
SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS
AUTOANTICUERPOS EN PACIENTES CON
SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO



Tesis Doctoral Presentada por

Norma Nelly Nardi

Para acceder al Grado de Doctor en Medicina

Octubre de 2010

Los doctores **Antoni Sisó Almirall**, Profesor Asociado Docente del Departamento de Medicina de la Universidad de Barcelona, y **Manuel Ramos Casals**, Profesor Colaborador del Departamento de Medicina de la Universidad de Barcelona

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral **“SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS AUTOANTICUERPOS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO”** ha sido realizada por Norma Nelly Nardi bajo su dirección en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona. El trabajo reúne las condiciones necesarias para optar al título de DOCTOR EN MEDICINA en el marco del programa de Doctorado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Barcelona Octubre de 2010

Antoni Sisó Almirall

Manuel Ramos Casals

Los doctores **Antoni Sisó Almirall**, Profesor Asociado Docente del Departamento de Medicina de la Universidad de Barcelona, y **Manuel Ramos Casals**, Profesor Colaborador del Departamento de Medicina de la Universidad de Barcelona

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral **“SIGNIFICADO CLINICO DE LOS AUTOANTICUERPOS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO”** presentado por la doctoranda Norma Nelly Nardi se ha realizado siguiendo la normativa del Consejo del Departamento de Medicina aprobado el 9-5-06.

De acuerdo a dicha normativa, la presente Tesis Doctoral se ha realizado en la modalidad de presentación como compendio de publicaciones, que consiste en la agrupación de trabajos científicos originales de una misma línea de investigación. Los artículos deberán estar publicados en revistas indexadas (al menos uno dentro de los dos primeros cuarteles del área de conocimiento correspondiente), en los que como mínimo el doctorando figure de primer autor en al menos uno de ellos. La estructura de la Tesis Doctoral presentada en este formato debe constar de los siguientes apartados:

- a) Introducción general
- b) Trabajos publicados presentados en forma de principales objetivos y resultados obtenidos
- c) Discusión conjunta de las conclusiones obtenidas

Barcelona Octubre de 2010

Antoni Sisó Almirall

Manuel Ramos Casals

A Omar, Santiago e Ignacio

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Josep Font Franco, quien me abrió las puertas del servicio y me permitió acceder al conocimiento del amplio espectro que comprenden las enfermedades autoinmunes sistémicas con una gran generosidad e hizo que a pesar de la lejanía me sintiera en casa.

Al Dr. Manuel Ramos Casals, una persona que sin dudas es un ejemplo a seguir por su inteligencia, tesón, su capacidad de trabajo, su generosidad para compartir conocimientos y su gran calidez en el trato cotidiano, además de permitirme incursionar en un terreno hasta entonces desconocido por mí y por cierto apasionante como es el trabajo en el laboratorio.

Al Dr. Antoni Sisó Almirall, por su gran ayuda, guía y colaboración en la realización de esta tesis

Al Dr. Ricard Cervera, por su cordialidad, gentileza en el trato cotidiano y por motivarme en el aprendizaje del idioma catalán.

Al Dr. Alberto Omar Orden, el artífice de mi pasión por las enfermedades autoinmunes sistémicas, un ejemplo de sabiduría, rectitud e incondicionalidad, alguien que no solamente se preocupa por la enfermedad del paciente sino por el ser humano, sin dudas el tipo de persona que muchos tratamos de imitar o aunque sea acercarnos a ello.

A la Dra. María del Pilar Brito Zerón, por ayudarme en mis primeros pasos en el laboratorio, su paciencia y capacidad de trabajo incansable.

A la Sra. Isabel Chávez, por la amistad, calidez, generosidad, ayuda constante y desinteresada, por ser una gran mujer y una gran amiga, gracias.

.

MOTIVACIÓN PERSONAL

Cuando comencé a incursionar en la reumatología en el Hospital Aeronáutico Central de la Ciudad de Buenos Aires de Argentina tuve mi primer acercamiento con el mundo a mi criterio apasionante de los autoanticuerpos, un sitio que la gran mayoría de los otros especialistas trata de evitar por considerarlo difícil de dilucidar.

Recuerdo que adquirí con sumo entusiasmo un libro de anticuerpos del Servicio de enfermedades Autoinmunes y Sistémicas del Hospital Clínic de Barcelona, un sitio que años después pasaría a ser mi segunda casa, donde fui recibida con gran consideración, cariño y respeto y donde se me brindó la posibilidad de acceder a un entrenamiento de excelencia en investigación y manejo clínico.

Allí gracias al Dr. Josep Font quién generosamente me abrió las puertas del servicio y de la mano del Dr. Manuel Ramos Casals descubrí lo interesante y polifacética que puede ser la enfermedad de Sjögren.

Durante varios años acompañé al Dr. Ramos Casals en el dispensario y en las salas de internación durante las visitas a pacientes con esta dolencia, lo que me permitió comprender la gran repercusión que la enfermedad de Sjögren tiene en los pacientes que la sufren y que pululan de puerta en puerta de los diferentes especialistas para tratar de obtener un alivio a las molestias que sufren cotidianamente y que muchas veces no encuentran eco en los profesionales por considerar sus síntomas casi banales.

Allí adquirí la mayor parte de mis conocimientos clínicos pero también aprendí el valor de la contención emocional. Por esto le agradezco al Dr. Ramos por mostrarme que uno puede hacer mucho por ellos, comenzando por escucharlos.....

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	21
ÍNDICE DE TABLAS	25
ANTECEDENTES DEL TEMA	29
1.Síndrome de Sjögren primario como enfermedad autoinmune	31
1.1. Aproximación a la etiopatogenia	32
1.1.1. Autoantígenos	33
1.1.2. Bases genéticas	33
1.1.3. Patógenos.....	34
1.2. Principales manifestaciones clínicas	35
1.2.1. Sequedad de mucosas.....	35
1.2.2. Fiebre.....	35
1.2.3. Fatiga y debilidad.....	36
1.2.4. Artralgias y artritis.....	36
1.2.5. Vasculitis cutánea.....	36
1.2.6. Mialgias y miositis	37
1.2.7. Afección bronquial.....	37
1.2.8. Neumonitis intersticial.....	37
1.2.9. Pleuritis.....	38
1.2.10. Pericarditis.....	38
1.2.11. Disfagia	38
1.2.12. Pancreatitis.....	39
1.2.13. Afección hepática	39
1.2.14. Nefritis intersticial	39
1.2.15. Glomerulonefritis	40
1.2.16. Afección del sistema nervioso central (SNC)	40
1.2.17. Neuropatía periférica	40
1.2.18. Neuropatías craneales.....	41
1.2.19. Otras manifestaciones clínicas	41
1.3. Alteraciones analíticas	42
1.3.1. Elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG)	42
1.3.2. Hipergammaglobulinemia	42
1.3.3. Gammapatía monoclonal	42
1.3.4. Elevación de $\beta 2$ microglobulina	43
1.3.5. Anemia	43
1.3.6. Leucopenia	43

1.3.7. Linfopenia	43
1.3.8. Neutropenia	44
1.3.9. Plaquetopenia	44
1.3.10. Hipocomplementemia	44
1.4. Pruebas diagnósticas	45
1.4.1. Gammagrafía parotídea	45
1.4.2. Pruebas oculares	46
1.4.3. Biopsia de glándulas salivares menores	46
1.5. Diagnóstico: criterios clasificatorios	47
1.6. Linfoma	49
1.6.1. Epidemiología del linfoma	50
1.6.2. Clasificación histológica del linfoma	51
1.6.3. Manifestaciones clínicas	54
1.6.4. Estudio histopatológico	55
1.6.5. Estudios de inmunofenotipado	56
1.6.6. Estudio de inmunogenotipado	57
1.6.7. Factores pronósticos	59
1.7. Tratamiento del Síndrome de Sjögren	60
1.7.1. Tratamiento sintomático	60
1.7.2. Fármacos agonistas muscarínicos	61
1.7.3. Inmunosupresores	62
1.8. Tratamiento del linfoma	63
1.9. Síndrome de Sjögren primario: principales marcadores serológicos de autoinmunidad	65
1.9.1. Anticuerpos antinucleares	65
1.9.2. Factor reumatoide	66
1.9.3. Anticuerpos anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B	67
1.9.4. Otros autoanticuerpos	68
1.9.5. Crioglobulinas	69
1.9.6. Inmunoglobulinas monoclonales circulantes	71
ARTÍCULOS PUBLICADOS	73
ARTÍCULO I	77
<i>Objetivos, principales resultados y conclusiones</i>	85
<i>Nardi N, Brito-Zerón P, Ramos –Casals M, Aguló S, Cervera R, Ingelmo M, Font J.</i>	
<i>Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren's syndrome; prevalence and</i>	

clinical significance in 335 patients. Clin Rheumatol. 2006 May; 25(3):341-6. Epub 2005 Oct 25.

ARTÍCULO II	87
Objetivos, principales resultados y conclusiones	99
<i>Ramos-Casals M, <u>Nardi N</u>, Brito-Zerón P, Aguiló S, Gil V, Delgado G, Bové A, Font J.</i>	
<i>Atypical autoantibodies in patients with primary Sjögren syndrome: clinical characteristics and follow-up of 82 cases. Semin Arthritis Rheum. 2006 Apr;35(5):312-21.</i>	
ARTÍCULO III	101
Objetivos, principales resultados y conclusiones	111
<i>Ramos-Casals M, Sanchez-Tapias JM, Parés A, Forns X, Brito-Zeron P, <u>Nardi N</u>, Vazquez P, Velez D, Arias I, Bové A, Plaza J, Rodés J, Font J.</i>	
<i>Characterization and differentiation of autoimmune versus viral liver involvement in patients with Sjögren syndrome. J Rheumatol 2006; 33:8</i>	
ARTÍCULO IV	113
Objetivos, principales resultados y conclusiones	121
<i>Ramos Casals M, Brito-Zerón P, Soria N, <u>Nardi N</u>, Vargas A, Muñoz S, Bové A, Suárez B, Lozano F.</i>	
<i>Mannose-binding lectin-low genotypes are associated with milder systemic and immunological disease expresión in Sjögren syndrome. Rheumatology (Oxford) 2009; 48:65-69</i>	
DISCUSIÓN	123
1. Autoanticuerpos en el síndrome de Sjögren: significado clínico.	125
1.1. Anticuerpos antinucleares	125
1.2. Anticuerpos contra antígenos no nucleares.	127
1.3. Anticuerpos ant-Ro/SS-A.	130
1.3.1 Manifestaciones cutáneas.	131
1.3.2. Manifestaciones neurológicas.	131
1.3.3. Afección fetal y neonatal.	132
1.3.4. Alteraciones hematológicas	132

1.3.5. Significado clínico de los anticuerpos contra subunidad Ro52 /Ro60.....	133
1.4. Anticuerpos anti-La/SS-B.....	135
1.5. Factor reumatoide.....	136
1.6. Crioglobulinas.....	137
2. Autoanticuerpos típicos de otras enfermedades autoinmunes: significado clínico.....	138
2.1. Significado clínico de marcadores inmunológicos relacionados con LES.....	139
2.2. Significado clínico de marcadores inmunológicos relacionados con EI SAF.....	141
2.3. Significado clínico de marcadores inmunológicos relacionados con ES.....	143
2.4. Significado clínico de marcadores inmunológicos relacionados con La EMTC.....	144
2.5. Anticuerpos relacionados con vasculitis sistémica.....	145
3. Influencia de la deficiencia genética de MBL en el perfil inmunológico del paciente con Síndrome de Sjögren.....	147
4. Implicación en la práctica clínica: del laboratorio al paciente.....	151
4.1. Implicación para la clasificación y el diagnóstico del SS.....	151
4.2. Presencia de autoanticuerpos atípicos. Qué indican?	151
4.3. Utilidad del perfil inmunológico en el diagnóstico diferencial de la afectación hepática en el paciente con Síndrome de Sjögren... ..	156
4.4. Significado de la deficiencia de MBL en la práctica clínica.	157
5. Glosario de autoanticuerpos en el Síndrome de Sjögren: principales utilidades y resultados obtenidos en la presente tesis.....	160
BIBLIOGRAFÍA.....	167

ABREVIATURAS

-
- **AAF** – Anticuerpos antifosfolipídicos
 - **aCL** – Anticuerpos anticardiolipina
 - **ACA** – Anticuerpos anticentrómero
 - **AHAI** – Anemia hemolítica autoinmune
 - **AINES** – Antiinflamatorios no esteroideos
 - **AMA** – Anticuerpos anti-mitocondriales
 - **ANA** – Anticuerpos antinucleares
 - **Anti-CP** – Anticuerpos anti-célula parietal
 - **Anti-RNP** – Anticuerpos anti-ribonucleoproteína
 - **Anti-Tg** – Anticuerpos anti-tiroglobulina
 - **Anti-TPO** – Anticuerpos anti-peroxidasa
 - **AQP** – Aquoporinas
 - **AR** – Artritis reumatoide
 - **ATRD** – Acidosis tubular renal distal
 - **ATRp** – Acidosis tubular renal proximal
 - **CA** – Colangitis autoinmune
 - **CBP** – Cirrosis biliar primaria
 - **CEP** – Colangitis esclerosante primaria
 - **CM** – Crioglobulinemia mixta
 - **CMV** – Citomegalovirus
 - **CU** – Colitis ulcerosa
 - **CVF** – Capacidad vital forzada
 - **CHOP** – Ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona
 - **CRISP-3** – Proteína secretora rica en cisteína 3
 - **DLCO** – Capacidad de difusión del monóxido de carbono
 - **DNA** – Ácido desoxirribonucleico
 - **dsDNA** – DNA de doble cadena
 - **EII** – Enfermedad inflamatoria intestinal
 - **EM** – Esclerosis múltiple
 - **EMTC** – Enfermedad mixta del tejido conectivo
 - **ES** – Esclerosis sistémica
 - **FEV1** – Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
 - **LF** – Linfoma folicular
 - **FM** – Fibromialgia
 - **FR** – Factor reumatoide
 - **GMN** – Glomerulonefritis

-
- **GMSI** – Gammapatía monoclonal de significado incierto
 - **HAI** – Hepatitis autoinmune
 - **Hb** – Hemoglobina
 - **Hcto** – Hematocrito
 - **HLA** – Antígenos leucocitarios humanos
 - **HR** – Razón de riesgo
 - **HTLV-1** – Virus de la leucemia T humana
 - **IBM** – Miopatía con cuerpos de inclusión
 - **IEF** – Inmunoelectroforesis
 - **IRC** – Idiotipos de reacción cruzada
 - **ISH** – Hibridación *in situ*
 - **LBA** – Lavado broncoalveolar
 - **LDH** – Lactato deshidrogenasa
 - **LES** – Lupus eritematoso sistémico
 - **LH** – Linfoma de Hodgkin
 - **LNH** - Linfoma no Hodgkin
 - **LLC** – Leucemia linfocítica crónica
 - **MALT** – Tejido linfoide asociado a las mucosas
 - **MBCL** – Linfoma monocitoide B
 - **MBL** – Lectina fijadora de manano
 - **MCL** – Linfoma de células del manto
 - **MM** – Mieloma múltiple
 - **mRNA** – RNA mensajero
 - **MW** – Macroglobulinemia de Waldenström
 - **MZL** – Linfoma B de la zona marginal
 - **OMS** – Organización Mundial de la Salud
 - **PCR** – Proteína C reactiva
 - **PCR'** – Reacción en cadena de la polimerasa
 - **PMN** – Polimorfonucleares
 - **PV-B19** – Parvovirus B19
 - **REAL** – Clasificación Revisada de Linfoma Americano-Europeo
 - **RM** – Resonancia magnética
 - **RNA** – Ácido ribonucleico
 - **SFC** – Síndrome de fatiga crónica
 - **SIR** – Razón estandarizada de incidencia
 - **SLL** – Linfoma linfocítico de células pequeñas

-
- **SMR** – Razón estandarizada de mortalidad
 - **SNC** – Sistema nervioso central
 - **SNP** – Sistema nervioso periférico
 - **SS** – Síndrome de Sjögren
 - **SSp** – SS primario
 - **TAC** – Tomografía axial computerizada
 - **TSH** – Hormona estimuladora del tiroides
 - **VEB** – Virus Epstein Barr
 - **VHC** – Virus de la hepatitis C
 - **VHH-6** – Virus herpes humano tipo 6
 - **VIH** – Virus de la inmunodeficiencia humana
 - **VSG** – Velocidad de sedimentación globular

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
TABLA 1.	
<i>Clasificación de la afección gammagráfica de las glándulas salivares ..</i>	45
TABLA 2.	
<i>Criterios Americano-Europeos de 2002</i>	48
TABLA 3.	
<i>Prevalencia de linfoma en el SSp según diferentes autores</i>	51
TABLA 4.	
<i>Subtipos histológicos de los linfomas de células B descritos en pacientes con SS</i>	52
TABLA 5.	
<i>Afección extranodal en pacientes con SSp y LNH</i>	55
TABLA 6.	
<i>Características clínicas e inmunológicas que se han relacionado con la aparición de un síndrome linfoproliferativo en el SSp</i>	60

ANTECEDENTES DEL TEMA

1. EL SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO COMO ENFERMEDAD AUTOINMUNE

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune sistémica que se caracteriza fundamentalmente por la presencia de sequedad ocular (xeroftalmía) y bucal (xerostomía), debido a la infiltración de las glándulas lagrimales y salivares por células linfoplasmocitarias. Estos infiltrados originan una destrucción progresiva de las glándulas exocrinas, con la consiguiente disminución de las secreciones glandulares y la aparición de sintomatología relacionada con la sequedad de las mucosas infiltradas. La hiperactividad de los linfocitos B periféricos es el principal dato inmunológico presente en el SS. Históricamente (1-15), las primeras descripciones de pacientes con sequedad de mucosas se realizaron a finales del siglo pasado, aunque no fue hasta 1933 cuando un oftalmólogo sueco, Henrik Sjögren, englobó dichas manifestaciones en un trastorno autoinmune generalizado que presentaba además otros signos de afección sistémica, como artritis o anemia (7).

El SS afecta predominantemente al sexo femenino, con una relación respecto al varón de 9-10:1. Los estudios realizados en varones no han mostrado diferencias significativas en las manifestaciones clínicas respecto a las que presentan las mujeres, aunque sí se observa una tendencia a la negatividad de los marcadores inmunológicos. En la mayoría de los casos, el SS aparece entre los 40 y los 60 años, aunque también se han descrito casos en edades más tempranas de la vida, y casos en edad geriátrica. Los estudios realizados en otras enfermedades autoinmunes sistémicas muestran una prevalencia de SS en el 7% de pacientes con artritis reumatoide (AR) (16), en el 20-30% de los pacientes con esclerosis sistémica (ES) (17) o lupus eritematoso sistémico (LES)

(18,19). Se ha descrito síndrome seco en el 42% de 55 pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) (20). La relación con otras enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple (EM) (21,22) o la enfermedad celiaca (23), también ha sido analizada recientemente.

La prevalencia del SSp varía del 0.02 al 13.3% de acuerdo a los estudios publicados (24-35). Sin embargo, los distintos criterios clasificatorios y los métodos epidemiológicos utilizados dificultan la interpretación de estas diferencias. En los estudios muestrales, la prevalencia del SSp varía del 0.77 al 3.3%. Se han encontrado prevalencias similares en los estudios epidemiológicos poblacionales, (0.02 al 2.70%) (26-28). Sin embargo, se han publicado prevalencias superiores (3.3-4.8%) (24,25) en ciertos grupos poblacionales como en población geriátrica hospitalizada y, recientemente, Sanchez-Guerrero et al (34), encontraron una prevalencia del 13.3% en 300 pacientes ambulatorios pertenecientes a los servicios de medicina interna y reumatología en un hospital mexicano de tercer nivel. La incidencia del SSp en la población general se ha analizado en diversos estudios (32,33,35).

1.1. Aproximación a la etiopatogenia

No se conoce adecuadamente la etiopatogenia del SS, aunque se ha propuesto la existencia de factores genéticos predisponentes sobre los que podrían actuar factores exógenos (principalmente infecciones víricas) y factores neurohormonales. Las principales características patogénicas del SS son la infiltración glandular exocrina por linfocitos T y la hiperestimulación de los linfocitos B. El proceso autoinmune se inicia en el tejido glandular exocrino (epitelitis autoinmune), y podría estar desencadenado por agentes externos (principalmente virus con especial tropismo por el tejido glandular), bien

directamente o bien a través de una reacción cruzada con moléculas propias (mimetismo molecular). Se produciría entonces una infiltración inflamatoria constituida en su mayor parte por linfocitos T CD4+, con la producción local de citocinas de predominio Th1 que contribuiría a perpetuar la respuesta inflamatoria en las glándulas salivales (36). La hiperestimulación de linfocitos B por parte de los linfocitos T activados originaría la producción de numerosos autoanticuerpos.

1.1.1. Autoantígenos. Se han sugerido recientemente moléculas propias como la α -fodrina y las aquoporinas como posibles autoantígenos. La α -fodrina forma parte del componente citoesquelético de diversas células eucariotas y está compuesta por dos cadenas heterodiméricas que se unen a la actina. Estudios recientes han detectado anticuerpos circulantes antifodrina en pacientes con SS (37), especialmente en formas infantiles y juveniles (38,39). Las aquoporinas (AQP) son una familia de canales proteínicos de membrana cuya función es el transporte de agua. La AQP5 fue identificada en las glándulas submandibulares de rata, y está presente en las glándulas lagrimales y pulmón, indicando su función en la generación de saliva, lágrima y secreciones pulmonares (40). Se ha demostrado una distribución anormal de la AQP5 en las células acinares de pacientes con SS, respecto a otras entidades como sialoadenitis no específica, sarcoidosis y ojo seco no autoinmune, en los que la AQP5 tiene una distribución similar a la población control. Al parecer existiría un defecto en el tráfico de la proteína, mas que en su síntesis, puesto que la cuantificación de AQP5 en la glándula lagrimal es similar en SS y controles (41-43).

