento específicos que desencadenan funciones características en inflamación y secreción de moléculas inmunorreguladoras.
- Depuración inmunitaria, eliminando complejos inmunitarios.

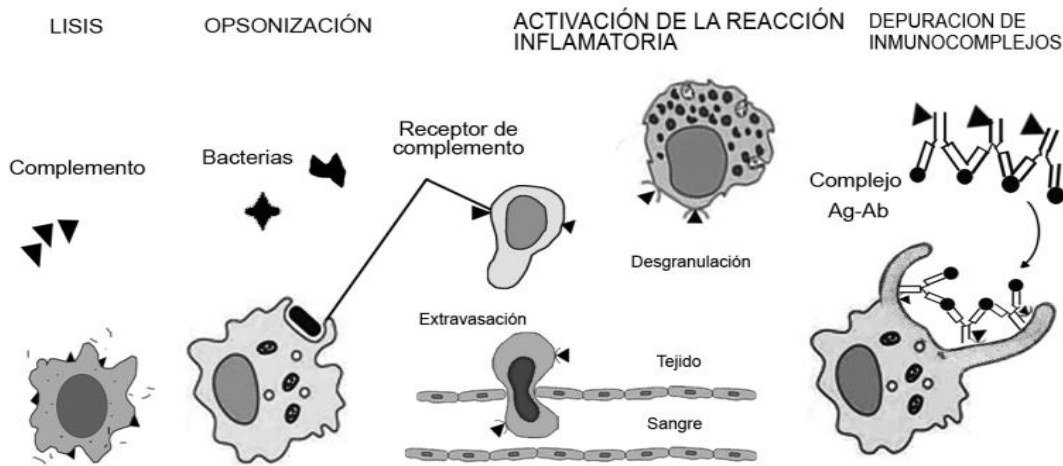


Figura 1. Activación de la cascada de complemento

2.7.2 Componentes del complemento

Las proteínas y glucoproteínas del complemento se sintetizan en los hepatocitos así como también los monocitos, macrófagos y células epiteliales de los aparatos digestivo y genitourinario. Constituyen el 5% (en peso) de la fracción de la globina sérica, circulan en el suero como *zimógenos*. La secuencia de reacción se inicia con una cascada enzimática. Los componentes de este sistema se designan con numerales (C1-C9). Los fragmentos peptídicos que se forman por activación se indican en minúsculas, los fragmentos más pequeños resultado de la escisión de un componente se designan "a" y al fragmento más grande se designa "b", cabe señalar que C2 es una excepción ya que C2a es el fragmento más grande.

Los fragmentos grandes se unen al sitio de activación, y los pequeños se difunden en reacciones inflamatorias localizadas uniéndose a receptores específicos. Los complejos con actividad enzimática se designan con una línea sobre el número (C4b2a).^{2,5,7}

2.7.3 Activación del complemento.

Existen tres vías que desencadenan la activación del complemento, las vías clásicas, alterna y la de la lectina. Los pasos finales llevan a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC, del inglés *membrane-attack complex*).

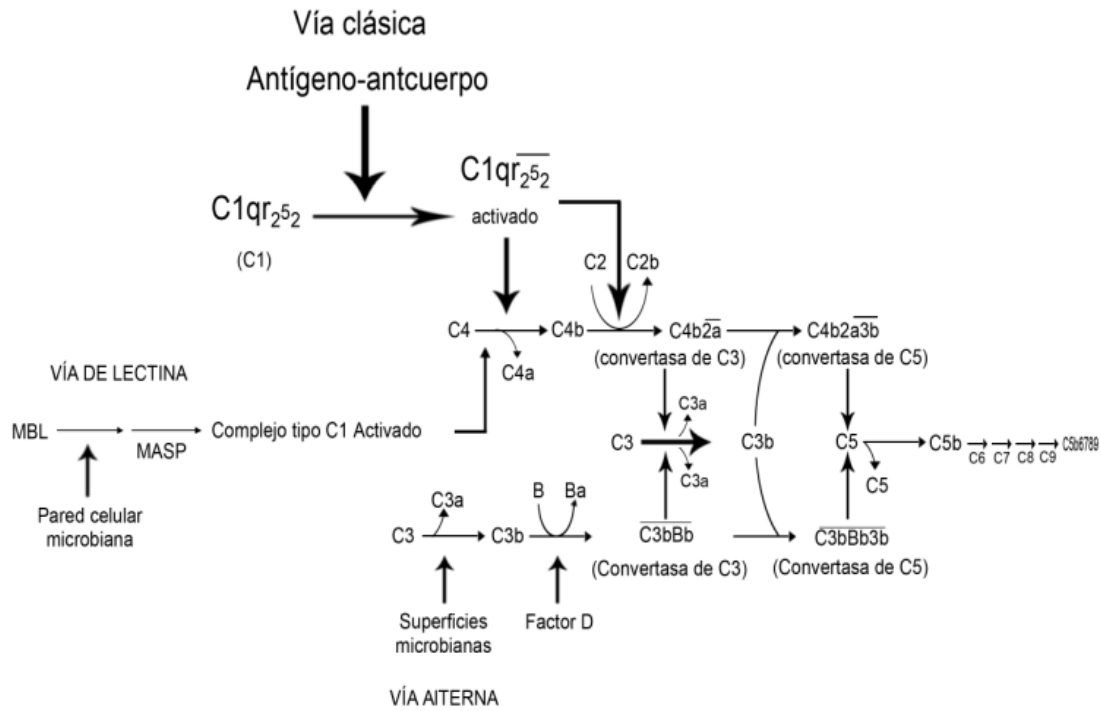


Figura 2. Generalidades de la activación del complemento

2.7.4 La vía clásica

La vía clásica se inicia con la unión de antígeno y anticuerpo.

La activación comienza con la formación de complejos de antígeno y anticuerpo solubles. La IgM y ciertas subclases de IgG pueden activar esta vía. La etapa inicial incluye C1, C2, C3, C4, que se encuentran en el plasma en forma inactiva.

La formación de complejo antígeno anticuerpo induciendo cambios en la conformación de la porción Fc de IgM exponiendo el sitio de unión para el componente C1. El C1 en suero es un complejo macromolecular que consiste en C1q y dos moléculas de C1r y dos C1s, unidas en un complejo (C1qr₂s₂) estabilizado por iones Ca²⁺. Cada monómero C1r y C1s contiene un dominio catalítico y un dominio de interacción con C1q de uno con el otro.

El complejo macromolecular C1 se une por cabezas globulares C1q a dos sitios Fc para hacer una interacción estable C1-anticuerpo. Cuando IgM se une al antígeno cambia su configuración en "grapa" exponiendo los sitios de unión para C1q. Mientras que la IgG contiene un sitio de unión C1q en el dominio de Fc, la unión firme de C1q se logra con dos moléculas de IgG que se encuentran a 30 a 40 nm.^{2, 5, 7, 13}

La unión de Fc produce un cambio de conformación en C1r que se convierte a una enzima proteasa de serina activa C1r que escinde C1s a una enzima activa similar C1s, conteniendo dos sustratos, C4 y C2. La glucoproteína tiene tres cadenas polipeptídicas α, β, y γ.^{5, 7}

El C4 se activa si C1s hidroliza al fragmento pequeño (C4a) de la cadena α exponiendo al sitio de unión con el fragmento más grande (C4b), este fragmento se fija en la cercanía de C1 y a la proenzima C2 haciendo el sitio de unión expuesto en C4b, mientras que la C1s, escinde C2; el fragmento pequeño (C2b) se difunde. El complejo C4b2a, se denomina convertasa de C3 en forma activa. El fragmento C4a es una anafilotoxina o mediador de la inflamación, las anafilotoxinas que incluyen los fragmentos son: C4, C3 y C5.

La hidrólisis de C3a de la cadena α de la convertasa de C3 genera C3b. Una molécula de convertasa de C3 puede generar más de 200 moléculas de C3b, parte de esta C3b se une a C4b2a formando un complejo trimolecular C4b2a3b, llamado convertasa C5. El componente C3b se une a C5 alterando su conformación de tal forma que C4b2a escinde C5 en C5a que se difunde mientras que C5b se fija a C6 e inicia el complejo de ataque a la membrana en secuencia denominada complejo de ataque a la membrana. La C3b generada en la actividad de la convertasa de C3 no se une a C4b2a que se difunde y cubre inmunocomplejos particulados que funciona como una opsonina promoviendo la fagocitosis.^{2, 13, 15}

2.7.5 La vía alterna

La vía alterna es independiente de anticuerpo.

La vía alterna genera productos activos sin necesidad de complejos antígeno y anticuerpo, en esta vía no se requiere de anticuerpo la vía alterna es un componente del sistema inmunitario innato.

La vía alterna el C3 sérico sufre hidrólisis para producir C3a y C3b, el C3b se une a antígenos de superficie extraños o incluso a células del hospedador. Las membranas de la mayoría de las células contienen concentraciones de ácido siálico que contribuye a la desactivación rápida de moléculas C3b unidas a células del hospedador. El C3b se une a estas superficies permaneciendo activo más tiempo. El C3b que se encuentra en la superficie de las células extrañas puede unir otra proteína sérica llamada factor B formando un complejo, estabilizado por Mg^{2+} . La unión a C3b expone un sitio en el factor B sirviendo como sustrato para proteína sérica con actividad enzimática llamada factor D. El factor B unido a C3b libera un fragmento pequeño (Ba) que se difunde y genera $\overline{C3bBb}$.

Este complejo $\overline{C3bBb}$, posee actividad de convertasa de C3 siendo un análogo del complejo $\overline{C4b2a}$, la actividad de convertasa de C3 del $\overline{C3bBb}$, tiene una vida media limitada a menos que se una a la properdina. El $\overline{C3bBb}$, puede activar C3 no hidrolizado liberando más C3b de modo autocatalítico. La actividad de convertasa de C3 del $\overline{C3bBb}$ genera el complejo $\overline{C3Bb3b}$ que muestra actividad de convertasa de C5 siendo análogo del complejo $\overline{C4b2a3b}$. El componente C3b no enzimático se une a C5 el componente Bb hidroliza al componente C5 para generar C5a y C5b, este último se une a la superficie antigénica dando comienzo a la fase final del ciclo lítico.^{5,13}

2.7.6 La vía de lectina

La vía de lectina se inicia con la unión de proteínas del hospedador a superficies microbianas.

