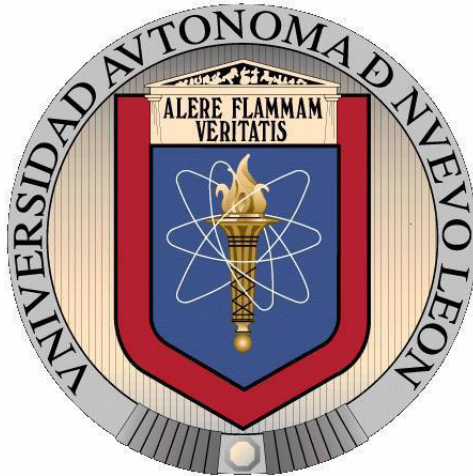


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

UTILIDAD DE LA $\beta 2$ MICROGLOBULINA SALIVAL COMO BIOMARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE SJÖGREN

POR

JANETT CARMEN LUZMILA RIEGA TORRES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

DICIEMBRE, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

UTILIDAD DE LA β 2 MICROGLOBULINA SALIVAL COMO BIOMARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE SJÖGREN

POR

DRA. JANETT CARMEN LUZMILA RIEGA TORRES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

DICIEMBRE, 2016

UTILIDAD DE LA β 2 MICROGLOBULINA SALIVAL COMO BIOMARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE SJÖGREN

Aprobación de la tesis.

Dr. C. Mario Alberto Garza Elizondo
Director

Dr. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez
Co – director

Dr. med. Cassandra Michelle Skinner Taylor
Comisión de tesis

Dr. med. Dionicio Ángel Galarza Delgado
Comisión de tesis

Dr. med. Jorge Antonio Esquivel Valerio
Comisión de tesis

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Sub-director de estudios de Posgrado

*“Si he visto más allá que otros hombres, es porque
he estado parado en hombros de gigantes”*

Sir Isaac Newton
Físico Inglés
(1643-1727)

*“Aquel que se atreve a desperdiciar una hora de tiempo
no ha descubierto el valor de la vida”*

Charles Darwin
Biólogo y geólogo inglés
(1852-1934)

*“El punto culminante de la vida es la comprensión de la
vida”*

George Santayana
Filósofo y poeta español
(1863-1952)

UTILIDAD DE LA β 2 MICROGLOBULINA SALIVAL COMO BIOMARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE SJÖGREN.

Por:

Janett Carmen Luzmila Riega Torres

Este trabajo se realizó en el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” con la ayuda invaluable de los siguientes servicios:

- Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina
- Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario
- Servicio de Anatomía patológica del Hospital Universitario
- Servicio de Periodoncia de la Facultad de Odontología

Todos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Sin la ayuda conjunta de todos estos servicios no se hubiera podido concretar este gran proyecto por lo cual agradezco y reconozco la gran labor de todos los integrantes que apoyaron para su culminación.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por darme la oportunidad de tener salud y vida para realizar este proyecto.

A mi esposo por todo su amor, apoyo y paciencia, por todas las experiencias que hemos vivido y por las que nos faltan por vivir.

A mis hijas Valeria y Sofía por ser el motor y soporte de mi vida que sin ellas mi vida estaría vacía y sin un balance perfecto.

A mis padres Oscar y Dora (QEPD) por todas sus enseñanzas y consejos, ya que sin ellos nunca habría podido llegar hasta aquí.

A mis Hermanos Oscar, Rosa, Manuel, Liliana y Eric por darme su cariño fraterno.

Al Dr. C. Mario A. Garza Elizondo al aceptar dirigir esta tesis y por darme todo el apoyo que se necesita para continuar con este proyecto que está dando buenos frutos.

A la Dr.C. Celia Sánchez Domínguez, Profesora del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., por aceptar co-dirigir la presente tesis doctoral.

Al Dr. med. Dionicio A. Galarza Delgado, Dr. med. Jorge A. Esquivel Valerio y al Dr. med. Cassandra M. Skinner Taylor por participar como miembros de la Comisión de tesis doctoral y por su apoyo incondicional.

Al Dr. med David Vega Morales por su enorme apoyo en el análisis estadístico y a mis amigas Dra Lorena Pérez Barbosa y Brenda Roxana Vazquez Fuentes por estar siempre ahí en el momento en que las necesité, Infinitas gracias

también a la Dr. Med. Diana Elsa Flores Alvarado que me apoyó en todo momento.

A los pasantes de Servicio Social Amaury Valdez Mancha, al Dr. Antonio J. Villarreal González, Mario Alberto Treviño y a Saúl Vázquez de nuestro Servicio de Reumatología por participar como colaboradores del presente estudio y compartir mi interés por la Reumatología Clínica.

Al brillantísimo estudiante de la Carrera de MCP Nicolás S. Alfaro Espinoza por su tenacidad y ayuda incondicional.

A Los Químicos de nuestro laboratorio de inmunología Diana y Andrés por su ayuda constante.

A todo el personal académico y administrativo que conforma al Servicio de Reumatología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la U.A.N.L. por su constante apoyo, soporte y confianza.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

Abreviatura	Significado
β 2M	β 2-microglobulina
°C	Grados Celsius
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
ACA	Anticuerpos anticentrómero
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMA	Anticuerpos antimitocondriales
ANA	Anticuerpos antinucleares
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AUC	Área bajo la curva
CBP	Cirrosis biliar primaria
cc	Centímetros cúbicos
CRP	Proteína C-reactiva
DHEA-S	Dehidroepiandrosterona
E-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos epidérmicos
ELISA	Ensayo de inmuno-adsorción ligado a enzima
EPI	Enfermedad pulmonar intersticial
ESP	Esclerosis sistémica progresiva
FR	Factor reumatoide
GG3PDH	Gliceraldehído 3 - fosfato deshidrogenasa
GMN	Enfermedad glomerular membranosa
BGSM	Glándula salival menor
H0	Hipótesis nula
H1	Hipótesis alterna
HHA	Hipotálamo Hipófisis Adrenal
IC	Intervalo de confianza
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
KCS	Queratoconjuntivitis
kDa	Kilo-Daltones
LAPI	Inmuno-ensayo de aglutinación de látex fotométrico
LES	Lupus eritematoso sistémico
ND	No disponible

ng	Nano-gramo
NIL	Neumonía intersticial linfocítica
NINE	Neumonía intersticial no específica
NIU	Neumonía intersticial usual
NO	Neumonía organizada
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SS	Síndrome de Sjögren
SSp	Síndrome de Sjögren primario
SSs	Síndrome de Sjögren secundario
SSNI	Síndrome seco no inmunológico
TACAR	Tomografía Computada de Alta Resolución
VEB	Virus Epstein-Barr
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VSG	Velocidad de Sedimentación Globular

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO.....	1
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES DIRECTOS.....	23
CAPÍTULO 3: JUSTIFICACIÓN.....	29
CAPÍTULO 4: ORIGINALIDAD Y CONTRIBUCIÓN.....	30
CAPÍTULO 5: HIPÓTESIS.....	31
CAPÍTULO 6: OBJETIVOS.....	32
CAPÍTULO 7: MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
CAPÍTULO 8: RESULTADOS.....	46
CAPÍTULO 9: DISCUSIÓN.....	56
CAPÍTULO 10: CONCLUSIONES.....	61
CAPÍTULO 11: REFERENCIAS.....	62
CAPÍTULO 12: RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	84

RESUMEN

UTILIDAD DE LA β 2 MICROGLOBULINA SALIVAL COMO BIO-MARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE SJÖGREN.

Introducción. El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune crónica cuya principal manifestación clínica es la sequedad oral (xerostomía) y ocular (xeroftalmia); se caracteriza por la infiltración mono-nuclear progresiva de las glándulas exocrinas y puede afectar una variedad de órganos y sistemas; esta enfermedad tiene un diagnóstico complejo, con un impacto en la calidad de vida de los enfermos. El objetivo de este trabajo fue determinar la utilidad de la β 2 microglobulina (β 2M) salival como bio-marcador diagnóstico en pacientes con SS.

Material y métodos. Se realizó un estudio transversal, comparativo y observacional en el que se evaluaron pacientes divididos en 4 grupos: Síndrome de Sjögren primario (SSp), Síndrome de Sjögren secundario (SSs), Síndrome seco sin enfermedad auto inmune (SSNI) y además se incluyó como grupo control un grupo de sujetos sanos. Se cuantificó las concentraciones de la β 2M en saliva y plasma en los diferentes grupos a través del método ELISA se registraron las principales variables clínicas, demográficas, serológicas, uso de medicación concomitante, así como la presencia de focos linfocitarios en la biopsia de glándula salival menor (BGSM).

Resultados: Se evaluaron 256 individuos: 64 (25%) con diagnóstico de SSp, 64 (25%) con SSs, 64 (25%) con SSNI y 64 (25%) controles sanos. Se encontraron diferencias significativas en los niveles β 2M salival entre pacientes que cursaban con SS (primario y secundario) de los pacientes con SSNI y sujetos sanos ($p=0.04$). Un valor de corte de β 2M de 0.28 μ g/mL provee una sensibilidad de 88 % y especificidad de 31 % para distinguir entre SS y sanos. Se documentó una correlación de 0.458 ($p<0.01$) entre la β 2M salival y la presencia de focos linfocitarios en la glándula salival menor.

Conclusiones. Se propone la β 2M salival como un Biomarcador útil para distinguir entre pacientes con SS ya sea primario o secundario de aquellos con síndrome seco por otras causas no inmunológicas y personas sanas. Un valor de corte de β 2M de 0.28 μ g/mL provee una sensibilidad adecuada que puede servir como método de tamizaje entre pacientes con SSp o SSs de pacientes con SSNI y sanos. Existe una correlación entre valores β 2M salival y plasmática, sin embargo, hasta el momento las concentraciones plasmáticas no son útiles para ser consideradas como prueba diagnóstica. Se encontró una correlación positiva entre β 2M y focos de infiltrado linfocítico en la BGSM.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Definición de Síndrome de Sjögren

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune crónica que se caracteriza por la infiltración mono-nuclear progresiva de las glándulas exocrinas cuya principal manifestación clínica es la sequedad oral (xerostomía), ocular (xeroftalmia) y vaginal; en un tercio de los casos se acompaña de manifestaciones extra-glandulares. (1)

Cuando el SS exhibe una presentación clínica aislada se le clasifica como Síndrome de Sjögren Primario (SSp) y se denomina Síndrome de Sjögren Secundario (SSs) cuando se asocia con otras enfermedades autoinmunes más frecuentemente la Artritis Reumatoide (AR), Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP) etc. (1).

El SS afecta principalmente a mujeres durante la cuarta y quinta década de la vida (aunque puede estar presente en cualquier edad, incluida la infancia) en una proporción mujer-varón de 9:1 y en la actualidad es considerada la segunda enfermedad reumática más frecuente después de la AR (2).

1.2 Historia

Es posible describir la investigación del SS en diferentes periodos: el primer período o período clínico, durante el cual se comenzaron a describir las manifestaciones clínicas, remontándose desde las descripciones de Mikulicz (3) y Hadden (4) en 1888 hasta 1950; el segundo período o período inmunológico,

se sitúa desde 1950 hasta 1980; y el tercer período o período molecular desde 1980 hasta la actualidad (7). Previo al período clínico una serie de investigadores europeos observaron a un grupo de pacientes con xerostomía y xeroftalmía. Las primeras observaciones relacionadas con el compromiso ocular de la enfermedad las hizo Leber en 1882 (6) quien describió en forma aislada la “queratitis filamentosa” en 3 pacientes.

Fisher, en 1889, documentó seis casos sobre queratitis filamentosa en donde describió a un paciente con síntomas de artritis, esta fue la primera descripción de compromiso articular en pacientes con SS (6). Algunos años después, el cirujano Johann Mikulicz (3) reportó el caso de un hombre de 42 años con aumento del volumen de las glándulas salivales mayores sin adenomegalias u órgano-megalias a quien le resecó parcialmente las glándulas lacrimales y submaxilares; el estudio patológico de este paciente mostró un conglomerado de células pequeñas; sin embargo, este paciente presentó recurrencia tras unos años. Posteriormente Haden (4), reportó el caso de una mujer de 65 años que cursaba con xerostomía y xeroftalmía de algunos meses de evolución en la que destacaban las características de la lengua de la paciente la cual se mostró roja, agrietada y con características similares a la “piel de un cocodrilo” y que se acompañaba de una mucosa palatina, seca y lisa con faringe y mucosa nasal de características similares; Hadden también encontró un aumento importante en el volumen de las glándulas salivales menores; Posteriormente Fuch (1919)

asoció el aumento de volumen de la glándula parótida a la disminución de la secreción salival en un mismo paciente(6).

Gougerot, médico francés, reportó tres casos de pacientes que acudían a consulta presentando xerostomía, xeroftalmía, atrofia progresiva de las glándulas mucosas, conjuntiva, nariz, laringe, vulva y fue el primero en agrupar todas estas manifestaciones como parte de un síndrome (8). En 1928, Albright fue el primero en demostrar la asociación de un infiltrado linfocitario en las glándulas lacrimales de un paciente con queratitis filamentosa (9).

Fue hasta 1933 cuando Henrik Sjögren, en su tesis para obtener el grado de Oftalmólogo en el Instituto Karolinska de Suecia, describió las características clínicas e histopatológicas de 19 mujeres con “queratoconjuntivitis Seca”. En este trabajo utiliza la tinción de Rosa de Bengala para colorear la córnea (10). Poco tiempo después en 1935, Sjögren publica dos artículos (11,12) en los que describe de forma clara sus observaciones sobre la queratoconjuntivitis seca y la xeroftalmía y en la otra publicación amplía el concepto de enfermedad sistémica (13). Sjögren también acuñó el “Síndrome de Sicca” (10-14) para referirse a la xerostomía y la xeroftalmía no asociadas a enfermedades del tejido conjuntivo o síndrome seco no inmunológico (SSNI).

Desde 1936 hasta 1952 Sjögren publicó más de 25 artículos médicos sobre la asociación de xerostomía, xeroftalmia (queratoconjuntivitis seca) y artritis (14-25), realizando la difusión de la presentación clínica de esta enfermedad a nivel

mundial. Touraine, publicó durante la primavera de 1950 en la “*Press Médicale*” la primera revisión de la literatura consagrada al síndrome de Gougerot-Houwers-Sjögren (26) que él le llama “xerodermosteosis”. Este padecimiento también conocido como epitelitis, se caracteriza por infiltrado linfocítico de glándulas exocrinas dando como resultado xerostomía y queratoconjuntivitis sicca (27). Morgan y Castleman (28, 29) clínico y patólogo respectivamente analizaron las muestras de los pacientes descritos por Mikulicz (3) y descubrieron que corresponden a una variante del complejo sintomático descritos por Sjögren. En 1952, Morgan y Ravenen (30) publicaron, por primera vez un artículo con el título de “*Síndrome de Sjögren, una enfermedad general*”; A finales de la década de 1950 y a comienzos de la década de 1960, se realizaron una serie de publicaciones científicas sobre las manifestaciones clínicas, serológicas, diagnósticas y sus asociaciones a la artritis reumatoide y diversas enfermedades del tejido conectivo, comenzando a diferenciar un SSp del SSs, los cuales fueron distinguidos por el griego *Moutsopoulos* (31). Actualmente, los criterios de clasificación diagnóstica incluyen el aspecto histopatológico de las glándulas salivales y fue en 1970 en que Chisholm, Waterhouse y Mason publican una de las clasificaciones usadas hoy en día para estadificar el grado de afección de las mismas (32).

1.3 Epidemiología

La prevalencia del SSp varía desde el 0.01% hasta el 4.8% de los casos en población adulta; esta variabilidad refleja diferencias en la definición,

aplicación de los criterios diagnósticos, diferencias geográficas y en los grupos de edad (2). En un meta análisis de estudios en población europea, americana y de Asia, se calcula una tasa de incidencia de 6.92 por cada 100,000 personas (34).

Un estudio realizado en Minnesota, USA reportó una incidencia anual de SSp de 4 casos por cada 100,000 habitantes (33). Otro estudio transversal realizado en París (2007) identificó a adultos con SSp diagnosticado en base a los criterios del Consenso Americano-Europeo y encontró una prevalencia de SSp de 1.52 por cada 10,000 adultos (35).

1.4 Etiología

La etiología del SS es desconocida, pero es importante la interacción entre factores genéticos y ambientales (36). A pesar de que se han reportado algunos casos de gemelos homocigotos con SS (40-43), no se ha establecido aun tasas confiables de concordancia, es común que los pacientes con SSp tengan familiares con otras enfermedades auto-inmunes como LES, AR, enfermedad tiroidea, y esclerosis múltiple (37, 38).

El factor genético en SSp es complejo e involucra genes asociados y no asociados al locus *HLA*, siendo los genes asociados *DR* y *DQ* quienes representan la mayor parte y su prevalencia varía entre grupos étnicos. Los alelos *DQA1*05:01*, *DQB1*02:01* y *DRB1*03:01* están asociados con alto riesgo para la enfermedad mientras que *DQA1*03:01*, *DQA1*0501* y *DQB1*05:01* se han relacionado con protección (46).

Dentro de los factores genéticos no asociados al *HLA* se ha ligado a la vía del interferón- α (IFN α) a través del factor regulador de interferón-5 (*FRI5*) que codifica la transcripción del IFN tipo I y a la señal de transducción-activación de transcripción 4 (*STAT4*) que induce la diferenciación de los linfocitos T en subtipos Th1. Otros genes no *HLA* que codifican para interleucina 6 (*IL-6*) se han relacionado con manifestaciones extra-glandulares y severidad de la enfermedad, pero no con predisposición de riesgo (47,48).

Dentro de los factores ambientales implicados al desarrollo de SSp están los virales, que son considerados como los principales candidatos en el desarrollo de auto-inmunidad en SSp ya sea por invasión local, inducción de migración linfocítica o por mimetismo molecular. A pesar de que no se ha hallado una correlación estricta entre SSp y un virus en particular, se ha encontrado material genético del virus Coxsackie en biopsias de la glándula salival menor; otros estudios han evidenciado el genoma de los Virus Epstein-Barr (VEB), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y Virus de la hepatitis C (VHC) en células epiteliales de pacientes con SSp (49).