1.1.2. Bases genéticas. En familias con miembros afectados de SS se diagnostican otros casos de SS con mayor frecuencia que en la población general, y también existe una mayor incidencia de otras enfermedades autoinmunes y de

autoanticuerpos en suero. La predisposición genética para el SSp podría estar ligada a los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad. Las frecuencias de los haplotipos B8, DR3, DR2 y especialmente del DRw 52, DQA1 0501 y DQB1 0201 son superiores en los pacientes con SS respecto a la población general. Las recientes técnicas de análisis multigénicos intentan identificar grupos de genes potencialmente implicados en la aparición del SS (44). Los estudios monogénicos más recientes se han centrado en el estudio de los polimorfismos de genes que codifican ciertas citocinas como la IL-10 (45-47), proteínas reguladoras como la proteína secretora rica en cisteína 3 (CRISP-3) (48) o la lectina fijadora de manano (MBL) (49).

1.1.3 Patógenos. Numerosos estudios sugieren que las infecciones víricas juegan un papel importante en la etiopatogenia del SS, especialmente en el caso de aquellos virus con un marcado tropismo salival. La orofaringe podría ser el reservorio de dichos virus, que permanecen habitualmente en estado latente bajo el control de la inmunidad local. En determinados individuos, genéticamente predispuestos, los virus podrían ser capaces de infectar las células epiteliales, e inducir la presentación de neoantígenos que iniciarían una respuesta anómala autoinmunitaria. Los principales agentes víricos implicados son los herpesvirus [virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus herpes humano tipo 6 (VHH-6)], retrovirus [virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la leucemia T humana (HTLV-I), virus de la hepatitis (VHC) y parvovirus B19 (PV-B19)]. Mención especial merece el VHC, que podría ser el principal factor etiopatogénico en un subgrupo de pacientes con SS que presentan afección hepática y/o crioglobulinemia mixta (CM) (50).

1.2. Principales manifestaciones clínicas

1.2.1. Sequedad de las mucosas. Los síntomas relacionados con la sensación de boca seca o xerostomía suelen iniciarse de forma insidiosa. Según el grado de intensidad de afección, el paciente puede presentar dificultad para hablar y comer (especialmente alimentos sólidos) y como consecuencia, perder peso, presentar halitosis, alteración del sabor de los alimentos, disestesias, sensación de ardor o quemazón bucal y labial e intolerancia para alimentos ácidos. La hiposecreción salival conduce también al aumento de infecciones bucales, especialmente por *Candida albicans* (51). La sensación de ojo seco o xeroftalmia aparece en más del 90% de los pacientes y es la manifestación clínica más frecuente del SS. La expresión que refieren es la sensación constante de tener arena o tierra en lo ojos. El síndrome de ojo seco también induce una hipersensibilidad a la luz y un deslumbramiento superior al habitual. La afección de otras mucosas origina una amplia variedad de manifestaciones clínicas: síntomas atribuibles a la sequedad de la mucosa respiratoria (sequedad nasal, epistaxis o tos irritativa), sequedad cutánea (xerosis) secundaria a la disminución en la producción de sudor por la infiltración de las glándulas exocrinas, con sequedad y caída del cabello, y sequedad vulvovaginal con prurito vaginal y dispareunia en las mujeres que padecen la enfermedad.

1.2.2 Fiebre. Se ha descrito fiebre intermitente hasta en un 40% de pacientes con SS, aunque sin grandes alteraciones en las proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR) (a diferencia de la fiebre de origen infeccioso). La fiebre podría estar originada por elevados niveles de citocinas circulantes que

reflejarían la actividad inmunoinflamatoria del SS. Su persistencia obliga a descartar procesos linfoproliferativos.

1.2.3 Fatiga y debilidad. La sintomatología derivada de la afección general que presenta el paciente con SS es diversa y suele estar presente en una gran parte de los pacientes, siendo la fatiga, el decaimiento y el insomnio las manifestaciones más frecuentes. En muchas ocasiones todos estos síntomas se relacionan con la existencia de una Fibromialgia (FM) asociada o un síndrome de Fatiga Crónica (SFC) (52,53). Algunos estudios sugieren una mayor frecuencia de procesos alérgicos en los pacientes con SS (54,55).

1.2.4 Artralgias y artritis. Las manifestaciones articulares más frecuentes son las poliartralgias, aunque se puede observar poliartritis no erosiva o bien una oligoartritis persistente. Las articulaciones más frecuentemente afectadas son las rodillas, las metacarpofalángicas y las interfalángicas proximales. Los síntomas articulares pueden preceder, coincidir o aparecer durante el transcurso de la enfermedad y no parece existir asociación entre las manifestaciones articulares y el resto de alteraciones clínicas o inmunológicas.

1.2.5 Vasculitis cutánea. La manifestación más frecuente de vasculitis cutánea en el SSp es la púrpura palpable, generalmente en las extremidades inferiores. La segunda afección cutánea por frecuencia es la urticaria-vasculitis. De forma característica, estas lesiones eritematosas generalmente persisten más de 24 horas, a diferencia de la urticaria clásica cuya duración es menor de 4-6 horas. Generalmente no son pruriginosas, aunque pueden producir una sensación de “quemazón”. El substrato histológico es una vasculitis leucocitoclástica, aunque se han descrito casos de vasculitis necrotizante de mediano vaso (56). Se han

descrito otras lesiones cutáneas como el eritema anular, la paniculitis, el eritema nodoso, el síndrome de Sweet o el liquen plano en el SS (56).

1.2.6 Mialgias y miositis. La frecuencia de la afección muscular oscila entre el 0 y el 9%, siendo las mialgias el síntoma más frecuente. Como procesos asociados que induzcan afección muscular en un paciente con SS destacan la asociación con una miopatía inflamatoria (57), miositis de causa farmacológica o miopatía con cuerpos de inclusión (IBM).

1.2.7 Afección bronquial. Los estudios sobre el funcionalismo pulmonar muestran resultados dispares. La presencia de una hipersensibilidad o hiperreactividad bronquial se ha descrito en el 42-60% de los pacientes con SS, mientras que la afección obstructiva varía desde la ausencia hasta el 50% (58). Se han realizado pocos estudios prospectivos, con resultados contradictorios, aunque la mayoría (59-61) no ha encontrado ningún cambio significativo en el funcionalismo respiratorio en pacientes seguidos entre 2 y 10 años. En otros estudios no se han detectado diferencias significativas en la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO) entre pacientes con SSp y controles (58).

1.2.8 Neumonitis intersticial. La afección pulmonar intersticial puede observarse en el 5-10% de pacientes. La forma más frecuente es la neumonitis intersticial linfocítica. Algunos pacientes presentan un curso benigno con resolución o estabilización. Hatron et al (62) realizaron lavado broncoalveolar (LBA) a pacientes con SSp y SS secundario (con o sin síntomas respiratorios), demostrando que hasta el 50% de los pacientes con SSp asintomáticos y sin alteraciones radiológicas de enfermedad pulmonar tenía un LBA anormal (de

predominio linfocítico en un 69% de casos). Se han descrito otras manifestaciones pulmonares poco frecuentes (63-67).

1.2.9 Pleuritis. La afección pleural no ha sido considerada como una manifestación extraglandular típica del SSp, por lo que su presencia hace sospechar la asociación con otra enfermedad autoinmune sistémica (especialmente LES) o bien neumonías recurrentes y atelectasias. Sin embargo, se han descrito casos aislados en los que la afección pleural ha constituido la primera manifestación de un SSp tras excluirse otras enfermedades autoinmunes de base.

1.2.10 Pericarditis. La afección cardíaca en el SS es poco frecuente. Mediante ecocardiografía puede detectarse derrame pericárdico moderado hasta en un 30% de casos, generalmente asintomático y sin repercusión hemodinámica (68-69). Dada la escasa frecuencia de derrame pericárdico en el SSp, su presencia obliga a descartar la presencia de otras enfermedades autoinmunes o neoplásicas asociadas. Otras afecciones cardiovasculares se han descrito infrecuentemente (70-74).

1.2.11 Disfagia. La incidencia real de afección esofágica en el SS no se conoce, aunque probablemente sea mayor de lo que la clínica indica. La disfagia, definida como una dificultad en la deglución, es frecuente en pacientes con SSp, y suele estar relacionada con la existencia de una xerostomía severa, aunque en ocasiones también puede ser indicativa de una afección intrínseca del esófago. Cuando existe una disfagia por afección esofágica en un paciente con SS, suele estar relacionada con alteraciones de la motilidad del esófago en relación a la coexistencia de una esclerodermia, aunque las formas primarias del SS también pueden presentar alteraciones de la motilidad esofágica (75-79).

1.2.12 Pancreatitis. No se conoce con exactitud la prevalencia de enfermedad pancreática en pacientes con SS. Aunque cerca del 50% de pacientes con SS puede presentar insuficiencia pancreática exocrina, la mayoría están asintomáticos (80-84). Los porcentajes varían según las técnicas utilizadas para el estudio de la función exocrina pancreática, siendo la alteración más comúnmente descrita, la disminución del volumen de secreción pancreática, utilizando la prueba de estimulación con secretina, o el test secretina-pancreozimina (85).

1.2.13 Afección hepática. La enfermedad hepática más comúnmente asociada al SS es la cirrosis biliar primaria (CBP), que se caracteriza por un infiltrado linfocitario en los espacios porta, alrededor de los conductos biliares lesionados, y una obstrucción fibrosa de los conductos biliares intrahepáticos. En más del 90% de los pacientes se detectan anticuerpos antimitocondriales (AMA). El síntoma inicial suele ser el prurito, desarrollándose ictericia a lo largo de meses o años. La CBP se asocia al SS con una incidencia muy alta, incluso superior a la conocida asociación del SS con la AR. Diversos estudios indican que entre un 40 y un 75% de pacientes con CBP presentan un SS asociado (86-88). La clínica y el perfil serológico de los pacientes con SS y afección hepática, una vez excluida la CBP y la infección por VHC, suele ser parecida a la hepatitis autoinmune (HAI) tipo 1 (89-91). La colangitis autoinmune (CA) se ha descrito de forma excepcional (92,93).

1.2.14 Nefritis intersticial. La incidencia de afección renal varía según los distintos autores, desde el 18.4% al 67% (94,95). De todas formas, recientes series que muestran una prevalencia del 4-6% (96-99). La afección tubulointersticial suele manifestarse como una acidosis tubular renal distal

(ATRd), y se presenta la mayoría de las veces sin manifestaciones clínicas evidentes (100-104), aunque puede incrementar el riesgo de desarrollar litiasis renal y de forma excepcional nefrocalcinosis

1.2.15 Glomerulonefritis. La glomerulonefritis en pacientes con SSp obliga a descartar, en primer lugar, otras causas de glomerulonefritis. Las lesiones más habitualmente observadas son la glomerulonefritis mesangial, la glomerulonefritis membranoproliferativa y la glomerulonefritis membranosa (96,105,106).

1.2.16 Afección del sistema nervioso central. La prevalencia de la afección del sistema nervioso central (SNC) varía según los diversos estudios, aunque en las grandes series suele ser excepcional (inferior al 5% de casos). Los síntomas pueden ser discretos e insidiosos y la afección, tanto cerebral como medular. La afección del SNC puede causar lesiones focales (déficits motores o sensitivos de tipo hemi o monoparesias) o difusas (alteraciones de las funciones cognoscitivas, meningitis asépticas, encefalopatía o demencia progresiva asociada), y varía desde la presencia de déficit motor, afasia, disartria, amaurosis y síndrome cerebeloso, en la expresión de daño difuso como encefalopatía subaguda, meningitis aséptica, disfunción cognitiva y anormalidades neuropsiquiátricas (107). Existe además un grupo de pacientes que presentan un cuadro neurológico indistinguible de la esclerosis múltiple (EM) (108,109). La afección del SNC en el SS también incluye la existencia de migraña (109), trastornos psiquiátricos y trastornos cognitivos (107,110).

1.2.17 Neuropatía periférica. La afección del sistema nervioso periférico (SNP) se observa en el 10-45% de los pacientes con SS y las formas de presentación más frecuentes son la polineuropatía sensitivomotora y la neuralgia del trigémino. La presentación suele ser insidiosa, se diagnostica según los hallazgos en el

electromiograma y su curso es habitualmente tórpido y con escasa respuesta al tratamiento. En las diversas series de pacientes con SSp que analizan los casos de afección del SNP, predomina la afección en forma de polineuropatía mixta (41 pacientes), seguido de la neuropatía sensitiva pura (n=27), la mononeuritis múltiple (n=15) y la afección trigeminal (n=13). Son mucho menos frecuentes la neuropatía motora pura, la afección de otros pares craneales y la polirradiculopatía (111). La polineuropatía mixta sensitivo-motora es la forma más frecuente en el SSp. En segundo lugar se ha descrito la denominada neuronopatía sensitiva debida a la infiltración ganglionar linfocitaria de la raíz dorsal, también llamada neuropatía sensitiva atáxica (112). Se han publicado 19 casos de mononeuritis múltiple en pacientes con SS, causada por isquemia secundaria a vasculitis de los “vasa nervorum”. Finalmente, los síndromes de atrapamiento (carpal, ulnar o tarsal generalmente) son otra forma común de manifestación neurológica en el SS.

1.2.18 Neuropatías craneales. Descrita por primera vez en el SS por Kaltreider y Talal en 1969 (113), la neuropatía del trigémino es una de las afectaciones neurológicas características del SS. Se produce cuando se afecta el ganglio de Gasser. Los síntomas consisten en hiperestesias o parestesias unilaterales o bilaterales en la rama maxilar y/o mandibular del nervio trigémino con función motora normal (114). También se ha descrito la afección de otros pares craneales, de forma aislada en el caso de la afección del III par, del VII o del VIII, o bien la afección múltiple de varios pares.

1.2.19 Otras manifestaciones clínicas. El paciente con SS puede presentar otras manifestaciones que incluyen enfermedad tiroidea (115-121) o afección otorrinolaringológica (122).

1.3. Alteraciones analíticas

1.3.1 Elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG). La VSG suele estar elevada en la mayoría de los pacientes con SS e incluso puede sobrepasar los 50 mm en la primera hora en más del 60% de los pacientes (123). En muchas ocasiones, una VSG elevada se relaciona de forma directa con una elevación importante de las proteínas circulantes, especialmente a expensas de una marcada hipergammaglobulinemia. Se han encontrado elevaciones mayores de la VSG en aquellos pacientes con anticuerpos Ro/La (+) (124), describiéndose como un factor predictivo de evolución a SSp en pacientes con síndrome seco (125,126).

1.3.2 Hipergammaglobulinemia. La hipergammaglobulinemia policlonal es uno de los datos analíticos más característicos del SSp y es el reflejo directo de la hiperactividad linfocitaria característica de la enfermedad. Aunque se ha descrito tanto en el SSp como en el secundario, ya en los estudios clásicos de los años 70 se consideró como un dato más representativo de la forma primaria de la enfermedad. Aunque en los estudios clásicos (12,127) se describe la existencia de hipergammaglobulinemia en casi el 100% de los pacientes con SS, estudios posteriores describen porcentajes inferiores que oscilan entre el 36-42% (12,127-133). De forma excepcional se ha descrito la existencia de inmunodeficiencias (134-140).

1.3.3 Gammapatía monoclonal. La existencia de inmunoglobulinas monoclonales circulantes es un dato frecuente en pacientes con SS, ya que se piensa que las inmunoglobulinas monoclonales y el FR se producen en etapas

tempranas de forma local en las glándulas salivales de estos pacientes (141-143).

1.3.4 Elevación de β_2 microglobulina. La β_2 microglobulina es una proteína de bajo peso molecular secretada por células nucleadas (linfocitos y otras células, 144). Los niveles de β_2 microglobulina en suero se encuentran elevados en pacientes con SS y esta elevación se ha relacionado con algunos aloantígenos de histocompatibilidad (145-147).

1.3.5 Anemia. La anemia está presente entre el 16 y el 50% (según las distintas series) de los pacientes con SS (12,127,128,130,148). El tipo más frecuente de anemia es similar a la que se observa en las enfermedades inflamatorias crónicas, es decir, normocítica y normocrómica (123,127). La mayoría de procesos hematológicos suelen ser una causa excepcional de anemia en el SSp (128,130,139,148-160). Se han descrito pacientes con anemia hemolítica autoinmune, aplasia pura de la serie roja (161,162), mielodisplasia o anemia perniciosa.

1.3.6 Leucopenia. Entre un 12 y un 33% de los pacientes con SS pueden presentar leucopenia (12,127,128,130,163).

1.3.7 Linfopenia. Aoki et al (163) encontraron linfopenia en 35 de 99 pacientes (35.3%). En este estudio, los pacientes con linfopenia mostraron menor frecuencia de artralgias aunque la presencia de anti-Ro/SSA y anti-La/SSB fue más frecuente, mientras que otros autores han reportado linfopenia absoluta en pacientes con SS principalmente asociado a AR. La causa de la linfopenia en el SS se desconoce. Henriksson et al (164), en un estudio de 214 pacientes con SSp, fueron los primeros en demostrar la presencia de anticuerpos anti-CD4 en los leucocitos del 12% de pacientes con SSp.

1.3.8 Neutropenia. La neutropenia es una manifestación poco frecuente dentro del SS, siendo más frecuente en enfermedades como la AR y el LES. Se han publicado 6 casos de neutropenia en el SSp, 4 en hombres y 2 en mujeres (148,149,165-168). Aunque estudios previos ya habían descrito de forma aislada la existencia de anticuerpos antineutrófilo en pacientes con SSp (169), fue en 1995 (170) cuando se analizó de manera específica su presencia en una serie de 66 pacientes, encontrándose una prevalencia del 45%. En otro estudio, Lamour et al (171) analizaron la presencia de anticuerpos IgG e IgM contra el FcγRIII en 66 pacientes con SSp, encontrando una prevalencia del 24% y 15%, respectivamente. Finalmente, se han detectado niveles circulantes de FcγRIII en pacientes con SSp (172), ya que el FcγRIII puede liberarse tras la activación de los PMN.

1.3.9 Plaquetopenia. La alteración plaquetaria en el SSp se manifiesta generalmente como una trombocitopenia leve ($100 - 150,000/\text{mm}^3$) con una prevalencia que oscila entre el 8 y el 15% según diversos estudios (12,128,148,163). Una revisión de la literatura japonesa (173), ha reportado más casos de trombocitopenia en pacientes con SSp que en el SS asociado. De los 20 pacientes con SS estudiados, la trombocitopenia se presentó en 16 con SSp y en 4 con SS asociado. Haro et al (174), describieron un paciente con SS y fallo cardíaco, el cual desarrolló trombocitopenia grave tras la aplicación de digoxina. En conclusión, la trombocitopenia, al igual que cualquier otra anormalidad hematológica, puede constituir el primer signo de un SS latente (149,175,176) bien sea primario o asociado.

1.3.10 Hipocomplementemia. La determinación rutinaria del complemento (C3, C4 y CH50) es una herramienta clínica importante en el manejo de

algunas enfermedades autoinmunes sistémicas. El mejor ejemplo es el LES, en el cual, la hipocomplementemia se correlaciona directamente con la actividad de la enfermedad, especialmente con el desarrollo de neuropatía. A pesar de que la hipocomplementemia es un dato inmunológico que con frecuencia presentan los pacientes con SSp, su estudio en esta enfermedad ha sido escaso. Suele observarse un descenso del CH50, sobretodo a expensas del descenso de C4, siendo más raro el descenso de C3. Suele traducir la existencia de una crioglobulinemia asociada, y se ha demostrado que está relacionada con una mayor frecuencia de procesos linfoproliferativos y mayor mortalidad en pacientes con SSp (130).

1.4. Pruebas diagnósticas

1.4.1 Gammagrafía parotídea. Para el estudio de la estructura anatómica se pueden utilizar técnicas ecográficas, sialográficas o gammagráficas. La sialografía suele provocar incomodidad y se substituye por la gammagrafía, que utiliza Tecnecio 99 y valora la captación y excreción del trazador, con unos criterios diagnósticos (Tabla 1).

TABLA 1. Clasificación de la afección gammagráfica de las glándulas salivales

Grado	Interpretación
I	Normalidad
II	Retraso moderado en la incorporación con buena concentración Buena actividad oral
III	Retraso marcado en la incorporación y/o mala concentración Actividad oral variable
IV	Ausencia de visualización glandular Actividad oral débil o nula

La ecografía de las glándulas parótidas y submandibulares muestra áreas hipoecoicas y diversos grados de desestructuración que podrían corresponder a focos de infiltración linfocitaria (177). Recientemente se ha propuesto el estudio parotídeo mediante RM (178).

1.4.2 Pruebas oculares. Las pruebas diagnósticas estudian por un lado la secreción lagrimal y por otro el estado del epitelio corneal. Para la prueba de Schirmer se utiliza un papel de filtro de 35 mm de largo por 5 mm de ancho que se adapta al canto externo del párpado inferior. Se lee a los 5 minutos considerándose una prueba cuantitativa de hiposecreción basal cuando es inferior a los 5 mm. La tinción con rosa de Bengala es una prueba cualitativa que valora las alteraciones de la capa mucínica después de aplicar en la córnea un colorante (rosa de Bengala al 1%) en el fórnix conjuntival inferior.

1.4.3 Biopsia de glándulas salivares menores. La biopsia salival permite valorar la estructura glandular y la infiltración inflamatoria. El estudio de otras glándulas exocrinas ha revelado la similitud con los hallazgos de la biopsia salival. El infiltrado linfocitario está constituido por linfocitos T CD4 (45-55%), linfocitos T supresores/citotóxicos CD8 (10-20%) y linfocitos B (20-35%). Los infiltrados celulares se localizan principalmente en los ductus y aparentemente se extienden a los acinos. La pérdida de los acinos es la anormalidad parenquimatosa dominante y se asocia de manera significativa al tamaño de los focos infiltrativos. Los indicadores de actividad linfocitaria son: mayor tamaño o número de infiltrados, aparición de centros germinales e infiltración de las vénulas postcapilares del endotelio. En las fases avanzadas hay atrofia y sustitución adiposa del parénquima glandular. La interpretación de la biopsia salival se realiza siguiendo los criterios propuestos por Chisholm y Mason (13).

La gradación histológica del número y tamaño de los infiltrados linfocitarios de las glándulas salivales “*focus score*” es el principal marcador de la afección exocrina del SS.