Las lectinas son proteínas reconocidas como blancos carbohidratos específicos y se unen a ellos, la lectina activa el complemento y se une a residuos de manosa, MBL (del inglés mannose-binding lectin) se une a residuos manosa en glucoproteínas o carbohidratos sobre la superficie de microorganismos. Las células humanas tienen residuos de ácido siálico que cubren los grupos azúcar reconocidos por MBL, no siendo blancos para la unión.

La MBL de la familia de las colectinas, es una proteína de fase aguda, aumenta su concentración durante las reacciones inflamatorias, su función en la vía del complemento es similar a la de C1q. Después de que la MBL se une a los residuos carbohidrato en la superficie de una célula, a ella se fijan las proteasas de serina relacionadas con MBL, MASP-1, MASP-2. El complejo activo formado por esta vinculación causa escisión y activación de C4 y C2. Las proteínas MASP-1 y MASP-2 tienen similitudes estructurales con C1r y C1s imitando sus actividades. De esta manera activan a los componentes C2 a C4 formando la convertasa C5 sin necesidad de unión de anticuerpo específico representa un mecanismo innato de defensa importante que utiliza los elementos de la vía clásica excepto las proteínas C1.^{5,7,14}

2.7.7 Complejo de ataque a la membrana.

Las tres vías del complemento convergen en el complejo de ataque a la membrana.

La ausencia terminal de activación del complemento incluye C5b, C6, C7, C8 y C9, interactúan de manera secuencial formando una estructura macromolecular denominada complejo de ataque a la membrana (MAC, del inglés membrane-attack complex). El complejo forma un conducto a través de la membrana de la célula blanco permitiendo la libre difusión de iones y moléculas a través de la membrana.

La producción de una convertasa de C5 activa escinde C5 que contiene dos cadenas proteínicas α y β , después de la unión de C5 al componente C3b no enzimático de la convertasa, se escinde la cadena α creando el fragmento C5a que se difunde y el fragmento C5b se une a la superficie de la célula proporcionando un sitio de unión para los componentes del complejo de ataque a la membrana. El componente C5b es un extremo lábil se desactiva a menos que se una a C6 y establezca la actividad. Las reacciones del complemento se llevan a cabo en la superficie hidrófila de la membrana o en inmunocomplejos.

A medida que se une C5b6 a C7 el complejo experimenta transición que expone las regiones hidrófobas que sirven como sitios de unión para los fosfolípidos de membrana, los sitios de unión hidrófobos permiten que el complejo C5b67 se inserte dentro de la bicapa fosfolípida.

Si la reacción tiene lugar en un inmunocomplejos, los sitios de unión hidrófobos no pueden fijar ("anclar") el complejo y este se libera. Los complejos C5b67 liberados pueden insertarse en la membrana de células cercanas y mediar la lisis de "espectadores inocentes". En condiciones normales las proteínas reguladoras impiden este acto, pero en ciertas enfermedades el daño celular puede ser efecto de dicha lisis, como resultado de la deficiencia de una proteína reguladora.

La unión de C8 a C5b67 a la membrana induce un cambio de conformación de C8 el canal sufre una transición que expone la región hidrófoba que interactúa en la membrana plasmática. El complejo C5b678 crea un poro de 10 Å de diámetro. La formación de este poro puede conducir a lisis. La etapa final en la formación del MAC, es la unión y polimerización de C9, una molécula parecida a perforina como lo es el complejo C5b678 esta puede unirse y polimerizarse de 10 hasta 17 moléculas de C9 por acción de un solo complejo C5b678. Las moléculas C9 experimentan una transición que también puede insertarse en la membrana. El MAC tiene forma tubular y tamaño de poro funcional de 70 a 100 Å, consiste en un complejo C5b678 rodeado por el complejo poli-C9. Los iones y las moléculas pequeñas se difunden con libertad a través del conducto central del MAC, la célula no puede conservar su estabilidad osmótica y es destruida por la entrada de agua y la pérdida de electrólitos.^{2, 13, 15}

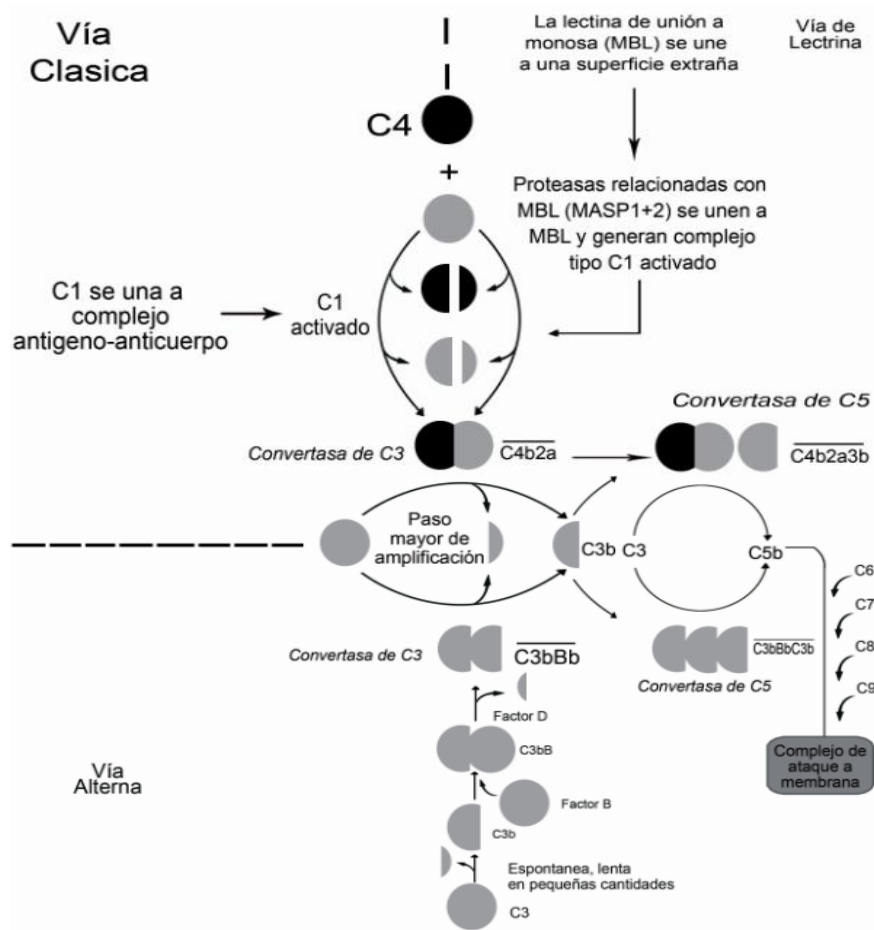


Figura 3. Resumen de las tres vías de activación del complemento, en donde todas las vías convierten C3 en su forma activa C3b que participa en la formación de la convertasa C5, con la formación de C5b, con esta formación las vías convergen en el complejo de ataque a la membrana.

2.8 Regulación del sistema complemento

Los elementos del sistema del complemento ataca tanto células del hospedador como células extrañas y microorganismos, los mecanismos reguladores complejos han surgido por evolución para restringir la actividad del complemento a los blancos asignados. Un mecanismo pasivo de regulación en todas las vías del complemento es la inclusión de componentes lábiles que sufren desactivación espontánea son estabilizados por una reacción con otros componentes.

La actividad de convertasa de CD3 generada en la vía alterna tiene vida media activa solo de 5 min.

La regulación activa de la actividad del complemento corre a cargo de una serie de proteínas reguladoras que desactivan diversos componentes del complemento. La glucoproteína denominada inhibidor de C1 puede formar un complejo con C1r2s2, la cual determina que se disocie de C1q y previene la activación adicional de C4 o C2.^{2,5}

La reacción catalizada por C3 convertasa C3 es el paso principal en la activación del complemento que genera moléculas de C3b. El daño a células normales del hospedador se minimiza por que C3b sufre hidrólisis espontánea para el momento que se ha difundido a una distancia de 40nm respecto a las enzimas convertasa C4b2a o C3bBb, no puede unirse al sitio blanco. Las proteínas

Las proteínas reguladoras contienen secuencias repetitivas de aminoácidos de unos 60 residuos llamadas repeticiones de consenso cortas (SCR, del inglés short consensus repeats). Estas proteínas se codifican en un mismo sitio en el cromosoma 1, se conoce como el grupo génico de reguladores de la activación del complemento (RCA, del inglés regulators of complement activation).

En la vía clásica y de lectina actúa de manera similar tres proteínas RCA, estas proteínas reguladoras incluyen la proteína de unión de C4b soluble (C4bBP) y dos proteínas de unión a membrana a saber receptor de complemento tipo 1 (CR1) y proteína cofactor de membrana (MCP) Cada una de las proteínas reguladoras se une a C4b y evita su vinculación con C2a. Cuando C4bBP, CRI o MCP se unen a C4b otra proteína reguladora, factor I, escinde C4b en C4d unida y C4c soluble. Una secuencia similar previene el ensamblaje de C3bBb (una convertasa de C3) en la vía alterna. En este caso CR1, MCP o un componente regulador denominado factor H se une a C3b y previene su enlace a factor B. Una vez que CRI, MCP o factor H se une a C3b, el factor I escinde C3b en un fragmento iC3b unido y un fragmento C3f. La escisión adicional de iC3b por el factor I libera C3c y deja a C3dg unido a la membrana.^{7,13}

Las proteínas RCA actúan sobre la convertasa de C3 ensamblada da lugar a la disociación; incluyen C4bBP, CR1 y factor H. El factor acelerador de la degradación (DAF o CD55) es una glucoproteína fijada de manera covalente a una proteína de membrana glucosfolipídica tiene la capacidad de disociar la convertasa de C3. Cada proteína RCA acelera la degradación de convertasa de C3 al liberar el componente con actividad enzimática (C2a o Bb) el componente unido a la célula (C4b o C3b). Cuando ocurre la disociación de la convertasa de C3, el factor I escinde el componente C4b o C3b unido a membrana restante lo que desactiva irreversiblemente la convertasa. Las proteínas reguladoras operan a nivel del complejo de ataque a la membrana. La posible liberación del complejo C5b67 implica una amenaza de lisis de espectador para células sanas. Las proteínas séricas contrarrestan la amenaza al unirse al C5b67 implica una amenaza de lisis de espectador inocente para células sanas. Las proteínas séricas contrarrestan la amenaza al unirse al C5b67 liberado e impidiendo su inserción en la membrana de células cercanas.^{2,5,7}

Las proteínas séricas llamada proteína S se une a C5b67 e induce una transición impidiendo la inserción de C5b67 en la membrana de células cercanas. La lisis de las células del complemento es

eficaz si el complemento proviene de una especie diferente a la de las células que lisan. El fenómeno depende de una proteína de membrana que bloquea la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC).