Se han implicado a componentes del sistema endócrino en el desarrollo y expresión clínica del SSp, al evidenciarse hipo actividad en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) ya sea por un defecto hipofisario y/o disfunción glandular adrenal (50). Se estudió en mujeres con SSp niveles plasmáticos de DHEA-S y se mostró la hipo actividad del eje HHA (51). Se hallaron anticuerpos anti 21-hidroxilasa (OH) en el plasma de aproximadamente una quinta parte de

pacientes con SSp en asociación con activación de células B e hipofunción adrenal; como resultado de esta hipofunción adrenal existe una disminución en los niveles de andrógenos, particularmente de DHEA-S en mujeres con SSp (50, 52). Las células epiteliales glandulares sufren apoptosis ante la disminución de andrógenos y estrógenos ya que el remodelado del tejido glandular salival está bajo control androgénico y su deficiencia puede explicar las alteraciones observadas en la arquitectura glandular. En ausencia de una acción compensatoria entre andrógenos y estrógenos, el estado menopáusico puede conducir hacia un proceso apoptótico que detona una respuesta inmune aberrante; La prolactina, otra hormona neuro-endocrina, se encontró elevada entre el 16% y el 46% de pacientes con SSp (50, 53).

Se ha estudiado el papel de las vitaminas como moduladores inmunológicos, especialmente la asociación entre los niveles de vitamina D y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, no encontrándose diferencias significativas entre pacientes y controles sanos, pero si se relacionó la deficiencia de Vitamina D (≤ 15 ng/mL) con manifestaciones neurológicas y la presencia de linfoma en estos pacientes (54,55).

Los pacientes con SSp experimentan niveles altos de estrés psicológico con una gran cantidad de eventos negativos en su calidad de vida en ausencia de respuestas adaptativas satisfactorias para confrontar el estrés. La falta de soporte social puede contribuir al riesgo relativo para el desarrollo de la enfermedad (56). La estimulación intrínseca de las células epiteliales glandulares

por un agente causal desconocido puede conducir a su activación, incremento de la apoptosis y presentación de neo-antígenos al sistema inmune. Estos eventos conducen a la acumulación de células T y B de memoria y a la perpetuación de la respuesta inmunológica por auto-antígenos liberados de las células apoptóticas

1.5 Histopatología glandular

El sello histopatológico de esta enfermedad es la presencia de agregados de células mono-nucleares alrededor de los ductos y acinos de las glándulas exocrinas, principalmente salivales y lagrimales, con deterioro progresivo de la función secretora (60).

Por mucho tiempo, se consideró a los infiltrados linfocíticos como la principal causa de disfunción secretora observada en el SS; sin embargo, la asociación entre síntomas clínicos y el nivel de destrucción glandular junto con hallazgos derivados de modelos animales, sugieren la existencia de vías alternativas que contribuyen a esta disfunción como son: la inducción de apoptosis de glándulas epiteliales, alteraciones en la distribución de aquaporinas o inhibición de neurotransmisión por anticuerpos anti-muscarínicos (59,63,70).

Existen reportes de alteraciones en la localización de la aquaporina 5 (ver figura 1) con predominio en la membrana baso-lateral en biopsias de GSM en pacientes con SSp; normalmente se sabe que las aquaporinas deben de estar localizadas apicalmente; además de esto se encontró una expresión disminuida de la misma en áreas adyacentes al infiltrado linfocitario (61, 62,63). Se ha

observado la presencia de anticuerpos y citocinas dirigidos contra receptores muscarínicos M3 (ver figura 2) lo cual influencia la localización y expresión en las células en BGSM (63). Se ha comprobado que el TNF- α en células humanas aisladas de glándula salival y la activación de receptores tipo Toll en ratones disminuyen la expresión de aquaporina 5 (64,65). Por el contrario, la administración de IFN- α administrado a cultivos de células humanas de parótida aumenta la expresión de la misma (66); como prueba de esto hay reportes de que el IFN- α mejora la xerostomía en algunos pacientes (67-69).

Las glándulas exocrinas están compuestas por células epiteliales ductales y acinares con función secretoria. Existen cambios en estas células en modelos animales de SSp en ausencia de linfocitos funcionales y se ha propuesto a las células epiteliales glandulares como los principales componentes en la generación de respuesta autoinmune al exhibir un fenotipo activado, debido a que expresan altas cantidades de HLA-DR, moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40), moléculas de adhesión (ICAM-1), receptores de respuesta innata del tipo Toll y factor activador de células B (BAFF) (57). Las células epiteliales acinares también expresan auto-antígenos provenientes del citoplasma lo cual representa una vía por medio de la cual estos son presentados al sistema inmune (14-15).

La composición celular de los infiltrados en la glándula salival menor (GSM), (ver figura 3) depende de la severidad de la lesión histopatológica: los Linfocitos T

CD4+ predominan en lesiones leves tempranas y los linfocitos B son los predominantes en los estadios avanzados de la enfermedad (71).

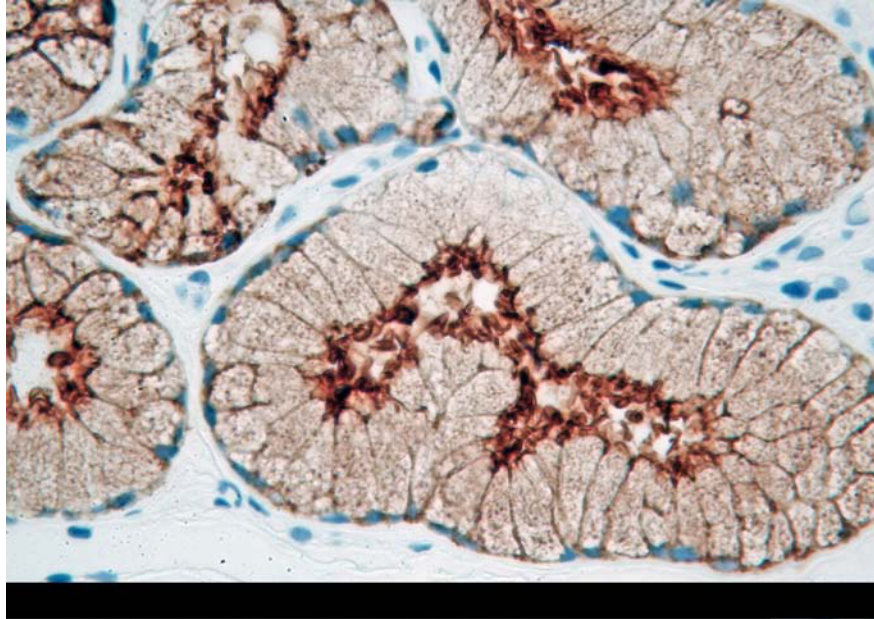


Figura 1A: Tinción de inmuno-histoquímica de tejido de BGSM que muestra la localización apical normal de aquaporina 5 en SSp (*Riega y cols*)

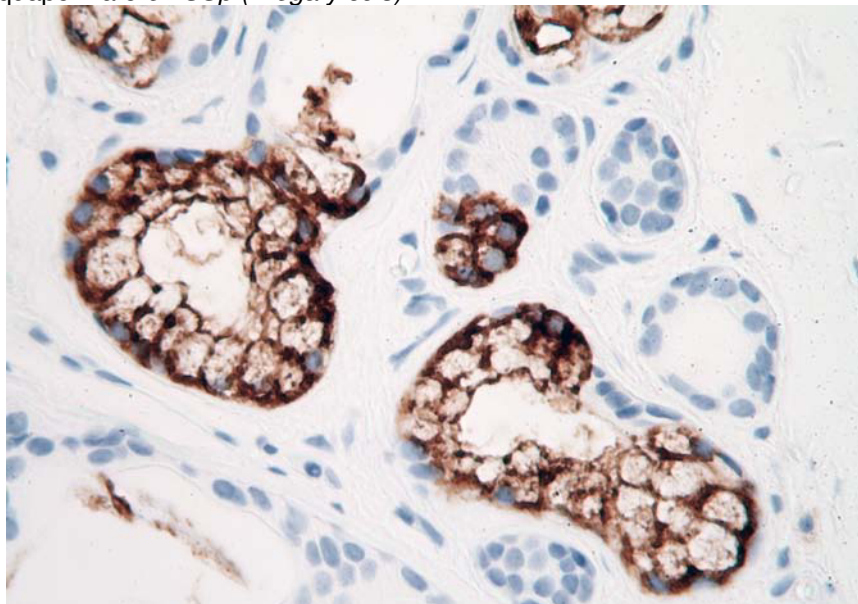


Figura 1B: Localización basal anormal de aquaporina 5 en BGSM de paciente con SSp teñido mediante Inmunohistoquímica (*Riega y cols*)

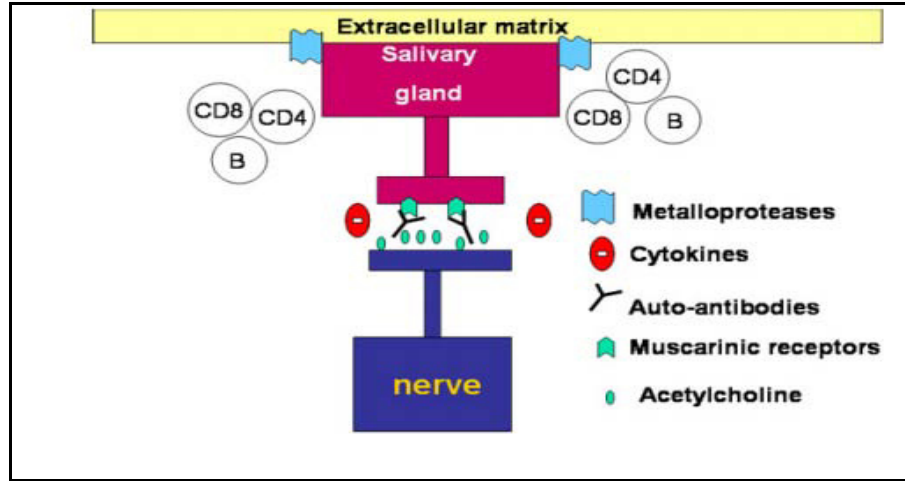


Figura 2: Bloqueo por auto-anticuerpos contra los receptores muscarínicos en la glándula salival (Tiofaz/revisión EULAR 2011)

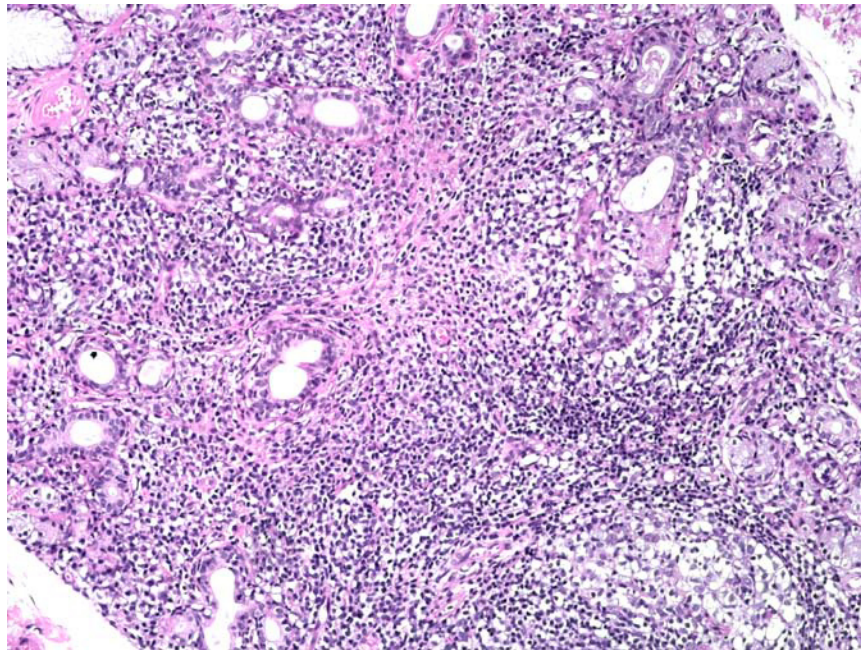


Figura 3. Biopsia de GSM. Se observan infiltrados linfocitarios en acúmulos=focos (1foco \geq 50 linfocitos en 4mm²) (*Riega y cols*)

1.6 Manifestaciones clínicas

El SS ocasiona múltiples manifestaciones clínicas, las más frecuentes son la sequedad oral, ocular y vaginal, pero puede involucrar otros órganos y sistemas (figura 4)

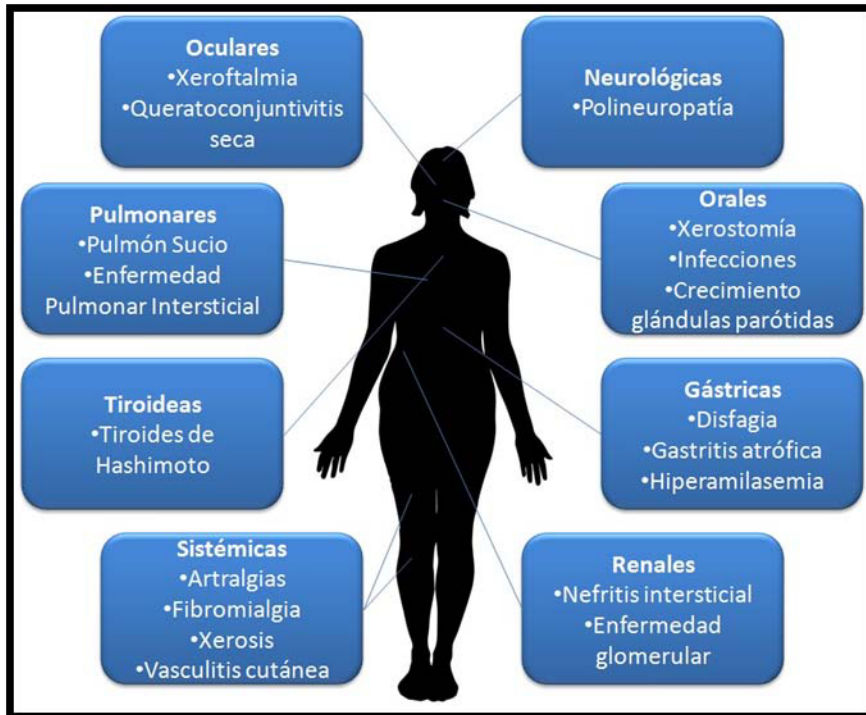


Figura 4. Manifestaciones clínicas en SS (*Riega y cols*)

Manifestaciones orales. El involucro de las glándulas salivales mayores y menores conduce a disminución de la secreción salival, manifestándose como xerostomía con incremento de infecciones bucales, friabilidad de la mucosa y caries dental debido a la pérdida de la lubricación y capacidades antimicrobianas de la saliva (72). Es común la candidiasis oral manifestada como lesiones mucosas eritematosas, fisuras linguales, atrofia de las papilas filiformes y queilitis angular (73,74). Puede ocurrir crecimiento asintomático y auto-limitado de las

glándulas parótidas (parotido-megalia) o de otras glándulas salivales mayores, pero en caso de ser persistente debe de vigilarse cuidadosamente hasta excluir infecciones y más importante, el desarrollo de linfoma (75). La xerostomía (figura 5) puede ser evaluada por diferentes métodos diagnósticos como gammagrafía, sialografía de glándula parótida, sialometría, sialoendoscopia y biopsia de glándula salival menor; esta última es tomada del labio inferior y se considera positiva si existe infiltración linfocítica de más de 50 cels por 4mm² (76,77).



Figura 5. Manifestaciones orales características presentes en SSp: Se observa sequedad peribucal y lingual con aumento de los surcos linguales. (*Riega y cols*)

Manifestaciones oculares. La infiltración linfocítica de las glándulas lagrimales conduce a disminución del flujo lagrimal (xeroftalmia) y a alteraciones en la composición química del fluido lagrimal con daño a los epitelios corneal y conjuntival, conocido como queratoconjuntivitis seca la cual se manifiesta como

una sensación de cuerpo extraño en los ojos, irritación (figura 6) foto-sensibilidad y alteraciones visuales. Las complicaciones producen ulceraciones corneales, queratitis bacteriana e infecciones oculares (72,75,78).

La Prueba de Schirmer es utilizada para medir la producción lagrimal, se puede realizar con o sin anestesia, se considera una prueba positiva si la producción de lágrima en el papel filtro es de menos de 5 mm en 5 minutos (79, 80).

La Tinción de la superficie ocular (córnea y conjuntiva) identifica y estadifica el daño estructural del epitelio ocular. Se utiliza la tinción con Verde de Lisamina para teñir la conjuntiva y la Fluoresceína de sodio para teñir la córnea .Se considera diagnóstico una puntuación igual o mayor a 4 (81).



Figura 6. Manifestaciones oftalmológicas características en el SS que muestran Irritación de la conjuntiva ocular con inflamación del párpado inferior. (*Riega y cols.*)

Manifestaciones sistémicas. Se presentan en el 30% a 70% de los pacientes antes o después del diagnóstico de la enfermedad (82-86). Es común la presencia de auto-anticuerpos circulantes anti-Ro (SSA) y anti-La (SSB) en comparación con enfermedad local aislada, siendo los anti-Ro(SSA) más específicos para este padecimiento (87). Hasta 70 % de los pacientes pueden experimentar fatiga con una correlación moderada entre este síntoma y depresión.

Afección musculoesquelética: Aproximadamente la mitad de los pacientes con SSp experimentan síntomas como artralgiyas y/o artritis en el curso de su enfermedad y pueden ocurrir antes del inicio de los síntomas glandulares, generalmente la artritis que distingue al SSp del SSs es que la primera cursa con una artritis leve no deformante (75).

Otras manifestaciones incluyen rigidez matutina o cuadros sintomáticos del tipo de fibromialgia (89). Existe una poli-artropatía típica no erosiva que afecta principalmente pequeñas articulaciones y que conduce ocasionalmente a una Artropatía de Jaccoud (75, 90). El involucro muscular es principalmente en forma de mialgias; se han descrito cuadros de debilidad muscular proximal de inicio insidioso y/o miopatía inflamatoria leve (polimiositis o miositis por cuerpos de inclusión) (17, 20).

Manifestaciones cutáneas: Existe resequedad de la piel conocida como "xerosis", acompañada de prurito; otras manifestaciones raras son el eritema anular y lesiones tipo pernio (91,92).