1.5. Diagnóstico: criterios clasificatorios

Existe cierta controversia respecto a los criterios clasificatorios del SS, especialmente entre autores americanos y europeos, por lo que se han propuesto varias clasificaciones (179). Los Criterios del Grupo de Estudio de la Comunidad Europea (CE) (180) (Tabla 2) son unos criterios realizados en base a un amplio número de pacientes y centros de diversos países europeos. Para el criterio histológico se utiliza la presencia de un foco como dato patológico, mientras en los de San Diego se requieren dos o más focos (181). La presencia de autoanticuerpos está incluida en los CE, pero sólo el 36% de los pacientes incluidos tenían anti-Ro positivos, mientras que con los criterios de San Diego lo tenían el 90% de los pacientes. Estudios posteriores demuestran que los criterios de la CE tienen una alta sensibilidad y una buena especificidad, en ocasiones superiores a los de San Diego o San Francisco (182).

En la actualidad están vigentes los criterios europeo-americanos de 2002 (Tabla 2). El cambio más importante con respecto a los criterios europeos es que debería existir de forma imprescindible una biopsia de glándula salival patológica y/o anti-Ro/La positivos (183). De todas formas, la obligatoriedad de estos criterios debe ser tratada con cautela, debido a la gran heterogeneidad del SS en su presentación clínica (184-191).

El carácter sindrómico del SSp y su tendencia a la evolución crónica dificultan su diagnóstico en el momento puntual en el que visitamos al paciente, y el resultado de las distintas pruebas diagnósticas varía en función del tiempo de evolución del síndrome. Fundamentalmente, la estrategia diagnóstica se basa en el estudio de los componentes ocular y bucal. Ante la sospecha de un SS una estrategia diagnóstica adecuada sería practicar primero la tinción con rosa de bengala, posteriormente la gammagrafía salival y en último término la biopsia labial (192).

TABLA 2. Criterios americano-europeos de 2002.

Síntomas subjetivos de sequedad
1. <i>Síntomas oculares</i>
2. <i>Síntomas orales</i>
Signos objetivos de sequedad
3. <i>Resultado positivo de al menos una de las siguientes pruebas:</i>
- Test de Shirmer <5 mm en 5 minutos
- Rosa de Bengala >4 según la escala de Van Bijsterveld
4. <i>Resultado positivo de al menos una de las 3 siguientes pruebas:</i>
- Gammagrafía salival (+)
- Sialografía parotídea (+)
- Flujo salival no estimulado <1,5 mL en 15 minutos
5. Datos histopatológicos
<i>Uno o más focos en la biopsia de glándula salival menor (50 o más células mononucleares)</i>
6. Datos inmunológicos
<i>Presencia en suero de al menos uno de los siguientes anticuerpos:</i>
- Anti-Ro/SSA o anti-La/SSB
<i>Se requiere la presencia de 4 de los 6 criterios. Es obligatoria la inclusión de la biopsia salival o de los anticuerpos anti-Ro/La en los 4 criterios necesarios</i>

El diagnóstico diferencial debe realizarse con otras entidades que puedan infiltrar las glándulas salivales, fundamentalmente sarcoidosis, amiloidosis primaria y procesos linfoproliferativos (193). Los pacientes con infecciones víricas crónicas, como la infección por el VIH-1 o el VHC, pueden presentar un cuadro

clínico, inmunológico e histológico similar (194). En los pacientes con VIH y síndrome seco, la infiltración linfocitaria de las glándulas salivales está compuesta por linfocitos CD8 positivos. En los pacientes VHC, se observa un patrón histológico muy similar, aunque a nivel inmunológico presentan negatividad de los anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSB, así como una elevada frecuencia de crioglobulinas e hipocomplementemia.

1.6. Linfoma

La incidencia de síndromes linfoproliferativos malignos en el SS es la más elevada entre las enfermedades autoinmunes (195) e incluso se le ha llegado a considerar como el “*crossroad*” entre la autoinmunidad y la proliferación linfoide maligna. Desde un punto de vista etiopatogénico, la transición de una proliferación autoinmune benigna a una transformación maligna, representa un proceso de múltiples etapas que se inicia con la activación policlonal de los linfocitos B y que culmina con una proliferación oligoclonal/monoclonal, seleccionándose así una subpoblación específica de linfocitos B. De hecho, la mayoría de los linfomas observados en los pacientes con SS son de origen linfocitario B, a pesar de que la mayoría de las células que infiltran las glándulas salivales son linfocitos T. Los estudios más recientes se han enfocado en el estudio de la etiopatogenia de la proliferación linfoide en el SS, incluyendo el papel etiológico de algunos agentes infecciosos como el VEB o el VHC (como factores responsables de la expansión clonal de los linfocitos B) y el papel crucial del análisis molecular de la clonalidad de los linfocitos B (como el primer paso para el diagnóstico de malignidad).

1.6.1 Epidemiología del linfoma. En 1978 se publicó el primer estudio prospectivo sobre la incidencia de linfoma en pacientes con SS. Kassan et al (196) encontraron que el riesgo de aparición alcanzaba los 6.4 casos por 1000 habitantes por año (44 veces más que la población general). Desde entonces, la mayoría de los estudios analizan retrospectivamente la incidencia de linfoma en pacientes con SS, encontrando porcentajes que oscilan entre el 1-10% (11,12,116,124,130,196-210) (Tabla 3).

La mayoría de los estudios muestran que los pacientes con SSp tienen un riesgo más elevado en desarrollar enfermedades linfoproliferativas que los pacientes con síndrome seco o SS asociado. Kruize et al (203) no encontraron enfermedad linfoproliferativa en aquellos pacientes que presentaban síntomas de queratoconjuntivitis ó SS asociado a otra enfermedad autoinmune. En otro estudio similar, en 331 pacientes italianos (205), no se detectó linfoma en ningún paciente con SS asociado. Por otra parte, un estudio epidemiológico reciente en pacientes finlandeses (211) demostró una mayor incidencia de LNH en el SSp, con un riesgo relativo de 8.7, comparado con el 4.5 y 2.2 para el SS asociado y la AR, respectivamente. Finalmente, se ha descrito que aquellos pacientes con aparición precoz del SS tienen un riesgo más elevado de presentar procesos linfoproliferativos. En el estudio de Kassan et al (196), los pacientes que desarrollaron SS antes de los 45 años de edad, presentaban un riesgo 60 veces superior de desarrollar linfoma comparado con la población general. Otros estudios (212), han demostrado una mayor incidencia de linfadenopatías, FR, inmunoglobulinas monoclonales y linfoma en pacientes cuya enfermedad apareció antes de los 35 años de edad.

TABLA 3. Prevalencia de linfoma en el SSp según diferentes autores

Autores	Año	País	Pacientes	Prevalencia LNH
			(n)	n (%)
Talal y Bunim (11)	1964	EUA	58	5 (8)
Bloch et al (12)	1965	EUA	62	3 (5)
Shearn et al (197)	1971	EUA	80	1 (1)
Whaley et al (198)	1973	Inglaterra	171	2 (1)
Kassan et al (196)	1978	EUA	136	7 (5)
McCurley et al (199)	1990	EUA	138	8 (6)
Kelly et al (116)	1991	Inglaterra	100	3 (3)
Pariente et al (200)	1992	Francia	62	4 (6)
Pavlidis et al (201)	1992	Grecia	120	8 (7)
Zufferey et al (202)	1995	Francia	55	5 (9)
Kruize et al (203)	1996	Holanda	31	3 (10)
Hernández et al (204)	1996	España	39	4 (10)
Tzioufas et al (210)	1996	Grecia	103	7 (7)
Valesini et al (205)	1997	Italia	295	9 (3)
Davidson et al (124)	1999	Inglaterra	100	3 (3)
Skopouli et al (130)	2000	Grecia	261	11 (4)
Gannot et al (206)	2000	EUA	80	6 (7)
Pertovaara et al (207)	2001	Finlandia	110	3 (3%)
Ramos et al (209)	2002	España	380	7 (3%)
Baldini et al (208)	2005	Italia	250	6 (2%)
TOTAL	-		2551	104 (4%)

LNH, linfoma no Hodgkin

1.6.2 Clasificación histológica del linfoma. Es posible observar imágenes clínicas sugestivas de malignidad en algunos pacientes pero que no se clasifican como malignas, aún por medio de técnicas modernas de genética molecular como el inmunofenotipado y el genotipado. El término pseudolinfoma, introducido por Godwin en 1952 (213), se aplica a tales casos (214) y se considera como una etapa intermedia en la transición de una proliferación linfoide benigna a una maligna. En la descripción original de pseudolinfoma en las glándulas salivales, se encontraron pequeños linfocitos,

células plasmáticas, inmunoblastos y distintas poblaciones de células mononucleares (214). En estudios posteriores se ha demostrado claramente la naturaleza B de esta población mononuclear (215-217). Actualmente, se acepta la designación de “*linfocitos B monocitoides*” como término apropiado para estas células. El término pseudolinfoma en la literatura antigua correspondía a la mayoría de los casos a linfomas de bajo grado. Se han descrito en la literatura varios subtipos histológicos de linfomas B en pacientes con SS (199-201,218-223) (Tabla 4).

Tabla 4. Subtipos histológicos de los linfomas de células B descritos en pacientes con SS

Subtipos histológicos de linfomas de células B	Referencia
Linfoma de células del manto (MCL)	199,218
Linfoma folicular (LF)	201,219
Linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL)	201
Linfoma linfoplasmocitoide/immunocitoma	199
Linfoma B de la zona marginal (MZL)	219,200,220
Linfomas MALT	221
Linfoma monocitoide B (MBCL)	222,223

La denominación MALT consiste en el tejido linfoide extranodal asociado al epitelio gastrointestinal, bronquial y tejidos de las mucosas. Está compuesto de linfocitos que pueden invadir estos lugares para procesar antígenos luminales y así proporcionar inmunidad de la mucosa. Los linfomas de bajo grado pueden surgir de los tejidos linfoides (MALT-linfomas) y del tejido linfoide asociado a otros tipos de epitelio. Los linfomas MALT se presentan con frecuencia como enfermedad extraganglionar localizada que afecta al tejido epitelial glandular. Isaacson et al (221,224) fueron los primeros en mencionar

el concepto de linfomas extranodales MALT. Se ha descrito que este grupo de linfomas surge del tejido extranodal del tubo digestivo, glándulas salivales, pulmón y tiroides (221,224,225) y con poca frecuencia del tejido extranodal normal como el de las placas de Peyer. Los linfomas MALT de bajo grado se caracterizan por presentar un curso clínico indolente y una similitud en la organización del MALT normal. Los linfomas MALT poseen características poco conocidas, como el mecanismo por el cual las células neoplásicas permanecen confinadas a un solo lugar, la presencia o ausencia de tráfico neoplásico celular y la diseminación específica de linfomas MALT a otras mucosas. Por otra parte, los linfomas MALT de bajo grado pueden sufrir una transformación histológica a formas más agresivas, habitualmente a un linfoma difuso de células grandes, con el consiguiente cambio en el pronóstico y tratamiento. El MBCL, homólogo de los linfomas MALT, es una neoplasia recientemente descrita de linfocitos B (222,223,226). Las células neoplásicas del MBCL, además de tener inmunoglobulinas monoclonales en la superficie y antígenos B celulares asociados, carecen de CD25 (222,227,228). Clínicamente, el MBCL tiene un curso indolente, afecta a los ganglios linfáticos, puede progresar a un linfoma más agresivo (222,226,228,229) y afectar lugares extranodales (222,228,229). Se sugiere que la asociación frecuente del MBCL con el SS se debe a que las glándulas salivales drenan a los ganglios linfáticos del cuello, que forman parte del ciclo de la circulación sistémica de los linfocitos (230). La asociación de SS y mieloma múltiple (MM) es infrecuente y sólo se han descrito 13 casos (199,207,231-240). Otras neoplasias hematológicas descritas excepcionalmente en pacientes con SS son 4 casos de MW (130,241,242) y 3 casos de leucemia linfocítica crónica

(LLC) (130,242). Los linfomas de linfocitos T se han descrito esporádicamente en pacientes con SS (253,254,243-252).

1.6.3. Manifestaciones clínicas. La presentación clínica del linfoma en un paciente con SS es muy diversa. Los LNH con manifestaciones sistémicas se presentan con afección del estado general, hepatoesplenomegalia y linfadenopatía generalizada, lo cual suele estar asociado a estados avanzados de la enfermedad. En un estudio multicéntrico europeo (255), la mayoría de los pacientes con SS y linfoma presentaron parotidomegalia, fiebre, linfadenopatía y una mayor frecuencia de afección extraglandular (vasculitis cutánea y afección del sistema nervioso). La posible aparición de linfoma en cualquier lugar del organismo donde exista tejido linfoide origina una gran variedad de cuadros clínicos de presentación en el paciente con SS. La localización más frecuente son las glándulas salivales y órganos parenquimatosos como pulmones o tubo digestivo (256) (Tabla 5).

La amplísima diversidad en cuanto a presentación y sitio de afección obliga a una precisa estadificación, mediante evaluación radiológica (TAC o RM) y biopsia de la médula ósea. La evaluación de datos como la edad, el tamaño de las adenopatías o la masa linfomatosa, el número de sitios extranodales afectados y los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), contribuyen a determinar el pronóstico y seleccionar la mejor terapéutica individualizada para cada paciente.

TABLA 5. Afección extranodal en pacientes con SSy y LNH.

Localización	Casos publicados (n)
Glándula salival	95
Pulmón	23
Estómago	20
Glándula mamaria	6
Timo	6
Orbita	6
Boca, garganta	5
Bazo	4
Glándula lacrimal	4
Riñón	3
Tiroides	3
Hígado	3
Piel	3
Intestino delgado	2
Órganos genitales internos	2
Intestino grueso (ciego)	1
Hueso	1

1.6.4 Estudio histopatológico. El diagnóstico de linfoma, asociado o no a SS, debe fundamentarse siempre con una biopsia tisular, con preferencia de un ganglio linfático. Sólo así será posible obtener el diagnóstico de linfoma y el tipo histológico exacto. La morfología histológica sigue siendo el elemento fundamental para el diagnóstico, pero hoy en día, la inmunohistoquímica y la biología molecular tienen gran importancia en la tipificación de los síndromes linfoproliferativos. El estudio histopatológico continúa siendo básico para el diagnóstico definitivo de linfoma en un paciente con SS. Los datos clínicos pueden resultar poco esclarecedores, ya que la mayoría pueden presentarse en muchos pacientes con SS sin que exista un linfoma. Por otra parte, la existencia de monoclonalidad tampoco puede utilizarse como criterio

diagnóstico obligado de malignidad, ya que la expansión clonal es un hecho frecuente en el SS. Por tanto, la sospecha de proliferación linfoide maligna en un paciente con SS obliga a descartar el linfoma mediante el estudio histopatológico. La accesibilidad del tejido varía en función de la sospecha del sitio linfomatoso, que puede ser desde tejidos superficiales (adenopatías periféricas o lesiones cutáneas) hasta órganos parenquimatosos (pulmón o tubo digestivo). Es imprescindible realizar una biopsia a fin de obtener la máxima muestra de tejido. No deben realizarse punciones aspirativas, ya que no son diagnósticas. Distinguir entre un linfoma y una expansión clonal linfocitaria benigna suele ser un problema difícil de resolver, especialmente aquellos casos donde el proceso linfoproliferativo aparece en las mucosas o en las glándulas salivales (221). Además, los linfomas pueden permanecer localizados en un mismo sitio durante muchos años, e incluso se ha descrito la remisión espontánea sin tratamiento de linfomas de bajo grado (257,258); ello hace todavía más borrosa la línea que separa la benignidad y la malignidad en el linfoma del paciente con SS. Los análisis moleculares, junto al cuadro clínico, pueden ayudar a decidir cuándo un proceso linfoproliferativo benigno como el SS evolucionará hacia la malignidad y cuando precisará de una terapéutica agresiva.

1.6.5 Estudios de inmunofenotipado. Las expansiones clonales se caracterizan por reordenamientos de genes idénticos que codifican las inmunoglobulinas o los receptores de linfocitos T, dando como resultado una expresión fenotípica homogénea de esos productos de genes (259). El estudio de inmunofenotipado de los linfocitos periféricos, así como de los linfocitos en

los diversos tejidos (ganglios linfáticos, bazo, médula ósea, etc) mediante citometría de flujo, se utiliza ampliamente en el laboratorio para el diagnóstico y la tipificación de las alteraciones linfoproliferativas. La tipificación fenotípica sobre la clonalidad de los linfocitos B implica el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas, con la utilización de antisuero específico peroxidasa conjugado para cadenas pesadas (IgM, IgA, IgG) o cadenas ligeras (λ o κ) que se aplican directamente sobre secciones de tejido para identificar poblaciones monoclonales. Se conoce bien la aparición y expresión de las distintas inmunoglobulinas durante la ontogenia de linfocitos B normales y esto permite una clara identificación de las etapas de desarrollo de linfocitos B homólogos neoplásicos (260,261). Así, todas las expansiones de linfocitos B capaces de sintetizar y expresar inmunoglobulinas pueden ser bien tipificadas por su expresión de inmunoglobulina citoplasmática o de membrana, con la característica restricción de la cadena ligera. Además, la intensidad de expresión de la inmunoglobulina de membrana se correlaciona con los niveles de diferenciación de los linfocitos B y obviamente con diferentes tipos de expansión neoplásica de los mismos. De todas formas, las diferencias entre el estudio histopatológico y el inmunofenotipado han llevado a la utilización de los estudios de inmunogenotipado.

1.6.6 Estudios de inmunogenotipado. El inmunogenotipado es la técnica más sensible para detectar los reordenamientos clonales del DNA en biopsias de tejido, por medio de técnicas de hibridación molecular que utilizan sondas específicas de DNA para las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas. El DNA se digiere *in vitro* mediante enzimas de restricción

bacterianas, los fragmentos de DNA son separados por electroforesis en gel de agarosa y trasferidos a la membrana donde son expuestos a sondas de DNA específicas para las inmunoglobulinas. La membrana se seca y se realiza la autoradiografía para identificar los reordenamientos de bandas que representan las poblaciones clonales. Esta técnica puede detectar en el tejido un 1% o más de células conteniendo el mismo reordenamiento de inmunoglobulina frente al 10% por inmunohistoquímica. El inmunogenotipado incluye el Southern blot, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR') y la hibridación *in situ* (ISH). La evaluación molecular de la clonalidad de los linfocitos B por análisis de hibridación Southern blot representó un gran avance en el estudio de la linfomagénesis de linfocitos B. Por medio de esta técnica, se puede demostrar la presencia de poblaciones clonales antes de la aparición del proceso linfoproliferativo (219,262,263,264). Este tipo de estudio requiere una gran cantidad de tejido fresco, lo que limita su utilidad en los pacientes. Fishleder et al (262) demostraron la presencia de reordenamientos de genes de inmunoglobulinas en las lesiones de las glándulas salivales que fueron consideradas como lesiones linfoepiteliales benignas sin afección linfomatosa. Por otra parte, Bodeutsch et al (265) describieron que la evolución a gammapatía sistémica monoclonal o linfoma maligno ocurrió exclusivamente en el subgrupo de pacientes con poblaciones de células plasmáticas monotípicas, con una proporción de $\kappa:\lambda >3$. La PCR' se ha utilizado con éxito en la valoración de la clonalidad de los linfocitos B en tumores por medio de la amplificación de los reordenamientos de la región VDJ de las cadenas pesadas y cadenas ligeras (232,266,267-269).

1.6.7 Factores pronósticos. El riesgo elevado en desarrollar un linfoma en pacientes con SS ha obligado a los investigadores clínicos a intentar establecer factores pronósticos (Tabla 6). En 1978, Kassan et al (196) fueron los primeros autores en describir que la existencia de linfadenopatía, esplenomegalia, parotidomegalia y exposición previa a sustancias inmunosupresoras se asociaba al desarrollo de linfoma en pacientes con SS. Han tenido que pasar más de veinte años para que estudios con un número suficiente de pacientes confirmen estos datos. Por ejemplo, en el estudio multicéntrico europeo (255), en el que 33 (27%) pacientes con linfoma y SS habían recibido tratamiento inmunosupresor previo, el 85% presentaban parotidomegalia y el 66% linfadenopatías, aunque sólo el 3% presentaban esplenomegalia. Otro estudio realizado por Valesini et al (205) confirma que la linfadenopatía y la esplenomegalia son factores clínicos predictivos del desarrollo de LNH. Datos parecidos obtuvieron Sutcliffe et al (129), quienes observaron que la historia previa de parotidomegalia y linfadenopatía predecían la evolución a linfoma. Otros estudios han detectado una mayor presencia de manifestaciones extraglandulares en los pacientes que desarrollan linfoma, por ejemplo púrpura en extremidades inferiores, posiblemente secundaria a la existencia de crioglobulinas (196,202,204,219). Finalmente, los pacientes con inicio de la enfermedad antes de los 35 años, presentan una mayor prevalencia de linfadenopatía, FR, crioglobulinas y proliferación linfoide, lo cual podría conferir a la edad de inicio del SS un importante valor pronóstico (212).

TABLA 6. Características clínicas e inmunológicas que se han relacionado con la aparición de un síndrome linfoproliferativo en el SSp

Características clínicas
Parotidomegalia
Esplenomegalia
Adenopatías
Adenopatías hiliares o mediastínicas
Nódulos pulmonares
Fiebre persistente
Características inmunológicas
β_2 -microglobulina elevada en suero
Inmunoglobulinas monoclonales circulantes
CM
Idiotipos de reacción cruzada (17-109, G6, SF18/2)

1.7. Tratamiento del síndrome de Sjögren

1.7.1 Tratamiento sintomático. Se basa en la sustitución de las secreciones ausentes, ya que no parece existir una terapia de fondo que altere el curso evolutivo de la enfermedad. Para la xeroftalmía se deben utilizar lágrimas artificiales 4 a 6 veces al día o instilar colirios que contengan edoisisina o mucolíticos. Es útil utilizar gafas de goma con cámara cerrada para evitar la evaporación de la lágrima durante la noche. Para la xerostomía el paciente puede incrementar la ingesta de agua, o utilizar productos que simulen o estimulen la producción salival. Es aconsejable mantener en la boca, alimentos ácidos no azucarados que incrementen la secreción de saliva (caramelos ácidos, zumo de limón) y evitar los fármacos anticolinérgicos. La higiene ocular y dental es imprescindible para evitar posibles complicaciones (infecciones, caries). En el tratamiento de la xerostomía se puede utilizar saliva artificial y los que mantengan

cierta función o reserva glandular, podrán beneficiarse del uso de sialogogos N-Acetilcisteína, Bromexina y Anetholetrithione y de esta forma obtener secreción de sustancias protectoras de la mucosa oral, como enzimas y anticuerpos presentes sólo en la saliva natural (270). Respecto a la sequedad de otras mucosas, la xerosis cutánea mejora con el uso de cremas hidratantes y se recomienda utilizar protectores labiales. Respecto a la sequedad vaginal, debe vigilarse la aparición de infecciones como la candidiasis, tratar la dispareunia con cremas lubricantes y, en mujeres postmenopáusicas, utilizar corticoides tópicos.