La proteína se encuentra en la membrana de células se denomina factor de restricción homólogo (HRF del inglés *homologous restriction factor*) o *inhibidor de membrana de lisis reactiva* (MIRL, del inglés *membrane inhibitor of reactive lysis* o CD59). La lisis inespecífica mediada por complemento al unirse a C8 impide el ensamblaje de poli-C9 y su inserción en la membrana plasmática la inhibición ocurre si los componentes del complemento provienen de la misma especie que las células blanco.^{5, 7,13}

2.9 Consecuencias biológicas de la activación del complemento

El complemento es un mediador importante de la reacción humoral, amplifica la respuesta y la convierte en un mecanismo de defensa eficaz para destruir microorganismos invasores.

El MAC media la lisis celular en tanto el complemento o productos de escisión participan en la reacción inflamatoria, la opsonización de antígeno, la neutralización vírica en la infección aguda protegiendo contra una nueva infección.⁵

2.9.1 Los productos de escisión de componentes del complemento median la inflamación.

La importancia crítica son los diversos péptidos que se generan durante la formación del MAC, teniendo una función en el desarrollo de una reacción inflamatoria eficaz. Los fragmentos más pequeños resultan de la escisión del complemento, C3a, C4a y C5a, llamados anafilotoxinas, se unen a receptores en células cebadas y basófilos sanguíneos e inducen desgranulación con liberación de histamina.

Las anafilotoxinas inducen contracción de músculo liso y aumentan la permeabilidad vascular, la activación del sistema del complemento tiene como resultado el ingreso de líquido que lleva anticuerpo y células fagocíticas al sitio de entrada de antígeno. Las actividades de estas anafilotoxinas muy reactivas son reguladas por una proteasa sérica llamada carboxipeptidasa N, escinde un residuo Arg del extremo C de las moléculas y produce las formas des-Arg. La forma des-Arg de C3 por complemento inactiva, mientras que la C5 conserva actividad quimiotáctica.

C3a y C5a pueden inducir a monocitos y neutrófilos a que se adhieran a células endoteliales vasculares, se extravasen por el recubrimiento endotelial de los capilares y migren activación en los tejidos el C5 a es más potente en la mediación de estos procesos y eficaz en cantidades picomolares.²

2.9.2 La unión de C3b y C4b facilita la opsonización

El C3b es la principal opsonina del sistema del complemento, aunque C4b e iC3b poseen actividad opsonizante. La amplificación observada de C3 causa recubrimiento de C3b en inmunocomplejos y antígenos particulados. Las células fagocíticas y algunas otras células expresan receptores de complemento (CR1, CR3 y CR4) que se unen C3b, C4b o iC3b. El antígeno recubierto con C3b se une a células que portan CR1.

La activación de células fagocíticas por diversos agentes, incluida la C5a, aumenta el número de Cr1 desde 5000 fagocitos en reposo hasta 50 000 en células activadas lo que facilita su fagocitosis de antígeno recubierto con C3b.^{5,13}

2.10 El riñón y sus funciones

Los mecanismos fisiológicos que el riñón ha adquirido para cumplir sus funciones exigen un alto grado de complejidad estructural.

Cada riñón adulto pesa unos 150g. Al llegar el uréter al hilio renal se dilata formando una cavidad infundiliforme, que se divide en dos o tres ramas: los cálices mayores y estos en tres o cuatro cálices menores. El riñón humano tiene unos 12 cálices menores. Al corte, la superficie del riñón está formada por corteza y médula; la primera tiene 1.2 a 1.5 cm de espesor. La médula contiene pirámides renales, cuyos vértices llamados papilas, terminan en un cáliz. El tejido cortical se prolonga ocupando los espacios adyacentes a las pirámides para formar así las columnas renales.⁹

El riñón está muy vascularizado y reciben el 25% del gasto cardiaco. La corteza es la parte rica en vasos y recibe el 90 % de la sangre que llega al riñón. La arteria renal principal se bifurca en dos ramas: anterior y posterior. De ellas parte las arterias interlobulares que discurren por entre los lóbulos y que emiten las arterias arcoatas que forman arcos entre la corteza y de la médula de ellas salen las arterias interlobulillares. Las arteriolas aferentes, forman el penacho glomerular en donde se dividen una y otra vez en 20 a 40 asas capilares dispuestas en varios lóbulos que confluyen y salen del glomérulo por las arteriolas eferentes, las arteriolas eferentes de las nefronas superficiales forman una rica red bascular rodeando a los túbulos corticales; más profundamente de los glomérulos yuxtamedulares nace la vasa recta siguiendo un trayecto rectilíneo y descendiendo para irrigar las zonas interna y externa de la medula.^{9,11}

Los glomérulos están formados por una red anastomosada de capilares revestidos por un epitelio fenestrado dotado de 2 envolturas epiteliales. El epitelio visceral se incorpora la pared capilar y se convierte en parte intrínseca, quedando separado de las células endoteliales por una membrana basal. El epitelio parietal reviste el espacio de Bowman, cavidad en la que se recoge el líquido resultante de la filtración del plasma.¹¹

Las células epiteliales viscerales (podocitos) son células complejas dotadas de expansiones digitiformes adherentes incrustadas en la lámina externa de la membrana basal. Las expansiones

podálicas adyacentes separadas por hendiduras o poros de filtración de 20 a 30 nm de ancho, unidos entre si por un fino diafragma en forma de puente. La matriz mesangial forma una malla que contiene células mesangiales esparcidas estas de origen mesenquimatoso poseen propiedades contráctiles fagocíticas capaces de proliferar depositando matriz y colágeno.

Las características de la filtración glomerular tienen una extraordinaria permeabilidad al agua y a los solutos de pequeño tamaño. La función de barrera glomerular permite separar las distintas proteínas según su tamaño y su carga eléctrica.

La estructura de las células epiteliales de los túbulos renales varía según los distintos segmentos de la nefrona.

Los mecanismos mediados por anticuerpos pueden iniciar muchas formas de glomerulonefritis ocasionadas por las células T nefritógenas sensibilizadas, como consecuencia de las reacciones de la inmunidad celular, producen algunas formas de lesión glomerular implicadas en el empeoramiento de muchas glomerulonefritis, la presencia en el glomérulo de macrófagos activados y de células T y sus productos.

La alteración de la vía alterna del complemento se produce en la entidad anatomoclínica denominada glomerulonefritis membranoproliferativa, independientemente del depósito de inmunocomplejos.^{9,11}

Cuando los reactantes inmunitarios o células T sensibilizadas se depositan en el glomérulo por la intervención de mediadores y elementos que intervienen en la inflamación aguda y crónica, los neutrófilos infiltran los glomérulos en ciertos tipos de glomerulonefritis debido a la activación del complemento seguida de la formación de agentes quimiotácticos (C5a principalmente) a través de la adherencia inmunitaria mediada por Fc y otros mecanismos, los neutrófilos liberan proteasas, que producen la degradación de la membrana basal glomerular; radicales libres de oxígeno, que causan lesión celular contribuyendo a disminuir la función glomerular.

Los macrófagos, linfocitos y células NK, infiltran el glomérulo durante las reacciones mediadas por anticuerpos y por la inmunidad celular. Las células glomerulares autóctonas son estimuladas y producen algunos mediadores de la inflamación tales como radicales libres, citocinas, factores de crecimiento entre otros poniendo en marcha la respuesta inflamatoria del glomérulo aunque no haya infiltración leucocitaria.

Los mediadores químicos de la inflamación intervienen en la lesión glomerular así como los factores quimiotácticos del complemento estimulando la emigración de leucocitos y de C5b-C9 como componente lítico, además de estimular a células mesangiales elaborando oxidantes como proteasa y otros mediadores. Incluso en ausencia de neutrófilos el C5b-C9 puede producir proteinuria, como se ha propuesto en la glomerulonefritis membranosa. Las citocinas como la interleucina 1 y el factor de necrosis tumoral, provocan adhesión de los leucocitos.

La lesión túbulo intersticial es un componente de muchas glomerulonefritis agudas ya que las células tubulares activadas expresan moléculas de adhesión y elaboran citocinas proinflamatorias.¹²

3. MODELO EXPERIMENTAL

El modelo de estudio es un ratón desnudo et/et; fue observado por primera vez en 1985 en una colonia cerrada no consanguínea de ratones albinos CD1 en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México

Una de sus características principales es la alopecia derivada como resultado de un gen recesivo autosómico simple de la cepa albina CD1, el término “et” se adopto para nombrar a la forma mutante. A este ratón se le llamo CD1 et/et hipotímico debido a que se encontró que los ratones machos de esta cepa presentan un timo rudimentario el cual es aproximadamente la mitad del peso que presentan los animales eutímicos CD1 et/et, mientras que en las hembras de esta misma cepa presentan una estructura parecida a un nódulo linfático en el lugar del timo y el peso de esta estructura es más bajo que el peso del timo de las hembras eutímicas CD1 et/et.

Se ha observado que presentan baja fertilidad, mortalidad alta, lesiones en ojos y una marcada susceptibilidad a problemas cutáneos como abscesos, dermatitis bacteriana y dermatomycosis así como un incremento de la frecuencia de parasitosis, neumonías y signos clínicos de envejecimiento prematuro.