La vasculitis cutánea afecta a entre el 5 y el 10 % de los pacientes en forma de púrpura palpable, el cual se relaciona con hiper-gamaglobulinemia con involucro de vasos de pequeño y mediano calibre, todas estas características son consideradas como un marcador pronóstico adverso para el desarrollo de linfoma. Otras manifestaciones poco comunes de la vasculitis cutánea son pápulas, úlceras y lesiones urticariales de predominio en extremidades inferiores (71,85,93).

Las mujeres con SS pueden padecer de sequedad vaginal y dispareunia por una posible infiltración linfocitaria local de la mucosa, teniendo estos síntomas un impacto adverso en la vida sexual a consecuencia de estos síntomas (94-97). En 2013 Maddali Bongji et al. reportaron que hasta un 68% de pacientes con SSp presentaron alteraciones en su vida sexual debido a la sequedad vaginal y dispareunia (98).

Manifestaciones pulmonares. La infiltración linfocítica de la laringe, tráquea y glándulas bronquiales exocrinas conduce a resequedad del árbol respiratorio que se manifiesta como tos seca irritativa y persistente. Las pruebas de función pulmonar revelan un patrón obstructivo de las vías aéreas pequeñas (101,102). En la tomografía computada de alta resolución (TACAR), tales características aparecen como un engrosamiento segmentario de los bronquios, bronquiectasias, nódulos centri-lobulillares y patrón en vidrio despulido (100,103). La Enfermedad Pulmonar Intersticial (EPI) se presenta hasta en un 25% en algunas series y se manifiesta como disnea, tos, estertores bilaterales e

infiltrados intersticiales en tele de tórax; Los patrones histológicos más frecuentemente encontrados son: neumonía intersticial no específica (NINE), neumonía intersticial usual (NIU), neumonía organizada (NO) y neumonía intersticial linfocítica (NIL). Se debe de excluir linfoma en caso de hallar nódulos pulmonares y linfadenopatía hiliar y/o mediastinal. Los patrones más frecuentes encontrados en TACAR son los siguientes: opacidades de vidrio despolido (92%), opacidades lineales no septales (75%), engrosamiento septal inter-lobular (55%), quistes (30%) y fibrosis (100). La radiografía de tórax es un método poco sensible para detectar cambios tempranos, pero en ocasiones puede observarse un aspecto de “pulmón sucio” y nódulos de 1 a 3 mm con predominio centro-lobulillar. Las biopsias trans-bronquiales revelan infiltración mono-nuclear peri-bronquial y/o peri-bronquiolar (99-101).

Los derrames pleurales son muy raros en el SSp pero comunes cuando se asocia a otras enfermedades reumáticas (100,104).

Manifestaciones gástricas. Existe disfagia debido a la sequedad de la faringe, el esófago o por alteración de la motilidad esofágica que puede acompañarse de náuseas y dolor epigástrico. El patrón histológico típico es la gastritis atrófica crónica con infiltración linfocítica; es frecuente la hiper-amilasemia, aunque muy rara vez es expresión de una pancreatitis aguda o crónica. La hepatitis autoinmune se diagnostica en el 1,7% y el 4% de los casos, mientras que la colangitis autoinmune (con cambios histológicos similar a la etapa I de la cirrosis

biliar primaria) en el 5% a 10% de los pacientes junto con anticuerpos anti-mitocondriales (105).

Manifestaciones renales y vesicales: En 5 % de los pacientes con SSp existe involucro renal clínicamente significativo, principalmente nefritis intersticial (NI) por infiltración linfocítica del intersticio con inicio temprano, o antes de la aparición de los síntomas de resequead. La presentación clínica más frecuente de la NI es la acidosis tubular distal (tanto de tipo I y II). La enfermedad glomerular de tipo membranosa o membrano-proliferativa (GMN) es rara en pacientes con SSp y está mediada por depósito de complejos inmunes en el contexto de una vasculitis sistémica que se asocia con bajos niveles de complemento y crioglobulinemia mixta que puede aparecer tardíamente en la enfermedad con incremento de la morbilidad y mortalidad (106-108).

Ocasionalmente puede aparecer cistitis intersticial con poliaquiuria y dolor suprapúbico o perineal. Las biopsias revelan inflamación en mucosa y submucosa con infiltración linfoide y de células cebadas (78,108).

Manifestaciones tiroideas. Se presentan en cerca del 20% de los pacientes con SSp a través de tiroiditis autoinmune (principalmente tiroiditis de Hashimoto y en menor frecuencia enfermedad de Graves), más del 50% de los casos tienen hipotiroidismo sub-clínico. Los auto-anticuerpos contra peroxidasa tiroidea (anti-TPO) y tiroglobulina (anti-TG) se pueden utilizar como bio-marcadores para el desarrollo enfermedad tiroidea asociada (50, 110).

Manifestaciones neurológicas. Varían entre 2% a 60%, la principal es la Poli-neuropatía predominantemente sensorial (ataxia sensorial o neuropatía dolorosa de fibras pequeñas) (84,111). Otras manifestaciones menos frecuentes son: poli-neuropatía sensitivo-motora, polirradiculopatía, mono-neuritis múltiple, neuropatías craneales (neuralgia del trigémino) y neuropatía autonómica (pupila de Adie e hipotensión ortostática).

El compromiso del sistema nervioso central es mucho menos común con cambios parecidos a esclerosis múltiple, convulsiones, mielitis transversa, meningitis aséptica, neuritis óptica, encefalopatía difusa y demencia (112).

Otras alteraciones: Existe dispareunia en un 40% de las mujeres post-menopáusicas secundaria a pérdida de lubricación (craurosis) en comparación con 3% de los controles sanos (113).

1.7 Hallazgos generales de laboratorio

El hallazgo más común es la hiper-gamaglobulinemia. Los niveles elevados de γ -globulinas contienen auto-anticuerpos dirigidos contra antígenos no específicos como el factor reumatoide (FR), anticuerpos antinucleares (ANA), antígenos celulares SSA / Ro, SSB / La y anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos orgánicos como células ductales salivales, anticuerpos anti-mitocondriales, anticuerpos anti células glandulares tiroideas y antígenos de la mucosa gástrica(114).

Es frecuente anemia, elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG) con niveles de proteína C-reactiva (CRP) normal, debido posiblemente a los

niveles elevados de IFN tipo I (78,115), además de citopenias (linfopenia, trombocitopenia y neutropenia) que correlacionan con manifestaciones extra glandulares; la neutropenia se ha propuesto como un marcador pronóstico adverso para el desarrollo de linfoma (116).

Puede existir hipocalcemia y acidosis hiperclorémica debido a involucro renal por acidosis tubular distal (107)

Se pueden detectar niveles altos de inmunoglobulina monoclonal en 10% al 15% de los pacientes con SSp. Aproximadamente en el 20% de los casos existen crioglobulinas en el plasma (117). El FR y las crioglobulinas juegan un papel importante en la patogénesis ya que han demostrado ser indicadores de aumento en el riesgo de linfoma. Los niveles de complemento pueden estar disminuidos, especialmente C4, ya sea por estar genéticamente predeterminado o secundario a su consumo (complejos inmunes o crioglobulinemia (78).

1.8 Alteraciones inmunológicas

Los títulos del FR se encuentran elevados en el 40% al 50 % de los pacientes con SSp. (114). Los ANA se encuentran elevados en el 50% al 90 % ; estos principalmente están dirigidos contra componentes nucleares aunque también reconocen los centrómeros; Los ANAs se detectan por inmunofluorescencia indirecta en células Hep-2 y exhiben un patrón moteado. Los anticuerpos anti-SSA/Ro y anti-SSB/La son los 2 anticuerpos más útiles para establecer el diagnóstico de SSp. Anti-SSA/Ro está presente entre el 50% al 90% de los pacientes (2). Estos auto-anticuerpos no son específicos ya que se

pueden encontrar en 30% a 50% de los pacientes con LES. Los anticuerpos anti-SSB/La se detectan exclusivamente en pacientes con anti-SSA/Ro. Anti-SSB/La son más específicos de SSp, ya que se detectan en 30% a 60% de los pacientes con SSp pero en sólo el 20-30% de los pacientes con LES. Los auto-anticuerpos anti-SSA/Ro se pueden unir a varios epítomos antigénicos expresados por dos proteínas de distintas masas moleculares, 52KDa y 60 kDa. Pareciera que el perfil de reactividad puede diferir para los pacientes con SSp (reactividad aislada anti SSA de 52 kDa) y aquellos con LES (reactividad anti SSA de 60 kDa). La presencia de anticuerpos anti-Ro/SSA y/o La/SSB se asocia a inicio de la enfermedad precoz, mayor duración de la enfermedad, inflamación recurrente de las glándulas parótidas, esplenomegalia, linfadenopatía y vasculitis en pacientes con SSp, por lo que bien pudieran ser considerados como biomarcadores de enfermedad precoz y de mayor severidad (81).

Los linfocitos B secretores de anticuerpos anti-SSA/Ro y anti-SSB/La están presentes en los infiltrados mono-nucleares de las glándulas exocrinas, a menudo asociados con los linfocitos T específicos para epítomos SSA/SSB, por lo tanto SSA y SSB podrían convertirse en inmunogénicos debido a su localización anormal en el citoplasma o a la expresión aumentada en la membrana de las vesículas apoteóticas en las células epiteliales (114).

Otros autos anticuerpos:

Diferentes estudios han reportado la presencia de otros tipos de auto anticuerpos:

-Anticuerpos Anti-Centrómero (ACA): se encuentran en un número limitado de pacientes con SSp y se caracterizan por una mayor prevalencia en el fenómeno de Raynaud y disfagia comparado con los pacientes ACA negativos (118).

-Anticuerpos α -fodrina: Los anticuerpos contra esta proteína del citoesqueleto fueron reportados en un estudio, posteriormente fue desarrollado un ELISA comercial, sin embargo dada a su baja sensibilidad y especificidad se impide el uso de esta prueba con fines diagnósticos (114).

-Anticuerpos contra receptores de Acetilcolina M3R : Este es el principal tipo de receptor muscarínico detectado en las glándulas salivales y se han relacionado con la inhibición de la transmisión neuro-glandular (ver figura 2) resultando en xerostomía y manifestaciones extra glandulares de la enfermedad asociados con disfunción autonómica (81).

-Anticuerpos Anti mitocondriales (AMA): Son considerados como marcador diagnóstico para Cirrosis Biliar Primaria (CBP), están presentes en el 6,6% de los pacientes con SSp. El 92% de los pacientes con SSp con afectación hepática con características histológicas de colangitis crónica similares a los observados en la etapa I de CBP tienen AMA positivos (20).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1 Dificultades diagnósticas del SS

El diagnóstico de SS es complejo y en ocasiones no se puede hacer fácilmente debido a que no existe un signo, síntoma o prueba patognomónica para diagnosticar la enfermedad, además de existir diferentes causas de sequedad (oral y ocular) que son unas de las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad.

Por muchos años el diagnóstico careció de estandarización pero a lo largo del tiempo se han lanzado diversos sets de criterios clasificatorios que se han publicado (119-121), a pesar de esto, el diagnóstico de SS sigue siendo un reto diagnóstico.

2.2 Características proteómicas de la saliva humana

La saliva humana es un fluido con diversas funciones biológicas esenciales para el mantenimiento de la salud bucal; su reciente uso en el diagnóstico de diversas enfermedades como el VIH, enfermedades cardíacas, diversos tipos de cáncer y su posible papel como indicador de enfermedades autoinmunes, la hacen una atractiva herramienta para el diagnóstico clínico de enfermedades (122). La saliva total es una mezcla de secreciones de los tres pares de glándulas salivales mayores (parótida, sub-mandibular, sublingual), de los miles de glándulas salivales menores situadas debajo de la mucosa oral y de constituyentes del fluido gingival, así como muchos otros contaminantes

microbianos de la boca y de las células descamativas del epitelio bucal. Las contribuciones de las diferentes glándulas salivales a la conformación de la saliva total son variables dependiendo del grado de estimulación y de las diferentes horas del día; muchos trabajos se han enfocado al estudio en la saliva total (123-125) y ductal, (126,127) lo que ha conducido al análisis completo del proteoma salival que nos puede brindar pistas importantes para el entendimiento de la patogénesis de enfermedades sistémicas.

La amplia variedad de moléculas presentes en las secreciones salivales coloca a la saliva como una fuente rica en bio-marcadores de diagnóstico, aunado a ventajas como su fácil recolección, almacenamiento y transporte a bajo costo; a diferencia del plasma, no sufre procesos de coagulación y es un método no invasivo que reduce así las molestias en el paciente cuando es necesario la toma de muestras repetidas. La saliva, en comparación con la sangre, puede demostrar marcadores más sensibles y específicos para diagnóstico de enfermedades orales (128).

Las proteínas y péptidos salivales se han estudiado con diferentes técnicas analíticas como cromatografía líquida, electroforesis en gel de poliacrilamida, espectrografía de masas e inmuno- ensayos (123-124).

En los últimos 40 años se han identificado una gran diversidad de proteínas y péptidos salivales con un amplio rango de propiedades funcionales como inmunoglobulinas con actividad antimicrobiana (lisozima, lactoferrina, sialoperoxidasa, histatinas y defensinas), lubricantes y de protección física como

las mucinas, proteínas ricas en prolina con funciones de precipitación de químicos dañinos de la dieta y otras proteínas salivales que están sujetas a la actividad proteolítica de proteasas salivales y bacterianas en la boca (129). En una revisión de Hu y colaboradores, se reveló el descubrimiento de aproximadamente 1380 proteínas, todas ellas detectadas usando diferentes técnicas de laboratorio, aunque solo 100 de estas estaban presentes en abundancia (130).

2.3 Definición clínica de Bio-marcador

El término Bio-marcador se ha utilizado en años recientes para describir especies moleculares significativas o combinación de ellas presentes en un fluido biológico que representan el estado fisiológico o patológico de una persona; en otras palabras, el término debe referirse a una especie molecular simple de alta sensibilidad y especificidad la cual está presente en una muestra de pacientes con una enfermedad particular en comparación con otros sujetos sanos y cuya característica analítica es ser detectable en concentraciones significativamente distintas (131).

2.4 Estudios de proteómica en saliva

El conocimiento del proteoma salival humano ha ganado gran aceptación clínica y ha puesto sobre la mesa la posibilidad de utilizar la saliva como una herramienta útil tanto en el diagnóstico como en el pronóstico del SS, se han realizado diversos estudios aplicando diversas técnicas y usando tanto saliva estimulada como saliva no estimulada (saliva total), donde la mayoría de ellos se

han enfocado en la búsqueda de bio-marcadores diagnósticos con el fin de generar y validar un panel proteómico salival (132-140). Los datos obtenidos de estos estudios indican que las proteínas secretoras de origen acinar se encuentran sub-expresadas, mientras que las proteínas inflamatorias presentan niveles elevados en su expresión, todo esto cuando se compararon con sujetos sanos (132,138).

El incremento de proteínas inflamatorias tiende a correlacionarse con inflamación crónica y daño persistente de las glándulas salivales en el microambiente oral. De todas las proteínas que se han caracterizado en la saliva de pacientes con SS, Hu y colaboradores han realizado la validación pre-clínica de β 2M, α -Enolasa y Catepsina-D en pacientes con SSp en comparación con pacientes con SSs, LES y controles sanos, usando el método de ELISA y Western-Blot, así como tres bio-marcadores de ARNm usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (135). En el 2011, Baldini y colaboradores estudiaron 180 pacientes con SSp, SSs (a AR y esclerodermia limitada) controles sanos y pacientes con xerostomía sin enfermedad autoinmune en los cuales se realizó un análisis proteómico usando electroforesis en doble dimensión, espectrometría masas, Western blot y ELISA; en este estudio se encontraron diferencias significativas en precursores de α -amilasa, anhidrasa carbónica VI, β 2M, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), proteína de unión a ácidos grasos epidérmicos (E-FABP), cadena ligera de inmunoglobulina κ (IGK-cadena ligera) en la saliva

de pacientes con SSp en comparación a voluntarios sanos y controles con xerostomía sin SS(132).

2.5 La β 2M como potencial Bio-marcador en SS

La β 2M fue aislada en 1968 por Berggard y Bearn; es una proteína no glucosilada con un peso molecular de 11,800 kDa y se ha identificado como una cadena ligera invariante de los antígenos del complejo de histocompatibilidad clase HLA-A, HLA-B y HLA-C; este complejo se encuentra en la superficie de todas las células nucleadas. La superficie de monocitos y linfocitos son particularmente ricos en β 2M, síntesis y expresión linfocítica están aumentadas por estimulación con mitógenos o IFN. Como resultado del reciclado del HLA, la β 2M se disocia en la forma libre en el fluido intersticial (142).

El aumento de la expresión de la β 2M es un reflejo de la activación y el incremento de la síntesis de inmunoglobulinas intra-glandulares. La disminución de las proteínas secretorias se atribuye al daño y disfunción de las células acinares y a la presencia de procesos de fragmentación los cuales pueden estar relacionados a un desequilibrio en la expresión entre proteasas e inhibidores de proteasa (141).

Diversos estudios han sugerido que la medición de β 2M en saliva es un método simple de cuantificar el daño glandular en pacientes con SS (142); hay reportes que muestran el incremento en la expresión de β 2M en saliva parotídea (132, 135, 143-146). Hu y cols. indican que esta proteína es un marcador altamente sensible y específico para distinguir entre pacientes con SSp y SSs (145) y se

puede usar como prueba diagnóstica suplementaria (142). Por otro lado, se ha comprobado que en pacientes con SSp y con niveles plasmáticos elevados de β 2M y cadenas libres de inmunoglobulinas está asociado a un incremento en la actividad sistémica de la enfermedad , lo que permite poner de relevancia la saliva como herramienta clínica (147).

Existen reportes de la medición d β 2M en saliva no estimulada usando diversos métodos en SS en población caucásica y japonesa pero no se ha explorado la presencia de esta proteína en saliva en población mestiza mexicana mediante el método de ELISA, por lo que nos planteamos el problema de medir los niveles de β 2M salival en una población de pacientes con SS tanto primario como secundario y determinar su utilidad como bio marcador que nos permita distinguirlos de una población sana y de sujetos con SSNI.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

El SS es una enfermedad de diagnóstico complejo, con un impacto en la calidad de vida de los enfermos. Las pruebas actuales de diagnóstico son invasivas, poco accesibles y/o costosas como por ejemplo la BGSM, los auto-anticuerpos los cuales no son muy específicos ya que pueden estar presentes en otras enfermedades auto inmunes como LES, las tinciones oculares, todos estos procedimientos no están al alcance de los pacientes ya que son realizados por diversos especialistas lo que provoca retraso en el diagnóstico en promedio de 8-10 años según reportes de la literatura.