1.7.2 Fármacos agonistas muscarínicos. La pilocarpina es un agente parasimpático-mimético, con acción agonista de los receptores muscarínicos M_3 de las glándulas salivales, con moderada acción beta-adrenérgica (M_2), que estimula la secreción glandular exocrina. Para su difusión actual en el tratamiento de la xerostomía en pacientes con SS, han sido claves los estudios recientes de Vivino et al (271) y Papas et al (272), aleatorizados y controlados con placebo en 600 pacientes con SS, que demuestran la eficacia de la pilocarpina en el tratamiento de la xerostomía. Igualmente nuestro grupo (273) encontró una mejoría de los síntomas de sequedad, principalmente del área orofaríngea, en el 75% de 100 pacientes con SSP tratados con Salagen® (pilocarpina). La mejoría de los síntomas fue inmediata y proporcional al incremento gradual de la dosis. Aunque la respuesta a la pilocarpina es individual y variable, la dosis utilizada es de 5 mg, 3 a 4 veces al día, siendo necesario en ocasiones, ajustar la dosis para evitar los efectos adversos. Los efectos secundarios están en relación con su acción colinérgica y pueden aparecer en el 10%-30% de los pacientes durante la primera hora tras su administración, siendo los efectos secundarios más frecuentes, la sudoración, los escalofríos o las náuseas, efectos que

desaparecen al disminuir la dosis. Ante una complicación o efecto secundario grave, se debe utilizar atropina subcutánea o intravenosa. Debe evitarse en pacientes con asma bronquial activo, iritis, glaucoma de ángulo estrecho y enfermedades cardíacas no controladas. Algunos pacientes, pueden notar también mejoría de la sequedad ocular e incluso cutánea, nasal y vaginal. La cevimelina es un nuevo agonista muscarínico M₃, que en trabajos experimentales ha mostrado una menor afinidad por el receptor muscarínico M₂, presente en corazón y pulmón. Se han publicado recientemente dos estudios (274,275) con el mismo diseño (aleatorizados, doble ciego) que comparan diversas dosis de cevimelina con la administración de placebo. La dosis mejor tolerada fue de una cápsula de 30 mg cada 8 horas. Esta dosificación provoca menor sudoración (16-18%) que la pilocarpina utilizada en comprimidos a dosis de 5 mg cada 6 horas, pero una mayor frecuencia de náuseas (16-21%) o diarrea (14-16%). Las contraindicaciones son las mismas que para la pilocarpina. Para el tratamiento de las complicaciones graves, se debe usar atropina de igual forma.

1.7.3 Inmunosupresores. El arsenal terapéutico que se dispone para el tratamiento de las manifestaciones extraglandulares del SS es muy similar al utilizado en otras enfermedades autoinmunes como el LES, y se basa en la utilización de antiinflamatorios y antipalúdicos para el tratamiento de la afección articular y general, y el uso de corticoides e inmunosupresores para el tratamiento de las manifestaciones viscerales (276). El tratamiento con corticoides o inmunosupresores no ha demostrado ser útil para evitar la progresión del SS. Su empleo estaría solamente justificado en aquellos casos graves de afección sistémica en la que predominan los fenómenos vasculíticos y neurológicos, miopatías inflamatorias y en las fases iniciales de afección renal o

pulmonar. En afección grave (GMN proliferativa, alveolitis, polineuropatía progresiva, úlceras o isquemia cutánea) se deben utilizar fármacos inmunosupresores como la ciclofosfamida en "bolus" endovenosos o las gammaglobulinas. La hidroxicloroquina se ha utilizado con buenos resultados en la afección articular de los pacientes con SS. Recientes estudios han analizado la eficacia de las terapias biológicas, con resultados negativos para el uso de terapias anti-TNF y prometedores para el uso de terapias anti-linfocitarias. Otros trabajos han analizado el posible papel del interferón (277), la zidovudina (278), la azatioprina (279) o la 2-cloro-2'-deoxiadenosina (280).

1.8 Tratamiento del linfoma

No existe una conducta terapéutica única para los pacientes afectados de un linfoma de bajo grado, en la mayoría de casos con linfoma MALT. Si el linfoma afecta a glándulas exocrinas y se encuentra localizado, se ha sugerido la no intervención terapéutica, con vigilancia activa de la enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se opta por aplicar tratamiento. Las opciones son muy variadas. La cirugía tiene su papel en formas localizadas si el tumor puede extirparse en su totalidad. En estos casos, la cirugía puede ser curativa, si bien el paciente puede desarrollar posteriormente un nuevo linfoma. La radioterapia se usa, en general, como tratamiento complementario si la exéresis quirúrgica no ha podido ser completa o, en ocasiones, tras la quimioterapia. Como excepción, se han de señalar los linfomas parotídeos, en los cuales la radioterapia puede ocasionar mucositis, así como una exacerbación de la xerostomía (281). La quimioterapia es el tratamiento más utilizado, tanto para las formas diseminadas como para aquellas formas

localizadas en las que la cirugía y la radioterapia son muy problemáticas (por ejemplo, los linfomas MALT pulmonares). El tipo de quimioterapia varía según los centros. Desde la monoterapia (clorambucilo o ciclofosfamida, combinados en ocasiones con prednisona), a la poliquimioterapia convencional (de tipo CHOP: ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona). En los últimos años, se han utilizado terapias biológicas, como el α -interferón (por ejemplo, para los linfomas MALT de la conjuntiva ocular) ó actualmente, ciertos anticuerpos monoclonales. El más representativo de estos últimos es el anti-CD20 que ha mostrado su eficacia en los linfomas MALT gástricos y cutáneos. El tratamiento básico de cualquier linfoma agresivo es, desde luego, la poliquimioterapia. El régimen CHOP es el tratamiento estándar, pero según las circunstancias y los factores pronósticos se pueden administrar quimioterapias más o menos agresivas. En casos seleccionados como en pacientes jóvenes con mal pronóstico, con respuesta parcial o tras una recidiva de un linfoma agresivo, se puede realizar un trasplante autólogo con promotores hematopoyéticos. En la serie multicéntrica europea que estudia las características de 33 pacientes con linfoma y SS (255), los pacientes con linfoma de bajo grado no recibieron tratamiento alguno, y tan sólo uno de ellos progresó a linfoma de alto grado. Los restantes 21 pacientes recibieron tratamiento, 15 con quimioterapia y el resto con radioterapia/cirugía. Se consiguió la remisión completa en 17 (81%), de los cuales 12 eran linfomas de bajo grado, y sólo la remisión parcial en 2. De los 33 pacientes, murieron un total de 9 (27%); 4 (40%) de los 10 pacientes con linfoma de grado intermedio/alto (por progresión de la enfermedad o complicaciones del tratamiento quimioterapéutico) y 5 (23%) de los 23 pacientes con linfomas de

bajo grado (sólo uno progresó a alto grado, el resto murió por causas no relacionadas con el linfoma). La supervivencia media fue de 1.8 años para los linfomas de grado intermedio/alto y de 6.33 para los de bajo grado. Finalmente se demostró que la presencia de síntomas B, el tamaño tumoral superior a 7 cm y el tipo histológico, eran factores asociados a una menor supervivencia. En otro estudio, Royer et al (253) consiguieron una remisión completa a los 5 años en 11 de los 16 pacientes, y la remisión parcial de la enfermedad en otros 3. La localización y el tipo histológico son factores importantes a tener en cuenta en el manejo del linfoma extranodal del paciente con SS, en general, los linfomas gastrointestinales y nasofaríngeos suelen ser más agresivos que los pulmonares, oculares o salivales. La mayoría de los linfomas de glándulas salivales son de bajo grado y son localizados, con una supervivencia que alcanza el 70-80% a los 5 años y del 40-50% a los 10 años.

1.9. SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO: PRINCIPALES MARCADORES SEROLÓGICOS DE AUTOINMUNIDAD

1.9.1 Anticuerpos antinucleares

La determinación de los ANA suele ser el principal dato inmunológico a solicitar cuando se sospecha la existencia de una enfermedad autoinmune. Su positividad forma parte de los criterios diagnósticos tanto del LES como del SSp. La positividad de los ANA en pacientes con SSp suele ser superior al 80% (282), aunque los trabajos publicados respecto a su asociación con manifestaciones clínicas son escasos. Nuestro grupo (282) no ha encontrado relación estadísticamente significativa con ninguna manifestación clínica y sí con la

presencia de anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSB. En pacientes con títulos elevados de ANA y negatividad para anti-Ro/La, hemos detectado (97) su asociación con mayor frecuencia de afección pulmonar y fenómeno de Raynaud.

1.9.2 Factor reumatoide

El FR es una inmunoglobulina IgM dirigida contra la fracción Fc de inmunoglobulinas IgG autólogas circulantes. En la mayoría de los estudios realizados en pacientes con SSp se ha demostrado un porcentaje elevado de positividad para el FR (283), cercana al 50%. Sin embargo, son pocos los trabajos que han analizado la asociación entre la presencia de FR y las manifestaciones clínicas e inmunológicas del SSp. En un estudio (95), se ha encontrado una prevalencia del 38%, destacando una relación estadísticamente significativa con la presencia de afección articular, vasculitis cutánea y positividad para anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSB. Es posible que en algunos de los pacientes con SSp la detección de FR se asocie a la presencia de crioglobulinemia, reflejando la actividad de tipo FR que poseen dichas crioglobulinas.

Estudios previos han mostrado que el FR monoclonal presenta idiotipos de reacción cruzada (IRC) (284,285) los cuales se clasifican en 3 grupos: *Wa* y *Po*, que incluyen el 60 y 20% del FR monoclonal, respectivamente (284) y el grupo *B/a* el cual define un subgrupo menor (285). La mayoría de los pacientes con SS expresan un ICR sobre las cadenas κ de sus moléculas de FR definido por el anticuerpo monoclonal 17-109 (286). El Ac 17109 reacciona con el FR monoclonal que pertenece a la familia del idiotipo *Wa*, y presenta regiones similares variables de la cadena ligera $\times$ perteneciente a la cadena del subgrupo V λ IIIb $\times$ -L y más específico al gen 325 humkv conservado (287) Es

importante añadir que la prevalencia de linfocitos B reactivos 17109 dentro de los infiltrados de las glándulas salivales de pacientes con SS es 10 veces mayor que la de ganglios linfáticos de pacientes de la misma edad (286). Así, los defectos intrínsecos de los linfocitos B pueden dar como resultado la selección preferencial de un gen que codifique una región variable en particular de la cadena ligera (288) y/o la alteración de diversificar este gen mediante mutaciones somáticas posteriores (289). Las alteraciones de los linfocitos T consisten en la función excesiva de los linfocitos T colaboradores o en la disfunción para expresar clonas particulares de linfocitos B. El mayor número de linfocitos B reactivos frente al MoAb 17-109 en el SS puede formar parte de una alteración generalizada en la inmunoregulación, ya que estos pacientes tienen una alta incidencia de cadenas ligeras libres (351) y paraproteínas en suero y orina (290-292) y en la mayoría de los casos, el FR monoclonal IgM en suero y los crioprecipitados expresan el epítipo asociado con la región variable VκIIIb.

1.9.3. Anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSB

Los anticuerpos contra el antígeno Ro/SSA se describieron por primera vez en 1962 en el suero de pacientes con SSp. Se consideran los autoanticuerpos con mayor especificidad para el diagnóstico del SSp, aunque aparezcan en porcentajes variables (30 - 70%, según la técnica empleada y la cohorte estudiada). Por otra parte, existe una clara relación entre la existencia de anticuerpos anti-Ro/SSA maternos y bloqueo cardíaco congénito (293). El primer dato sugestivo de SSp en mujeres Ro positivas asintomáticas puede ser el nacimiento de un niño con bloqueo cardíaco congénito, ya que el 60% de las madres están asintomáticas en el momento del nacimiento. También se ha

descrito la asociación de miositis y positividad para anticuerpos anti-Ro/SSA en pacientes con SSp. Finalmente, se han descrito otras asociaciones. Alexander et al (294) han descrito una mayor prevalencia de parotidomegalia y linfadenopatía en pacientes con SSp y anticuerpos anti-Ro/SSA. También se ha descrito una mayor prevalencia de anti-Ro/SSA en aquellos pacientes con un inicio precoz de la enfermedad (295). Clásicamente se ha asociado la presencia de anticuerpos anti-Ro/SSA con la existencia de anemia (294,296), leucopenia (124,294,296-298), linfopenia (163,297,298) y trombocitopenia (163,296). Recientemente se ha corroborado la asociación con leucopenia en un análisis estadístico multivariado (209). Por otra parte, diversos autores han asociado la existencia de hipergammaglobulinemia con anticuerpos anti-Ro/SSA positivos (294,296).

Por otra parte, diversos estudios han analizado la relación entre los anticuerpos anti-La/SSB y las manifestaciones clínicas del SSp. Venables et al (299) encontraron una asociación entre el anti-La/SSB, parotidomegalia y el desarrollo de púrpura cutánea. Otros autores han descrito su asociación con la leucopenia, la linfopenia, la hipergammaglobulinemia, el FR, la parotidomegalia y la vasculitis (296). Por otra parte, se ha descrito mayor afección articular, fenómeno de Rauynaud, vasculitis cutánea, afección tiroidea y positividad para ANA, FR y anti-Ro/SSA en aquellos con anti-La/SSB, además de una posible asociación con linfopenia y trombocitopenia (209).

1.9.4. Otros autoanticuerpos

Los anticuerpos contra el ácido desoxirribonucleico de doble cadena (anti-dsDNA) y los anti-Sm constituyen uno de los criterios diagnósticos de LES, y no suelen detectarse en pacientes con SSp. Estudios recientes sugieren que la existencia de títulos elevados de anti-dsDNA en pacientes con SSp sugiere una

posible evolución a LES (300,301). Respecto a los anticuerpos contra la ribonucleoproteína (anti-RNP), se han descrito prevalencias que oscilan entre el 8 y el 28% de casos, aunque probablemente se incluyan tanto SSp primarios como asociados. De forma aislada se ha descrito la positividad de anticuerpos anticentrómero (ACA) en pacientes con SSp. Es posible que su detección pueda representar un dato inicial de posible evolución a ES limitada. Es aconsejable detectar los ACA en todo paciente con SS y Raynaud, especialmente en aquellos con ANA a títulos elevados con negatividad para Ro/La. Varios autores han analizado la prevalencia de anticuerpos antifosfolipídicos (AAF) en pacientes con SSp, encontrando una prevalencia que oscila entre el 2 y el 33%, aunque su presencia suele considerarse como un mero epifenómeno autoinmune sin repercusiones clínicas. La presencia de anticuerpos AMA fue descrita por primera vez en 1965 en pacientes con CBP, en los que se detectan en un 95% de los casos. El frecuente solapamiento entre la CBP y el SSp motiva que la detección de AMA en un paciente con SSp sugiera la existencia de una CBP asociada (302).

1.9.5. Crioglobulinas

Las crioglobulinas mixtas son proteínas que precipitan en frío, están formadas por la IgG y el FR anti-IgG, generalmente una IgM de origen monoclonal (tipo II) o policlonal (tipo III) (303). Las crioglobulinas se han observado en una gran variedad de enfermedades, entre ellas infecciones, enfermedades autoinmunes y neoplasias (304). Desde la publicación del primer caso de crioglobulinemia en un paciente con SS (305), se han realizado algunos estudios sobre la prevalencia y el significado clínico de las crioglobulinas en el SSp. La prevalencia de la crioglobulinemia en el SSp varía desde un 5 a un

61% (141,306,307-308). Las características de los crioprecipitados han demostrado un FR IgMκ monoclonal en la mayoría los pacientes con SS (141,210,309). Ramos et al (141) encontraron que la presencia de vasculitis leucocitoclástica cutánea, la hipocomplementemia y la infección por VHC están independientemente asociados con la presencia de crioglobulinas en el suero de pacientes con SS.

En pacientes con SS y crioglobulinemia tipo II, se ha detectado la misma cadena ligera κ en los linfocitos B de las glándulas salivales (307). Moutsopoulos et al (307) encontraron un aumento de células que expresan las cadenas ligeras κ en los infiltrados de las glándulas salivales menores. Tzioufas et al (310) analizaron la expresión fenotípica de las células plasmáticas que infiltran las glándulas salivales menores de pacientes con SS y encontraron el predominio de células κ positivas, mientras que los pacientes sin crioglobulinas o con crioglobulinas policlonales tenían un porcentaje similar de cadenas κ y λ expresadas en las células plasmáticas (254). Es por ello que la presencia de crioglobulinemia tipo II con un FR IgM monoclonal puede considerarse como un signo temprano de selección oligoclonal/monoclonal de linfocitos B en pacientes con SS. Un estudio reciente (141) ha analizado la presencia de crioglobulinas en 115 pacientes con SSp, encontrando una prevalencia del 16%, muy similar a la obtenida por Tzioufas et al (210) (19% en 103 pacientes). El papel de las crioglobulinas en el SSp se centra en tres importantes aspectos: su clara relación con manifestaciones clínicas de tipo vasculítico, su asociación con el VHC (obliga a descartar dicha infección en todo paciente con SSp y crioglobulinemia) y finalmente, su carácter predictivo de posible desarrollo a linfoma.

1.9.6. Inmunoglobulinas monoclonales circulantes

Las inmunoglobulinas monoclonales son el único producto de una sola clona de linfocitos B relativamente maduros o de células plasmáticas. La presencia de inmunoglobulinas monoclonales no equivale por sí misma a la existencia de proliferación linfoide maligna de linfocitos B, sino que indica únicamente la presencia de una o más poblaciones de linfocitos B capaces de producir una inmunoglobulina homogénea. La detección de las inmunoglobulinas monoclonales se realiza por medio de electroforesis de proteínas séricas sobre acetato de celulosa o gel de agarosa que permite en la mayoría de los casos, la detección de una banda electroforéticamente homogénea. Se ha considerado que la característica del proceso de transición de un estado de autoinmunidad a un estado de proliferación linfoide maligno, es la presencia de inmunoglobulinas monoclonales en suero y en orina de pacientes con SS antes de la aparición del linfoma, por lo que su seguimiento y caracterización es de gran valor en pacientes con SS (311,312). En 1983, Moutsopoulos et al (312) encontraron que los pacientes con SS presentaban una elevada incidencia de cadenas ligeras libres circulantes en suero y que el nivel de cadenas ligeras libres en orina se correlacionaba con la actividad de la enfermedad (313).

Asimismo, se ha descrito que la expansión monoclonal de linfocitos B en pacientes con SS se correlaciona con la detección de inmunoglobulinas monoclonales o cadenas ligeras (11,314,315). El origen monoclonal de las células plasmáticas monotípicas en la sialadenitis autoinmune, se ha confirmado mediante estudios sobre el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (254,262). Con todo, es necesario mencionar que la evidencia de monoclonalidad no representa necesariamente la existencia de

malignidad linfoide. Varios estudios demuestran la presencia de una expansión oligoclonal de linfocitos B en lesiones de las glándulas salivales menores de pacientes con SS sin evolución a linfoma. Pablos et al (316) estudiaron 13 pacientes con SS que presentaban expansión clonal de linfocitos B y ninguno desarrolló enfermedad linfoproliferativa durante el seguimiento. Por tanto, parece que la expansión clonal de los linfocitos B sería sólo un marcador temprano de malignidad y, por lo tanto, no apoya el uso de terapia agresiva en estos pacientes (313,306,317).

ARTÍCULOS PUBLICADOS

ARTICULO I



Clin Rheumatol 2006; 25: 341-346

Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren syndrome.

Prevalence and clinical significance in 335 patients

Nardi N, Brito Zerón P, Ramos Casals M, Aguiló S, Cervera R, Ingelmo M, Font J.

ARTÍCULO II



Semin Arthritis Rheum 2006; 35:312-321

Atypical autoantibodies in patients with primary Sjögren Syndrome: Clinical characteristics and follow-up of 82 cases

Ramos Casals M, Nardi N, Brito Zerón P, Aguiló S, Gil V, Delgado G, Bové A, Font J.

ARTICULO III

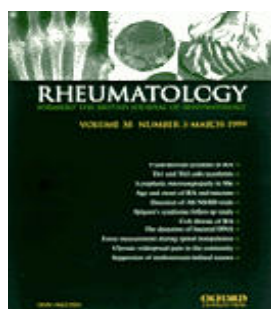


J Rheumatol 2006; 33:1593-1599

Characterization and differentiation in autoimmune versus viral liver involvement in patients with Sjögren Syndrome

Ramos Casals M, Sánchez Tapias JM, Parés A, Fornés X, Brito Zerón P, Nardi N, Vázquez P, Velez D, Arias I, Bové A, Plaza J, Rodés J, Font J.

ARTÍCULO IV



Rheumatology (Oxford) 2009; 48:65-59

Mannose-binding lectin-low genotypes are associated with milder systemic and immunological disease expression in primary Sjögren Syndrome

Ramos Casals M, Brito Zerón P, Soria N, Nardi N, Vargas A, Muñoz S, Bové A, Suárez B, Lozano F.