Los ratones et/et presentan autoanticuerpos antifosfolípidos de tipo IgA, IgG, e IgM, autoanticuerpos (anti Ro y anti La), factor reumatoide, y desarrollan una exocrinopatía inflamatoria con daño histopatológico de glándulas salivales y lagrimales que asemeja a los pacientes con SS.^{4, 22, 23.}

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que el síndrome de Sjögren consiste en una enfermedad autoinmune ocasionada por inflamación crónica resultado de una respuesta anómala en el sistema inmunitario caracterizado por la presencia de un proceso inflamatorio con infiltración linfocitaria generando destrucción dirigida contra las células que recubren el interior de las glándulas de secreción externa dirigido por la presencia de complejos inmunes.

Y determinado que las células mesangiales que rodean al glomérulo, promueven la aparición de enfermedades glomerulares mediada por complejos inmunes, por lo que se sugiere puede encontrarse disminución de C3 en el suero quedando comprometida la activación de la vía alterna del complemento, así como la disminución de nitritos.

Tomando en cuenta lo antes descrito se plantea:

¿Se puede establecer si la nefropatía observada en el SS tiene como base la hipocomplementemia (privación de la vía clásica o la vía alterna)?

5. OBJETIVOS

1. Determinar la actividad hemolítica de los sueros de los ratones, evaluando vía clásica y vía alterna de la cascada de complemento.
2. Determinar ceruloplasmina como marcador de proteína de fase aguda.
3. Determinar nitritos como marcador de radicales libres de nitrógeno.

6. HIPÓTESIS

Los ratones que desarrollan el SS deberán mostrar menor porcentaje de actividad de complemento por la vía clásica debido a la presencia de los autoanticuerpos, y los valores de ceruloplasmina y nitritos, en estos ratones que desarrollan el SS, deberán tener mayores niveles que los mostrados por los ratones testigos.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio: Se realizará un estudio observacional, transversal, prospectivo

- **Población de estudio.**

Se utilizarán tres cepas de ratones de la raza CD1 clasificados como:

Ratones (envejecidos 30 semanas)

CD1 +/+ : 5 hembras y 5 machos

CD1 et/+ : 12 hembras y 9 machos

CD1 et/et : 8 hembras y 15 machos

Ratones (Jóvenes 12 semanas)

CD1 +/+ : 5 hembras y 5 machos

CD1 et/+ : 15 hembras y 15 machos

CD1 et/et : 15 hembras y 15 machos

Ratones (Jóvenes 12 semanas)

CD1 +/+ : 15 hembras y 15 machos

CD1 et/+ : 15 hembras y 15 machos

CD1 et/et : 15 hembras y 15 machos

Criterios

- **Inclusión**

CD1 +/+ : hembra y macho

CD1 et/+ : hembra y macho

CD1 et/et : hembra y macho

Con un peso entre 30-45g, que no presenten ningún padecimiento.

- **Exclusión**

Cepas CD1 +/+, CD1 et/+, que no se encuentren entre la edad requerida o presenten padecimientos

- **Eliminación**

Animales que desarrollen infecciones o tumores

Variables:

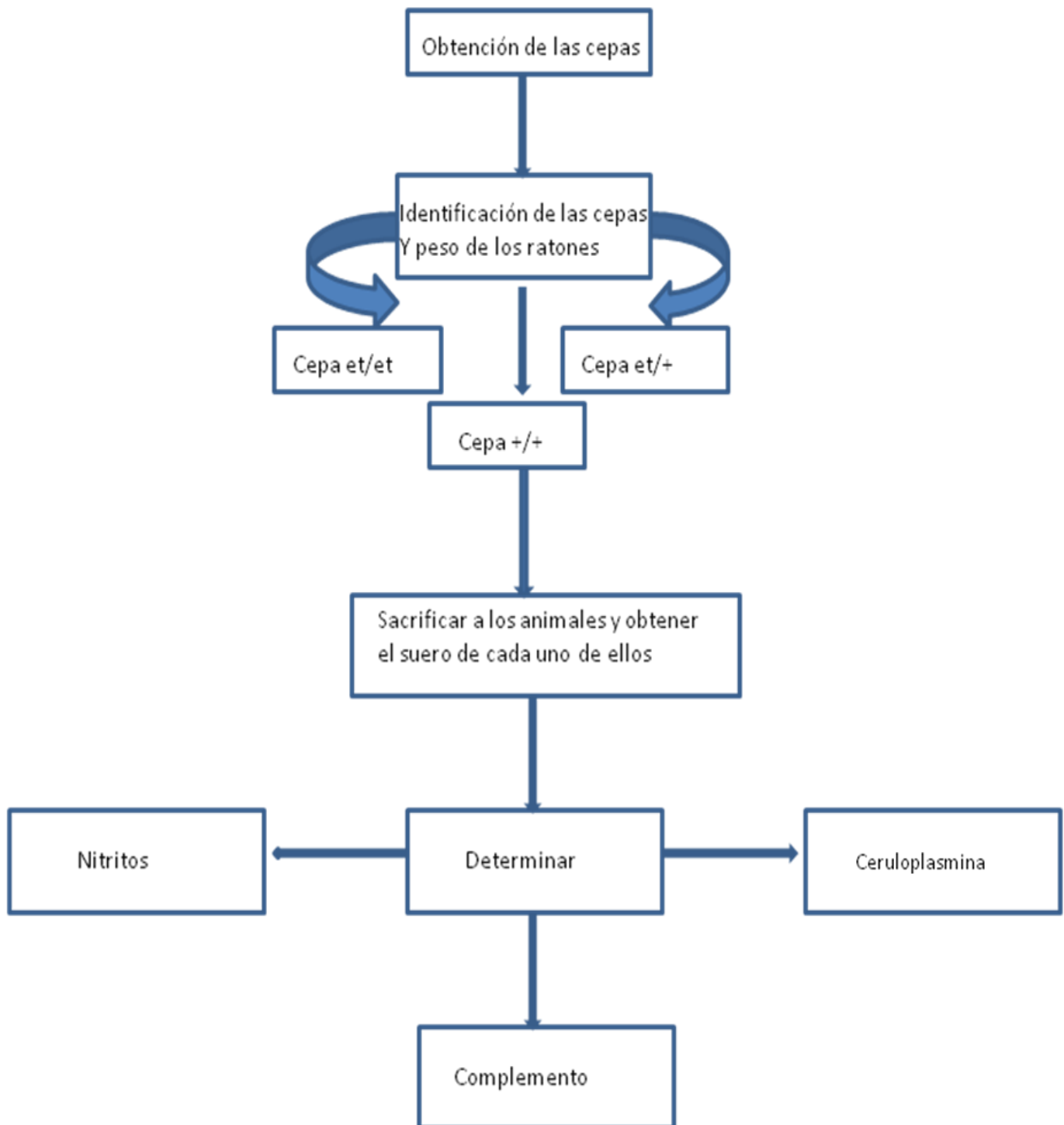
- **Variables independientes:**

Edad
Peso del animal
Peso del riñón
Grado de lesión

- **Variables dependientes:**

Unidades de nitritos
Unidades de Ceruloplasmina
Unidades de complemento

8. DIAGRAMA DE FLUJO



9. MATERIAL

- **Reactivos**

Nombre	Proveedor
Ácido clorhídrico	Merck
Ácido acético	Merck
Agarosa	Bioxon
Azida de sodio	Bioxon
Cadmio metálico	Técnica química S.A
Cloruro de sodio	Hycel de México S.A.
Cloruro de magnesio	JT.Baker
Cloruro de calcio	JT.Baker
Cloruro de amonio	J.T.Baker
EGTA	Sigma Chemical Company
Fosfato de potasio monobásico	Técnica química
Fosfato de sodio	J.T.Baker
Hidróxido de sodio	Merck
N-(1-naftil)-etilendiaminodichlorhidratado (NED)	Merck
Ortofenilendiamina	Sigma Chemical Company
Sulfato de cobre	Técnica Clínica
Sulfato de Zinc	Hycel de México
Sulfanilendiamina	Merck

- **Equipo**

Nombre	Marca
Agitador vortex genie	Scientific Industries Inc.
Agitador Rocker platform	Bellco Glass
Baño metabólico	Precisión Circulating System 253
Campana de extracción	
Centrifuga clínica	Hamilton Bell
Congelador	Tor Rey
Equipo de disección	
Micropipeta de 4-40µl	Finnipipette-Labsystems
Micropipeta de 10-100µl	Labpette-Labnet
Micropipeta de 100-1000µl	BIOHIT Proline
Pipeta automática	Finnipipette, de 20-400µl
Refrigerador	Philips 127 volts-VA

- **Instrumentos**

Nombre

Balanza analítica
Espectrofotometro

Marca

Mettler H33AR
6305 UV/Vis, Jeneway

- **Material Biológico**

- a) Ratones.
- b) Glóbulos rojos de carnero conservados en solución Alsever
- c) Glóbulos rojos de conejo conservados en solución Alsever

- **Material**

Material

Cámara de éter
Celdas
Gradilla
Matraz aforado 100ml, 250ml
Matraz Erlenmeyer 125ml
Mechero Fisher
Papel parafilm
Pinzas
Pipeta graduada 1ml, 2ml, 5ml, 10ml
Pipeta Pasteur
Placas Falcon
Probeta 10ml, 100ml
Tubos de ensayo 13X100mm
Tubos de ensayo 10X75mm
Tubos Eppendorf
Vaso de precipitado 50ml, 100ml, 500ml.

Marca

Kartell

Pyrex
Kimax

ANC

Pyrex
Corning
Falcon
Pyrex
Pyrex
Pyrex
Fisher Brand
Pyrex

10. METODO

- **Obtención de muestras**

1. Pesar los ratones
2. Se anestesian los ratones previamente en una cámara de éter.
3. Sangrarlo mediante el corte de vena axilar (Colocarlo en posición ventral y con un bisturí realice la incisión en el área axilar, colecte la mayor cantidad de sangre.)
4. Una vez formados los coágulos centrifugar a 3500rpm durante 5 minutos.
5. Los sueros obtenidos se colocan en tubos Eppendorf y se mantienen a -20° C hasta su utilización.
6. Mediante disección extraer ambos riñones, pesarlos.