Se necesitan de nuevos métodos no invasivos para el diagnóstico de la enfermedad .

Además de la necesidad de contar con éstos nuevos métodos no invasivos, también se necesitan pruebas que reúnan la suficiente sensibilidad y especificidad que le ayuden al reumatólogo a realizar un diagnóstico preciso .

CAPÍTULO 4

ORIGINALIDAD Y CONTRIBUCIÓN

La evaluación de los niveles de β 2M salival en una población de pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico conocido de SS tanto primario como secundario en comparación con pacientes con síndrome seco sin auto inmunidad y un grupo control sano es fundamental para determinar su papel como biomarcador diagnóstico en esta enfermedad.

Este estudio constituye el primero en su tipo al evaluar la presencia de un biomarcador salival en una muestra de pacientes mexicanos usando como prueba analítica el método de ELISA .

CAPÍTULO 5

HIPÓTESIS

H0. La β 2M salival es un bio-marcador que no es útil para distinguir entre SS de No SS.

H1. La β 2M salival es un Bio-marcador que me permite distinguir entre pacientes con SS y sin SS.

CAPÍTULO 6

OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar la utilidad de la β 2M salival como Bio-marcador diagnóstico para SS.

6.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar las diferencias cuantitativas entre los niveles β 2M salival entre pacientes con SSp y SSs.
- b) Determinar un valor de corte de la β 2M salival en pacientes con SS y sanos.
- c) Determinar diferencias entre los niveles de la β 2M en saliva entre pacientes con SSp y con SSNI.
- d) Comparar los niveles de β 2M en saliva y en plasma tanto de pacientes como de controles.
- e) Relacionar los valores de β 2M y la presencia de focos de infiltrado linfocitario en biopsias de GSM.

CAPÍTULO 7

MATERIALES Y MÉTODOS

La realización del presente estudio fue aprobada por el Comité de Ética en Investigación de nuestra Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la U.A.N.L. bajo el número de registro RE14-009. Nuestro trabajo tuvo financiamiento a través de recursos propios de nuestro Servicio de Reumatología; además, declaramos no haber obtenido ganancias financieras o comerciales por la realización del mismo ni tener algún tipo de conflicto de interés.

7.1 Lugar de Referencia

Para este trabajo se reclutaron pacientes provenientes de Servicio de Reumatología de nuestro Hospital Universitario José Eleuterio González con diagnóstico confirmado de SS tanto primario como secundario que acudieron regularmente a su consulta; se incluyó a pacientes con síndrome seco de etiología no inmunológica (SSNI) con ingesta de medicamentos, xerogénicos, portadores de diabetes Mellitus, fibromialgia ,menopausia, etc como grupo control se incluyó a pacientes sanos (acompañantes de pacientes que no tuvieran lazos familiares) sin enfermedad conocida, sin sequedad y que no tomaran ningún medicamento xerogénico ; A cada paciente se le explicó

ampliamente y en lenguaje comprensible en qué consistió el estudio y se les invitó a formar parte del mismo; su participación quedó formalizada a través de la firma de consentimiento informado.

7.2 Características de los pacientes

Los pacientes incluidos en este estudio reunieron criterios clasificatorios para SSp (grupo 1) y SSs a AR y a LES (grupo 2) así como pacientes que cursaron con síndrome seco de pero sin datos de enfermedad autoinmune (SSNI) (grupo 3). Además, se incluyó un grupo de voluntarios sanos (grupo 4: control negativo) acompañantes no familiares de pacientes sin antecedentes de enfermedad autoinmune o de ningún otro tipo sin ingesta de medicamentos ni signos o síntomas de resequeidad.

Criterios de inclusión (para los grupos 1 al 3)

- Mayores de 18 años.
- Diagnóstico de SSp.
- Diagnóstico SSs a AR y LES
- Con síntomas de resequeidad sin enfermedad auto- inmune.

Criterios de exclusión:

- Pacientes menores de 18 años.
- Pacientes sin historia de infección por VHC o VIH.
- Pacientes que nieguen presencia de inmunodeficiencias.
- Pacientes sin historia de ser sometidos a radioterapia de cabeza y cuello.
- Pacientes sin historia de enfermedad asociada a IgG4 o sarcoidosis.

- Mujeres embarazadas.

Criterios de eliminación:

Pacientes que no aceptaron participar en el estudio, que retiraron su consentimiento informado y pacientes que no produjeran saliva.

.

7.3 Número de sujetos por incluir y fundamento del cálculo del tamaño de la muestra

Se calculó un tamaño muestra para el contraste de dos curvas ROC mediante la validación de Obuchowski y McClish, asumiendo la igualdad entre ellas en datos continuos para dos colas. Considerando un poder de 0.8, una alfa de 0.05, una área bajo la curva ajustada para H0 de 0.87 y para H1 de 0.95, una tasa de falsos positivos mínima de 0.00 y máxima de 1.00 y una relación entre las desviaciones estándar de 1 (basados en lo observado en el artículo de Shen Hu y cols. se determinó un tamaño muestra de 64 pacientes por grupo.

7.4 Metodología a realizar

Este proyecto se llevó a cabo en cuatro etapas:

Etapá 1 de identificación :Se identificaron pacientes que reunieron criterios clasificatorios para SSp, los cuales fueron clasificados dentro del Grupo 1 de estudio; para el grupo 2, se incluyeron pacientes con SSs a AR

y LES; nuestro grupo 3 estuvo conformado por pacientes con síntomas de resequeidad sin datos de autoinmunidad pero si asociados a padecimientos como fibromialgia, diabéticos o que tomaran alguna medicación que les condicionen boca seca denominado grupo Sicca(SSNI); y como grupo 4 se identificaron a controles sanos que no padecieran ningún síntoma de sequedad ni historia de enfermedad ni ingesta de medicamentos, regularmente estos fueron acompañantes de pacientes sin parentesco con el paciente y pareados por sexo y edad con una diferencia de +/- 5 años.

Etapas 2 o colecta y procesamiento de bio-especímenes. Aquellos pacientes que aceptaron y firmaron su consentimiento informado para participar en el estudio, se les explicó en qué consistía su participación en el protocolo, a cada uno de estos pacientes se les proporcionó información escrita y oral acerca del procedimiento a realizar y se respondieron todas sus dudas; a los pacientes se les realizó una encuesta que recabó datos epidemiológicos, clínicos, antecedentes familiares de otras enfermedades autoinmunes relacionadas y factores ambientales entre otros; posterior a esto, se procedió a la toma de una muestra de saliva no estimulada y una toma de sangre para determinar las concentraciones de $\beta 2M$. Las muestra de sangre y saliva fueron transportadas a la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina molecular de nuestra Facultad de Medicina, ambos bio-especímenes fueron transportados en hielo; la saliva se centrifugó a 14000 g durante 20 minutos a una temperatura de 4°C para remover materiales insolubles, detritos y

remanentes de alimentos; el sobrenadante de cada muestra fue dispuesto en alícuotas y almacenado a -80°C hasta su análisis.

Etapa 3 o análisis de los resultados. Cada una de las muestras colectadas, así como toda la información clínica y epidemiológica fue codificada dentro de una base de datos prediseñada para salvaguardar la información personal de los pacientes y volverla de carácter confidencial; en el análisis se compararon los niveles de β 2M entre los diferentes grupos estudiados y se estableció un valor de corte entre casos y controles, se correlacionó con variables clínicas, inmunológicas, demográficas.

7.4.1 Recolección de bio-especímenes

Para la toma de saliva total fue importante comunicarle al paciente las siguientes instrucciones,

- No consumir ningún líquido ni alimento sólido 1 hora antes de la cita.
- No cepillarse, fumar, masticar goma de mascar durante este periodo.
- Suspendir cualquier medicamento 8 horas antes de la sesión con autorización de su médico.
- Se le explica al paciente el procedimiento y se le dieron instrucciones a seguir.
- El paciente realizó un enjuague con agua destilada y se le pidió que se relaje por 5 minutos

- Se le pidió que incline su cabeza hacia adelante colocando su boca en donde se recolectara la muestra y se pidió que trague una vez y a partir de ese momento evitar pasar saliva por 5 minutos, reteniéndola en su boca hasta completar los 5 minutos y posteriormente se le solicitó que la deposite en uno de los micro-tubos que previamente se le proporcionó.
- Al terminar los 5 minutos se le pidió al paciente que escupa cada minuto por los próximos 5-15 minutos en el micro-tubo.
- Al finalizar la colecta se pesó el micro-tubo para saber el peso total de la muestra (restándole el peso del micro-tubo sin la muestra). Se transportaron los micro-tubos en hielo y se centrifugó la saliva en el equipo Z400K (Lab-International Inc. Woodbridge, NJ, USA) hasta obtener un sobrenadante y este se almacenó a -80°C hasta su procesamiento por el método de ELISA.

7.4.2 Toma de muestra de sangre para medición de β 2M

A los sujetos de estudio se les solicitó acudir a la toma de sangre con al menos 8 horas de ayuno; se les realizó la toma con una jeringa de 10 cc (la cual se llenó al máximo correspondiente), para posteriormente colocarla en tubos con anticoagulante (EDTA) para su posterior traslado al laboratorio. La sangre se centrifugó a 3000 x g por 5 minutos, y el plasma fue extraído y almacenado a 4°C hasta su uso.

El procedimiento detallado de cómo se realizó la toma de sangre se expone a continuación:

- Se identificó al paciente y se le explicó el procedimiento al que fue sometido.
- Se realizó la asepsia de manos del flebotomista.
- Se acomodó al paciente con la zona a puncionar sobre la almohadilla.
- Se revisó la piel y las venas del paciente para seleccionar el sitio que ofertó mejor seguridad de éxito de la técnica.
- Al seleccionar el sitio de punción, se prefirieron las venas del pliegue del codo por tener mejor calibre, permitiendo un mejor acceso.
- Se colocó la ligadura a 4 traves de dedos sobre el lugar a puncionar.
- Se desinfectó un área de 5 cm de la piel del paciente, con alcohol al 70%.
- Se insertó la aguja con el bisel hacia arriba, puncionando la vena en la misma dirección en que ésta se encuentra.
- Se obtuvo la cantidad de sangre adecuada.
- Se soltó la ligadura.
- Se retiró la jeringa, dejando la torunda seca en el sitio de punción, pidiéndole al paciente, dentro de lo posible, que la afirmará sin doblar el brazo.
- Se llenó con la cantidad necesaria los frascos de examen, siempre llene primero los frascos que tienen anticoagulantes, girándolos según corresponda.
- Se colocó tela adhesiva con un pequeño trozo de algodón seco o parche curita en el sitio de punción.

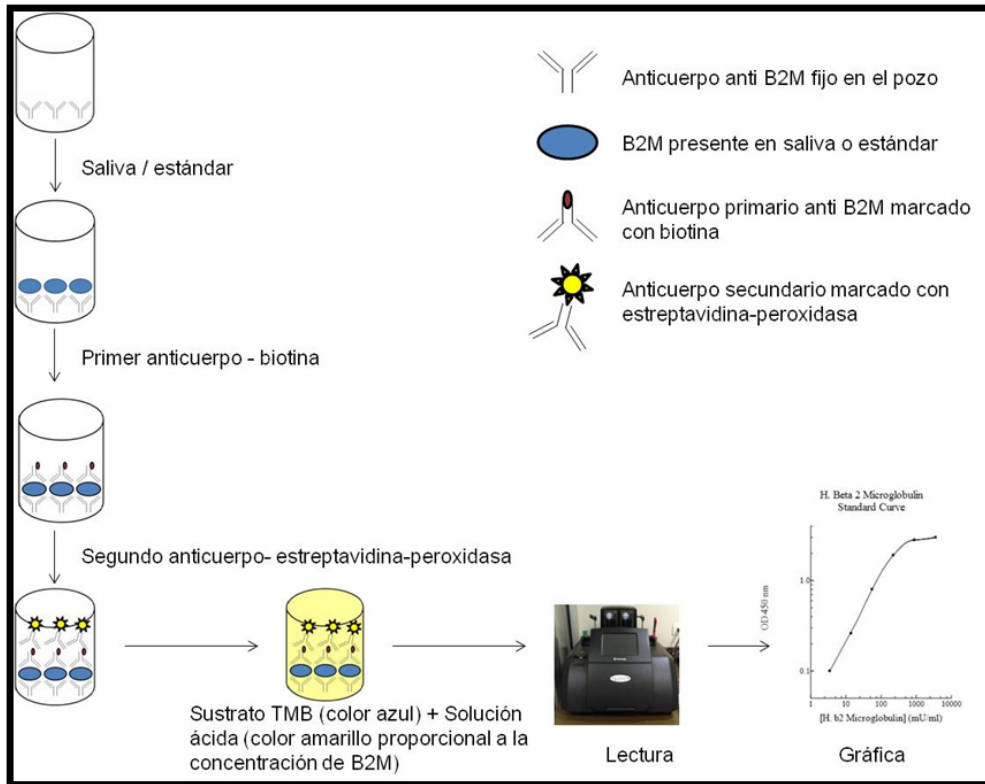
7.4.3 Medición de β 2M

La cuantificación de la β 2M se realizó mediante el Human Beta 2 Microglobulin ELISA Kit de la casa comercial Abcam (Cambridge, Reino Unido, catálogo No. ab108885). El ensayo está diseñado para la medición cuantitativa de los niveles de β 2M en fluidos distintos fluidos biológicos como plasma, plasma, leche, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo; así como sobrenadantes de cultivos celulares.

Se empleó una placa de 96 pozos recubierta con un anticuerpo específico contra β 2M. Se añadió a cada pozo muestra o estándar, y posteriormente se añadió un anticuerpo primario biotinilado contra β 2M; posterior a un lavado se añadió un conjugado anticuerpo-estreptavidina-peroxidasa, se lavó nuevamente y finalmente se agregó una solución de TMB para visualizar la reacción enzimática, la cual produjo una coloración azul que cambió a amarillo tras la adición de una solución ácida para detener la reacción. La intensidad de la coloración amarilla es directamente proporcional a la cantidad de β 2M capturada en la placa proveniente de las muestras o estándares. Los resultados se leyeron en un Lector de ELISA E9032 de la casa comercial Promega Bio-Systems (Sunnyvale, Inc. Sunnyvale, CA, Estados Unidos).

A partir de los resultados de los estándares se construyó una curva de calibración para calcular la ecuación de la recta y de ella se calcularon las concentraciones de β 2M presente en saliva y en sangre para cada una de las

muestras analizadas. La figura 7 muestra un panorama general de de la reacción de ELISA que llevamos a cabo para determinar las concentraciones de β 2M:



El procedimiento para la elaboración de la ELISA se detalla a continuación: Los reactivos se utilizan a temperatura ambiente (20-25°C).

Preparación de los reactivos. Se prepararon los reactivos frescos inmediatamente antes de su uso. Si se formaron cristales, se mezcló suavemente hasta que se disolvieron.

1. Diluyente 1X N: Se diluyó la cantidad requerida del concentrado del diluyente 10X en una dilución 1:10 con agua ultrapura. Se mezcló suavemente (Se puede almacenar un máximo de 30 días a 4°C).

2. Tampón de lavado 1X: Se diluyó el concentrado 20X de tampón de lavado a una dilución 1:20 con agua ultrapura. Se mezcló suavemente.
3. Anticuerpo detector anti beta 2 microglobulina biotinilado 1X. Se diluyó con diluyente 1X de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta y de acuerdo al número de pozos que se analizaron. Por ejemplo, para 4 tiras, 32 pozos, se requirió 1,760 µl de volumen total. El remanente se guardó a -20°C.
4. Conjugado SP1X. Se centrifugó el concentrado 100X de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Conjugado SP) y se diluyó la cantidad deseada con Diluyente 1X N. El remanente se guardó a -20°C.
5. Estándares. Se prepararon diluciones seriadas inmediatamente antes de su uso. Cualquier restante se almacenó a -20°C después de su reconstitución y utilizado dentro de los 30 días.

Procedimiento

Se removieron del empaque el número de tiras de pozos necesarias para el número de muestras a ensayar.

1. A cada pozo se añadieron 50 μL de muestra de saliva o estándar. La placa se cubrió e incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Después de la incubación se aspiró el contenido de cada pozo con ayuda de una línea de vacío y lavó cinco veces con 200 μL de tampón de lavado diluido al 1X, secando sobre toallas de papel después del último lavado.
3. A cada pozo se le añadió 50 μL de Anticuerpo detector anti beta 2 microglobulina biotinilado 1X. La placa se cubrió e incubó durante una hora a temperatura ambiente.
4. La placa se lavó como en el paso 2.
5. A cada pocillo de la placa se añadieron 50 μL de Conjugado SP 1X y se incubó por 30 minutos.
6. La placa se lavó como en el paso 2.

7. A cada pocillo de la placa se añadieron 50µL de sustrato cromógeno (TMB) y se incubó la placa durante 10 min a temperatura ambiente.
8. A cada pocillo de la placa se añadieron 50µL de la solución de paro en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que para la adición de TMB. Se mezcló con agitación suave. En los pocillos con B2M detectable el color azul cambió a amarillo.
9. Se realizó la lectura de manera inmediata a una absorbancia 450 nm. Se restó a las lecturas la corrección de longitud de onda a 570 nm de (para corregir imperfecciones ópticas).
10. Se construyó la curva de calibración en el programa Excel.