ARTÍCULO I

Norma Nardi · Pilar Brito-Zerón ·
Manuel Ramos-Casals · Sira Aguiló · Ricard Cervera ·
Miguel Ingelmo · Josep Font

Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren's syndrome

Prevalence and clinical significance in 335 patients

Received: 22 February 2005 / Revised: 25 May 2005 / Accepted: 27 May 2005 / Published online: 25 October 2005
© Clinical Rheumatology 2005

Abstract The aim of this study was to analyze the prevalence and clinical significance of circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in a large cohort of Spanish patients with primary Sjögren's syndrome (SS). We studied 335 patients diagnosed with primary SS seen consecutively in our department since 1994 and tested for anti-nuclear antibodies (ANA), anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, anti-Sm, anti-ribonucleoprotein (anti-RNP), anti-smooth muscle antibodies (anti-SMA), anti-parietal cell antibodies (anti-PCA), anti-liver-kidney microsome type-1 (anti-LKM-1) antibodies and anti-mitochondrial antibodies (AMA). ANA were detected in 278 (83%) patients. The association of positive ANA with the presence of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies reached statistical significance at a titre of ANA $>1/80$ ($p<0.001$), while the presence of anti-Sm and anti-RNP was associated with positive ANA at a titre $\geq 1/320$ ($p=0.037$ for Sm and $p=0.016$ for RNP). ANA titres correlated with the number of positive antibodies against specific nuclear antigens ($p<0.001$) but not with the number of positive antibodies against non-nuclear antigens. We found positive anti-Ro/SS-A antibodies in 111 (33%) patients, anti-La/SS-B in 78 (23%), anti-RNP in 8 (2%) and anti-Sm in 4 (1%). Anti-SMA antibodies were detected in 208 (62%) patients, with no significant associations with clinical or analytical SS features, while anti-PCA antibodies were found in 90 (27%) patients and were associated with a higher prevalence of thyroiditis and liver involvement. AMA were detected in 28 (8%) patients,

although only 14 presented clinical and/or analytical evidence of liver involvement. No patient presented anti-LKM antibodies. ANA play a central role in the immunological expression of primary SS, due to their frequency and close association with the underlying presence of one or more anti-ENA antibodies. Positivity for antibodies against non-nuclear antigens such as anti-PCA and AMA suggests an association with some organ-specific autoimmune diseases (thyroiditis and primary biliary cirrhosis), while the presence of anti-SMA, in spite of their high prevalence, has no clinical significance in primary SS.

Keywords Auto-antibodies · Sjogren syndrome

Introduction

Sjögren's syndrome (SS) is a systemic autoimmune disease that mainly affects the exocrine glands and usually presents as persistent dryness of the mouth and eyes due to functional impairment of the salivary and lacrimal glands [1]. In the absence of an associated systemic autoimmune disease, patients with this condition are classified as having primary SS. The histological hallmark is a focal lymphocytic infiltration of the exocrine glands, and the spectrum of the disease includes both sicca features and diverse extraglandular manifestations [2–4]. Positive auto-antibodies are included as one of the current classification criteria for SS. The 1993 European criteria [5] included the presence of one or more of four antibodies [anti-nuclear antibodies (ANA), rheumatoid factor (RF), Ro/SS-A and/or La/SS-B]. However, in the recently proposed 2002 criteria [6], only Ro/La were included and, together with a positive salivary gland biopsy, became mandatory criteria for the classification of primary SS. Even so, the clinical significance of other auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens has been little studied in primary SS [7].

The aim of this study was to analyze the prevalence and clinical significance of circulating auto-antibodies against nuclear [ANA, Ro/SS-A, La/SS-B, Sm and ribonucleopro-

N. Nardi · P. Brito-Zerón · M. Ramos-Casals · S. Aguiló ·
R. Cervera · M. Ingelmo · J. Font
Department of Autoimmune Diseases,
Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques
August Pi i Sunyer (IDIBAPS), School of Medicine,
University of Barcelona,
Barcelona, Spain

M. Ramos-Casals (✉)
Servei de Malalties Autoimmunes,
Hospital Clínic, C/Villarroel, 170,
08036 Barcelona, Spain
e-mail: mramos@clinic.ub.es
Tel.: +34-93-2275774
Fax: +34-93-2275774

tein (RNP)] and non-nuclear [smooth muscle antibodies (SMA), parietal cell antibodies (PCA), liver–kidney microsome type-1 (LKM-1) antibodies and anti-mitochondrial antibodies (AMA)] antigens in a large cohort of Spanish patients with primary SS.

Methods

Patients

We studied 335 patients diagnosed with primary SS seen consecutively in our department since 1994. All patients fulfilled four or more of the preliminary diagnostic criteria for SS proposed by the European Community Study Group in 1993 [5] and underwent a complete history and physical examination. Diagnostic tests for SS (rose bengal staining, Schirmer's test, parotid scintigraphy and salivary gland biopsy) were applied according to the recommendations of the European Community Study Group [5], and clinical and serologic characteristics of all patients were collected in a protocol form. Salient features included in the protocol were the following: (1) age at disease onset, defined as the initial manifestation clearly attributable to SS; (2) age at inclusion, defined as the age when the patient entered the protocol; (3) cumulative clinical manifestations during disease evolution (from the onset until protocol inclusion), defined according to previous studies [3]; and (4) laboratory findings at protocol inclusion. We considered as exclusion criteria for the diagnosis of primary SS the coexistence of other systemic autoimmune diseases, pre-existing haematological diseases and hepatitis B virus, hepatitis C virus or HIV infections.

Auto-antibody profile

Immunological tests were performed at the first visit in all patients and included the determination of the following auto-antibodies: ANA, AMA, anti-PCA, anti-SMA and anti-LKM-1 were determined by indirect immunofluores-

cence using triple tissue cryostat sections (liver–stomach–kidney) and Hep-2 cells as substrate (Euroimmun); precipitating antibodies to the extractable nuclear antigens Sm, RNP, Ro/SS-A and La/SS-B were detected by ELISA (Captia, Trinity Biotech, Ireland). All positive results were confirmed during follow-up visits by subsequent immunological tests. Other immunological tests included rheumatoid factor (RF) (latex fixation and Waaler–Rose tests), complement factors C3 and C4 (measured by nephelometry using a Behring BNA nephelometer) and cryoglobulins.

Statistical analysis

Chi-square and Fisher's exact tests were applied to analyze qualitative differences. The *p* values obtained in multiple comparisons were adjusted using Bonferroni correction. For comparison of quantitative parameters, the Student's *t* test was used in large samples of similar variance and the non-parametric Mann–Whitney *U* test for small samples. Values of quantitative variables are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical significance was established at *p* < 0.05. The statistical analysis was performed by the SPSS program.

Results

The cohort consisted of 312 (93%) female and 23 (7%) male patients (female/male ratio 14:1). Mean age at the onset of symptoms attributable to the disease was 52.9 ± 0.83 years (range 15–87) and at the time of protocol inclusion was 58.5 ± 0.78 years (range 16–87). Three hundred and twenty-six (97%) patients presented xerostomia, 321 (96%) xerophthalmia and 63 (19%) parotidomegaly. Moreover, 294/305 (96%) were positive (according to the 1993 European criteria [5]) for ocular diagnostic tests (Schirmer's test and/or rose bengal staining). The main extraglandular features and diagnostic tests are summarized in Table 1. The main immunological features are summarized in Table 2. Two hundred and five (61%) patients presented auto-

Table 1 Prevalence of the main clinical, diagnostic and haematological features according to the presence or absence of ANA

	Total (N=335)	ANA+ (n=278)	ANA- (n=57)	<i>p</i> value
Parotidomegaly	63 (19%)	55 (20%)	8 (14%)	0.357
Fever	21 (6%)	21 (8%)	0 (0%)	0.032
Adenopathies	21 (6%)	21 (8%)	0 (0%)	0.032
Articular involvement	116 (35%)	98 (35%)	18 (32%)	0.649
Pulmonary involvement	34 (10%)	29 (10%)	5 (9%)	0.814
Cutaneous vasculitis	36 (11%)	34 (12%)	2 (4%)	0.060
Peripheral neuropathy	24 (7%)	20 (7%)	4 (7%)	1.000
Raynaud's phenomenon	41 (12%)	39 (14%)	2 (4%)	0.026
Renal involvement	12 (4%)	11 (4%)	1 (2%)	0.699
Positive ocular tests	294/305 (96%)	244/256 (95%)	46/49 (98%)	0.701
Positive scintigraphy	249/280 (89%)	207/230 (90%)	42/50 (84%)	0.220
Positive salivary biopsy	121/156 (78%)	95/124 (77%)	26/32 (81%)	0.643
ESR >50 mm	68/331 (21%)	66/260 (25%)	2/51 (4%)	<0.001*
Cytopenia	268/323 (83%)	111/268 (41%)	13/55 (24%)	0.015

ESR erythrocyte sedimentation rate

*Statistically significant after Bonferroni correction

antibodies against both nuclear and non-nuclear antigens, 73 (22%) exclusively against nuclear antigens and 34 (10%) exclusively against non-nuclear antigens, and 23 (7%) patients were negative for all the nine auto-antibodies tested.

Antibodies against nuclear antigens

Anti-nuclear antibodies

We found positive ANA in 278 (83%) patients. Fifty-three (19%) had a titre of 1/40, 56 (20%) a titre of 1/80, 46 (16%) a titre of 1/160, 35 (13%) a titre of 1/320 and 88 (32%) a titre $>1/640$. Compared with patients with negative ANA, patients with ANA showed a higher prevalence of fever (8 vs 0%, $p=0.032$), adenopathies (8 vs 0%, $p=0.032$), Raynaud's phenomenon (13 vs 2%, $p=0.001$), erythrocyte sedimentation rate (ESR) >50 mm/h (25 vs 4%, $p<0.001$) and cytopenia (41 vs 24%, $p=0.015$), although only ESR >50 mm/h remained statistically significant after Bonferroni correction (Table 1). The statistical analysis found no additional clinical associations when ANA positivity was considered at titres higher than 1/40, except that patients with ANA $\geq 1/80$ had a higher prevalence of anaemia (27 vs 16%, $p=0.017$) and leukopenia (21 vs 7%, $p=0.006$).

We analyzed the association of ANA titres with the existence of antibodies against specific nuclear antigens. The association of positive ANA with the presence of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies reached statistical significance at a titre of ANA $>1/80$ ($p<0.001$), while the presence of anti-Sm and anti-RNP was associated with positive ANA at a titre $\geq 1/320$ ($p=0.037$ for Sm and $p=0.016$ for RNP). We also found a close correlation between ANA titres and the number of positive antibodies against specific nuclear antigens (Pearson correlation of

0.467, bilateral significance <0.001) but not with the number of positive antibodies against non-nuclear antigens. Thus, patients with the highest titres of ANA had a higher number of positive auto-antibodies against nuclear antigens. ANA titres also correlated with the percentage of serum gammaglobulins (Pearson correlation of 0.548, bilateral significance <0.001).

Compared with ANA-negative patients, those with ANA showed a similar prevalence of fulfilment of the new 2002 classification criteria (87 vs 82%, $p=0.430$), but patients with a titre $>1/80$ showed a higher prevalence of fulfilment of the 2002 criteria (91 vs 75%, $p=0.003$). The existence of ANA $>1/80$ alone had a sensitivity of 74% and a specificity of 53% for the classification of primary SS according to the new 2002 classification criteria, with a high positive predictive value (91%).

Anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies

We found anti-Ro/SS-A and/or anti-La/SS-B antibodies in 116 (35%) patients (74 presented both antibodies, 38 exclusively anti-Ro/SS-A and 4 exclusively anti-La/SS-B antibodies). These patients showed a higher prevalence of adenopathies (12 vs 3%, $p=0.002$), cutaneous vasculitis (16 vs 8%, $p=0.025$), peripheral neuropathy (12 vs 5%, $p=0.014$), parotidomegaly (27 vs 15%, $p=0.006$), Raynaud's phenomenon (20 vs 8%, $p=0.003$), positive salivary gland biopsy (93 vs 71%, $p=0.003$), ESR >50 mm/h (42 vs 12%, $p<0.001$) and cytopenia (60 vs 27%, $p<0.001$), although only adenopathies, Raynaud's phenomenon, positive salivary gland biopsy, ESR >50 mm/h and cytopenia remained statistically significant after Bonferroni correction (Table 3). No significant differences were found between patients with both Ro/La and those with only Ro or only La auto-antibodies.

Anti-RNP and anti-Sm antibodies

We found positive anti-RNP antibodies in 8 (2%) patients. All were women, with a mean age at diagnosis of 49 years (range 30–71 years). Four patients presented extraglandular features. None of these patients fulfilled the classification criteria for mixed connective tissue disease (MCTD) proposed by Alarcón-Segovia et al. [8], although some presented clinical features included in these criteria, such as Raynaud's phenomenon ($n=2$) or sinovitis ($n=2$). Other features included in the MCTD criteria, such as edema of hands, myositis or acrosclerosis, were not observed.

We found positive anti-Sm antibodies in 4 (1%) patients. All were women, with a mean age of diagnosis at 60 years (range 45–76 years). Three patients presented extraglandular features. Although some patients had features included in the systemic lupus erythematosus (SLE) criteria, such as leukopenia or arthritis, none fulfilled the classification criteria for SLE. No Sm-positive patient had positive anti-DNA antibodies.

Table 2 Immunological features in 335 patients with primary SS

Immunological tests	Positive	Percent
Antibodies against nuclear antigens	282	84
Anti-nuclear antibodies	278	83
Anti-Ro/SS-A antibodies	111	33
Anti-La/SS-B antibodies	78	23
Anti-RNP antibodies	8	2
Anti-Sm antibodies	4	1
Antibodies against non-nuclear antigens	239	71
Anti-smooth muscle antibodies	208	62
Anti-parietal cell gastric antibodies	90	27
Anti-mitochondrial antibodies	27	8
Anti-LKM antibodies	0	0
Other immunological features		
Rheumatoid factor	120	36
Hypocomplementemia	29/316	9
Cryoglobulinaemia	21/247	9

Anti-RNP ribonucleoprotein, *anti-LKM* anti-liver–kidney microsome

Table 3 Prevalence of the main clinical, diagnostic and haematological features according to the presence of anti-Ro/SS-A and/or anti-La/SS-B antibodies

	Ro and/or La (+) (n=116)	Ro and La (-) (n=219)	p value
Parotidomegaly	31 (27%)	32 (15%)	0.006
Fever	8 (7%)	13 (6%)	0.449
Adenopathies	14 (12%)	7 (3%)	0.002*
Articular involvement	43 (37%)	73 (33%)	0.547
Pulmonary involvement	10 (9%)	24 (11%)	0.572
Cutaneous vasculitis	19 (16%)	17 (8%)	0.025
Peripheral neuropathy	14 (12%)	10 (5%)	0.014
Raynaud's phenomenon	23 (20%)	18 (8%)	0.003*
Renal involvement	5 (4%)	7 (3%)	0.758
Positive ocular tests	101/104 (97%)	191/201 (95%)	0.553
Positive scintigraphy	82/89 (92%)	167/191 (87%)	0.308
Positive biopsy	42/45 (93%)	79/111 (71%)	0.003*
ESR >50 mm/h	44/105 (42%)	24/206 (12%)	<0.001*
Cytopenia	66/110 (60%)	58/213 (27%)	<0.001*

*Statistically significant after Bonferroni correction

Antibodies against non-nuclear antigens

Anti-smooth muscle antibodies

We found positive anti-SMA antibodies in 208 (62%) patients: 121 (58%) had a titre of 1/40, 54 (26%) a titre of 1/80, 26 (12%) a titre of 1/160, 2 (1%) a titre of 1/320 and 5 (2%) a titre >1/640. No significant associations with clinical or analytical data were found according to the presence or absence of anti-SMA, although a higher prevalence of ANA was found in those with anti-SMA (87 vs 77%, $p=0.035$).

Anti-parietal cell antibodies

We found positive anti-PCA antibodies in 90 (27%) patients: 19 (21%) had a titre of 1/40, 22 (24%) a titre of 1/80, 18 (20%) a titre of 1/160, 16 (18%) a titre of 1/320 and 15 (17%) a titre >1/640. No significant associations with SS features were found when patients were compared according to the presence or absence of positive anti-PCA at titres >1/40. However, patients with anti-PCA >1/80 presented a higher prevalence of thyroiditis (22 vs 13%, $p=0.035$), especially in patients with titres >1/640 (40 vs 13%, $p=0.012$). In addition, patients with anti-PCA also showed a higher prevalence of liver involvement (62 vs

Table 4 Prevalence of the main clinical, diagnostic and haematological features according to the presence or absence of AMA

	AMA+ (n=28)	AMA- (n=307)	p value
Parotidomegaly	4 (14%)	59 (19%)	0.622
Fever	1 (4%)	20 (6%)	1.000
Adenopathies	4 (14%)	17 (5%)	0.086
Articular involvement	6 (21%)	110 (36%)	0.149
Pulmonary involvement	3 (11%)	31 (10%)	0.149
Cutaneous vasculitis	2 (7%)	34 (11%)	0.752
Peripheral neuropathy	5 (18%)	19 (6%)	0.039
Raynaud's phenomenon	8 (29%)	33 (11%)	0.012
Renal involvement	0 (0%)	12 (4%)	0.149
Positive ocular tests	24/25 (96%)	268/280 (96%)	1.000
Positive scintigraphy	24/25 (96%)	225/255 (88%)	0.331
Positive biopsy	9/10 (90%)	112/146 (77%)	0.459
ESR >50 mm	12/26 (46%)	56/285 (20%)	0.005
Cytopenia	14/26 (54%)	110/297 (37%)	0.097

23%, $p<0.001$). Only 2 (2%) patients with anti-PCA antibodies had pernicious anaemia/atrophic gastritis.

Anti-mitochondrial antibodies

We found positive AMA in 28 (8%) patients: 3 had a titre of 1/40, 8 a titre of 1/80, 7 a titre of 1/160, 4 a titre of 1/320 and 6 a titre $\geq 1/640$. There were 27 females and 1 male, with a mean age of 50 years (range 24–77 years). Fourteen (50%) patients presented clinical and/or analytical evidence of liver involvement. Increased transaminases were found in 11 (39%) patients, increased GGT in 13 (46%), raised alkaline phosphatase in 8 (29%) and elevated bilirubin in 4 (14%). AMA-positive patients showed a higher prevalence of Raynaud's phenomenon (29 vs 11%, $p=0.012$), liver involvement (50 vs 3%, $p<0.001$), peripheral neuropathy (18 vs 6%, $p=0.039$), hypergammaglobulinaemia (46 vs 17%, $p=0.001$) and ESR >50 mm (46 vs 20%, $p=0.005$) (Table 4). Liver biopsy was performed in 4 of the 14 patients with liver involvement and showed primary biliary cirrhosis in 2 patients and no significant histological changes in the remaining 2 patients.

Anti-liver-kidney microsome antibodies

No patient presented anti-LKM antibodies.

Discussion

Primary SS is a systemic autoimmune disease that overwhelmingly affects women (ratio 14:1) of middle age, with xerostomia, xerophthalmia, ANA, anti-Ro/SS-A and RF being the most frequent features [3, 4]. One of the most important findings of the present study is the description of primary SS as a disease which can express

in many immunological guises, due to the presence of a range of auto-antibodies against both nuclear and non-nuclear antigens, with ANA being the most frequent auto-antibody detected. Patients with primary SS also presented a higher prevalence of some antibodies against non-nuclear antigens, such as anti-SMA (62%), while the presence of antibodies against nuclear antigens other than Ro/La was very infrequent, with less than 2% of patients presenting anti-RNP or anti-Sm antibodies.

ANA were found in more than 80% of our patients with primary SS and at high titres ($>1/320$) in nearly half. ANA were discovered during research on the LE cell phenomenon [9] and have become a key immunological test for the diagnosis of systemic autoimmune diseases [5, 10], with a low titre being less significant than a high one [11]. Although ANA were not included in the 2002 classification criteria for SS, the results of this study suggest that their role in the diagnosis of patients with suspected SS should be reconsidered for various reasons. Firstly, ANA were the most frequently detected antibodies in primary SS, and their determination plays a central role in differentiating SS from non-autoimmune causes of sicca syndrome. Secondly, ANA were associated with various extraglandular and analytical SS features, as reported by other studies [12–14], and we also found a close association between higher titres of ANA and hypergammaglobulinaemia, elevated ESR and a higher number of ENA auto-antibodies.

With respect to the ANA dilutions, we found that ANA were associated with the presence of positive anti-Ro/La in patients with titres $>1/80$, while antibodies against nuclear antigens other than Ro/La (such as RNP or Sm) were detected mainly in patients with high titres of ANA ($>1/320$). This suggests that in patients diagnosed with primary SS and high titres of ANA, titres higher or equal to $1/80$ are closely related to the presence of anti-ENA antibodies. In addition, ANA $>1/80$ alone had an excellent positive predictive value (91%) for the classification of patients with primary SS according to the 2002 criteria. Considering this evidence, we believe that a patient with sicca syndrome, positive ocular tests and parotid scintigraphy and positive ANA $>1/80$ should be classified as having a primary SS in the absence of coexisting systemic autoimmune diseases, even when Ro/La antibodies are negative.

We also found a higher prevalence of extraglandular and analytical features in those patients with primary SS and positive anti-Ro/La antibodies. Previous reports in smaller series of patients have found a close correlation between positive anti-Ro/La antibodies and extraglandular manifestations [15–19], serological markers [15–20] and a higher focus score in the salivary gland biopsy [13, 21]. The subset of patients with primary SS and anti-Ro/La antibodies probably represents the most clinically and immunologically “active” presentation of the disease. In these patients, a more exhaustive clinical follow-up could lead to earlier identification and treatment of extraglandular features. Nevertheless, we believe that the presence of Ro/La probably identifies a specific subset of the disease and should not be considered per se as a mandatory criterion for

primary SS. Thus, we found that some of the subsets described in a previous study [3] were mainly Ro/La-negative: 22 (85%) of the 26 male patients were negative, as were 33 (77%) of the 43 patients with a late SS onset and 91 (68%) of 134 patients with a sicca-limited disease. The inclusion of positive anti-Ro/La antibodies as a mandatory criterion limits the primary SS diagnosis to a very specific subset of patients, excluding most male patients, those with a late onset and those without extraglandular features.

The different criteria currently used for the diagnosis of primary SS lead to different visions of the disease. The US criteria [22], which are more specific, identify principally those patients with the greatest extraglandular and immunological expression. In contrast, the 1993 European criteria [5] permit a diagnosis of SS with negative salivary gland biopsy and negative immunology. The recent 2002 American–European classification criteria [6] occupy an intermediate position, including either a positive salivary gland biopsy or positive anti-Ro/La as mandatory criteria. We believe that these modified criteria are currently the most appropriate for the diagnosis of primary SS, although in light of the results of the present study, we recommend the inclusion of ANA (at titres $>1/80$) in the mandatory immunological criteria of the 2002 criteria.