- **Solución de glóbulos rojos de carnero**

1. Lavar los glóbulos rojos por centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos con solución TBS.
2. Ajustar la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% en TBS
3. Colocar en un tubo de 13X100mm 0.3ml de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% adicionar 1.7 ml de agua destilada. Leer la densidad óptica en un espectrofotómetro a 500nm, usando como blanco agua destilada.
4. Ajustar la densidad óptica a 0.5 con la ecuación: $D. 0.1 \times V.1 = D. 0.2 \times V. 2$

- **Solución de glóbulos rojos de conejo**

1. Lavar los glóbulos rojos por centrifugación a 3500rpm por 5 min con solución de TBS libre de calcio.
2. Ajustar la suspensión de glóbulos rojos de conejo al 2% en TBS libre de calcio
3. Colocar en un tubo 13X100mm 0.3ml de la suspensión de glóbulos rojos de conejo al 2% adicione 1.7 ml de agua destilada. Leer la densidad óptica en un espectrofotómetro a 500nm usando como blanco agua destilada.
4. Ajustar la densidad óptica a 0.5 con la ecuación $D.O.1 \times V.1 = D.O.2 \times V.2$

- **Determinación de complemento Vía Clásica**

Método:

1. Colocar en cada tubo de 10X 75 mm 25µl de cada suero de ratón, 75µl de TBS y 50µl de glóbulos rojos de carnero sensibilizados.
2. Incubar a 37°C durante 30 min, empleando agitación cada 5 min. Se detiene la reacción con 1ml de TBS frío.
3. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 min. Se elimina el sobrenadante y el paquete se lisa con 1ml de agua destilada.
4. Leer en el espectrofotómetro a 500nm.
 - ✓ Testigo positivo: 50µl de glóbulos rojos + 1ml de agua destilada.
 - ✓ Blanco: 50µl de glóbulos rojos de carnero sensibilizados + 1ml de TBS

- **Determinación de complemento Vía Alterna**

Método:

1. Colocar en cada tubo de 10X75mm 50µl de suero de ratón, 50µl de TBS libre de calcio y 50µl de glóbulos rojos de conejo al 1% sin sensibilizar.
2. Incubar a 37°C durante 30min. Con agitación cada 5min.
3. Detener la reacción con 15µl de EDTA 0.2M
4. Centrifugar a 3500rpm por 10 min. Eliminar el sobrenadante y el paquete se lisa con 1ml de agua destilada.
5. Centrifugar a 3500rpm durante 5 min.
6. Leer el sobrenadante en el espectrofotómetro a 500nm
 - ✓ Testigo positivo: 50µl de glóbulos rojos de conejo +1ml de agua destilada
 - ✓ Blanco: 50µl de glóbulos rojos de conejo + 200µl de TBS libre de calcio

- **Determinación de Ceruloplasmina por inmunodifusión radial**

Método:

- Preparación de las placas:

1. Pesar 0.3g de agarosa
2. Colocar la agarosa en un matraz de 250ml y agregar 30ml de agua.
3. Esterilizar
4. Dejar enfriar y agregar 0.1g de azida de sodio.
5. Se colocan 2ml de agarosa con una pipeta graduada a los tubos por utilizar
6. Se coloca a baño María a 45°C durante 10 min.
7. A cada tubo se le agregan 200µl de suero de conejo anticerculoplasmina y se agita.
8. Cada uno de los tubos se vacía en los pozos de las placas Falcon, evitando la presencia de burbujas.
9. Las placas se dejan reposar hasta alcanzar la solidificación.
10. Se realizan 4 perforaciones de 3mm en cada contenedor con agarosa y se utiliza el mismo día de la preparación.

- Procesamiento de la muestra:

1. Se colocan 5µl de cada muestra problema en el orificio de los pozos de las placas.
2. Estos se identifican de acuerdo a la numeración de cada muestra.
3. Las placas se refrigeran durante 48h.
4. A las 48h se mide el halo de inhibición con una regla milimétrica.

- **Determinación de nitritos por el método de Griess**

Método:

Plateamiento de cadmio:

1. En tubos de 13X100mm se colocan 0.5g de cadmio metálico
2. Se agregan 2ml de sulfato de cobre al 5%
3. Se agita en un Rocker por 10min.
4. Se lavan 3 veces con agua destilada para eliminar el cobre
5. Se lava una vez más con ácido clorhídrico 0.1N, para remover el hidróxido de cadmio
6. Se lava el cadmio con cloruro de amonio al 5%

- Procesamiento de la muestra

1. En un tubo de 13X100mm se adicionan 100µl de suero
2. Se adicionan 300µl de agua destilada
3. Se agregan 20µl de solución de sulfato de zinc al 30%, se mezcla perfectamente
4. Se centrifuga a 10 000rpm por 5min.
5. Al tubo con cadmio activado se les retira el cloruro de amonio y se adiciona al tubo todo el sobrenadante de la muestra y se deja en agitación durante 15 min.
6. Se centrifugan a 3500rpm durante 5 min, se toman 200µl del sobrenadante.
7. Se prepara una solución de 2µg/ml de estándar de nitritos (nitrito de sodio)

▪ **Curva estándar por el método de Griess**

Tubo	Estandar (μL)	Agua destilada (μL)
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
Muestras	200 del sobrenadante	700

8. Adicionar 50μL de sulfanilamida. Incubar por 10 min. (Temperatura ambiente)

9. Adicionar 50μL del reactivo de NED, se mezcla e incuba por 30min. (Temperatura ambiente)

10. Leer a 540nm

DISEÑO ESTADISTICO

Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete estadístico SPSS versión 11.0 para MS Windows. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante análisis de varianza de un factor seguido de la prueba de Tukey, así como correlación de Pearson.

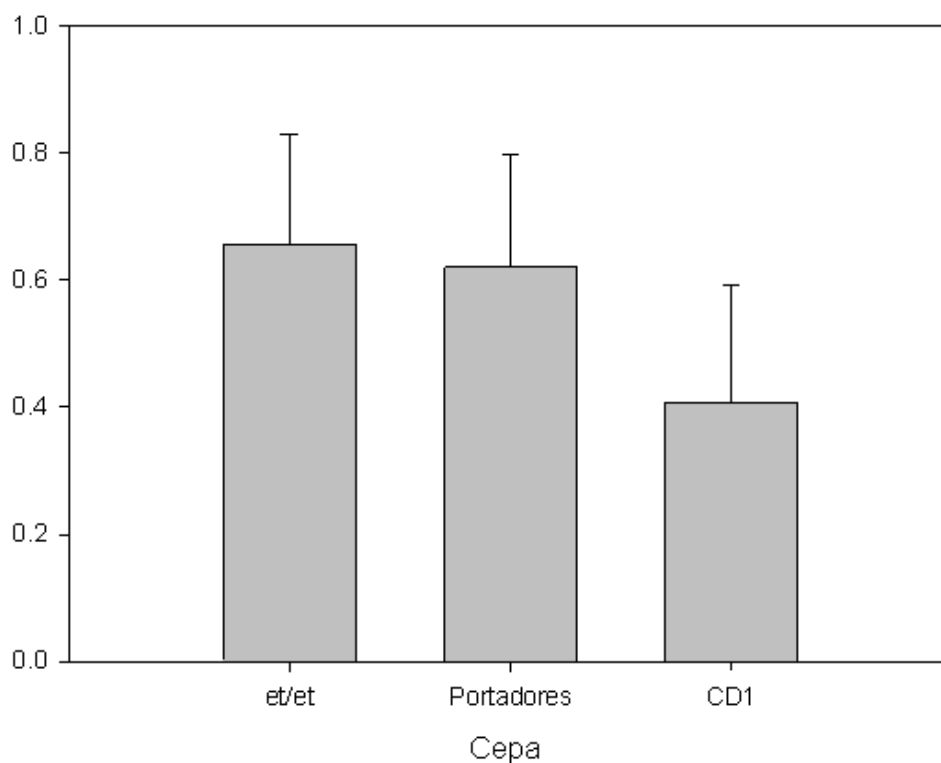
11. RESULTADOS

Para la evaluación de los resultados del presente trabajo se empleo el programa SPSS versión 21, se realizaron las técnicas de t de Student y ANOVA. Al realizar el análisis de varianza, a los resultados obtenidos de la inmunidifusión radial para la determinación de ceruloplasmina en suero no presento asociación del incremento de la concentración de ceruloplasmina con ninguna cepa (P= 0.624). Con respecto a la determinación de nitritos en suero de ratón el análisis de varianza no mostro diferencia significativa entre los grupos (P= 0.654).

En el análisis de varianza para los pesos absolutos de hígado, riñón así como los pesos corporales, y se encontró que los ratones et/et presentan un mayor peso de riñón comparados con los pesos de riñones de los ratones CD1, no hay diferencia significativa con respecto a los ratones et/+ (P=0.763). Ver gráfica 1. Para los valores de índice hepático se encontró diferencia significativa con la población de ratones et/et, en donde presenta un mayor peso comparado con los pesos de hígado de los ratones CD1, no hay diferencia significativa con respecto los ratones et/+ (P=0.972). Ver gráfica 2. En los valores de peso corporal se encontró diferencia significativa con la población de ratones et/+, en donde presenta un mayor peso comparado con los pesos corporales de los ratones CD1, no se presenta diferencia significativa con respecto a los ratones et/et (P= 0.937). Ver gráfica 3. Se presento un alto índice de lesiones oculares para la población de ratones et/et en comparación con los ratones et/+ y CD1. Ver gráfica 4. Se presenta un incremento en lesiones oculares con respecto al sexo de los ratones et/et lo que muestra que los machos presentan mayor número de lesiones oculares con respecto a las hembras. Ver gráfica 5.

En el grupo de ratones jóvenes no se encontró diferencia significativa entre los grupos para niveles de concentración de nitritos en suero de ratones (P= 0.869). El análisis de varianza para la determinación de unidades de complemento por la determinación de porcentaje de actividad lítica no presento diferencia significativa por vía clásica (P= 0.631), ni por vía alterna (P= 0.103) entre los grupos. El análisis de varianza con respecto a los resultados obtenidos en la determinación de ceruloplasmina en suero de ratones presenta diferencia significativa (P=0.002). Ver gráfica 6. En cuanto a la presencia de lesiones oculares, la población de ratones et/et presento pocas lesiones, en su mayoría las presenta en su primera etapa, inflamación, mientras que para las cepas et/+ y CD1 no presentan lesiones oculares. Ver gráfica 7.