7.4.4 Análisis estadístico

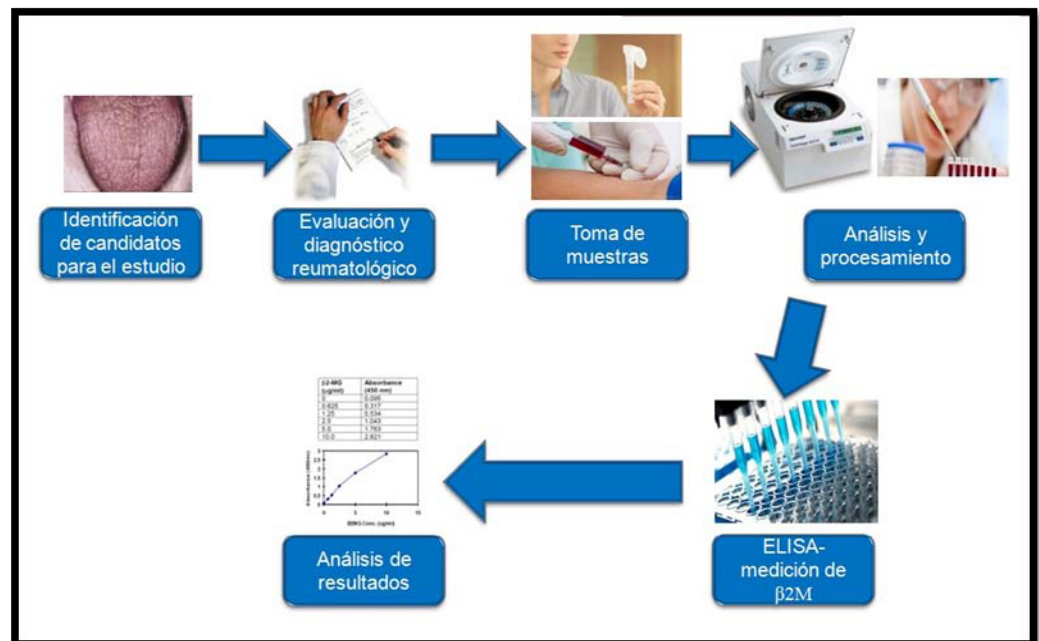
Se realizó estadística descriptiva para las variables cuantitativas describiendo su media y desviación estándar (variables normales) o mediana y rango intercuartil (no normales), dependiendo de su distribución y las pruebas de

normalidad (ShapiroWilk o Kologorov- Smirnov, según sea el caso). Se realizaron gráficos de barras o diagrama de cajas, respectivamente.

Se realizó estadística descriptiva para las variable cualitativas o categóricas y ordinales describiendo su frecuencia y su porcentaje, se graficarán en barras.

Se realizó estadística analítica, formando diferentes grupos clínicos y comparando las variables según su descripción y distribución. Para variables cuantitativas normales se utilizó el estadístico de T de student; para variables cuantitativas no normales se utilizó el estadístico U de Mann Whitney. Para las variables categóricas, la CHI cuadrada o exacta de Fisher.

Con esto se realizó el análisis univariado para encontrar factores asociados a las variables principales.



En resumen, la figura 6 muestra a la estrategia general que siguió este proyecto.

CAPÍTULO 8

RESULTADOS

Se evaluaron 256 individuos, 128 con diagnóstico de SS de los cuales 64 cursaban con SSp y 64 con SSs (de este último grupo se incluyeron 50 pacientes con SS secundario a Artritis reumatoide y 14 con SS secundario a Lupus Eritematoso Sistémico), además de 64 pacientes con SS seco no inmunológico (SSNI) y 64 sujetos sanos.

La tabla 1 y 2 muestra las principales variables clínicas, demográficas y serológicas de la población; los pacientes sanos mostraron ser más jóvenes que los controles.

Tabla 1. Variables clínicas y demográficas de los sujetos participantes.

Características generales	SSp n=64 (%)	SSs + AR n=50 (%)	SSs + LES n=14(%)	Sicca No-AI n=64 (%)	Sanos n=64 (%)
Edad (RIQ)	50 (15)	54.5 (16)	50 (14)	55.5 (18)	47 (18)
Género femenino	64 (100)	50 (100)	14 (100)	62 (97)	63 (98)
Uso de fármacos xerogénicos	28 (44)	18(28)	5(8)	46(72)	-
Uso de esteroides	18 (28)	22 (44)	5 (36)	0	-
Uso de Hidroxicloroquina	30 (47)	13 (26)	6 (43)	0	-
Uso de MTX	15 (23)	24 (48)	6 (43)	0	-
Uso de biológicos	0	4 (8)	0	0	0

Tabla 2. Principales Hallazgos serológicos, de flujo lagrimal, salival e histopatológicos en los grupos de estudio.

n= 256	SSp n=64 (%)	SSs + AR n=50 (%)	SSs + LES n=14 (%)	Sicca No-AI n=64 (%)	Sanos n=64 (%)
SSA/Ro	44 (69)	7 (16)	3 (23)	0	-
SSB/La	14 (22)	2 (5)	2 (17)	0	-
Schirmer positivo	52 (81)	35 (73)	9 (64)	40 (63)	-
Biopsia de GSM positiva	54 (87)	20 (61)	4 (50)	0	-
Flujo salival ml/min (RIQ)	0.06 (0.06)	0.06 (0.06)	0.09 (0.05)	0.08 (0.07)	-

La mediana de $\beta 2M$ salival en SSp fue de 0.71 $\mu\text{g/ml}$, en SS secundario a AR fue de 0.84 y en LES su valor fue de 0.63 $\mu\text{g/ml}$. Por lo que no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos.

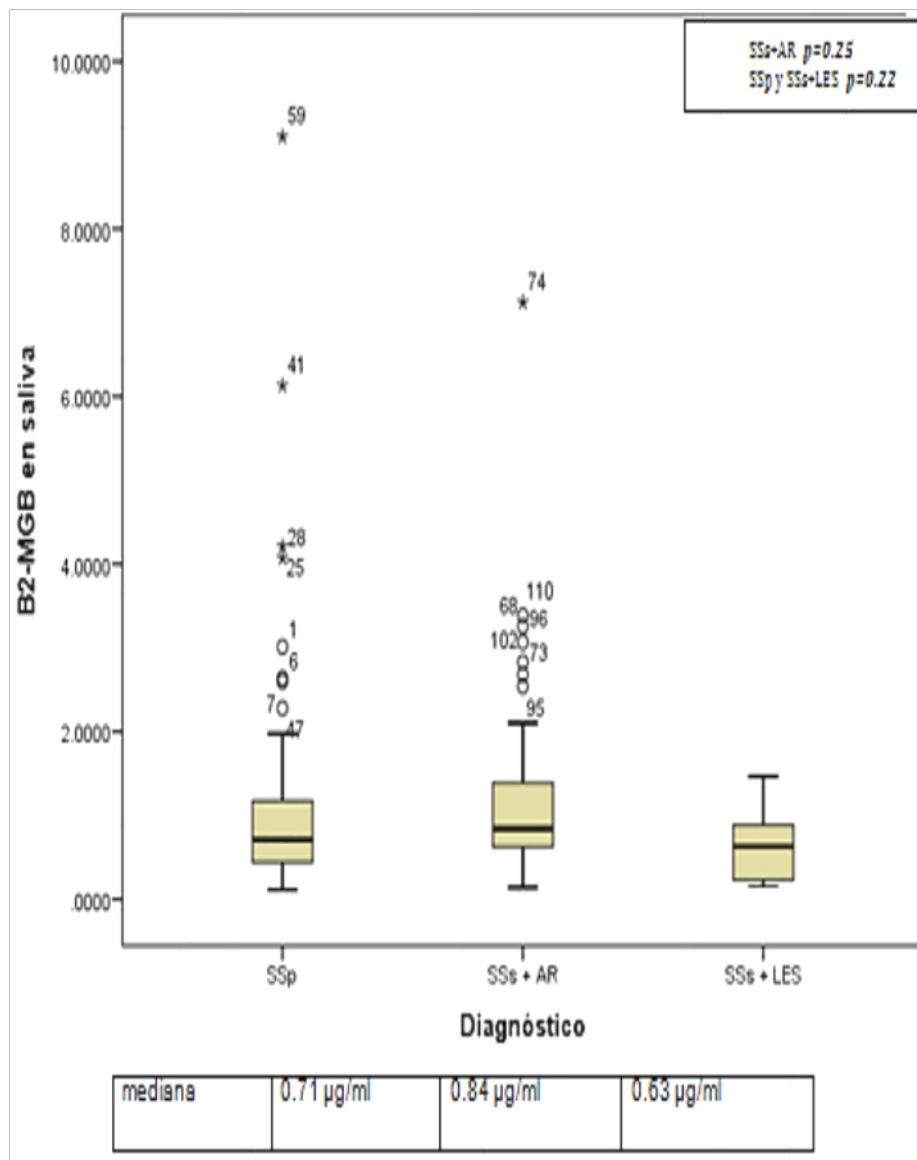
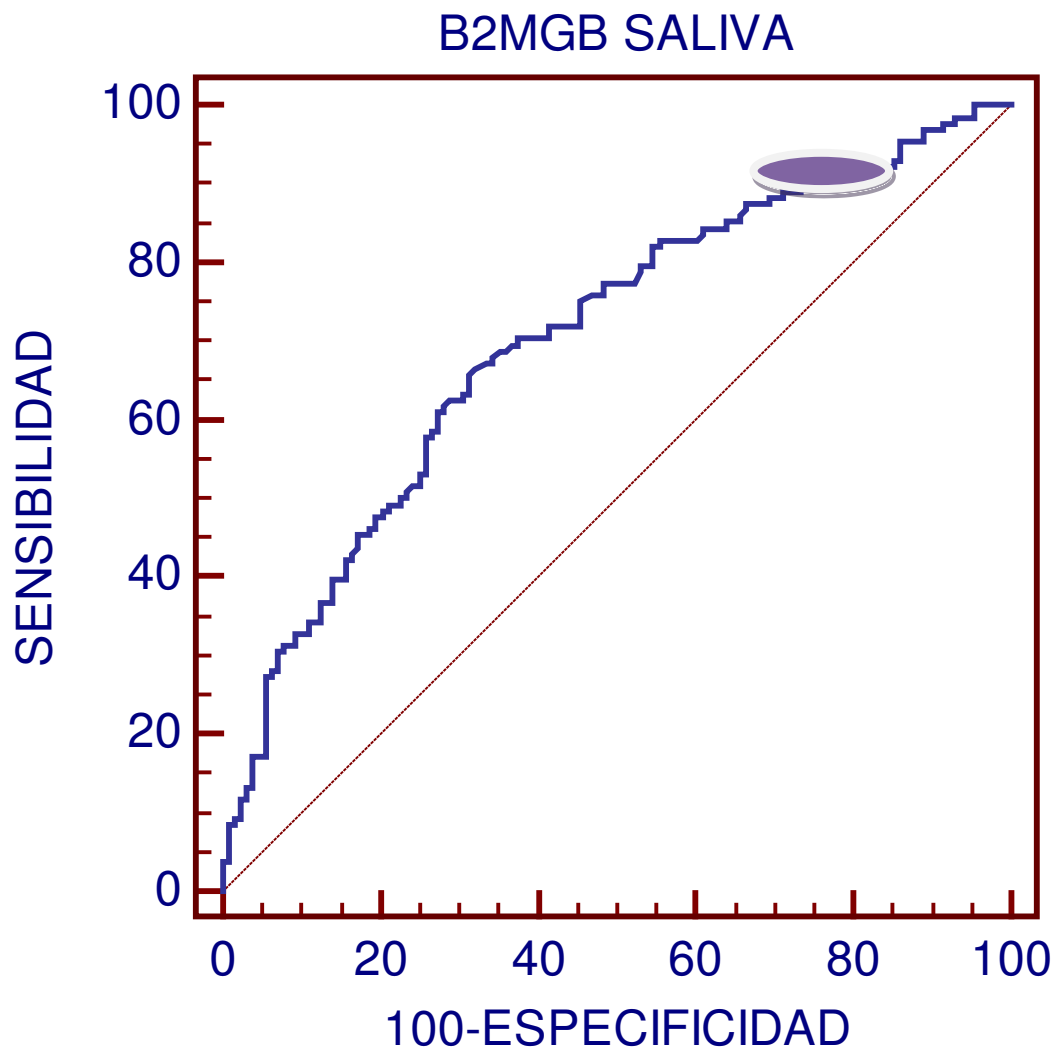


Figura 9. Comparación de niveles de $\beta 2M$ en saliva entre pacientes con SSp y SSs.

Un valor de corte B2MG de 0.28 $\mu\text{g/mL}$ con una sensibilidad de 88% y una especificidad de 31% puede distinguir entre pacientes con Síndrome Sjögren y no sjögren (SSNI y sanos) como se visualiza en la figura 10



Se encontraron diferencias significativas en los niveles β 2M salival entre pacientes que cursaban con SSp y pacientes con Sd Seco sin enfermedad autoinmune (SSNI)

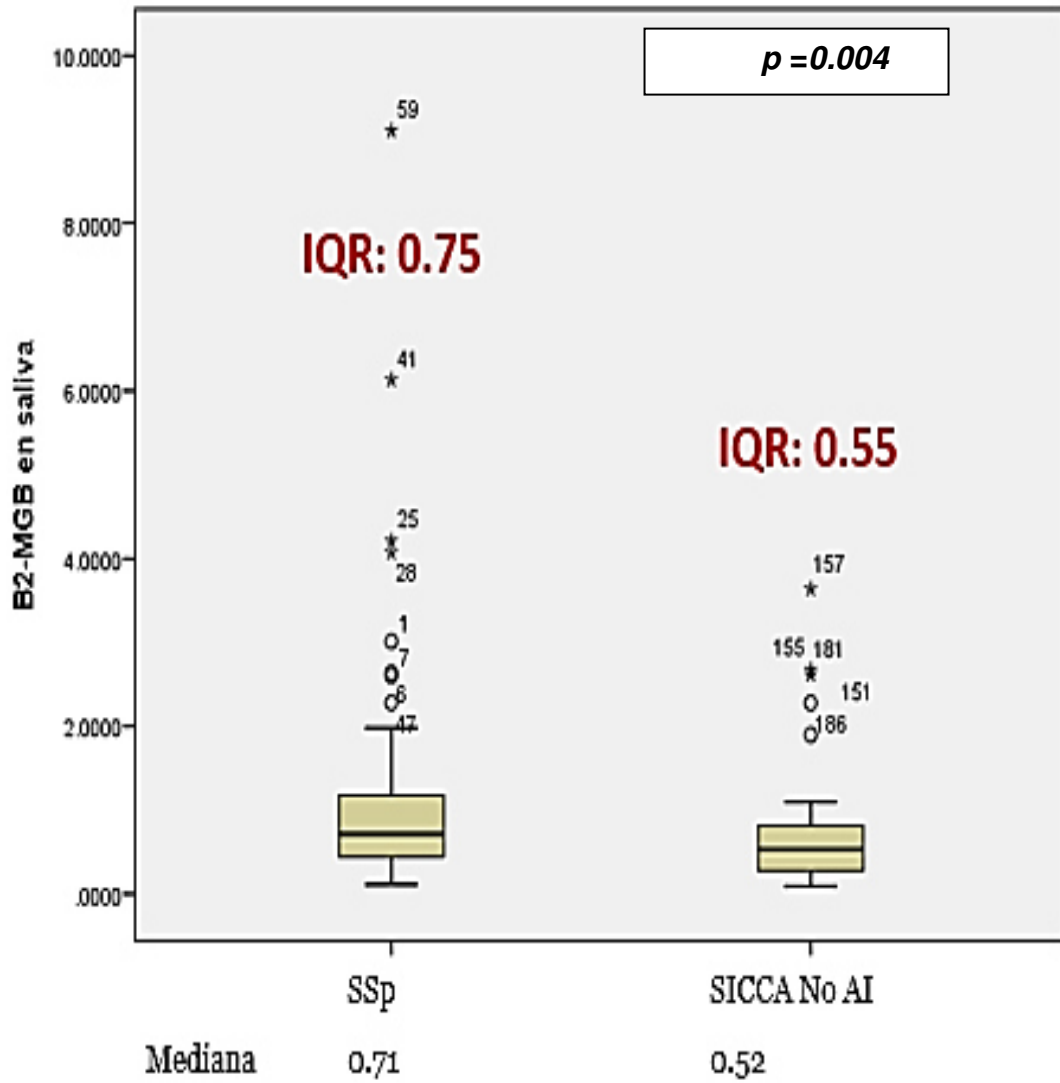
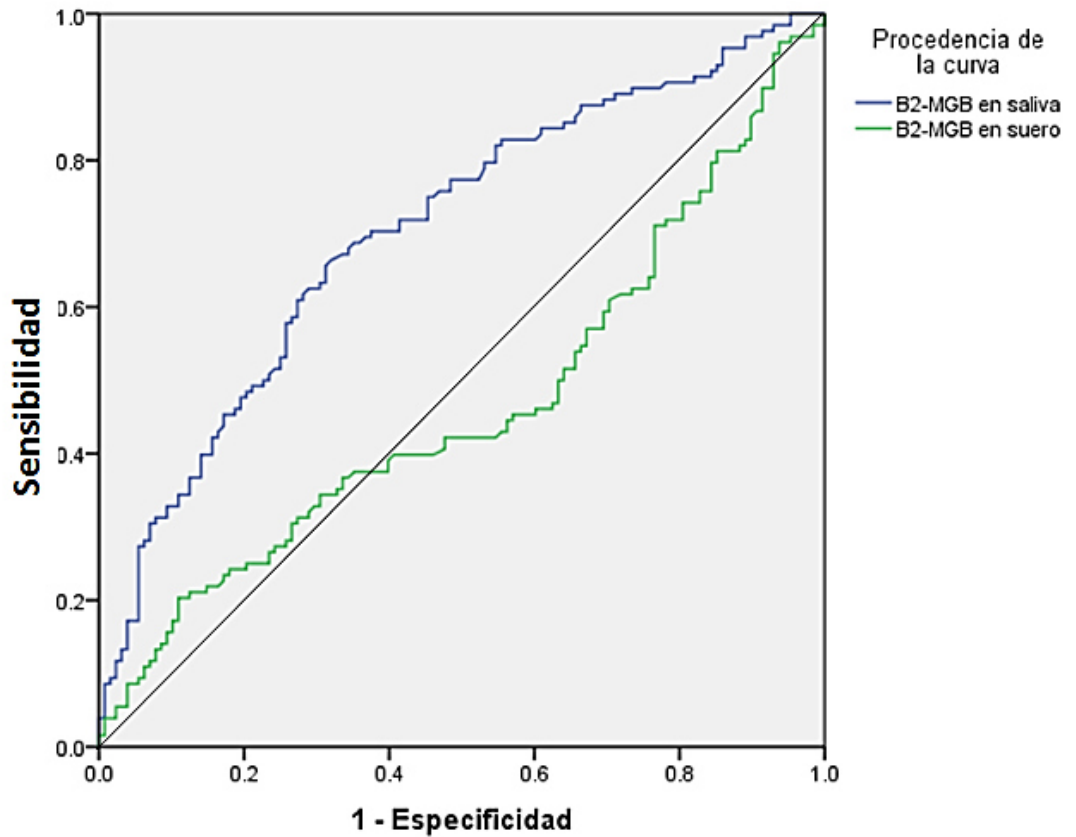


Figura 11. Comparación de las concentraciones de β 2M salival de pacientes con SSp y con síndrome seco sin autoinmunidad (SSNI)

Comparación entre los niveles $\beta 2M$ en saliva/plasma tanto de pacientes y testigos.