The presence of ENA antibodies other than Ro/La in primary SS, although possible, has been shown to be extremely infrequent, with a very small number of patients with primary SS showing positive anti-Sm and/or anti-RNP ($<2\%$ of patients). With respect to the 8 patients identified with positive anti-RNP, none fulfilled the classification criteria for MCTD, although some presented various clinical feature included in these criteria, such as Raynaud’s phenomenon or synovitis. Primary SS patients may present Sm antibodies (1%) but less frequently than positive RNP antibodies. We recommend a close follow-up of patients with primary SS with positive Sm/RNP antibodies in order to detect clinical and/or analytical data (especially positive anti-DNA antibodies) suggesting the development of an additional systemic autoimmune disease (mainly SLE).

In contrast to ANA, the clinical significance of antibodies against non-nuclear antigens has not been evaluated in primary SS. This study has found relevant data on their prevalence and clinical significance. Firstly, these antibodies are detected in primary SS at very different percentages. Thus, anti-SMA were the second most frequently detected antibodies in our patients, anti-PCA were detected at a similar frequency as, for example, anti-La/SS-B, and anti-LKM-1 were negative in all patients. Secondly, the clinical significance of these auto-antibodies differs from that of antibodies against nuclear antigens. In contrast to ANA, which are closely associated with extraglandular and analytical SS features, antibodies against non-nuclear antigens are clearly associated with the presence of associated organ-specific autoimmune diseases, mainly hepatic and thyroid autoimmune processes. Anti-PCA antibodies have been associated with chronic atrophic gastritis and pernicious anaemia, although this has been never investigated in patients with primary SS. In

2002, we reviewed haematological manifestations in our cohort of patients and only found 2 cases out of 380 [4], with only 4 additional cases being reported in the literature [23–25], suggesting that pernicious anaemia is a very infrequent finding in primary SS. In addition, there was a small subset of patients with primary SS and positive AMA (8%), an immunological marker closely related to primary biliary cirrhosis (PBC) [26]. Interestingly, only 50% of our SS-AMA-positive patients had clinical or analytical evidence of liver involvement. This suggests the existence of an incipient or incomplete PBC in some patients with primary SS, with AMA being an early immunological marker of this associated autoimmune liver disease. In spite of their significant prevalence, antibodies against cytoplasmic antigens seem to have lesser clinical significance compared with ANA, and we do not recommend their routine determination in patients with primary SS, except in those with some specific analytical alterations such as raised liver enzymes or macrocytic anaemia.

Acknowledgement The authors wish to thank David Buss for his editorial assistance.

References

- Daniels T, Fox PC (1992) Salivary and oral components of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 18:571–589
- Moutsopoulos HM (1994) Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol* 72:162–165
- García-Carrasco M, Ramos-Casals M, Rosas J, Pallares L, Calvo-Alen J, Cervera R et al (2002) Primary Sjogren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. *Medicine (Baltimore)* 81:270–280
- Ramos-Casals M, Font J, García-Carrasco M et al (2002) Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)* 81:281–292
- Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM et al (1993) Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 36:340–347
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE et al (2002) Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American–European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 61:554–558
- García-Carrasco M, Ramos-Casals M, Font J, Vives J (2003) Interpretación de las pruebas inmunológicas en el síndrome de Sjögren. In: Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M (eds) *Síndrome de Sjögren*. Ed. Masson, Barcelona, pp 445–466
- Alarcón-Segovia D, Cardiel MH (1989) Comparison between three diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. Study of 593 patients. *J Rheumatol* 16:328–334
- Hollingsworth PN, Pummer SC, Dawkins RL (1996) Antinuclear Antibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y (eds) *Antibodies*. Elsevier, Amsterdam, pp 74–90
- Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:1725
- Adams BB, Mutasim DF (2000) The diagnostic value of anti-nuclear antibody testing. *Int J Dermatol* 39:887–891
- Asmussen K, Andersen V, Bendixen G et al (1996) A new model for classification of disease manifestations in primary Sjögren's syndrome. *J Intern Med* 239:475–482
- Wise CM, Woodruff RD (1993) Minor salivary gland biopsies in patients investigated for primary Sjögren's syndrome. A review of 187 patients. *J Rheumatol* 20:1515–1518
- Shah F, Rapini RP, Arnett FC, Warner NB, Smith CA (1990) Association of labial salivary gland histopathology with clinical and serologic features of connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 33:1682–1687
- Davidson BKS, Kelly CA, Griffiths ID (1999) Primary Sjögren's syndrome in the north east of England: a long-term follow-up study. *Rheumatology* 38:245–253
- Moutsopoulos HM, Zerva LV (1990) Anti-Ro (SS-A)/La (SS-B) antibodies and Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 9(Suppl 1):123–130
- Alexander EL, Arnett FC, Provost TT, Stevens MB (1983) Sjögren's syndrome: association of anti-Ro (SS-A) antibodies with vasculitis, hematologic abnormalities and serologic hyperreactivity. *Ann Intern Med* 98:155–159
- Alexander EL, Provost TT, Stevens MB, Alexander GE (1982) Neurologic complications of primary Sjogren's syndrome. *Medicine (Baltimore)* 61:247–257
- Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M et al (1986) Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 29:196–206
- Manoussakis MN, Tzioufas AG, Pange PJ, Moutsopoulos HM (1986) Serological profiles in subgroups of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 61:89–92
- Markus HM, Veldhoven CH, Swaak AJ, Smeenk RT (1993) The clinical significance of the detection of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B autoantibodies using purified recombinant proteins in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int* 13:147–150
- Fox RI, Robinson C, Curd J, Michelson P, Bone R, Howell FV (1986) First international symposium on Sjögren's syndrome: suggested criteria for classification. *Scand J Rheumatol* 61 (Suppl):28–30
- Wegelius O, Fyhrquist F, Adner PL (1970) Sjogren's syndrome associated with vitamin B12 deficiency. *Acta Rheumatol Scand* 16:184–190
- Williamson J, Paterson RW, McGavin DD, Greig WR, Whaley K (1970) Sjogren's syndrome in relation to pernicious anaemia and idiopathic Addison's disease. *Br J Ophthalmol* 54:31–36
- Pedro-Botet J, Coll J, Tomás S, Soriano JC, Gutiérrez Cebollado J (1993) Primary Sjogren's syndrome associated with chronic atrophic gastritis and pernicious anemia. *J Clin Gastroenterol* 16:146–148
- Talwalkar JA, Lindor KD (2003) Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 362:53–61

**Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren syndrome.
Prevalence and clinical significance in 335 patients**

OBJETIVOS

1. Analizar la prevalencia y el significado clínico de los autoanticuerpos contra antígenos nucleares y no nucleares circulantes en suero de pacientes con SSp.
2. Determinar las implicaciones de la presencia de ANA en la expresión clínica e inmunológica de los pacientes con SSp.
3. Analizar la correlación de los títulos de ANA con la presencia de anticuerpos específicos contra antígenos nucleares y no nucleares.
4. Analizar la relación entre la presencia de anticuerpos contra antígenos no nucleares y la afectación específica de órgano

PRINCIPALES RESULTADOS

- El 61% de los pacientes presentaron positividad para anticuerpos contra antígenos tanto nucleares como no nucleares, el 22% fue positivo exclusivamente contra antígenos nucleares y el 10% solo para anticuerpos contra antígenos no nucleares; mientras que el 7% fue negativo para ambos tipos de autoanticuerpos.
- Los pacientes con ANA positivo mostraron una mayor prevalencia de fiebre, adenopatías, fenómeno de Raynaud, VSG>50 mm/hr y citopenia en comparación con los ANA negativos.

-
- Se observó que existe relación entre los títulos de ANA y la presencia de anticuerpos contra antígenos nucleares específicos, pero no con el número de anticuerpos contra antígenos no nucleares positivos.
 - La presencia de ciertos anticuerpos contra antígenos no nucleares sugirió asociación con algunas enfermedades autoinmunes órgano específicas.

CONCLUSIONES

Los ANA fueron los anticuerpos más frecuentemente detectados y su determinación juega un papel fundamental en la diferenciación entre SSp y el síndrome seco de causa no autoinmune, por lo que recomendamos la inclusión de los ANA (a títulos $>1/80$) entre los criterios inmunológicos establecidos en la clasificación Americano-Europea del 2002.

Así también detectamos una alta prevalencia de compromiso extraglandular y de alteraciones analíticas en aquellos pacientes con SSp y con anticuerpos Ro/La positivos.

Los autoanticuerpos dirigidos contra antígenos no nucleares se asociaron claramente con enfermedades autoinmunes órgano-específicas, principalmente procesos hepáticos y tiroideos.

Por último, observamos que a pesar de la alta prevalencia de anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos estos parecen tener un menor significado clínico comparados con los ANA, por lo que no recomendamos su determinación de manera rutinaria excepto frente a la presencia de alteraciones analíticas específicas.

ARTÍCULO II

Atypical Autoantibodies in Patients with Primary Sjögren Syndrome: Clinical Characteristics and Follow-Up of 82 Cases

Manuel Ramos-Casals, MD, PhD,* Norma Nardi, MD,[†] Pilar Brito-Zerón, MD,[†] Sira Aguiló, MD,[‡] Victor Gil, MD,[‡] German Delgado, MD,[§] Albert Bové, MD,[‡] and Josep Font, MD, PhD^{§,||}

OBJECTIVES To analyze the clinical characteristics, follow-up, and fulfillment of classification criteria for other systemic autoimmune diseases (SAD) in patients with primary Sjögren syndrome (SS) and atypical autoantibodies.

METHODS We studied 402 patients diagnosed with primary SS seen consecutively in our Department since 1994. We considered anti-DNA, anti-Sm, anti-RNP, antitopoisomerase I/Scl70, anticentromere (ACA), anti-Jo1, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), anticardiolipin antibodies (aPL), and lupus anticoagulant as atypical autoantibodies. The patients were prospectively followed after inclusion into the protocol, focusing on the development of features that might lead to the fulfillment of classification criteria for additional SAD. As a control group, we selected an age-sex-matched subset of patients with primary SS without atypical autoantibodies.

RESULTS Eighty-two (20%) patients showed atypical autoantibodies (36 had aPL, 21 anti-DNA, 13 ANCA, 10 anti-RNP, 8 ACA, 6 anti-Sm, 2 anti-Scl70, and 1 anti-Jo-1 antibodies). There were 77 (94%) women and 5 (6%) men, with a mean age of 57 years. Patients with atypical autoantibodies had no statistical differences in the prevalence of the main sicca features, extraglandular manifestations (except for a higher prevalence of Raynaud's phenomenon, 28% versus 7%, $P = 0.001$), immunological markers, and in the fulfillment of the 2002 classification criteria, compared with the control group. After a follow-up of 534 patient-years, 13 (16%) of the 82 patients with atypical autoantibodies developed an additional SAD (systemic lupus erythematosus in 5 cases, antiphospholipid syndrome in 4, limited scleroderma in 3, and microscopic polyangiitis in 1) compared with none in the control group ($P < 0.001$).

CONCLUSIONS This study shows an immunological overlap (defined by the presence of autoantibodies considered typical of other SAD) in 20% of our patients with primary SS. However, the clinical significance of these atypical autoantibodies varies widely depending on the autoantibodies detected, with a broad spectrum of prevalence and clinical patterns of disease expression, and a specific predilection for association with some SAD in preference to others.

Semin Arthritis Rheum 35:312-321 © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

*Consultant.

[†]Research Fellow.

[‡]Specialist Physician.

[§]Resident.

^{||}Senior Consultant.

Address reprint requests to Dr. Manuel Ramos-Casals, Servei de Malalties Autoimmunes, Hospital Clínic, C/Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: mramos@clinic.ub.es

KEYWORDS primary Sjögren syndrome, anti-DNA antibodies, anticentromere antibodies, ANCA, antiphospholipid antibodies, anti-Sm antibodies, anti-RNP antibodies

Sjögren syndrome (SS) is a systemic autoimmune disease (SAD) that mainly affects the exocrine glands and usually presents as persistent dryness of the mouth and eyes due to functional impairment of the salivary and lacrimal glands (1). In the absence of an associated SAD, patients with this condition are classified as having primary SS (2). The histological hallmark is a focal lymphocytic infiltration of the exocrine glands, and the spectrum of the disease extends from an organ-specific autoimmune disease (autoimmune exocrinopathy) (3) to a systemic process with diverse extraglandular manifestations (4,5).

The overproduction of a wide variety of immunoglobulins including autoantibodies directed at specific nuclear or cytoplasmic antigens is a central etiopathogenic characteristic of primary SS. Nevertheless, the 1993 European Criteria (6) included the presence of 4 antibodies (antinuclear antibodies (ANA), rheumatoid factor (RF), Ro/SS-A, and/or La/SS-B) in the immunologic criteria and, in the recently proposed 2002 Criteria (7), only Ro/La has been included. However, patients with primary SS sometimes have autoantibodies considered characteristic of other SAD, although the clinical significance of this immunological overlap is not well established. Some studies have attributed the presence of some autoantibodies to the B-cell hyperactivity characteristic of primary SS (8,9), while the presence of other of these autoantibodies might have a predictive role for the development of additional SAD (10,11).

The aims of this study were to analyze the clinical characteristics, follow-up, and fulfillment of classification criteria for other SAD in patients with primary SS and autoantibodies not included in the current SS classification criteria, to define the clinical relevance of this immunological overlap, and to suggest clinical guidelines for testing for these autoantibodies in primary SS.

Methods

Patients

We studied 402 patients diagnosed with primary SS seen consecutively in our Department since 1994. All patients fulfilled 4 or more of the preliminary diagnostic criteria for SS proposed by the European Community Study Group in 1993 (6) (including as mandatory criterion either positive immunological markers or salivary lip biopsy) and underwent a complete history and physical examination. Diagnostic tests for SS (rose bengal staining, Schirmer test, parotid scintigraphy, and salivary gland biopsy) were applied according to the recommendations of the European Community Study Group (6). Exclusion criteria for the diagnosis of primary SS were the coexistence of other SAD, preexisting hematological diseases, and hepatitis B virus, hepatitis C virus, or HIV infections. We considered the following as atypical autoantibodies:

- DNA antibodies (>20 UI/L by Farr's technique (12))
- Anti-Sm antibodies (ELISA)
- Anti-RNP antibodies (ELISA)
- Anti-Scl70 antibodies (ELISA)
- Anticentromere antibodies (ACA) (ELISA)
- Anti-Jo1 antibodies (ELISA)
- Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) (staining patterns by indirect immunofluorescence, antigenic specificity by ELISA (13))
- Anticardiolipin antibodies (aCL) (IgG and IgM-aCL measured by ELISA (14))
- Lupus anticoagulant (LA) (coagulation assays (15))

The patients were prospectively followed after inclusion into the protocol, focusing on the development of clinical and/or laboratory features that might lead to the fulfillment of classification criteria for additional SAD. The diagnosis of associated SAD was based on the following criteria:

- Systemic lupus erythematosus (SLE) according to the revised criteria of the American College of Rheumatology (ACR) (16);
- Systemic sclerosis (SSc) by the ACR preliminary criteria (17);
- Polymyositis-dermatomyositis by the Bohan and Peter criteria (18)

Abbreviations

ACR	American College of Rheumatology
aCL	anticardiolipin antibodies
ACA	anti-centromere antibodies
LKM-1	antiliver-kidney microsome antibodies type-1
AMA	antimitochondrial antibodies
ANA	antinuclear antibodies
PCA	anti-parietal cell antibodies
aPL	antiphospholipid antibodies
APS	antiphospholipid syndrome
SMA	antismooth muscle antibodies
CNS	central nervous system
LA	lupus anticoagulant
PAM	microscopic polyangiitis
MCTD	mixed connective tissue disease
MPO	myeloperoxidase
PR3	proteinase 3
RF	rheumatoid factor
SS	Sjögren syndrome
SEM	standard error of the mean
SAD	systemic autoimmune diseases
SLE	systemic lupus erythematosus
SSc	systemic sclerosis

Table 1 Epidemiological, Clinical, and Immunological Features, and Disease Evolution of 82 Patients with Primary SS and Atypical Autoantibodies

Atypical Antibodies	n	Female: Male Ratio	Mean Age (years)	Extraglandular Features (%)	ANA (%)	RF (%)	Ro (%)	La (%)	Associated SAD (%)
aPL	36	35:1	55	Articular (50) Raynaud (22)	89	25	31	22	APS (11)
Anti-DNA	21	20:1	54	Articular (38) Lymphadenopathy (29)	100	50	50	50	SLE (24)
ANCA	13	13:0	62	Raynaud (61) Pulmonary (54)	92	38	46	31	PAM (7)
Anti-RNP	10	9:1	58	Articular (54) Articular (30) Raynaud (20) Neuropathy (20)	90	60	50	30	—
ACA	8	7:1	64	Raynaud (75) Pulmonary (38) Articular (38)	100	30	10	10	Limited Sc (38)
Anti-Sm	6	5:1	68	Raynaud (33) Pulmonary (33)	100	50	83	67	—
ScI 70	2	2:0	55	Articular (50) Raynaud (50)	100	50	50	0	—
Anti-Jo1	1	1:0	72	—	100	0	100	0	—

Abbreviations: aPL: antiphospholipid antibodies; ACA: anticentromere antibodies; ANA: antinuclear antibodies; RF: rheumatoid factor; SAD: systemic autoimmune diseases; APS antiphospholipid syndrome; SLE: systemic lupus erythematosus; PAM: microscopic polyangiitis; SSc: systemic sclerosis.

Mixed connective tissue disease (MCTD) by the Alarcon-Segovia and coworkers criteria (19)

Antiphospholipid syndrome (APS) by the preliminary classification criteria (20)

Systemic vasculitis by the 1990 ACR criteria (21).

Other immunologic tests included the determination of ANA (indirect immunofluorescence using mouse liver/kidney/stomach as substrates), antimitochondrial antibodies (AMA), antiparietal cell antibodies (PCA), antismooth muscle antibodies (SMA), and antiliver-kidney microsome antibodies type-1 (LKM-1) (indirect immunofluorescence), precipitating antibodies to the extractable nuclear antigens Ro/SS-A and La/SS-B (ELISA), RF (latex fixation and Waaler-Rose tests), complement factors C3 and C4 (measured by nephelometry using a Behring BNA nephelometer), and serum cryoglobulins.

Statistical Analysis

The χ^2 and Fisher's exact tests were applied to analyze qualitative differences. For comparison of quantitative parameters, the Student's *t*-test was used in large samples of similar variance and the nonparametric Mann-Whitney *U*-test was used for small samples. Values of quantitative variables are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical significance was established at $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using the SPSS program. As a control group, we selected an age-sex-matched subset of patients with primary SS without atypical autoantibodies.

Results

General Description

Eighty-two (20%) patients had atypical autoantibodies (Table 1): 36 had antiphospholipid antibodies (aPL) (19 positive IgG-aCL, 19 LA, and 6 IgM-aCL), 21 positive anti-DNA antibodies, 13 ANCA, 10 anti-RNP, 8 ACA, 6 anti-Sm, 2 anti-ScI70, and 1 anti-Jo-1 antibodies. In 15 patients, more than 1 of these autoantibodies were detected. There were 77 (94%) women and 5 (6%) men (female:male ratio, 15:1), with a mean age at protocol inclusion of 57.3 ± 1.77 years (range, 20 to 87). A retrospective application of the 2002 classification criteria was possible in 49 cases (in the remaining 33 salivary gland biopsy was not performed), 44 of whom (90%) fulfilled these criteria. Patients with atypical autoantibodies had no statistical differences in the prevalence of the main sicca features, extraglandular manifestations (except for a higher prevalence of Raynaud's phenomenon, 28% versus 7%, $P = 0.001$), immunological markers (ANA, RF, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, hypocomplementemia, and cryoglobulins), and in the retrospective fulfillment of the 2002 classification criteria, compared with the age-sex-matched control group.

After a follow-up of 534 patient-years (median time of follow-up, 6.7 years), 13 (16%) of the 82 patients with atypical autoantibodies developed an additional SAD (SLE in 5 cases, APS in 4, limited scleroderma in 3, and microscopic polyangiitis in 1) compared with none of the age-sex-matched control group ($P < 0.001$). The main atypical autoantibodies at diagnosis of primary SS in these 13 patients

included ANA in 100%, anti-Ro/SS-A in 39%, anti-La/SS-B in 39%, and RF in 30%. A retrospective application of the 2002 criteria showed that 7 patients fulfilled these criteria; in the remaining 6, the criteria were not applied due to the lack of a salivary gland biopsy. Analysis of the main clinical and analytical data at the onset of follow-up of these 13 patients found no predictive factors for development of additional SAD, except for a higher frequency of men (23% versus 3%, $P = 0.026$). In addition, no significant differences were found in the percentage of patients who retrospectively fulfilled the 2002 classification criteria according to the development or not of an additional SAD.

SS Patients with Anti-DNA Antibodies

We found anti-DNA antibodies (>20 UI/L) in 21 patients (5%). Twenty were female and 1 was male, with a mean age at protocol entry of 53.7 years (range 23 to 76 years). Fifteen patients (71%) had extraglandular features, including articular involvement ($n = 8$), adenopathy ($n = 6$), Raynaud's phenomenon ($n = 3$), peripheral neuropathy ($n = 3$), pulmonary involvement ($n = 2$), monoclonal gammopathy ($n = 2$), fever ($n = 1$), cutaneous vasculitis ($n = 1$), and renal involvement ($n = 1$). The main immunological features were ANA ($n = 21$), anti-Ro/SS-A ($n = 14$), anti-La/SS-B ($n = 10$), RF ($n = 10$), cryoglobulins ($n = 4$), and hypocomplementemia ($n = 2$). Ten patients had low titers of anti-DNA antibodies (20 to 40 UI/L), 5 had moderate titers (40 to 60 UI/L), and the remaining 4 had high titers (>80 UI/L).