COMPARACIÓN DE MEDIAS CON RESPECTO AL PESO DE RIÑÓN EN LOS RATONES VIEJOS.



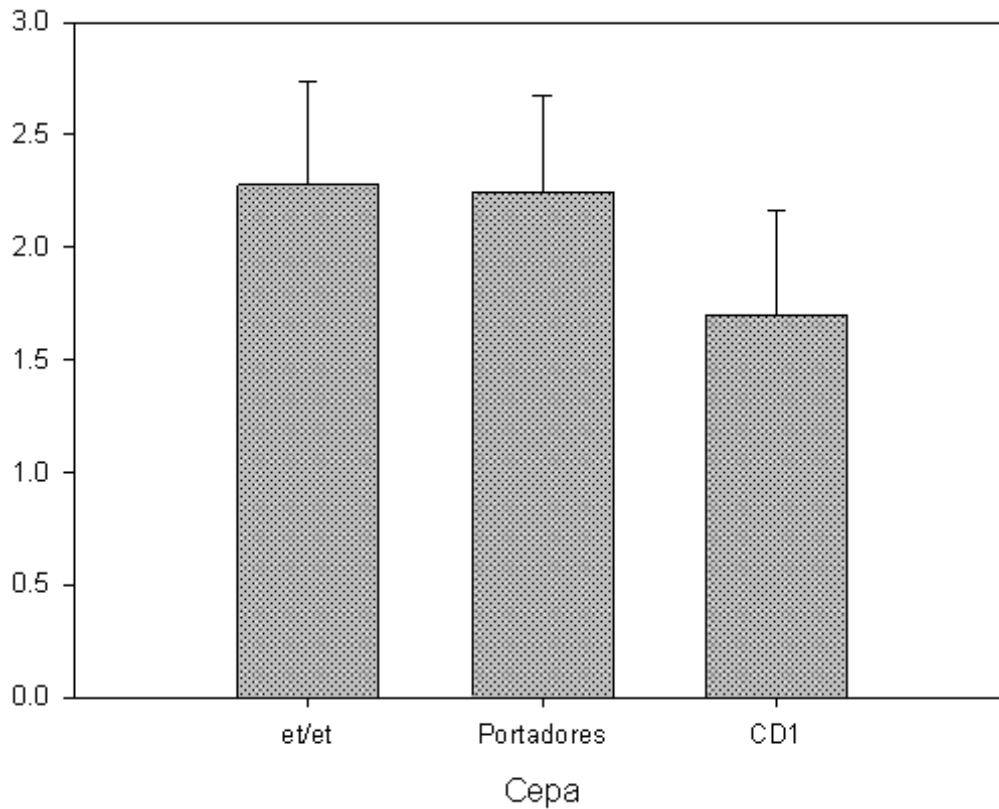
Gráfica 2. Peso de riñón CD1^a P= 0.002 (ANOVA).

CEPA	MEDIA	ERROR
et/et	.65690	.171697
Portadores	.61954	.177106
CD1	.40720	.185214

Cuadro 2. Comparación de medias con respecto al peso de riñón, analizados mediante ANOVA con diferencia significativa ($p < 0.05$), con una confianza del 95%.

Para el peso de riñón contra cepas se encontró que los ratones et/et presentan aumento en el peso de riñón.

COMPARACIÓN DE MEDIAS CON RESPECTO AL PESO DE HÍGADO EN LOS RATONES VIEJOS.



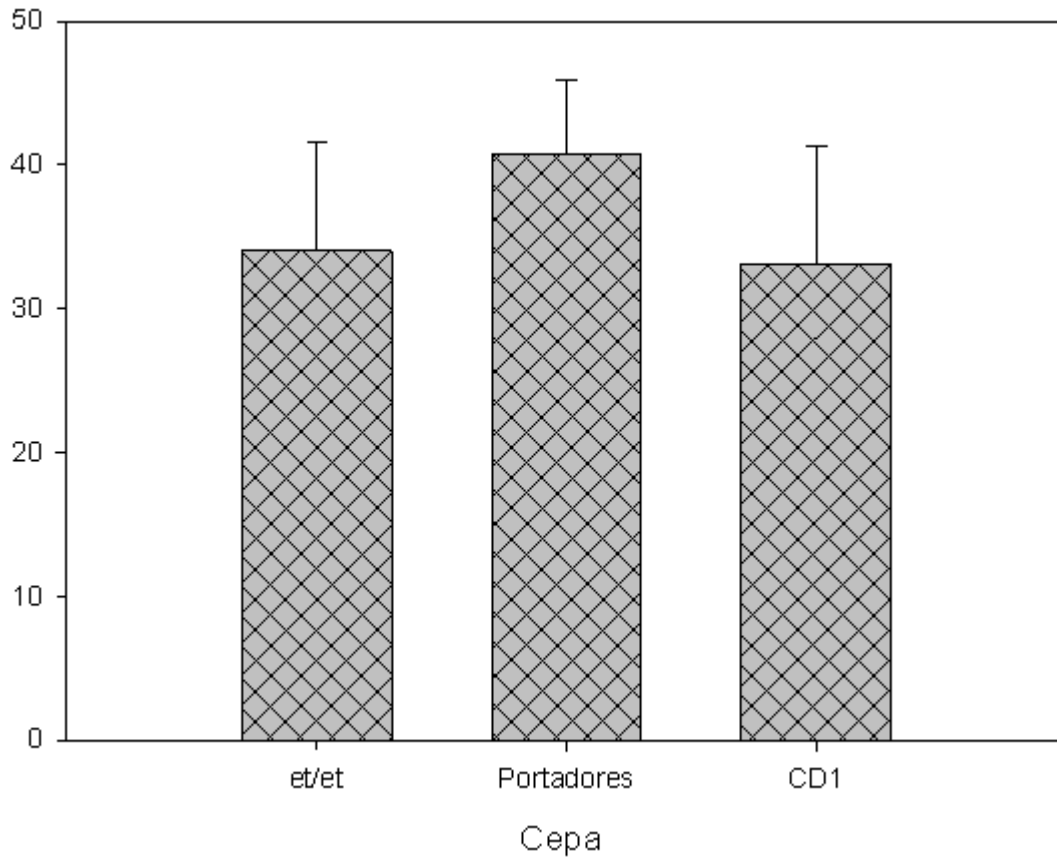
Gráfica 1. Peso de hígado CD1^a P= 0.003, (ANOVA).

CEPA	MEDIA	ERROR
et/et	2.2774	.45795
Portadores	2.2467	.42913
CD1	1.7020	.46404

Cuadro 1. Comparación de medias con respecto al peso de hígado, analizados mediante ANOVA con diferencia significativa ($p < 0.05$), con una confianza del 95%.

En la evaluación en cuanto al peso de hígado contra cepas, se encontró diferencia significativa $P=0.003$ (Gráfica 1)

COMPARACIÓN DE MEDIAS CON RESPECTO AL PESO CORPORAL EN LOS RATONES VIEJOS.

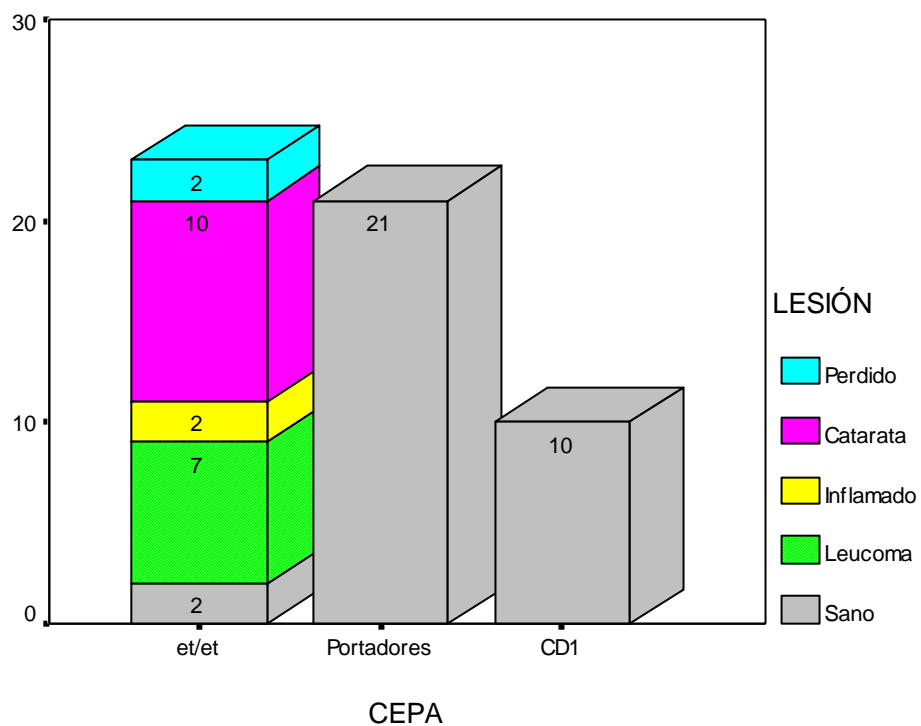


Gráfica 3. Peso corporal portadores^a P= 0.003 (ANOVA).

CEPA	MEDIA	ERROR
et/et	34.0000	7.63366
Portadores	40.7143	5.22631
CD1	33.1000	8.26573

Cuadro 3. Comparación de medias con respecto al peso de los ratone, analizados mediante ANOVA con diferencia significativa ($p < 0.05$), con una confianza del 95%.

NÚMERO DE CASOS DE LAS ALTERACIONES OCULARES EN LOS RATONES VIEJOS.