Se puede observar en la figura 12 que los valores plasmáticos no son constantes ya que existen variaciones que la hacen alejarse por debajo de la curva estimada

Se realizó una prueba de Rho de Spearman para comprobar si existió o no una correlación entre los niveles de $\beta 2M$ y la cantidad de infiltrados linfocitarios en la BGSM obteniendo un coeficiente de correlación de 0.458 y

un valor de $p < 0.01$ por lo que existió una diferencia estadísticamente significativa entre ambos parámetros.

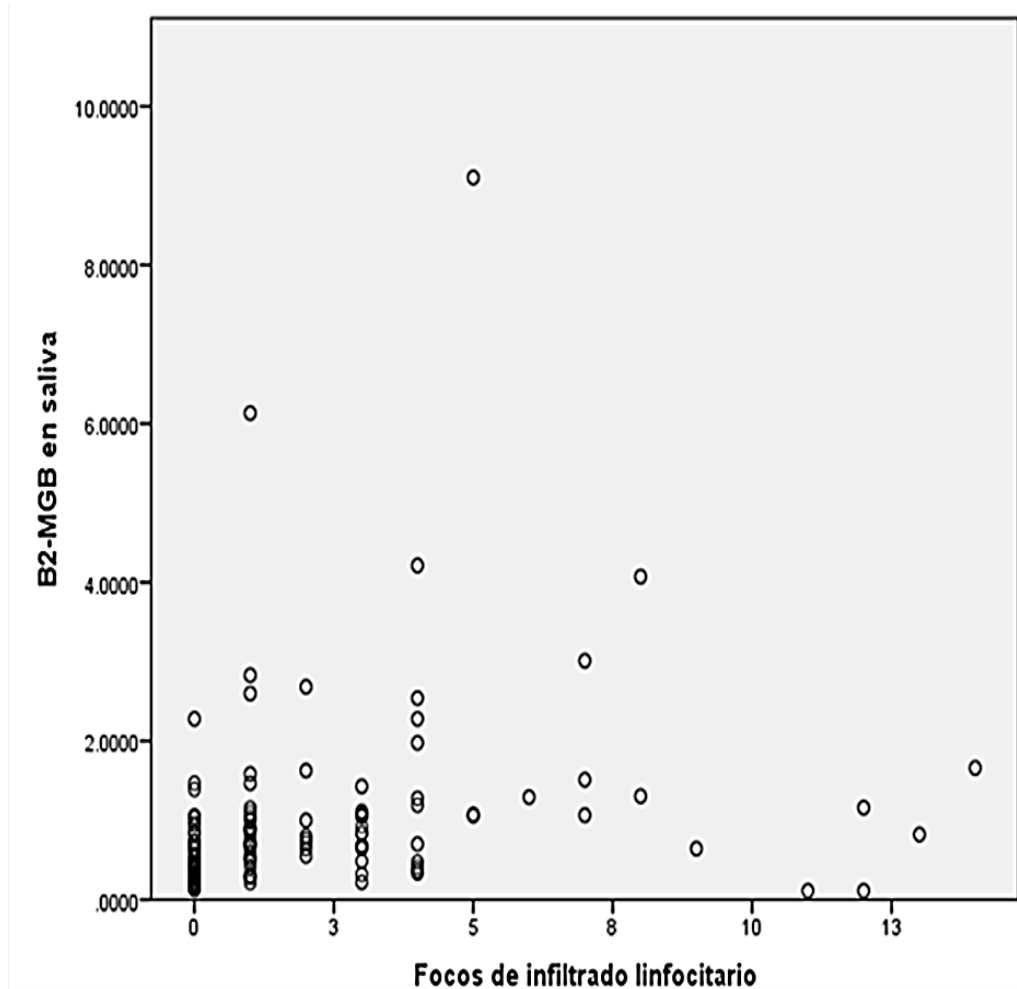


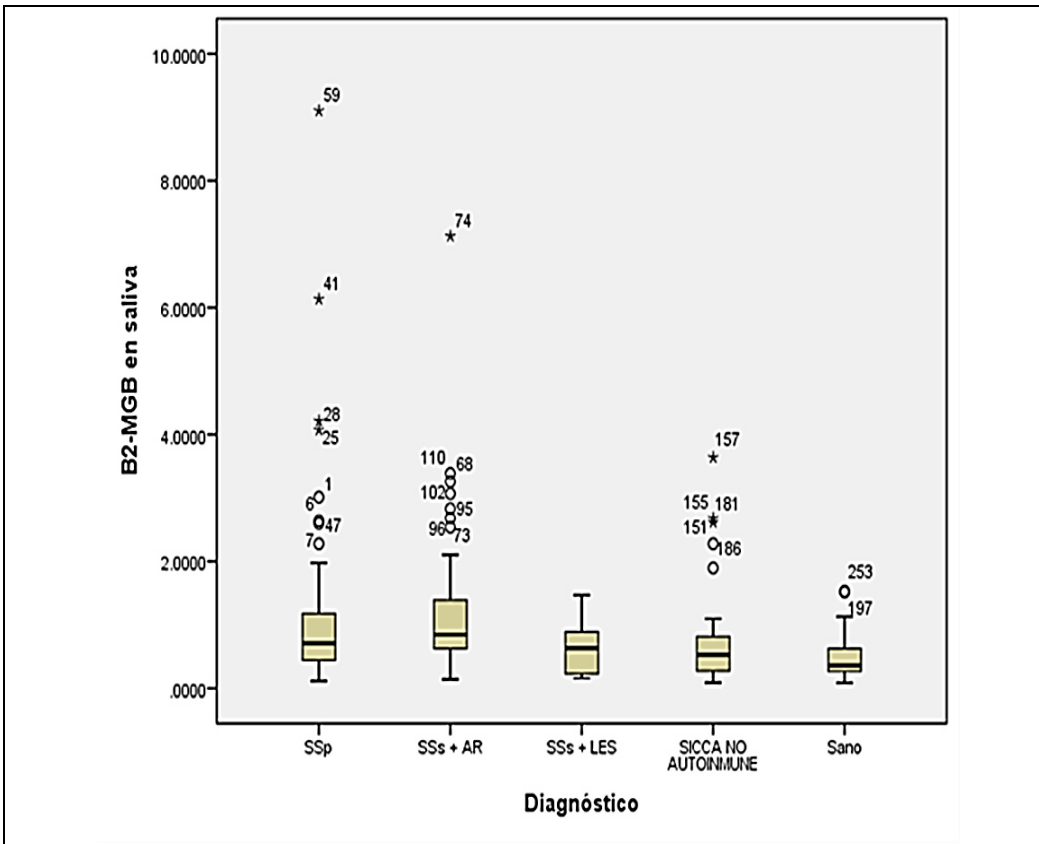
Figura 13. Grafica de dispersión. Correlación entre la medición de B2M en saliva con la cantidad de focos de infiltrado linfocitario en la BGSM.

La tabla 3 muestra los resultados generales de los niveles obtenidos de $\beta 2M$, tanto salival como plasmática para los 4 grupos de estudio.

Paciente	SSp		SSs		Sicca		Controles sanos	
	Saliva	Plasma	Saliva	Plasma	Saliva	Plasma	Saliva	Plasma
1	3.0114	2.1413	0.6989	1.0322	0.6595	0.7098	0.6250	0.8119
2	0.6823	0.4133	0.7044	1.0662	1.0292	2.5753	0.6995	0.8429
3	0.3433	1.7843	0.8698	0.7071	0.4137	0.8429	0.5417	ND
4	2.6403	0.4410	3.2583	0.8155	0.5316	2.0006	0.6652	1.0440
5	2.598	2.4487	0.2116	0.8207	0.3317	ND	1.5298	0.8920
6	0.4718	0.8739	0.3976	0.4747	0.2044	1.6674	0.7336	0.5681
7	1.9765	1.6105	1.6601	ND	1.0945	1.5657	0.3433	0.8882
8	1.3044	0.9057	0.3433	1.3038	0.4102	0.2625	0.2026	0.7578
9	0.5255	0.3820	2.6824	0.6471	0.6499	2.3412	0.3628	1.0250
10	0.8374	0.7136	7.1259	0.3844	0.5382	1.2768	0.0835	0.7044
11	0.3144	0.6250	0.7285	0.5027	0.2634	1.9005	0.2561	0.5083
12	1.4275	1.1466	2.1042	2.0427	0.4169	1.0750	0.2805	1.2042
13	1.0353	0.7887	1.6676	1.5480	0.4962	0.9762	0.2738	0.6404
14	1.0745	0.7136	0.1564	0.7483	0.1691	0.5998	0.3566	0.9166
15	1.2923	2.9244	0.7661	2.9758	0.1064	0.6656	0.3333	0.7800
16	0.4729	2.3100	0.5681	0.9630	0.2172	0.4709	0.2484	ND
17	0.8071	0.7882	0.6250	0.9166	0.3355	0.8885	0.2204	0.9030
18	0.1122	0.6087	0.7305	0.7407	0.7780	1.1615	0.4448	0.8223
19	1.4667	0.4390	0.2634	0.9687	0.7231	1.2333	1.0195	1.1671
20	4.2118	0.8478	0.3080	0.7231	0.5826	0.4731	0.2528	ND
21	0.7166	0.2835	1.3044	ND	1.0569	1.2736	0.4916	0.8949
22	0.3290	0.6455	0.6522	1.3782	0.6981	2.4072	0.6766	0.9630
23	4.0719	1.5323	1.2768	6.5675	2.2779	0.7578	1.1296	0.9278
24	0.3312	0.7690	0.2116	0.9057	0.7350	0.8119	0.2805	0.8683
25	0.9293	0.9653	0.7541	1.4414	0.1262	0.3007	0.4214	ND
26	0.6431	0.7708	0.7733	ND	0.4054	1.8846	0.2857	0.9882
27	0.3691	0.3820	1.4661	2.5670	2.6754	0.8327	0.5385	0.8429
28	0.6800	4.244	0.4843	2.2688	0.1054	0.9950	0.3013	0.8284
29	0.6449	1.3478	0.2289	0.7965	3.6381	ND	0.3802	0.7800
30	1.0644	1.5530	0.1767	0.0362	0.5139	1.3803	0.4916	0.7690
31	0.3030	0.7274	2.5402	0.6710	0.2528	ND	0.2699	0.7086
32	0.6710	0.7708	3.0682	1.4318	1.0730	1.6244	0.4272	0.7800
33	0.4028	0.8155	1.3909	0.5122	0.9586	1.3554	0.1669	0.6387
34	1.5843	0.4731	0.6656	2.7454	0.7946	ND	0.2204	0.8739
35	0.5255	0.5287	0.5970	1.4752	0.1907	1.0365	0.2383	0.5205
36	6.1333	0.7274	0.8473	1.8726	0.8525	0.8473	0.1967	0.8949
37	0.4703	0.1278	0.6111	0.3355	0.2661	0.9906	0.1372	1.3761
38	0.2902	0.7274	2.8285	1.6337	0.5312	0.9820	0.625	0.7578
39	0.7839	1.0039	0.4458	0.2411	0.4437	1.5433	1.0548	1.3044
40	0.2195	0.4437	0.8885	1.5168	0.2250	1.5103	0.1431	0.9509
41	0.1122	0.5796	1.0562	1.8866	0.8360	ND	0.3330	0.7690
42	2.2792	0.8104	1.3184	0.3115	1.0569	1.3937	0.3623	0.8782
43	0.8000	0.6471	0.8417	1.0768	0.5681	0.6522	0.4624	1.2273
44	0.5509	0.7790	0.1410	0.8576	0.8417	0.8532	0.8131	ND

45	0.7051	0.8025	1.0125	1.0751	0.4703	1.1023	0.3026	1.1495
46	0.3196	0.6250	3.3846	1.1832	0.2971	1.2664	0.5970	1.0014
47	1.1922	0.3724	0.4137	0.7776	0.2805	0.7607	0.7676	ND
48	1.1529	0.6250	0.3974	1.1647	0.3271	0.6835	1.0548	0.9392
49	1.0754	0.6360	0.7044	1.0174	0.6387	0.7908	0.8351	0.9166
50	0.8784	0.6813	0.7086	0.8417	0.1020	0.7354	0.2857	0.9278
51	0.3361	0.8121	1.0529	0.5874	0.5531	2.6479	0.4616	0.9882
52	0.2803	0.7136	0.9148	1.6737	0.3080	1.2333	0.6192	1.1452
53	0.6431	0.625	1.6270	1.1262	2.6163	0.9352	0.2738	0.5377
54	9.1018	0.7879	0.7350	1.2346	0.9687	0.4137	0.3212	0.6835
55	0.2116	0.8635	1.7101	1.1102	0.0887	1.3234	0.2679	0.6553
56	1.159	0.7941	0.4106	0.7223	0.6656	1.0751	0.8963	1.0916
57	0.206	0.6986	1.0561	1.4626	0.5245	0.5770	0.1491	0.9509
58	0.4769	1.1066	0.9984	0.3077	1.8963	1.0457	0.3448	1.3495
59	0.7001	0.8136	0.9052	0.4979	0.8912	ND	0.3507	1.7430
60	1.0903	0.8121	1.1140	1.1003	0.4703	1.3021	0.3625	0.9754
61	0.2027	1.3704	0.6387	0.7601	0.7709	ND	1.5139	1.0873
62	0.2592	ND	0.4527	ND	0.1064	ND	0.7620	1.3234
63	0.1702	0.9950	0.8212	0.8264	0.1633	0.9341	0.1129	ND
64	0.8651	1.2683	0.9359	1.8424	0.2131	0.8777	0.2915	ND

La figura 14 muestra, las diferencias en los niveles de cuantificación de $\beta 2M$ salival entre todos los grupos de estudio.



CAPÍTULO 9

DISCUSIÓN

Consideramos que la β 2M se debe usar como bio-marcador en pacientes con SS esto en base a que se cumple la definición de Bio-marcador propuesta por Sausan y cols: *"molécula simple o su combinación en un fluido ya sea saliva o sangre el cual está presente en muestras de pacientes con una enfermedad particular en comparación con otros sujetos."*(149)

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en otras poblaciones estudiadas ya que desde 1975 *Talal y cols* reportaron elevaciones de la B2M en saliva parotídea en SS y en fluido sinovial en AR y desde esos tiempos se ha reportado que las concentraciones en los fluidos biológicos exceden las concentraciones séricas sugiriendo que estas elevaciones son secundarias a la secreción local por infiltrados linfoides característicos en estas enfermedades. En este trabajo *Talal y cols* estudiaron 17 pacientes con SSp y se usó saliva parotídea (estimulada), los niveles de β 2M promedio fueron 4.99 +/- 1.97 para lo cual usó el método de radio-inmuno-ensayo y los criterios que se usaron para clasificar a los pacientes fué la presencia de keratoconjuntivis seca y disminución de la secreción salival (150). A diferencia de Talal nosotros medimos saliva total no estimulada y usamos el método de ELISA y clasificamos pacientes de acuerdo a criterios 2002/2012, nuestros niveles más bajos se deben (0.71 mcgr/ml) probablemente a diferente método usado y a que en nuestra población la mayoría de los pacientes se encontraban recibiendo tratamiento ya sea

inmuno-modulador y/o inmunosupresor, estas aseveraciones las hacemos en base a los trabajos de *Talal y cols* en donde mencionan variaciones de esta proteína en respuesta a tratamiento médico.

En el 2011 Hu y cols. Pre-validaron un panel Bio-marcadores salivales: β 2M, *Alfa-Enolasa* y *Catepsina D* en 34 pacientes con SSp, 34 con LES y 34 sanos (135); se usó ELISA para medir la β 2M y Western blotting para Alfa Enolasa y Catepsina D; a diferencia de nuestra población usó saliva_ parotídea estimulada con parafina; en sus resultados este panel de proteínas puede distinguir SSp de controles sanos con una área bajo la curva (ABC) de 0.99 (sensibilidad de 94% y especificidad de 97%), cuando se usó para distinguir SSp de LES arrojó una curva ABC de 0.94 con una sensibilidad de 92 % y especificidad de 88%. En este trabajo se desconoce si fueron pacientes con Sjögren secundario a LES. Nuestros niveles de β 2M comparados con los pacientes con Sjögren secundario a LES no fueron significativos ($p=0.22$).

Los valores de Hu de β 2M en promedio fueron de 1.5 mcrg/ml; desconocemos las características de su población para inferir acerca de estas diferencias con nuestra muestra; en este trabajo Hu no comparó SSp de pacientes con SSNI ni tampoco SSs a AR.

Nuestros resultados no permiten distinguir entre pacientes con SSp de SSs inclusive nuestros valores mostraron una tendencia más alta aunque no significativa de β 2M salival en pacientes con SSs a AR (β 2M de 0.84 mcgr/ml $p=0.25$). *Baldini y cols* en el 2011 encontraron resultados discordantes entre

estos dos grupos (40 pacientes con SSp y 7 con SSs a AR) ya que al utilizar electroforesis en gel de segunda dimensión y Western Blot encontraron aumento de esta en comparación a SSs a AR ($P < 0.05$), pero al realizar ELISA no existió diferencias significativas ($p=0.514$) entre ambos grupos (132).

Asashima y cols en el 2013 compararon los niveles de $\beta 2M$ salival con el método de aglutinación en látex entre 71 pacientes japoneses con SSp y 50 pacientes con SSs a otras enfermedades auto inmunes más frecuentemente AR, LES, ESp (18, 15 y 7 pacientes respectivamente) en este trabajo al igual que nosotros no encontró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sin embargo los niveles de esta proteína en promedio resultaron más altas que nuestro grupo (5.3 ± 5.1) y no se hizo análisis separado en el grupo de SSs a AR sino que se analizó todo el pool de pacientes con SSs (148).