After a mean follow-up of 6.7 years (ranging from 2 to 11 years), 5 (24%) patients fulfilled the classification criteria for SLE. In addition to immunological markers (ANA and anti-DNA, that were >40 UI/L in 4 of the 5 patients), features that led to the fulfillment of SLE included cytopenias in all cases, arthritis in 3, cutaneous features (photosensitivity, malar rash, or alopecia) in 2, and serositis in 1. Eight additional patients fulfilled 3 classification criteria for SLE (in addition to ANA and anti-DNA, 5 patients had cytopenias and 3 had arthritis).

SS Patients with Anti-Sm Antibodies

Six (1.5%) patients had anti-Sm antibodies. Five were female and 1 was male, with a mean age at protocol of 67.5 years (range 46 to 80 years). Five patients (75%) had extraglandular features, including Raynaud's phenomenon ($n = 2$), pulmonary involvement ($n = 2$), lymphoma ($n = 2$), articular involvement ($n = 1$), peripheral neuropathy ($n = 1$), renal involvement ($n = 1$), and monoclonal gammopathy ($n = 1$). The main immunological features were ANA ($n = 6$), anti-Ro/SS-A ($n = 5$), anti-La/SS-B ($n = 4$), and RF ($n = 3$). No patient had positive anti-DNA antibodies. After a mean follow-up of 8 years (ranging from 6 to 10 years), no patient fulfilled SLE criteria, although 5 fulfilled 3 criteria. In addition to positive immunology (ANA and anti-Sm antibodies), 1 patient had arthritis and 4 had cytopenias (leukopenia and thrombocytopenia).

SS Patients with Anti-RNP Antibodies

Ten (2.5%) patients with primary SS had anti-RNP antibodies. Nine were female and 1 was male, with a mean age at protocol of 58 years (range 38 to 78 years). Five patients (50%) had extraglandular features, including articular involvement ($n = 3$), Raynaud's phenomenon ($n = 2$), peripheral neuropathy ($n = 2$), cutaneous vasculitis ($n = 1$), pulmonary involvement ($n = 1$), monoclonal gammopathy ($n = 1$), and lymphoma ($n = 1$). The main immunological features were ANA ($n = 9$), RF ($n = 6$), anti-Ro/SS-A ($n = 5$), anti-La/SS-B ($n = 3$), hypocomplementemia ($n = 2$) and cryoglobulins ($n = 1$). According to the classification criteria for MCTD proposed by Alarcon-Segovia and coworkers (19), none of the SS-RNP patients could be classified as having MCTD, although 3 fulfilled 2 criteria (anti-RNP + synovitis in 2 patients, anti-RNP + Raynaud's phenomenon in the other) and 1 had 3 criteria (anti-RNP, synovitis, and Raynaud's phenomenon). After a mean follow-up of 7.8 years (ranging from 5 to 11 years, after inclusion in the protocol), none developed other features included in the MCTD criteria, such as hand edema, myositis, or acrosclerosis.

SS Patients with Anticentromere Antibodies

Eight (9%) of 92 patients had ACA. Seven were female and 1 was male, with a mean age at protocol entry of 64.4 years (range 53 to 77 years). All patients had extraglandular features, including Raynaud's phenomenon ($n = 6$), articular involvement ($n = 3$), pulmonary involvement ($n = 3$), and monoclonal gammopathy ($n = 1$). The main immunological features were ANA ($n = 8$), RF ($n = 3$), anti-Ro/SS-A ($n = 1$), anti-La/SS-B ($n = 1$), and hypocomplementemia ($n = 1$).

After a mean follow-up of 6 years (ranging from 2 to 11 years), 3 patients developed clinical features suggestive of a limited Sc. These patients had a common clinico-immunological pattern, with a previous history of Raynaud's phenomenon, no clinical data suggestive of Sc at the time of protocol inclusion, high titers of ANA ($>1/320$) with negative Ro/La antibodies, and the development of incipient cutaneous signs of sclerodactyly.

SS Patients with Anti-Scl 70 Antibodies

Two women, aged 49 and 60 years at protocol entry, had positive anti-Scl70 antibodies from 92 patients tested (2%). One patient had arthritis, Raynaud's phenomenon, and peripheral neuropathy, while the other only had sicca features without extraglandular manifestations. The first patient had additional atypical autoantibodies, with a triple association of anti-Sm, anti-RNP, and anti-Scl 70 antibodies. After a mean follow-up of 10 years, neither patient developed clinical features suggestive of SSc.

SS Patients with Antiphospholipid Antibodies

Thirty-six of 281 patients (13%) had aPL: aCL were found in 24 patients—IgG in 19 (8 had low positive levels, 6 had moderate positive levels, and 5 had high positive levels), and IgM in 6 (4 had low positive levels and 2 had high positive

levels)—and LA in 19 patients. Thirty-five were female and 1 was male, with a mean age at protocol of 55.2 years (range 20 to 80 years). Twenty-five patients (69%) had extraglandular features, including articular involvement ($n = 18$), Raynaud's phenomenon ($n = 8$), cutaneous vasculitis ($n = 4$), fever ($n = 2$), pulmonary involvement ($n = 1$), renal involvement ($n = 1$), and peripheral neuropathy ($n = 1$). The main immunological features were ANA ($n = 32$), anti-Ro/SS-A ($n = 11$), RF ($n = 9$), anti-La/SS-B ($n = 8$), hypocomplementemia ($n = 5$), and cryoglobulins ($n = 3$).

Four (11%) of the 35 SS-aPL patients fulfilled the current classification criteria for APS. Two additional patients had probable APS, with thrombosis but with only 1 positive aPL determination of 4 serial measurements. Seven patients had APS-related features not included in the current classification criteria, consisting of thrombocytopenia in 3 (8%) cases and a history of 1 or 2 spontaneous abortions in 4 (11%). The remaining 23 (64%) patients had no clinical or hematological features suggestive of APS.

SS Patients with ANCA

Thirteen (6%) of 201 patients had a positive ANCA: 12 had a pANCA fluorescence pattern and the remaining 1 had an atypical pattern. Antigen specificity determined by ELISA showed that 5 patients had antibodies against myeloperoxidase (MPO). No patient had antibodies against proteinase 3 (PR3). All were female, with a mean age at protocol of 62 years (range, 40 to 87 years). Nine (69%) patients had extraglandular features, including Raynaud's phenomenon ($n = 8$), pulmonary involvement ($n = 7$), articular involvement ($n = 7$), peripheral neuropathy ($n = 4$), cutaneous vasculitis ($n = 3$), and renal involvement ($n = 1$). The main immunological features were ANA ($n = 12$), anti-Ro/SS-A ($n = 6$), RF ($n = 5$), anti-La/SS-B ($n = 4$), and hypocomplementemia ($n = 3$).

After a mean follow-up of 7.7 years (ranging from 4 to 11 years), only 1 patient fulfilled the classification criteria for a systemic vasculitis. This 73-year-old woman was diagnosed with microscopic polyangiitis after developing fever, arthritis, livedo reticularis, polyneuropathy, and papulonecrotic cutaneous lesions. Histological analysis of the skin and muscle disclosed necrotizing vasculitis of medium-size arteries. She was treated with prednisone and intravenous cyclophosphamide and improved clinically.

Discussion

The diagnosis of SAD is a clinical challenge based on the application of internationally agreed sets of classification criteria that often combine diverse organ-specific manifestations with findings of circulating autoantibodies. In primary SS, the clinical significance of autoantibodies considered typical of other SAD is controversial. We have identified 224 previously reported cases with atypical autoantibodies (Table 2) (8,10,11,22-49). We describe a further 82 patients with primary SS having SLE-, APS-, SSc-, MCTD-, and vasculitis-related antibodies. Analysis of these 306 cases leads us to

suggest that the clinical significance of this immunological overlap varies widely, with some autoantibodies being related to clinical and serologic data suggestive of another SAD, while others have less clinical relevance.

Clinical Significance of SLE-Related Immunological Markers

Only 2 reports have analyzed the clinical significance of anti-DNA antibodies in patients with primary SS. Satoh and coworkers (11) described an elderly woman with primary SS who had anti-Sm and anti-DNA antibodies prior to the development of SLE, while Zufferey and coworkers (10) described SLE development in 2 of 4 primary SS patients in whom anti-DNA antibodies were detected 2 and 11 years after the diagnosis of primary SS. The main SLE classification criteria found in the 26 reported primary SS patients with anti-DNA autoantibodies (21 from our series and the 5 aforementioned cases) were ANA in all cases, leukopenia in 14 (54%), and articular involvement in 9 (35%), while other criteria such as SLE-specific cutaneous features, and renal and CNS involvement were infrequent. After a median follow-up of nearly 6 years (ranging between 2 and 11 years), 8 of the 26 (31%) SS-DNA patients fulfilled 4 or more of the classification criteria for SLE and 10 (38%) fulfilled 3 criteria (SLE-like). Thus, there seems to be a fine line separating primary SS and SS-SLE in patients older than 50 years (50,51), since the main SLE-related features found in SS-SLE patients (ANA, articular involvement, and cytopenias) are also frequently found in primary SS (4,5,52-54) (Table 3). However, since some SS-DNA patients develop SLE on follow-up, we suggest testing for anti-DNA antibodies in the follow-up of patients with primary SS, especially in those with articular involvement or leukopenia.

Anti-Sm antibodies are rarely found in patients with primary SS, with only 9 cases (6 from our series) being reported. After a mean follow-up of nearly 5 years, the previously reported 3 SS-Sm patients developed SLE, while 5 of our 6 SS-Sm patients had a SLE-like disease with the fulfillment of 3 criteria (4 had cytopenia and 1 arthritis in addition to the 2 immunological criteria, ANA, and anti-Sm). All 9 SS-Sm patients had negative anti-DNA antibodies.

Clinical Significance of APS-Related Immunological Markers

aPL are the most frequently detected atypical autoantibodies in primary SS, with a total of 134 patients reported as having aPL, including the 36 cases described in our study (Table 2). Despite this frequent detection, its association with APS-related manifestations is infrequent. Only 13 (10%) SS-aPL patients had thrombotic events, 12 (9%) thrombocytopenia, 8 (6%) fetal losses, 2 (1.5%) livedo reticularis, and 1 (1%) hemolytic anemia. According to the 1999 classification criteria (20), only 12 (9%) of the 134 SS-aPL patients had an associated APS. Although most authors suggest that aPL should be considered as nonspecific immunological markers in patients with primary SS, analysis of the clinical and immunological features of these 134 patients shows greater

Table 2 Clinical Features and Evolution to an Additional SAD in 306 Patients with Primary SS and Atypical Autoantibodies

Author (reference)	Patients (n)	Atypical Antibodies	Features Suggestive for Additional SAD	Evolution to Additional SAD
Zufferey (10)	4	DNA	Leuk (3), renal (2), cutaneous (1), CNS (2), artic (2), ANA (4)	SLE (2)
Satoh (11)	1	DNA, Sm	Leuk, cutaneous, ulcers, artic, ANA, renal	SLE (1)
Zufferey (10)	2	Sm	Leuk (1), cutaneous (2), CNS (1), artic (1), serositis (2), ANA (2)	SLE (2)
Present series	6	Sm	Leuk (3), thrombocytopenia (1), artic (1), ANA (6)	—
Present series	21	DNA	Leuk (10), ANA (21), cutaneous (2), artic (6), serositis (1)	SLE (5)
Total	34	DNA (26) Sm (9)	ANA (34), Leuk (17), artic (11), cutaneous (6), renal (3), CNS (3), ulcers (1), serositis (1)	SLE (10)
Manoussakis (22)	3	aPL	—	—
Ingram (23)	2	aPL	Thrombotic events (2), livedo (2), thrombocytopenia (2), skin necr (1), CNS (1)	APS (2)
Arroyo (24)	14	aPL	—	—
Pennec (25)	24	aPL	Thrombotic events (1)	APS (1)
Asherson (26)	13	aPL	—	—
Jedryka-Goral (27)	5	aPL	Thrombotic events (1)	APS (1)
Biyajima (28)	1	aPL	Fetal losses, thrombotic events, thrombocytopenia	APS (1)
Merkel (29)	3	aPL	—	—
Katayama (30)	1	aPL	Thrombocytopenia (1)	—
Fauchais (8)	28	aPL	Thrombotic events (2), fetal loss (1)	APS (3)
Manoussakis (31)	4	aPL	—	—
Present series	36	aPL	Thrombotic events (6), thrombocytopenia (8), AHA1 (1), fetal losses (6)	APS (4)
Total	134	aPL	Thrombotic events (13), thrombocytopenia (12), fetal losses (8), livedo (2), AHA1 (1)	APS (12)
Tsuzaka (32)	11	RNP	Raynaud (8), puffy hands (4), myopathy (2)	—
Ohtsuka (33)	9	RNP	Raynaud (7), puffy hands (4)	—
Manoussakis (31)	1	RNP	—	—
Present series	10	RNP	Raynaud (2), synovitis (3)	—
Total	31	RNP	Raynaud (17), puffy hands (8), synovitis (3), myopathy (2)	—
Schmidt (34)	2	Jo-1	—	—
Present series	1	Jo-1	—	—
Total	3	Jo-1	—	—
Gross (35)	8	pANCA	NS	—
Fukase (36)	9	pANCA	NS	—
Kitahara (37)	1	pANCA	RPGN, Raynaud, lung, peripheral neuropathy	—
Hernández (38)	1	pANCA	RPGN	—
Merkel (39)	13	pANCA (3) aANCA (10)	NS	—
Nishiya (40)	10	pANCA	NS	—
Kamachi (41)	1	pANCA	RPGN	—
Tatsumi (42)	1	pANCA	RPGN	—
Akposso (43)	1	pANCA	RPGN, cutaneous vasculitis, artic	—
Young (44)	1	cANCA	Lung cavitation, artic	Wegener's granulomatosis
Present series	13	pANCA (12) aANCA (1)	Raynaud (7), lung (7), artic (6), peripheral neuropathy (4), cutaneous vasculitis (3), RPGN (1)	PAM
Total	59	pANCA (47) aANCA (11) cANCA (1)	Lung (9), Raynaud (8), artic (8), RPGN (6), peripheral neuropathy (5), cutaneous vasculitis (4)	Systemic vasculitis (2)

Table 2 Continued

Author (reference)	Patients (n)	Atypical Antibodies	Features Suggestive for Additional SAD	Evolution to Additional SAD
Tubach (97)	4	ACA	—	NS
Tektonidou (99)	10	ACA	Raynaud (10), puffy hands (6), telangiectasia (6)	—
Caramaschi (97)	10	ACA	NS	Limited SSc (4)
Chan (94)	4	ACA	Raynaud (1)	NS
Katano (01)	12	ACA	Raynaud (6)	NS
Present series	8	ACA	Raynaud (6), lung (3), telangiectasia (3)	Limited SSc (3)
Total	48	ACA	Raynaud (23), telangiectasia (9), puffy hands (6), lung (3)	Limited SSc (7)
Present series	2	Scl 70	—	—
Total	2	Scl 70	—	—

Abbreviations: Leuk, leukopenia; CNS, central nervous system; artic, articular; thrombocytopenia, thrombocytopenia; AHAI, autoimmune hemolytic anemia; SLE, systemic lupus erythematosus; APS, antiphospholipid syndrome; RPGN, rapid progressive glomerulonephritis; PAM, microscopic polyangiitis; SSc, systemic sclerosis.

clinical relevance than previously supposed. First, these patients had a different aPL profile in comparison to patients with APS, with an infrequent detection of IgM-aCL (22,26,27). Second, in one-quarter of these SS-aPL patients a heterogeneous spectrum of APS-related manifestations was observed. Although only 3% of patients with primary SS have an associated APS, aPL are detected in nearly 25%. In contrast, in SLE patients, aPL are detected in 43% (55), while 15% fulfill APS classification criteria (55,56). The coexistence of primary SS and APS should be considered an infrequent (but not exceptional) event that occurs in 1 of each 10 SS patients with a positive aPL.

Clinical Significance of SSc-Related Immunological Markers

In this study, we described 2 patients with primary SS and anti-Scl 70 antibodies. No previous studies have analyzed the

prevalence and clinical significance of these autoantibodies in patients with primary SS, with only 2 isolated cases being reported in patients with coexisting SS and SLE (57). None of these 4 patients had clinical features suggestive of SSc, suggesting that these autoantibodies have little significance in primary SS.

In contrast, ACA have a higher prevalence and greater clinical significance in patients with primary SS, with a total of 48 cases (including our 8 patients) being reported. Joint analysis of these 48 patients suggests a specific pattern of clinical expression and evolution. Clinically, analysis of the 38 well-described SS-ACA patients showed Raynaud's phenomenon and telangiectasia as the predominant features, which were observed in 61% of patients. In the follow-up, development of a limited scleroderma was described in 7 (25%) of 28 patients, characterized by the appearance of the incipient cutaneous changes of sclerodactyly. Thus, we recommend routinely testing for ACA in patients with primary SS and Raynaud's phenomenon, especially in cases with high titers of ANA and negative anti-Ro/La antibodies, since one-quarter of these patients may develop a coexisting limited scleroderma. SS-ACA patients may represent a specific clinical subset that may initially be classified as having primary SS, but with a higher probability of developing limited scleroderma in the follow-up.

Table 3 Prevalence of the Clinical, Serological, and Immunological Features Included in the Current SLE Classification Criteria (16) in Patients with Primary SS

	Prevalence	References
Malar rash	NE	—
Discoid lupus	NE	—
Photosensitivity	Isolated cases	52
Oral ulcers	Isolated cases	52
Articular	23–37%	4,5,53
Renal	6–9%	4,5,53
CNS involvement	0–1%	4,5,53
Serositis	1–2%	4,5,53
Hemolytic anemia	1–3%	4,5,53
Thrombocytopenia	13%	4,5
Leukopenia	12–16%	4,5,53
Lymphopenia	9%	4,5
Anti-DNA	4–5%	4,5,53
Anti-Sm	1.5%	4,5,53
aPL	13%	4,5
ANA	74–89%	4,5,53,54

Abbreviation: NE, not evaluated.

Clinical Significance of MCTD-Related Immunological Markers

Only 2 studies have specifically analyzed the presence of anti-RNP antibodies in patients with primary SS, finding an overall prevalence of 17% (32,33). Analysis of the clinical characteristics of the 30 well-described patients reported with primary SS and anti-RNP antibodies (including our 10 patients) shows a specific pattern of disease expression, defined by a higher frequency of Raynaud's phenomenon (57% of patients), puffy hands in 27% of cases, and myositis in 10%. However, no patient fulfilled the classification criteria for MCTD. Since the introduction of the European criteria in

Table 4 Prevalence, Clinical Significance, Overlap with Other SAD and Testing Indications for Atypical Autoantibodies in Patients with Primary SS

Atypical Antibodies	Prevalence Range (%)	Clinical Significance	Overlap with Additional SAD	Specific Immunological Pattern	Testing Indications in Primary SS
aPL	20–25	+	APS (9%)	Infrequent IgM-aCL detection	Thrombotic events
ANCA	10–15	+	Systemic vasculitis (3%)	ANA (100%) Positive Ro/La	Cytopenia RPGN Suspected systemic vasculitis
ACA	5–10	++	Limited scleroderma (25%)	High titers ANA Negative Ro/La	Raynaud
Anti-DNA	5	++	SLE (30%)	ANA (100%)	Arthritis Cytopenia
Anti-RNP	5	—	—	—	—
Anti-Scl 70	<2	—	—	—	—
Anti-Sm	<2	—	—	ANA (100%)	—

Abbreviations: aPL, antiphospholipid antibodies; ACA, anticentromere antibodies; ANA, antinuclear antibodies; RF, rheumatoid factor; SAD, systemic autoimmune diseases; APS, antiphospholipid syndrome; SLE, systemic lupus erythematosus; SSc, systemic sclerosis; RPGN, rapid progressive glomerulonephritis.

1993, the coexistence of primary SS and MCTD has been very rarely described, with only 3 patients being reported (58–60). Our findings suggest that less than 5% of patients with primary SS have anti-RNP antibodies, associated in some cases with clinical features included in the classification criteria of MCTD (Raynaud's phenomenon, hand edema, and/or arthritis).

Systemic Vasculitis-Related Antibodies

Including our 13 cases, a total of 59 patients with primary SS and positive ANCA have been reported (Table 2). The clinical characteristics of SS-ANCA patients are detailed in 19 of 59 cases and include a high prevalence of extraglandular features, such as Raynaud's phenomenon and pulmonary involvement in nearly 50% of cases, and necrotizing crescentic glomerulonephritis, peripheral neuropathy, or cutaneous vasculitis in 20 to 30% of patients. SS-ANCA patients had a prominent immunological expression, with high positive titers of ANA, and positive anti-Ro, anti-La, and/or RF in 71% of cases. In contrast, the association of coexisting systemic vasculitis was exceptional. One of our patients developed an associated microscopic polyangiitis (PAM); only 2 similar cases have been previously reported (44,61). The clinical significance of ANCA in patients with primary SS may be summarized by an overwhelming prevalence of the pANCA pattern (with positive MPO in less than 20% of cases), a high frequency of extraglandular and immunological features, and a rare association with associated ANCA-related vasculitis.

Our results suggest that testing for atypical autoantibodies may be helpful in diagnosing a possible overlap between primary SS and other SAD. Although all of our patients with atypical autoantibodies were initially classified as having primary SS (most of them also fulfilling the more restrictive 2002 classification criteria), 20% fulfilled classification criteria for additional SAD during the follow-up. This suggests that only the evolution of the disease in these patients, with the development of new clinical or immunological features

typical of other SAD, is critical in differentiating between primary SS and SS associated with other SAD, and that SS patients with atypical antibodies require a closer follow-up. However, the risk of developing an additional SAD differed according to the atypical autoantibody present at the diagnosis of "primary" SS. Patients having anti-DNA or ACA had a higher risk of developing an additional SAD and require a closer follow-up to detect clinical and/or laboratory data suggestive of coexisting SLE or SSc. Evolution to another SAD was infrequent in patients with aPL and ANCA (despite their higher prevalence) and was exceptional in the case of anti-RNP, anti-Sm, anti-Scl 70, and anti-Jo1. Our results suggest that atypical autoantibodies should be tested only in patients with primary SS presenting a specific clinico-immunological profile (Table 4), or when specific clinical and/or serologic features suggestive of an overlapping SAD appear during follow-up.