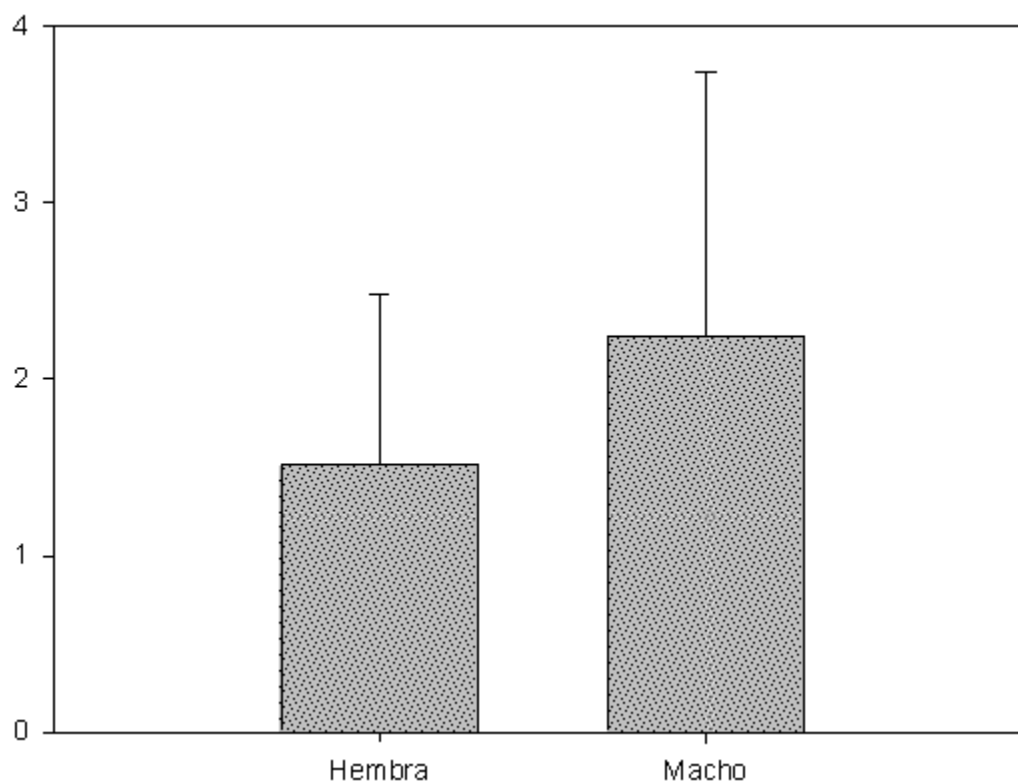


Gráfica 4. Número de casos de alteraciones oculares.

CEPA	SANO (%)	INFLAMADO (%)	LEUCOMA (%)	CATARATA (%)	PERDIDO (%)
et/et	8.7	8.7	30.4	43.5	8.7
Portadores	100	0	0	0	0
CD1	100	0	0	0	0

Cuadro 4. Recuento porcentual de alteraciones oculares en cada una de las cepas

NÚMERO DE CASOS DE LAS ALTERACIONES OCULARES EN LOS RATONES CON RESPECTO AL SEXO; RATONES VIEJOS.

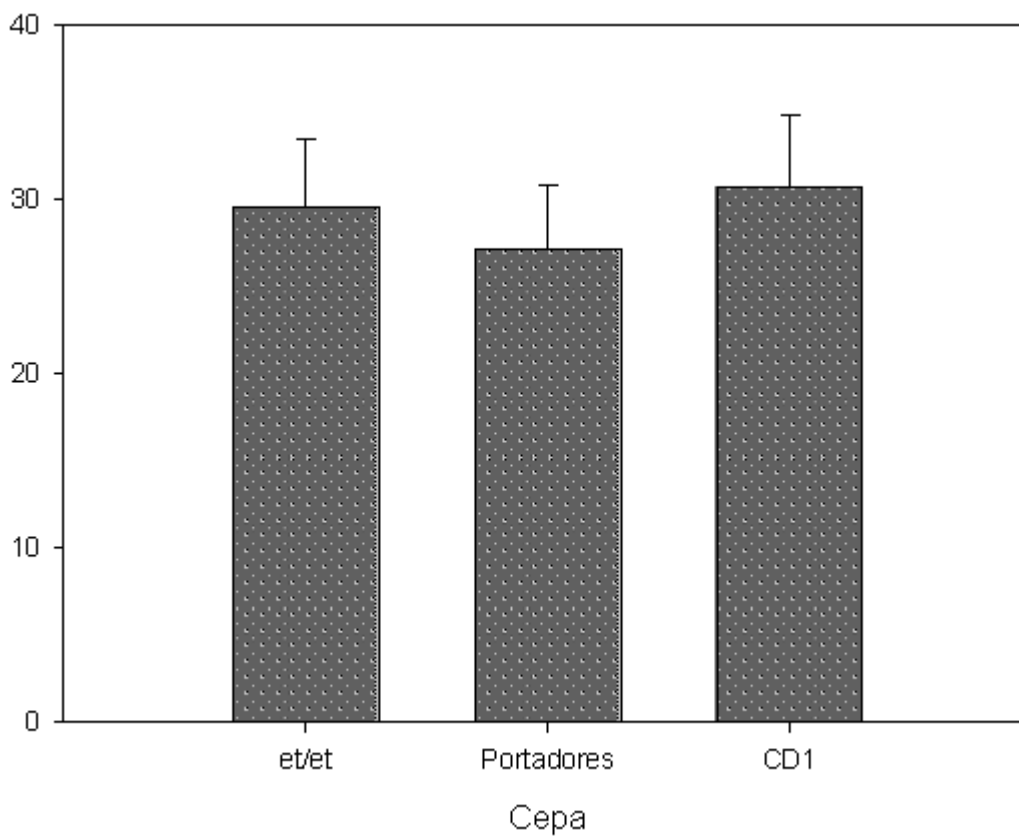


Gráfica 5: Medias \pm error estándar. $P= 0.044$ (t Student)

CEPA	MEDIA	ERROR
Hembra	1.5200	.96264
Macho	2.2414	1.50369

Cuadro 5: Comparación de medias en número de casos de lesiones oculares con respecto al sexo en ratones viejos, analizados con diferencia significativa ($p < 0.05$), con una confianza del 95%.

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE CERULOPLASMINA EN EL SUERO DE LOS RATONES (RATONES JÓVENES)

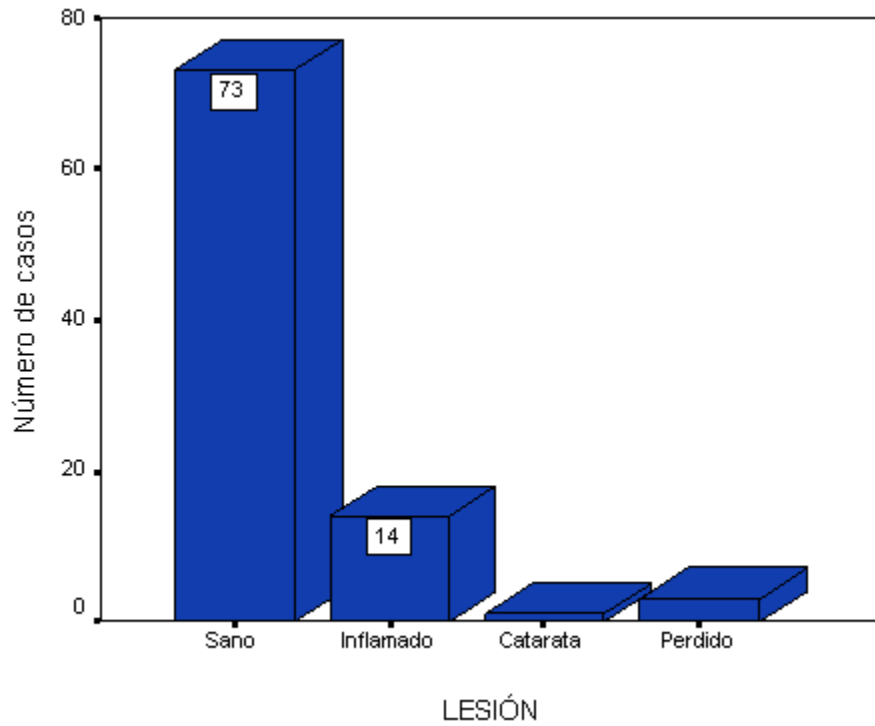


Gráfica 6. Concentración de ceruloplasmina (mg/dL) Portadores ^a P= 0.002 (ANOVA).

CEPA	MEDIA	ERROR
et/et	29.6129	3.91167
Portadores	27.1800	3.61085
CD1	30.7667	4.04358

Cuadro 6. Comparación de medias de las concentraciones de ceruloplasmina, analizados mediante ANOVA con diferencia significativa ($p < 0.05$), con una confianza del 95%.

NÚMERO DE CASOS DE LAS ALTERACIONES OCULARES EN LOS RATONES JÓVENES



Gráfica

7.

Número de casos de alteraciones oculares.

CEPA	SANO (%)	INFLAMADO	CATARATA	PERDIDO
et/et	80%	15.4	1.1	3.3
Portadores	100%	0	0	0
CD1	100%	0	0	0

Cuadro 7. Recuento porcentual de alteraciones oculares en cada una de las cepas.

12. ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que los ratones et/et y portadores presentan un aumento en el tamaño de riñón e hígado en comparación con los ratones testigo CD1, lo cual deja ver que se presenta un síntoma de inflamación, esto por la alteración de las bases morfológicas del endotelio por acción de los mediadores químicos. Es claro inferir que el riñón presenta un edema con infiltración celular que conlleva un aumento inicial en el peso del mismo, conforme la lesión avanza habrá pérdida de masa muscular así como de función renal. Este proceso inflamatorio es semejante al que ocurre en las glándulas exocrinas. Algunos autores mencionan que los índices glandulares de las submaxilares de los ratones et/et alcanzan su máximo tamaño a las 19 semanas, mientras que para las lagrimales se alcanza su máximo entre las 22 y 26 semanas de edad, también se reporta que la severidad de las lesiones aparece a partir de la semana 22 e incrementa conforme avanza la edad, correspondiendo al máximo tamaño glandular alcanzado por la cepa et/et.⁴

La enfermedad renal se asocia con los pacientes con SSp sobre todo la nefritis intersticial tubular, así como acidosis tubular renal. Las lesiones renales en SSp se deben a la presencia de complejos inmunitarios subendoteliales glomerulares ocasionando daño.