El valor de corte de $\beta 2M$ salival que escogimos fue de 0.28 mcgr /ml esta área bajo la curva se encuentra solo por debajo de la biopsia de GSM y los anticuerpos para distinguir entre pacientes con SS ya sea primario o secundario de aquellos con SSNI y sanos con una adecuada sensibilidad (88%) y baja especificidad (31%); al tener una buena sensibilidad se puede convertir en una herramienta de tamizaje ya que la podemos utilizar como screening de pacientes y evitar un primer paso como sería realizar biopsia o anticuerpos los cuales son procedimientos caros, invasivos y que solo deben de ser realizados por personal experto lo que muchas veces provoca retraso en el diagnóstico de la enfermedad. *Asashima y cols* establecieron un valor de corte de $\beta 2M$ en saliva

no estimulada de 2.3 mg/L (AUC=0.9) en la población japonesa con una sensibilidad de 89 % y especificidad de 83% y una agudeza diagnóstica de 0.72 para distinguir entre SS del grupo No SS, a diferencia de la población japonesa nuestro valor de corte es mucho mas bajo probablemente debido a diferencias raciales (148).

Un resultado concordante con la literatura de otras poblaciones caucásicas y japonesas fue en que la β 2M nos ayuda a distinguir entre pacientes con SS (primario o secundario) de aquellos pacientes con SSNI, Maddali Bongi *et al* estudiaron hace tres décadas el rendimiento diagnóstico de β 2M en una pequeña muestra. En este estudio, el diagnóstico de SSp se hizo sobre la base de los criterios propuestos por Fox *et al* (84,85) los cuales actualmente no se utilizan (151).

Al comparar los valores de β 2M en saliva y plasma detectamos una media menor en plasma en comparación a la de la saliva; sin embargo la curva muestra desigualdad esto no nos permite usarla como herramienta diagnóstica. En relación a este hallazgo *Talal y cols* encontraron altas concentraciones séricas de β 2M en 135 pacientes con SS comparación a pacientes con posible SS y sanos estos valores elevados estaban asociados a manifestaciones extra-glandulares de la enfermedad como alteraciones renales (nefritis o acidosis tubular renal), Macro-globulinemia de Waldenström o a malignidades hematológicas como leucemias o linfomas, además de estas observaciones. *Talal y cols* realizaron determinaciones seriadas de β 2M y detectaron variaciones

en la misma relacionadas ya sea a exacerbaciones de la enfermedad o a respuesta a tratamiento; en nuestra población no medimos seriadamente la β 2M por lo que no podemos realizar aseveraciones al respecto (152).

Concordantemente con *Talal y cols.* encontramos correlación entre focos de infiltrado linfocítico en la BGSM y los niveles de β 2M salival , aunque se observaron bajas concentraciones de β 2M salival en algunos pacientes con biopsia positiva, Talal encontró 17 de 18 pacientes con biopsia negativa y bajas concentraciones de β 2M, en nuestro estudio a diferencia de Talal realizamos 54 biopsias (84%) en pacientes con SSp y un número menor (20%) en pacientes con SSs . *Maddali-Bongi y cols.* en 1995 similar a nuestros resultados encontró una correlación positiva de β 2M en saliva no estimulada de 12 pacientes con una correlación positiva entre el numero de focos y la concentración de β 2M salival ; a diferencia de *Markusse y cols* en 1992 quien no encontró correlación usando saliva parotídea (151, 153). *Baldini y cols* no encontraron correlación entre el número de focos en la BGSM, factor reumatoide y SSB/LA y los valores de β 2M en saliva no estimulada, pero si encontró similar a nuestro estudio una correlación positiva entre el número de focos y los valores de anti SSA/RO. (132)

CAPITULO 10

CONCLUSIONES

Se propone a la β 2M salival como un Bio-marcador sensible para distinguir entre pacientes con SS ya sea primario o secundario, de aquellos pacientes sanos o que cursen con SSNI ya que es una herramienta sencilla y no invasiva que puede evitar retrasos en el diagnóstico debido a la complejidad en el diagnóstico de esta enfermedad. Necesitamos más estudios en nuestra población que corroboren estos resultados.

CAPITULO 11

REFERENCIAS:

- 1 Peri Y, Agmon-Levin N, Theodor E, Shoenfeld Y. Sjogren's syndrome, the old and the new. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2012 Feb;26(1):105-17.
- 2 Mavragani CP, Moutsopoulos HM. The geoepidemiology of Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev*. 2010 Mar;9(5):A305-10.
- 3 Mikuliez J: UebereineeigenartigesymmetrischeErkrankung derTränen und Mundspeicheldrüsen. *Medical classics*. 1937; 2: 165.
- 4 Hadden WB: On " dry mouth", or suppression of the salivary and buccal secretions. *Trans. ClinSocLondon*. 1888; 21: 176.
- 5 "Talal N: Sjögren's Syndrome: Historical overview and clinical spectrum of disease. *Rheumatic Dis Clin NA*. 1992; 18: 507-515"
- 6 Leber: Ueber die Entstehung der Netzhautablosung. *Ver Versamml Ophthical Ges Stuttg*. 1882; 14: 165
- 7 "Anaya, J.-M., Ramos, C. M., Mario, C., & Carrasco, G. (2001). Síndrome de Sjögren (1st ed.). Medellín, Colombia. Retrieved from http://www.sjogrenchile.cl/pdf/Libro_azuldeSS.pdf"
- 8 Gougerot H: Insuffisance progressive et atrophie des glandes salivaires et muqueuses de la bouche, desconjonctives (et parfois des muqueusesnasale, laryngee, vulvaire) secheresse de la bouche, des conjonctives, etc. *Bull. Med. (Par.)*. 1926; 40: 360.

- 9 Albrich K: Filiform keratitis due to insufficient secretion of lacrimal glands. 3 cases. Arch Ophthal. 1928; 121: 402
- 10 Sjögren H: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis (Keratitis filiformis bei Hypofunktion der Tränenrüsen). Acta Ophthal (Kbh). 1933; 11: 1.
- 11 Sjögren, H: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis Sicca. II. Allgemeine Symptomatologie und Ätiologie. Acta Ophthal (Kbh). 1935; 13: 1.
- 12 Sjögren H: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis Sicca. III. Mikroskopische Veränderungen der Nasendrüsen. Acta Ophthal (Kbh). 1935; 13: 40.
- 13 Sjögren H: Dry keratoconjunctivitis as partial symptom of larger symptom complex. Nord Med. 1935; 9: 953.
- 14 Sjögren H: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca. VI. Das sicca syndrom und ähnliche Zustände. Dacryosialadenopathia atrophicans. Acta Ophthal (Kbh). 1940; 18: 369
- 15 Sjögren H: Keratoconjunctivitis sicca - ein Teilsymptom eines grösseren symptomatischen Komplexes. Ver Versamml Deutsch Ophthal Gesellsch. 1936; 51:
- 16 Sjögren H: Further studies of keratoconjunctivitis sicca. Acta Ophthal (Kbh). 1937; 15: 519.
- 17 Sjögren H: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca. IV. Mikroskopische Untersuchungen über das initial stadium der Drüsenveränderungen. Acta Ophthal (Kbh). 1938; 16: 70.

- 18 Sjögren H: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca. V. Augenveränderungen nach extirpation der Tränendrüse Behandlung. Acta Ophthal (Kbh). 1938; 16: 80.
- 19 Sjögren H: Keratoconjunctivitis sicca contre les lymphogranulomatoses. Acta Med Scan. 1940; 103:526.
- 20 Sjögren H: Keratoconjunctivitis sicca, En: Modern Trends in ophthalmology, Ridley F, Sorsby A (Editores), Butterworth, London. 1940, p. 403.
- 21 Sjögren H: A New conception of Keratoconjunctivitis sicca (Keratitis filiformis in hypofunction of the lachrymal glands). (Traducido por JB Hamilton) Australasian Medical Pub. Co., Sydney. 1943.
- 22 Sjögren H: Keratoconjunctivitis sicca and chronic polyarthritis. Acta Med Scand. 1948; 130: 484.
- 23 Sjögren H: Some problems concerning keratoconjunctivitis sicca and sicca syndrome. Acta Ophtha (Kbh). 1951; 29:33.
- 24 Sjögren H, Eriksen A: ACTH and Keratoconjunctivitis sicca. Acta Ophthal (Kbh).1952; 30: 463.
- 25 Sjögren H: Congenital alacrimia and keratoconjunctivitis sicca in children. New Zeal Med J. 1952 (Suppl.) p. 32.
- 26 Touraine A: La xérodermostèose (Syndrome de Gougerot-HouwersSjögren). Presse Med. 1950; 58:405.
- 27 Roguedas, A.-M., Youinou, P., Lemasson, G., Pennec, Y.-L., & Misery, L. (2006). Primary Gougerot-Sjogren syndrome: a dermatological approach. Journal

of the European Academy of Dermatology and Venereology, 20(3), 243–247.

<https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2006.01441.x>

28 13. Morgan WS, Castleman B: A clinico-pathologic study of “Mikulicz’s disease”. *Amer J Path.* 1953; 29: 471.

29 Morgan WS: The probable systemic nature of Mikulicz’s disease and its relation to Sjögren’s syndrome. *New Eng J Med.* 1954; 251: 5.

30 Morgan AD, Raven RW: Sjögren syndrome: A general disease. *Brit J Surg.* 1952; 40: 154.

31 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.* 1979; 66: 733

32 Chisholm, D. M., Waterhouse, J. P., & Mason, D. K. (1970). Lymphocytic sialadenitis in the major and minor glands: a correlation in postmortem subjects. *Journal of Clinical Pathology*, 23(8), 690–694.

33 Pillemer SR, Matteson EL, Jacobsson LT, Martens PB, Melton LJ, 3rd, O’Fallon WM, et al. Incidence of physician-diagnosed primary Sjogren syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo ClinProc.* 2001 Jun;76(6):5939.

34 Qin, B., Wang, J., Yang, Z., Yang, M., Ma, N., Huang, F., & Zhong, R. (2015). Epidemiology of primary Sjögren’s syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(11), 1983–1989. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205375>

- 35 Maldini, C., Seror, R., Fain, O., Dhote, R., Amoura, Z., Bandt, M., ... & Lhote, F. (2014). Epidemiology of primary Sjögren's syndrome in a French multiracial/multiethnic area. *Arthritis care & research*, 66(3), 454-463.
- 36 Longhi, B. S., Appenzeller, S., Centeville, M., Gusmão, R. J., & Marini, R. (2011). Primary Sjögren's syndrome in children: is a family approach indicated?. *Clinics*, 66(11), 1991-1993.
- 37 Cobb, B. L., Lessard, C. J., Harley, J. B., & Moser, K. L. (2008). Genes and Sjögren's syndrome. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 34(4), 847–68, vii. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2008.08.003>
- 38 Ice, J. A., Li, H., Adrianto, I., Lin, P. C., Kelly, J. A., Montgomery, C. G., ... Moser, K. L. (2012). Genetics of Sjögren's syndrome in the genome-wide association era. *Journal of Autoimmunity*, 39(1–2), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.01.008>
- 39 Kuo, C.-F., Grainge, M. J., Valdes, A. M., See, L.-C., Luo, S.-F., Yu, K.-H., ... Doherty, M. (2015). Familial Risk of Sjögren's Syndrome and Co-aggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families: A Nationwide Population Study. *Arthritis & Rheumatology*, 67(7), 1904–1912. <https://doi.org/10.1002/art.39127>
- 40 Besana C, Salmaggi C, Pellegrino C, Pierro L, Vergani S, Faravelli A, et al. Chronic bilateral dacryo-adenitis in identical twins: a possible incomplete form of Sjogren syndrome. *Eur J Pediatr* 1991;150:652–5.
- 41 Bolstad AI, Haga HJ, Wassmuth R, et al. Monozygotic twins with primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*. 2000;27(9):2264–6. [PubMed]

- 42 Houghton KM, Cabral DA, Petty RE, et al. Primary Sjogren's syndrome in dizygotic adolescent twins: one case with lymphocytic interstitial pneumonia. *J Rheumatol*. 2005;32(8):1603–6. [PubMed]
- 43 Scofield RH, Kurien BT, Reichlin M. Immunologically restricted and inhibitory anti-Ro/SSA in monozygotic twins. *Lupus*. 1997;6(4):395–8. [PubMed]
- 44 Reveille, J. D. (1991). The molecular genetics of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*, 3(5), 722–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1751307>
- 45 Reveille, J. D., Wilson, R. W., Provost, T. T., Bias, W. B., & Arnett, F. C. (1984). Primary Sjögren's syndrome and other autoimmune diseases in families. Prevalence and immunogenetic studies in six kindreds. *Annals of Internal Medicine*, 101(6), 748–56.
- 46 Cruz-Tapias P, Rojas-Villarraga A, Maier-Moore S, Anaya JM. HLA and Sjogren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmun Rev*. 2012 Feb;11(4):281-7.
- 47 Kimoto O, Sawada J, Shimoyama K, Suzuki D, Nakamura S, Hayashi H, et al. Activation of the interferon pathway in peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*. 2011 Feb;38(2):310-6.
- 48 Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Pasternack A, Hurme M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjogren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Jun;40(6):656-61.

- 49 Triantafyllopoulou A, Moutsopoulos H. Persistent viral infection in primary Sjogren's syndrome: review and perspectives. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007 Jun;32(3):210-4.
- 50 Mavragani CP, Fragoulis GE, Moutsopoulos HM. Endocrine alterations in primary Sjogren's syndrome: an overview. *J Autoimmun*. 2012 Dec;39(4):354-8.
- 51 Valtysdóttir, S. T., Wide, L., & Hällgren, R. (2001). Low serum dehydroepiandrosterone sulfate in women with primary Sjögren's syndrome as an isolated sign of impaired HPA axis function. *The Journal of Rheumatology*, 28(6), 1259–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11409117>
- 52 Mavragani, C. P., Schini, M., Gravani, F., Kaltsas, G., & Moutsopoulos, H. M. (2012). Brief Report: Adrenal autoimmunity in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism*, 64(12), 4066–4071. <https://doi.org/10.1002/art.34679>
- 53 Jara, L. J., Medina, G., Saavedra, M. A., Vera-Lastra, O., & Navarro, C. (2011). Prolactin and Autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 40(1), 50–59. <https://doi.org/10.1007/s12016-009-8185-3>
- 54 Toubi E, Shoenfeld Y. The role of vitamin D in regulating immune responses. *Isr Med Assoc J*. 2010 Mar;12(3):174-5.
- 55 Szodoray P, Horvath IF, Papp G, Barath S, Gyimesi E, Csathy L, et al. The immunoregulatory role of vitamins A, D and E in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Feb;49(2):211-7.
- 56 Karaiskos D, Mavragani CP, Makaroni S, Zinzaras E, Voulgarelis M, Rabavilas A, et al. Stress, coping strategies and social support in patients with

primary Sjogren's syndrome prior to disease onset: a retrospective case-control study. *Ann Rheum Dis.* 2009 Jan;68(1):40-6.

57 Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *J Autoimmun.* 2010 Nov; 35(3):219-24.

58 Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome or autoimmune epithelitis? *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007 Jun;32(3):199-200.

59 Mavragani, C. P., & Moutsopoulos, H. M. (2014). Sjögren's syndrome. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 273-285.

60 Daniels, T. E., Cox, D., Shiboski, C. H., Schiødt, M., Wu, A., Lanfranchi, H., ... Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Research Groups, F. the S. I. C. C. A. (SICCA) R. (2011). Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis and Rheumatism*, 63(7), 2021–30. <https://doi.org/10.1002/art.30381>

61 Steinfeld, S., Cogan, E., King, L. S., Agre, P., Kiss, R., & Delporte, C. (2001). Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjögren's syndrome patients. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 81(2), 143–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11232635>

62 Enger, T. B., Aure, M. H., Jensen, J. L., & Galtung, H. K. (2014). Calcium signaling and cell volume regulation are altered in Sjögren's Syndrome. *Acta*

Odontologica Scandinavica, 72(7), 549–556.

<https://doi.org/10.3109/00016357.2013.879995>

63 Delporte, C., Bryla, A., & Perret, J. (n.d.). Aquaporins in Salivary Glands: From Basic Research to Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms17020166>

64 Yao, C., Purwanti, N., Karabasil, M. R., Azlina, A., Javkhlan, P., Hasegawa, T., ... Hosoi, K. (2010). Potential Down-Regulation of Salivary Gland AQP5 by LPS via Cross-Coupling of NF- κ B and p-c-Jun/c-Fos. *The American Journal of Pathology*, 177(2), 724–734. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090282>

65 Yamamura, Y., Motegi, K., Kani, K., Takano, H., Momota, Y., Aota, K., ... Azuma, M. (2012). TNF- α inhibits aquaporin 5 expression in human salivary gland acinar cells via suppression of histone H4 acetylation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(8), 1766–75. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01456.x>

66 Smith, J. K., Siddiqui, A. A., Modica, L. A., Dykes, R., Simmons, C., Schmidt, J., ... Berk, S. L. (1999). Interferon-alpha Upregulates Gene Expression of Aquaporin-5 in Human Parotid Glands. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 19(8), 929–935. <https://doi.org/10.1089/107999099313479>

67 Cummins, M. J., Papas, A., Kammer, G. M., & Fox, P. C. (2003). Treatment of primary sjögren's syndrome with low-dose human interferon alfa

administered by the oromucosal route: Combined phase III results. *Arthritis & Rheumatism*, 49(4), 585–593. <https://doi.org/10.1002/art.11199>

68 Shiozawa, S., Cummins, J. M., & Fox, P. C. (2000). Opening the flood gates: interferon-alpha treatment for Sjögren's syndrome. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 13(5), 305–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034537>

69 Ship, J. A., Fox, P. C., Michalek, J. E., Cummins, M. J., Richards, A. B., & Group, I. P. S. (1999). Treatment of Primary Sjogren's Syndrome with Low-Dose Natural Human Interferon-alpha Administered by the Oral Mucosal Route: A Phase II Clinical Trial. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 19(8), 943–951. <https://doi.org/10.1089/107999099313497>

70 Sumida, T., Tsuboi, H., Iizuka, M., Hirota, T., Asashima, H., & Matsumoto, I. (2014). The role of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells in Sjögren's syndrome: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 51, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.012>

71 Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun.* 2010 Jun;34(4):400-7.

72 Venables, P. J. W. (2004). Sjögren's syndrome. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 18(3), 313–29. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2004.02.010>

73 Radfar, L., Shea, Y., Fischer, S. H., Sankar, V., Leakan, R. A., Baum, B. J., & Pillemer, S. R. (2003). Fungal load and candidiasis in Sjögren's syndrome.

Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics, 96(3), 283–287. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(03\)00224-5](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(03)00224-5)

74 Abraham, C. M., al-Hashimi, I., & Haghighat, N. (1998). Evaluation of the levels of oral *Candida* in patients with Sjögren's syndrome. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 86(1), 65–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690247>

75 Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjogren syndrome. *Arch Intern Med*. 2004 Jun 28;164(12):1275-84.

76 Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum*. 1984 Feb;27(2):147-56.

77 Shacham R, Puterman MB, Ohana N, Nahlieli O. Endoscopic treatment of salivary glands affected by autoimmune diseases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Feb;69(2):476-81.

78 Tzioufas AG, D.I. Mitsias, and H.M. Moutsopoulos. Sjögren's Syndrome. In: M.C. Hochberg ea, editor. *Rheumatology*. Philadelphia: Elsevier; 2008.

79 Lemp, M. A. (1995). Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *The CLAO Journal : Official Publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists, Inc*, 21(4), 221–32.

80 Versura, P., Frigato, M., Cellini, M., Mulè, R., Malavolta, N., & Campos, E. C. (2007). Diagnostic performance of tear function tests in Sjogren's syndrome patients. *Eye*, 21(2), 229–237. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6702204>

- 81 Athanasios G Tzioufas CPM, Xavier Mariette. Sjögren's Syndrome and lymphoproliferations in autoimmune diseases. Eular On-line Course on Rheumatic Diseases. 2007-2011:module n°22.
- 82 Tincani A, Andreoli L, Cavazzana I, Doria A, Favero M, Fenini MG, et al. Novel aspects of Sjogren's syndrome in 2012. BMC Med. 2013;11:93
- 83 Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. SeminArthritisRheum. 2000 Apr;29(5):296-304.
- 84 Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Rosas J, Pallares L, Calvo-Alen J, Cervera R, et al. Primary Sjogren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. Medicine (Baltimore). 2002 Jul;81(4):270-80.
- 85 ter Borg EJ, Risselada AP, Kelder JC. Relation of systemic autoantibodies to the number of extraglandular manifestations in primary Sjogren's Syndrome: a retrospective analysis of 65 patients in the Netherlands. Semin Arthritis Rheum. 2011 Jun;40(6):547-51.
- 86 Seror R, Bootsma H, Bowman SJ, Dorner T, Gottenberg JE, Mariette X, et al. Outcome measures for primary Sjogren's syndrome. J Autoimmun. 2012 Aug;39(1-2):97-102.
- 87 Ramos-Casals M, Solans R, Rosas J, Camps MT, Gil A, Del Pino-Montes J, et al. Primary Sjogren syndrome in Spain: clinical and immunologic expression in 1010 patients. Medicine (Baltimore). 2008 Jul;87(4):210-9.

- 88 Tincani A, Andreoli L, Cavazzana I, Doria A, Favero M, Fenini MG, et al. Novel aspects of Sjogren's syndrome in 2012. *BMC Med.* 2013;11:93.
- 89 Ostuni, P., Botsios, C., Sfriso, P., Bertagnin, A., Cozzi, F., Doria, A., & Todesco, S. (2002). [Prevalence and clinical features of fibromyalgia in systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis and Sjögren's syndrome]. *Minerva Medica*, 93(3), 203–9.
- 90 Fauchais, A. L., Ouattara, B., Gondran, G., Lalloue, F., Petit, D., Ly, K., ... Hatron, P. Y. (2010). Articular manifestations in primary Sjogren's syndrome: clinical significance and prognosis of 188 patients. *Rheumatology*, 49(6), 1164-1172.
- 91 Soy, M., & Piskin, S. (2007). Cutaneous findings in patients with primary Sjogren's syndrome. *Clinical Rheumatology*, 26(8), 1350–1352.
- 92 Fox, R. I., & Liu, A. Y. (2006). Sjögren's syndrome in dermatology. *Clinics in Dermatology*, 24(5), 393–413.
- 93 Tsokos, M., Lazarou, S. A., & Moutsopoulos, H. M. (1987). Vasculitis in primary Sjögren's syndrome. Histologic classification and clinical presentation. *American Journal of Clinical Pathology*, 88(1), 26–31.
- 94 Al-Ezzi, M. Y., Pathak, N., Tappuni, A. R., & Khan, K. S. (2016). Primary Sjögren's syndrome impact on smell, taste, sexuality and quality of life in female patients: A systematic review and meta-analysis. *Modern Rheumatology*, 1–7.

- 95 Priori, R., Minniti, A., Derme, M., Antonazzo, B., Brancatisano, F., Ghirini, S., ... Framarino-dei-Malatesta, M. (2015). Quality of Sexual Life in Women with Primary Sjogren Syndrome. *The Journal of Rheumatology*, 42(8), 1427–1431.
- 96 Ugurlu, G. K., Erten, S., Ugurlu, M., Caykoylu, A., & Altunoğlu, A. (2014). Sexual Dysfunction in Female Patients with Primary Sjögren's Syndrome and Effects of Depression: Cross-Sectional Study. *Sexuality and Disability*, 32(2), 197–204.
- 97 van Nimwegen, J. F., Arends, S., van Zuiden, G. S., Vissink, A., Kroese, F. G. M., & Bootsma, H. (2015). The impact of primary Sjögren's syndrome on female sexual function. *Rheumatology*, 54(7), 1286–1293.
- 98 Maddali Bongi, S., Del Rosso, A., Orlandi, M., & Matucci-Cerinic, M. (n.d.). Gynaecological symptoms and sexual disability in women with primary Sjögren's syndrome and sicca syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 31(5), 683–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23710558>
- 99 Papiris SA, Maniati M, Constantopoulos SH, Roussos C, Moutsopoulos HM, Skopouli FN. Lung involvement in primary Sjogren's syndrome is mainly related to the small airway disease. *Ann Rheum Dis*. 1999 Jan;58(1):61-4.
- 100 Flament, T., Bigot, A., Chaigne, B., Henique, H., Diot, E., & Marchand-Adam, S. (2016). Pulmonary manifestations of Sjögren's syndrome. *European Respiratory Review*, 25(140).
- 101 Stojan, G., Baer, A. N., & Danoff, S. K. (2013). Pulmonary manifestations of Sjögren's syndrome. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(4), 354–60.

- 102 (Ito et al., 2005) Ito, I., Nagai, S., Kitaichi, M., Nicholson, A. G., Johkoh, T., Noma, S., ... Mishima, M. (2005). Pulmonary Manifestations of Primary Sjögren's Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(6), 632–638.
- 103 Kokosi, M., Riemer, E. C., Highland, K. B., & al., et. (2010). Pulmonary involvement in Sjögren syndrome. *Clinics in Chest Medicine*, 31(3), 489–500.
- 104 Hatron PY, Tillie-Leblond I, Launay D, Hachulla E, Fauchais AL, Wallaert B. Pulmonary manifestations of Sjogren's syndrome. *Presse Med.* 2011 Jan;40(1 Pt 2):e49-64.
- 105 Ebert EC. Gastrointestinal and hepatic manifestations of Sjogren syndrome. *J ClinGastroenterol.* 2012 Jan;46(1):25-30
- 106 Evans, R., Zdebik, A., Ciurtin, C., & Walsh, S. B. (2015). Renal involvement in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology*, 54(9), 1541–1548.
- 107 Goules A, Masouridi S, Tzioufas AG, Ioannidis JP, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Clinically significant and biopsy-documented renal involvement in primary Sjogren syndrome. *Medicine (Baltimore).* 2000 Jul;79(4):241-9.
- 108 Evans, R., Zdebik, A., Ciurtin, C., & Walsh, S. B. (2015). Renal involvement in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology*, 54(9), 1541–1548.
- 109 van de Merwe, J. P. (2007). Interstitial cystitis and systemic autoimmune diseases. *Nature Clinical Practice Urology*, 4(9), 484–491.

- 110 Jara, L. J., Navarro, C., Brito-Zerón, M. del P., García-Carrasco, M., Escárcega, R. O., & Ramos-Casals, M. (2007). Thyroid disease in Sjögren's syndrome. *Clinical Rheumatology*, 26(10), 1601–1606.
- 111 Pavlakis PP, Alexopoulos H, Kosmidis ML, Mamali I, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, et al. Peripheral neuropathies in Sjogren's syndrome: a critical update on clinical features and pathogenetic mechanisms. *J Autoimmun*. 2012 Aug;39(1-2):27-33.
- 112 Chai J, Logigian EL. Neurological manifestations of primary Sjogren's syndrome. *Curr Opin Neurol*. 2010 Oct;23(5):509-13.
- 113 Mulherin DM, Sheeran TP, Kumararatne DS, Speculand B, Luesley D, Situnayake RD. Sjogren's syndrome in women presenting with chronic dyspareunia. *Br J ObstetGynaecol*. 1997 Sep;104(9):1019-23.
- 114 Routsias JG, Tzioufas AG. Sjogren's syndrome--study of autoantigens and autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007 Jun;32(3):238-51.
- 115 Enocsson H, Sjowall C, Skogh T, Eloranta ML, Ronnblom L, Wettero J. Interferon-alpha mediates suppression of C-reactive protein: explanation for muted C-reactive protein response in lupus flares? *ArthritisRheum*. 2009 Dec;60(12):3755-60.
- 116 Baimpa E, Dahabreh IJ, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. Hematologic manifestations and predictors of lymphoma development in primary Sjogren syndrome: clinical and pathophysiologic aspects. *Medicine (Baltimore)*. 2009 Sep;88(5):284-93.

117 Tzioufas AG, Boumba DS, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Mixed monoclonal cryoglobulinemia and monoclonal rheumatoid factor cross-reactive idiotypes as predictive factors for the development of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1996 May;39(5):767-72.

118 Bournia VK, Diamanti KD, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. Anticentromere antibody positive Sjogren's Syndrome: a retrospective descriptive analysis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):R47.

119 Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell L, Baer A, Challacombe S, Lanfranchi H, et al. American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012 Apr;64(4):475-87.

120 Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002 Jun;61(6):554-8.

121 Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum.* 1993;36(3):340-7.

122 Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent.* 2009 Aug;22(4):241-8.

- 123 Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol.* 2004 Dec;49(12):951-62.
- 124 Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek Loo RR, Li Y, Loo JA, et al. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics.* 2005 Apr;5(6):1714-28.
- 125 Guo T, Rudnick PA, Wang W, Lee CS, Devoe DL, Balgley BM. Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS. *J Proteome Res.* 2006 Jun;5(6):1469-78.
- 126 Hu S, Denny P, Xie Y, Loo JA, Wolinsky LE, Li Y, et al. Differentially expressed protein markers in human submandibular and sublingual secretions. *Int J Oncol.* 2004 Nov;25(5):1423-30.
- 127 Denny P, Hagen FK, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellanno M, et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *J Proteome Res.* 2008 May;7(5):1994-2006.
- 128 Hu S, Yu T, Xie Y, Yang Y, Li Y, Zhou X, et al. Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. *Cancer Genomics Proteomics.* 2007 Mar-Apr;4(2):55-64.
- 129 Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Mar;1098:2250

- 130 Huq NL CK, Ung M, Myroforidis H, Veith PD, Chen D, et al. A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2007;13:547–64.
- 131 Sausan Al Kawasa,b , Zubaidah H.A. Rahimb , David B. Fergusonb,* . Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Archives of Oral Biology* 57(2012)91-9. Department of Oral & Craniofacial Health Sciences, College of Dentistry, University of Sharjah, Sharjah, United Arab Emirates Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Kuala Lumpur, Malaysia
- 132 Baldini C, Giusti L, Ciregia F, Da Valle Y, Giacomelli C, Donadio E, et al. Proteomic analysis of saliva: a unique tool to distinguish primary Sjogren's syndrome from secondary Sjogren's syndrome and other Sicca syndromes. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(6):R194.
- 133 Fleissig Y, Deutsch O, Reichenberg E, Redlich M, Zaks B, Palmon A, et al. Different proteomic protein patterns in saliva of Sjogren's syndrome patients. *Oral Dis*. 2009 Jan;15(1):61-8.
- 134 Giusti L, Baldini C, Bazzichi L, Ciregia F, Tonazzini I, Mascia G, et al. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for rheumatic diseases--the example of Sjogren's syndrome. *Proteomics*. 2007 May;7(10):1634-43.
- 135 Hu S, Gao K, Pollard R, Arellano-Garcia M, Zhou H, Zhang L, et al. Preclinical validation of salivary biomarkers for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010 Nov;62(11):1633-8.

- 136 Hu S, Wang J, Meijer J, leong S, Xie Y, Yu T, et al. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2007 Nov;56(11):3588-600.
- 137 Peluso G, De Santis M, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Messina I, et al. Proteomic study of salivary peptides and proteins in patients with Sjogren's syndrome before and after pilocarpine treatment. *Arthritis Rheum.* 2007 Jul;56(7):2216-22.
- 138 Ryu OH, Atkinson JC, Hoehn GT, Illei GG, Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford).* 2006 Sep;45(9):1077-86.
- 139 Ito K, Funayama S, Hitomi Y, Nomura S, Katsura K, Saito M, et al. Proteome analysis of gelatin-bound salivary proteins in patients with primary Sjogren's syndrome: identification of matrix metalloproteinase-9. *ClinChimActa.* 2009 May;403(1-2):269-71.
- 140 Gallo A, Baldini C, Teos L, Mosca M, Bombardieri S, Alevizos I. Emerging trends in Sjogren's syndrome: basic and translational research. *ClinExpRheumatol.* 2012 Sep-Oct;30(5):779-84.
- 141 Baldini C, Gallo A, Perez P, Mosca M, Alevizos I, Bombardieri S. Saliva as an ideal milieu for emerging diagnostic approaches in primary Sjogren's syndrome. *ClinExpRheumatol.* 2012 Sep-Oct;30(5):785-90.

- 142 van der Geest SA, Markusse HM, Swaak AJ. Beta 2 microglobulin measurements in saliva of patients with primary Sjogren's syndrome: influence of flow. *Ann Rheum Dis.* 1993 Jun;52(6):461-3.
- 143 Kalk WW, Vissink A, Spijkervet FK, Bootsma H, Kallenberg CG, NieuwAmerongen AV. Sialometry and sialochemistry: diagnostic tools for Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2001 Dec;60(12):1110-6.
- 144 Michalski JP, Daniels TE, Talal N, Grey HM. Beta2 microglobulin and lymphocytic infiltration in Sjogren's syndrome. *N Engl J Med.* 1975 Dec 11;293(24):1228-31.
- 145 Pedersen AM, Bardow A, Nauntofte B. Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjogren's syndrome. *BMC ClinPathol.* 2005 Mar 1;5(1):4.
- 146 Tishler M, Yaron I, Shirazi I, Yaron M. Saliva: an additional diagnostic tool in Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* 1997 Dec;27(3):173-9.
- 147 Gottenberg, J.-E., Seror, R., Miceli-Richard, C., Benessiano, J., Devauchelle-Pensec, V., Dieude, P., ... Mariette, X. (2013). Serum Levels of Beta2-Microglobulin and Free Light Chains of Immunoglobulins Are Associated with Systemic Disease Activity in Primary Sjögren's Syndrome. Data at Enrollment in the Prospective ASSESS Cohort. *PLoS ONE*, 8(5), e59868.
- 148 Asashima H, Inokuma S, Onoda M, Oritsu M. Cut-off levels of salivary beta2-microglobulin and sodium differentiating patients with Sjogren's syndrome

from those without it and healthy controls. *ClinExpRheumatol.* 2013 Sep-Oct;31(5):699-703.

149 Al Kawas, S., Rahim, Z. H., & Ferguson, D. B. (2012). Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Archives of oral biology*, 57(1), 1-9.

150 Talal, N., Grey, H. M., Zvaifler, N., Michalski, J. P., & Daniels, T. E. (1975). Elevated salivary and synovial fluid beta2-microglobulin in Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Science*, 187(4182), 1196-1198.

151 Maddali, B. S., Campana, G., D'Agata, A., Palermo, C., & Bianucci, G. (1995). The diagnosis value of beta 2-microglobulin and immunoglobulins in primary Sjogren's syndrome. *Clinical rheumatology*, 14(2), 151-156.

152 Michalski, J. P., Daniels, T. E., Talal, N., & Grey, H. M. (1975). Beta2 microglobulin and lymphocytic infiltration in Sjögren's syndrome. *New England Journal of Medicine*, 293(24), 1228-1231.

153 Markusse, H. M., Otten, H. G., Vroom, T. M., Smeets, T. J. M., Fokkens, N., & Breedveld, F. C. (1992). The diagnostic value of salivary fluid levels of β 2-microglobulin, lysozyme and lactoferrin for primary Sjögren's syndrome. *Clinical rheumatology*, 11(4), 521-525.

CAPÍTULO 12

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Janett Carmen Luzmila Riega Torres nació el 8 de julio de 1969, en el Distrito de José María Quimper “El Cardo” perteneciente a la provincia de Camaná, una de las 8 provincias que forman al Departamento de Arequipa, Perú. Es hija del señor Oscar Riega Granda, de ocupación agricultor, y de la señora (QEPD) Dora Torres Gonzalez, ama de casa.

Llegó a México en el año de 1987 con la finalidad de estudiar la carrera de Médico Cirujano y Partero, de la cual se graduó en 1997. Se casó en 1998 con el Dr. Erick Orlando Mata Rodríguez, quien se encontraba realizando en ese tiempo la especialidad de Traumatología. Cursó trámites de naturalización (obtuvo su carta de naturalización mexicana en la Cd. de México, expedida por el presidente Cedillo) para realizar la especialidad de Medicina Interna, la cual cursó en el ISSSTE regional de monterrey del 2002 al 2006 y en el último año fue nombrada jefe de residentes. En el año 2002 concibe a su primer hija, Valeria Guadalupe Mata Riega. En el 2006 ingresa a la subespecialidad de Reumatología, graduándose en el año 2008 y durante su último año de residencia es nombrada residente distinguido de su subespecialidad. Fue nombrada Coordinadora de Enseñanza de posgrado de Medicina Interna del Hospital Universitario de la UANL. En el año 2014 concibe su segunda hija, Sofía Michelle Mata Riega. Actualmente es ciudadana mexicana y cursa el tiempo completo dentro de las actividades del servicio de Reumatología del Hospital Universitario de la UANL.