Cuando los reactantes inmunitarios o células T sensibilizadas se depositan en el glomérulo, se sospecha que los mediadores son elementos que intervienen habitualmente en la inflamación aguda y crónica. Los macrófagos, linfocitos y células NK, infiltran al glomérulo cuando se producen reacciones mediadas por anticuerpos, que los factores quimiotácticos del complemento estimulan la migración de leucocitos, a las lesiones dependientes del complemento-neutrófilos, activando la producción del complejo lítico C5-9, dañando las células de la membrana basal glomerular. Es posible que estas células sean estimuladas y produzcan mediadores de inflamación tales como radicales libres de oxígeno, citocinas, factores de crecimiento, óxido nítrico, y endotelina, haciendo posible la activación local de la cascada de coagulación en consecuencia de la activación de la cascada de complemento.¹³

Con base a los resultados presentados de concentraciones séricas de nitritos y ceruloplasmina en los ratones no presentan incrementos significativos esperados, asociados a los síntomas de inflamación, los cuales podrían haberse consumido por la activación de la cascada de complemento y la cascada de coagulación, ya que se sabe que el óxido nítrico, contribuye a producir proteínas antihemolíticas.²⁴

En el caso de las lesiones oculares se encontró una correlación significativa para los ratones desnudos et/et, con un alto porcentaje de incidencia en cuanto a la presencia de leucoma y catarata, asociado a los pacientes con SSp, ya que estos la pueden desarrollar posterior a una inflamación, infecciones recurrentes de los ojos, generados por la xeroftalmía que presentan.

Mientras que para el grupo de ratones jóvenes, se encontró correlación con la cepa et/et, pero en un menor porcentaje de incidencia en las lesiones, contando con un 80% de ratones sanos.

Y los resultados observados en los niveles séricos de ceruloplasmina para este grupo se encuentra relacionados con las lesiones oculares presentes en la población de ratones jóvenes, por encontrarse con un incremento significativo, anunciando la presencia de inflamación aguda.

Se conoce que las enfermedades autoinmunes generan complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ab), que inducen la activación del complemento por vía clásica, el complemento activado genera factores que atraen leucocitos polimorfonucleares, así como sus enzimas lisosómicas, iniciando lesiones a diversos órganos, afectando la calidad de vida de los pacientes.

Dado que los ratones et/et presentan los complejos Ag-Ab, por la presencia de autoanticuerpos estos comprometen la activación de la vía clásica de la cascada del complemento; En el presente trabajo se encontró un dato interesante, en donde se presenta la activación de la vía clásica, activando la vía alterna en la cascada de complemento, siendo directamente proporcional una con la otra, activando el complejo de ataque a la membrana.

En la vía alterna se involucran cuatro proteínas séricas: C3, factor B, Factor D y properdina, siendo las más importantes los factores B y D. Cuando se genera C3b de la vía clásica, está es capaz de activar a B, la interacción entre C3b y el factor B estabilizados por properdina genera el complejo C3bB, tras la unión el factor D rompe al factor B, generando Ba que queda liberado en el medio mientras que Ba se une al complejo C3bB, formando C3bBb. El complejo C3bBb posee actividad enzimática sobre C3, por ende C3bBb se conoce como la convertasa C3 formando C3a que es liberado al medio y C3b se une al C4bC2a de la vía clásica generando más convertasa de C5 activando el complejo de ataque a la membrana.⁷

Cabe mencionar que el sexo no es un factor predisponente para la presencia de inflamación aguda así como la presencia de lesiones oculares.

La hipocomplementemia es detectada en el 84% de los pacientes con SSp, niveles bajos de C3 en 42% y niveles bajos de C4 en 39%. Pacientes con niveles bajos de C4 presentan una alta prevalencia de neuropatía periférica así como la xeroftalmia presente. Para los resultados antes mencionados no se presentan resultados significativos que demuestren una hipocomplementemia en los ratones; sin embargo si se presentan lesiones oculares en los ratones, asociado a un consumo en la cascada de complemento.³¹

13. CONCLUSIONES

- ❖ La presencia de lesiones en los ratones et/et se asocia al consumo de las unidades de complemento por la presencia de complejos inmunes.
- ❖ Se logra determinar que la cepa et/et presenta un incremento en peso de riñón e hígado asociado a la presencia de inflamación crónica.
- ❖ Se logra determinar que la cepa et/et presenta un incremento en los niveles de ceruloplasmina, con lo que se logra establecer su participación en un proceso inflamatorio.
- ❖ Se logra establecer una correlación directamente proporcional en la activación de la vía clásica y la vía alterna.

14. REFERENCIAS

1. Hales B, Tadures M. and Ngunyen Q. Sjogren Syndrome: An old tale with a now twist. Arch.Immunol. Ther. Exp. 2009;57: 57-66
2. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby M. Inmunología 5a edición. McGraw Hill México 2004: 316-336
3. Rojas-Espinosa O. Oltra A, Arce P. Mendez Patricia. Inhibition of complement activity in murine leprosy. International Journal of leprosy 1991; 59: 605-612.
4. Marroquín Segura R, Martínez Rodríguez C F, García Burciaga M M, Calvillo Esparza R, Flores Pimentel M, Exocrinopatya in the CD1 et/et hypotymic mouse resembling Sjögren syndrome. Vet Mex 2003; 34(2): 129-141.
5. Kenneth Murphy. Janeway's Immunology 7a edition. Pauls Traver Mark Walport New York 2008: 61-108
6. Arturo Ferreira V. Alejandro Afanl. S, Paola Lanza B, Juan Carlos Aguilon G. Inmunología Básica y Clínica. Mediterranea Buenos aires 2005: 168-184.
7. Arce Mendoza Alma Y. Inmunología e inmunopatología. Manual Moderno México 2009: 27-53.
8. Perham Peter. Inmunología 2ª edición Panamericana. México 2006: 247-302.
9. McPhee Stephen J. Diagnostico clínico y tratamiento. 48ª edición Mc GrawHill. México 2009: 741-742.
10. Levy Mathew N. Fisiología. 4ª edición Elsevier. Paris 2006:193-206.
11. Chandrasoma Parakrama. Patología general 2ª edición. El Manual Moderno Bogota 1994: 757-773
12. Rubin E, Farber J. L.Patología 2ª edición Panamericana México 1990:757-778.
13. Cotran RS. Patología estructural y funcional 6ª edición. Mc GrawHill Interamericana México 2004: 972-990.
14. Eales JL. Immunology or life scientist 2ª edición. Wiley. Londres 2003: 75-84.
15. Benacerraf B. Benacerraf Baruj, Unanue Emil R. Inmunología 2ª edición. Panamericana México 1989: 181-197.
16. Leskowitz S, Benjamín E. Immunology a short course. 4a edición. Wiley –Liss Inc. Publication. New York 1993: 221-222.

-
17. Cruz Barrera Antonio. Abordaje, Diagnostico, Tratamiento y seguimiento de Síndrome de Sjögren Primario. Secretaría de Salud. México 2010.
 18. Johnsson R, Vogelsan P, Espinoza A, Appel S. The complexity of Sjögren`s syndrome: Novel Aspects on Pathogenesis. Immunology Letters 2011;141: 1-9.
 19. Galvés J, Saís E, Lopez P, Carrillo A, et al; Diagnostics evaluation and classification criteria in Sjögren Syndrome. Elsevier Masson 2009;79:44-49.
 20. Mostafa Saninaz, Seamon Vanessa, Azzarolo Ana Maria. Influence of sex hormones and genetic predisposition in Sjögren Syndrome: A new clue to the immunopathogenesis of dry eye disease. Experimental Eye Research 2012;96:88-97.
 21. Yapur MN, Bustos F, González A, Negri A. Ceruloplasmina: Determinación de su actividad ferroxidasa. Acta Bioquímica Clínica latino. 2007; 41(3):347-51.
 22. Marroquín R, Lara MA, Calvillo R, y col. Exocrinopatía mostrada en el ratón Hipotimico CD1 et/et que semeja al síndrome de Sjögren. Vet. Méx 2003; 34(2): 129-141.
 23. Rojas O, Marroquín-Segura R, Wek K, Reyes E, Arce P. Susceptibility of “et” the spontaneously mutating CD1-derived Nude Mous, to infection of M. Lepraemurium. International Journal of leprosy 1998; 67(1): 46-51.
 24. Viant F, Fonseca CJ, García R, Martínez P. Óxido nítrico, importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. Medisan 1998;2:45-53.
 25. Lira V, Arredondo R. óxido nítrico:un héroe disfrazado de villano. Revista elemento, ciencia y cultura 2004;11:11-17.
 26. Goules A, Masouridi S, Tzioufas AG, Ioannidis JP, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Clinically significant and biopsy documented renal involment in primary Sjögren syndrome. Medicine (Baltimore) 2000;79:241-9
 27. Gorriz L, Molino M, Arjona D, Estripeaut D. Sjögren syndrome associated whit renal tubular acidosis type II. Departamento de medicina, hospital de Santo Tomas. Rev med Panama 2000;25:30-33
 28. Bérron R, Paniagua M, Benitez J, Alvarez J, Galicia L. El sistema de complemento. Vía clásica y de la lectina que se une a la manosa. Alergia, asma e inmunologías pediátricas 2003; 12(3):75-81.
 29. Boos L, Campbell L, Ames R, Wetsel R, Barnum W, and Scott R. Deletion of the complement anaphylotoxin C3a receptor attenuates, whereas ectopic expression of C3a in the brain exacerbates, experimental autoimmune encephalomyelitis. The journal of immunology 2004;173:4708-14

-
30. Morgan B, Griffiths M, Khanom H, Taylor S, Neal J, Blockade of the C5a receptor fails to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. Clin exp immunol 2004;138:430-38.
 31. Solís González A. Determinación de constantes de unidades del complemento vía clásica y alterna en ratones CD1 et/et y su relación histopatológica de daño renal. Tesis de licenciatura. México D.F. FES Zaragoza, UNAM; 2005