In summary, this study shows an immunological overlap (defined by the presence of autoantibodies considered typical of other SAD) in 20% of patients with primary SS. However, the clinical significance of these atypical autoantibodies in the setting of primary SS varies widely depending on the autoantibodies detected, with a broad spectrum of prevalence, clinical patterns of disease expression, and evolution to coexisting SAD (Tables 4 and 5). The prevalence of these autoantibodies does not correlate with their clinical significance. Thus, aPL and ANCA are the most frequent atypical autoantibodies found in primary SS, with a prevalence ranging between 10 and 25%, but within this subset a coexisting APS or systemic vasculitis is only detected in around 10% of cases. In contrast, anti-DNA and ACA have a prevalence of only 5 to 10% but are more closely related to clinical and/or analytical data suggestive of associated SLE and limited scleroderma, respectively, leading to the fulfillment of classification criteria for these diseases in more than 25% of cases. Finally, anti-Sm, anti-RNP, anti-Scl 70, and anti-Jo1 have a prevalence of lower than 5% and are rarely associated with

Table 5 Prevalence of Atypical Autoantibodies in Patients with Primary SS

Atypical Antibodies	Patients (positive/tested)	Prevalence (%)	References
Antiphospholipid antibodies	120/589	20	26,27,25,24,22,8, present study
ANCA	43/357	12	40,35,36,39, present study
ACA	8/92	9	Present study
Anti-DNA	34/718	5	10,53, present study
Anti-RNP	34/782	4	32,33,53, present study
Anti-Scl 70	2/92	2	Present study
Anti-Sm	8/457	2	10, present study

the development of other SAD, suggesting that their clinical significance in patients with primary SS is low.

References

- Daniels TE, Fox PC. Salivary and oral components of Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:571-89.
- Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Font J. Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis* 2005;64:347-54.
- Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjogren syndrome. *Arch Intern Med* 2004;164:1275-84.
- 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;81:270-80.
- Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, Brito MP, Rosas J, Calvo-Alen J, et al. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:281-92.
- Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1993;36:340-7.
- 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;61:554-8.
- Fauchais AL, Lambert M, Launay D, Michon-Pasturel U, Queyrel V, Nguyen N, et al. Antiphospholipid antibodies in primary Sjogren's syndrome: prevalence and clinical significance in a series of 74 patients. *Lupus* 2004;13:245-8.
- Cervera R, Garcia-Carrasco M, Font J, Ramos M, Reverter JC, Munoz FJ, et al. Antiphospholipid antibodies in primary Sjogren's syndrome: prevalence and clinical significance in a series of 80 patients. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15:361-5.
- Zufferey P, Meyer OC, Bourgeois P, Vayssairat M, Kahn MF. Primary Sjogren syndrome preceding systemic lupus erythematosus: a retrospective study of 4 cases in a cohort of 55 SS patients. *Lupus* 1995;4:23-7.
- Satoh M, Yamagata H, Watanabe F, Nakayama S, Ogasawara T, Tojo T, et al. Development of anti-Sm and anti-DNA antibodies followed by clinical manifestation of systemic lupus erythematosus in an elderly woman with long-standing Sjogren's syndrome. *Lupus* 1995;4:63-5.
- Font J, Cervera R, Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Sentis J, Herrero C, et al. Clusters of clinical and immunologic features in systemic lupus erythematosus: analysis of 600 patients from a single center. *Semin Arthritis Rheum* 2004;33:217-30.
- Font J, Ramos-Casals M, Cervera R, Bosch X, Mirapeix E, Garcia-Carrasco M, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary Sjogren's syndrome: prevalence and clinical significance. *Br J Rheumatol* 1998;37:1287-91.
- Ghavarri AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987;46:1-6.
- Brandt JT, Barna LK, Triplett DA. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of The Second International Workshop for identification of lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995;74:1597-603.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
- Anonymous. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association diagnostic and therapeutic criteria committee. *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90.
- Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 1975;292:344-7.
- Alarcon-Segovia D, Villareal M. Classification and diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. In: Kasukawa R, Sharp GC, eds. *Mixed connective tissue disease and anti-nuclear antibodies*. Amsterdam, Elsevier Science, 1987:33-40.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.
- Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994;37:187-92.
- Manoussakis MN, Gharavi AE, Drosos AA, Kitridou RC, Moutsopoulos HM. Anticardiolipin antibodies in unselected autoimmune rheumatic disease patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;44:297-307.
- Ingram SB, Goodnight Jr, SH Bennett RM. An unusual syndrome of a devastating noninflammatory vasculopathy associated with anticardiolipin antibodies: report of two cases. *Arthritis Rheum* 1987;30:1167-72.
- Arroyo RA, Ridley J, Brey RL, Houk R, Higgs J, Boswell N. Anticardiolipin antibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1989;32(Suppl):Abstract B141.
- Pennec YL, Magadur G, Jouquan J, Youinou P. Serial measurements of anticardiolipin antibodies in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1991;9:165-7.
- Asherson RA, Fei HM, Staub HL, Khamashta MA, Hughes GR, Fox RI. Antiphospholipid antibodies and HLA associations in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1992;51:495-8.
- Jedryka-Goral A, Jagiello P, D'Cruz DP, Malydykova H, Khamashta MA, Hughes GR, et al. Isotype profile and clinical relevance of anticardiolipin antibodies in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1992;51:889-91.
- Biyajima S, Osada T, Daidoji H, Hisaoka T, Sakakibara Y, Tajima J, et al. Pulmonary hypertension and antiphospholipid antibody in a patient with Sjogren's syndrome. *Intern Med* 1994;33:768-72.
- Merkel PA, Chang Y, Pierangeli SS, Convery K, Harris EN, Polissos RP. The prevalence and clinical associations of anticardiolipin antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue diseases. *Am J Med* 1996;101:576-83.
- Katayama Y, Kohriyama K, Kirizuka K, Nishizaki H, Fujii H, Tanji Y. Sjogren's syndrome complicated with autoimmune hepatitis and antiphospholipid antibody syndrome. *Intern Med* 2000;39:73-6.
- Manoussakis MN, Georgopoulou C, Zintzaras E, Spyropoulou M, Stavropoulou A, Skopouli FN, et al. Sjogren's syndrome associated with

- systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2004;50:882-91.
32. Tsuzaka K, Ogasawara T, Tojo T, Fujii H, Tsukatani Y, Kubo A, et al. Relationship between autoantibodies and clinical parameters in Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1993;22:1-9.
 33. Ohtsuka E, Nonaka S, Shingu M, Yasuda M, Nobunaga M. Sjogren's syndrome and mixed connective tissue disease. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10:339-44.
 34. Schmidt WA, Wetzel W, Friedlander R, Lange R, Sorensen HF, Lichey HJ, et al. Clinical and serological aspects of patients with anti-Jo-1 antibodies: an evolving spectrum of disease manifestations. *Clin Rheumatol* 2000;19:371-7.
 35. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated diseases: a rheumatologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 1991;18:175-9.
 36. Fukase S, Ohta N, Inamura K, Kimura Y, Aoyagi M, Koike Y. Diagnostic specificity of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in otorhinolaryngological diseases. *Acta Otolaryngol Suppl* 1994;511:204-7.
 37. Hiromura K, Kitahara T, Kuroiwa T, Hayashi J, Tsukada Y, Kanai H, et al. [Clinical analysis of 14 patients with anti-myeloperoxidase antibody positive rapid progressive glomerulonephritic syndrome]. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1995;37:573-9.
 38. Hernandez JL, Rodrigo E, De Francisco AL, Val F, Gonzalez-Macias J, Riancho JA. ANCA-associated pauci-immune crescentic glomerulonephritis complicating Sjogren's syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:2313-5.
 39. Merkel PA, Polisson RP, Chang Y, Skates SJ, Niles JL. Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue disease. *Ann Intern Med* 1997;126:866-73.
 40. Nishiya K, Chikazawa H, Hashimoto K, Miyawaki S. Antineutrophil cytoplasmic antibody in patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1999;18:268-71.
 41. Kamachi M, Migita K, Tominaga M, Ichinose Y, Nakamura H, Origuchi T, et al. Sjogren's syndrome complicated by MPO-ANCA positive crescentic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1033-4.
 42. Tatsumi H, Tateno S, Hiki Y, Kobayashi Y. Crescentic glomerulonephritis and primary Sjogren's syndrome. *Nephron* 2000;86:505-6.
 43. Akposso K, Martinant de Preneuf H, Larousserie F, Sraer JD, Rondeau E. [Rapidly progressive acute renal failure. A rare complication of primary Sjogren syndrome]. *Presse Med* 2000;29:1647-9.
 44. Young C, Hunt S, Watkinson A, Beynon H. Sjogren's syndrome, cavitating lung disease and high sustained levels of antibodies to serine proteinase 3. *Scand J Rheumatol* 2000;29:267-9.
 45. Tubach F, Hayem G, Elias A, Nicaise P, Haim T, Kahn MF, et al. Anticentromere antibodies in rheumatologic practice are not consistently associated with scleroderma. *Rev Rhum Engl Ed* 1997;64:362-7.
 46. Tektonidou M, Kaskani E, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Microvascular abnormalities in Sjogren's syndrome: nailfold capillaroscopy. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:826-30.
 47. Caramaschi P, Biasi D, Carletto A, Manzo T, Randon M, Zeminian S, et al. Sjogren's syndrome with anticentromere antibodies. *Rev Rhum (Engl Ed)* 1997;64:785-8.
 48. Chan HL, Lee YS, Hong HS, Kuo TT. Anticentromere antibodies (ACA): clinical distribution and disease specificity. *Clin Exp Dermatol* 1994;19:298-302.
 49. Katano K, Kawano M, Koni I, Sugai S, Muro Y. Clinical and laboratory features of anticentromere antibody positive primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 2001;28:2238-44.
 50. Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: historical perspective and ongoing concerns. *Arthritis Rheum* 2004;50:681-3.
 51. Bell DA. SLE in the elderly—is it really SLE or systemic Sjogren's syndrome? *J Rheumatol* 1988;15:723-4.
 52. Ramos-Casals M, Anaya JM, Garcia-Carrasco M, Rosas J, Bove A, Claver G, et al. Cutaneous vasculitis in primary Sjogren syndrome: classification and clinical significance of 52 patients. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:96-106.
 53. Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000;29:296-304.
 54. Theander E, Manthorpe R, Jacobsson LT. Mortality and causes of death in primary Sjogren's syndrome: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004;50:1262-9.
 55. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Ugalde J, Aguirre C. High impact of antiphospholipid syndrome on irreversible organ damage and survival of patients with systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* 2004;164:77-82.
 56. Perez-Vazquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J, Alarcon-Segovia D. Influence of disease duration, continued follow-up and further antiphospholipid testing on the frequency and classification category of antiphospholipid syndrome in a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1993;20:437-42.
 57. Al Attia HM, D'Souza MS. Antitopoisomerase I antibody in patients with systemic lupus erythematosus/sicca syndrome without a concomitant scleroderma: two case reports. *Clin Rheumatol* 2003;22:70-2.
 58. Kmiecik L, Corguille M, Rocher P, Eugene C, Lemaire E, Tennenbaum R, et al. [Autoimmune hepatitis, acute pancreatitis, mixed connective tissue disease and Sjogren's syndrome. A case report.] *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27:840-1.
 59. Brandt J, Maier T, Rudwaleit M, Kuhl U, Hiepe F, Sieper J, et al. Co-occurrence of spondyloarthritis and connective tissue disease: development of Sjogren's syndrome and mixed connective tissue disease (MCTD) in a patient with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:80-4.
 60. Min JK, Han NI, Kim JA, Lee YS, Cho CS, Kim HY. A case of cholestatic autoimmune hepatitis and acute liver failure: an unusual hepatic manifestation of mixed connective tissue disease and Sjogren's syndrome. *J Korean Med Sci* 2001;16:512-5.
 61. Radaelli F, Meucci G, Spinzi G, Terruzzi V, Imperiali G, Lenoci N, et al. Acute self-limiting jejunitis as the first manifestation of microscopic polyangiitis associated with Sjogren's disease: report of one case and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:931-4.

Atypical autoantibodies in patients with primary Sjögren Syndrome: Clinical characteristics and follow-up of 82 cases

OBJETIVOS

1. Analizar las características clínicas de los pacientes con SSp y presencia en suero de autoanticuerpos atípicos.
2. Describir los hallazgos durante el seguimiento de estos pacientes a lo largo de la evolución de su enfermedad, detectando la aparición de signos y/o síntomas vinculables a otra enfermedad autoinmune.
3. Determinar el cumplimiento de criterios de clasificación en los pacientes con SSp de otra enfermedad autoinmune sistémica y su relación con la presencia de determinados autoanticuerpos atípicos.

PRINCIPALES RESULTADOS

- Detectamos que el 20% de nuestros pacientes con SSp presentan autoanticuerpos atípicos y que no muestran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la prevalencia de las manifestaciones glandulares o extraglandulares (excepto por una mayor prevalencia de fenómeno de Raynaud)
- Del total de nuestros pacientes con autoanticuerpos atípicos, el 16% desarrollaron una enfermedad autoinmune sistémica adicional, comparado con ningún caso en el grupo control. Además pudimos observar que el significado clínico de estos autoanticuerpos varía ampliamente dependiendo del autoanticuerpo detectado y que existe una predilección específica para la asociación con alguna EAS.

CONCLUSIONES

Del análisis realizado se concluye que el significado clínico de esta superposición inmunológica varía ampliamente, de forma que algunos autoanticuerpos se relacionan con ciertos datos clínicos y serológicos sugestivos de otra enfermedad autoinmune sistémica, mientras que otros poseen menor relevancia clínica.

Asimismo, este estudio mostró que la presencia de estos autoanticuerpos atípicos no se correlaciona con su apariencia clínica, dado que los autoanticuerpos aPL y los ANCA fueron los más frecuentemente hallados en el SSp, pero la coexistencia de EAS relacionada con ellos se situó en un rango bajo de prevalencia, mientras que con otros autoanticuerpos como anti-DNA y ACA que tuvieron una baja prevalencia, se relacionaron con datos clínicos y serológicos que llevaban al cumplimiento de los criterios clasificatorios para las EAS relacionadas.

ARTÍCULO III

Characterization and Differentiation of Autoimmune versus Viral Liver Involvement in Patients with Sjögren's Syndrome

MANUEL RAMOS-CASALS, JOSE-MARÍA SÁNCHEZ-TAPIAS, ALBERT PARÉS, XAVIER FORNS, PILAR BRITO-ZERÓN, NORMA NARDI, PILAR VAZQUEZ, DESIRÉE VÉLEZ, ISABEL ARIAS, ALBERT BOVÉ, JOAN PLAZA, JUAN RODÉS, and JOSEP FONT

ABSTRACT. Objective. To analyze the prevalence and clinical significance of liver involvement in patients with Sjögren's syndrome (SS), focusing on the characterization and differentiation of autoimmune versus chronic viral liver disease.

Methods. We investigated liver involvement (clinical signs, analytical data, chronic viral infections, and autoantibodies) in 475 consecutive patients with SS. All patients fulfilled 4 or more of the 1993 European Community Study Group criteria for SS.

Results. Liver involvement was detected in 129 (27%) patients. After ruling out chronic illnesses or use of hepatotoxic drugs, the main etiologies were chronic viral liver disease in 64 (13%) cases [chronic hepatitis C virus (HCV) infection in 63 and HBV infection in one] and autoimmune liver diseases in 24 (5%); primary biliary cirrhosis in 16 patients and type-1 autoimmune hepatitis in 8). The analytical liver profile was not useful in differentiating between viral and autoimmune liver disease. In contrast, patients with SS and autoimmune liver disease presented higher mean values of erythrocyte sedimentation rate ($p = 0.044$), circulating gammaglobulins ($p = 0.007$), and a higher prevalence of antinuclear antibodies ($p < 0.001$), antimitochondrial antibodies ($p < 0.001$), anti-smooth muscle antibodies ($p = 0.026$), anti-Ro/SSA ($p < 0.001$), and anti-La/SSB ($p = 0.01$), while patients with chronic viral liver disease had a higher frequency of cryoglobulinemia ($p < 0.001$) and hypocomplementemia ($p < 0.001$).

Conclusion. Chronic viral liver disease (associated overwhelmingly with HCV) was the main cause of liver involvement in our patients with SS, with a prevalence of 13%, nearly 3-fold greater than that observed for autoimmune liver involvement. The immunological pattern played a key role in the differentiation of viral (predominance of cryoglobulins and low complement levels) and autoimmune (higher frequency of autoantibodies) liver involvement. (J Rheumatol 2006;33:1593–9)

Key Indexing Terms:

LIVER DISEASES
AUTOIMMUNE HEPATITIS

SJÖGREN'S SYNDROME

PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS
HEPATITIS C VIRUS

Sjögren's syndrome (SS) is a systemic autoimmune disease that mainly affects the exocrine glands and usually presents as persistent dryness of the mouth and eyes due to functional impairment of the salivary and lacrimal glands¹. The histological hallmark is a focal lymphocytic infiltration of the exocrine glands, and the spectrum of the disease extends from an organ-specific autoimmune disease (autoimmune exocrinopathy)² to a systemic process with diverse extraglan-

dular manifestations³. A possible association between SS and liver disease began to emerge during the 1960s. In 1965 Bloch, *et al*⁴ found a prevalence of liver involvement (hepatomegaly and/or raised alkaline phosphatase) of 27% in the first well-described series of patients with SS. In 1970 Golding, *et al*⁵ reported a higher frequency of sicca syndrome in patients with diverse liver diseases including chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis (PBC), or cryptogenic cirrhosis. Further studies confirmed a close association between PBC and SS^{6,7}, although reports of other autoimmune liver diseases, such as autoimmune hepatitis or sclerosing cholangitis, are scarce.

Chronic viral liver diseases have recently emerged as an additional cause of liver involvement in patients with SS (especially in some geographical areas), broadening the spectrum of hepatopathies that may affect these patients⁸. Few studies have analyzed the complete spectrum of liver disease in large series of patients with primary SS^{9,10}, and none have analyzed the manner of differentiating the 2 main causes of liver disease, namely autoimmune or viral. We analyzed the

From the Departments of Autoimmune Diseases and Hepatology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Supported by Grant FIS 04/0701.

M. Ramos-Casals, MD, PhD; P. Brito-Zerón, MD; N. Nardi, MD; P. Vazquez, MD; D. Vélez, MD; I. Arias, MD; A. Bové, MD, PhD; J. Plaza, MD; J. Font, MD, PhD, Department of Autoimmune Diseases; J.-M. Sánchez-Tapias, MD, PhD; A. Parés, MD, PhD; X. Forns, MD, PhD; J. Rodés, MD, PhD, Department of Hepatology.

Address reprint requests to Dr. J. Font, Servei de Malalties Autoimmunes Sistèmiques, Hospital Clínic, C/Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: jfont@clinic.ub.es

Accepted for publication March 2, 2006.

prevalence and clinical significance of liver involvement in patients with SS, focusing on the characterization and differentiation of autoimmune versus chronic viral liver disease.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Between 1994 and 2004, we investigated the clinical and immunological characteristics of 475 patients with SS (434 women and 41 men, with a mean age of 59.7 years) seen consecutively in our department. All patients fulfilled 4 or more of the preliminary diagnostic criteria for SS proposed by the European Community Study Group in 1993¹¹, including as mandatory criteria either immunological criteria or positive salivary gland biopsy. We retrospectively applied the recent 2002 classification criteria in the 292 patients having all the mandatory tests performed, and found that 260 (89%) fulfilled these more restrictive criteria. Diagnostic tests for SS (Rose-Bengal staining, Schirmer test, parotid scintigraphy, and salivary gland biopsy) were applied according to the recommendations of the European Community Study Group¹¹, and clinical and serologic characteristics of all patients were collected in a protocol form. Positive anti-Ro/La antibodies were found in 158 patients and 162/198 patients had a positive salivary gland biopsy. Glandular and extraglandular manifestations of SS were defined according to previous studies^{12,13}.

Evaluation of liver involvement. Liver involvement was defined as the presence of one or more of the following: (1) Clinical signs of liver disease: hepatomegaly, splenomegaly, jaundice, ascites, encephalopathy, and/or (2) Biochemical data: raised liver enzymes [aspartate/alanine transaminases (ALT/AST) ≥ 40 IU/l, γ -glutamyltranspeptidase (GGT) ≥ 40 IU/l, alkaline phosphatase > 290 IU/l, and/or elevated bilirubin > 1.2 mg/dl] found in at least 3 analytical determinations over a minimum period of 2 years. (3) Immunological markers: positive antimitochondrial antibodies (AMA) with a specific M2 pattern¹⁴, or positive antinuclear antibodies (ANA), antismooth muscle antibodies (anti-SMA), or anti-liver-kidney microsome antibodies type-1 (LKM-1)¹⁵ in patients with clinical and/or analytical data of liver involvement. (4) Virological markers for chronic viral infections [anti-hepatitis C and hepatitis B virus surface antigen (HbsAg)]. (5) Histological examination of liver biopsies included hematoxylin and iron stains, stains for connective tissue and copper-associated protein.

Classification of liver involvement

Autoimmune liver disease

Primary biliary cirrhosis: The presence of one or more of the following features was considered highly suggestive¹⁶: (1) positive AMA with a specific M2 pattern; (2) raised alkaline phosphatase levels (at least twice normal upper limit); (3) raised serum IgM levels (> 2.6 g/dl); (4) liver biopsy showing histological features compatible with PBC according to the histological classification stages (1 to 4) proposed by Ludwig, *et al*¹⁷.

Autoimmune hepatitis (AIH): The diagnosis of AIH was based on the scoring system established by the International Autoimmune Hepatitis Group¹⁸. This group proposed criteria for the definite or probable diagnosis of AIH based on clinical presentation, biochemistry, serology, and biopsy results. A diagnostic score > 15 is considered as definite AIH¹⁷.

Autoimmune cholangitis (AMA-negative PBC): Laboratory evidence of cholestasis in a patient with AMA titer $< 1:40$ and a liver biopsy compatible with PBC or cholangitis¹⁹.

Primary sclerosing cholangitis (PSC): The diagnosis of PSC required a compatible cholangiogram.

Chronic viral liver disease

HCV infection: Positive results (at least twice) for HCV antibodies using a second or third-generation ELISA, confirmed by third-generation recombinant immunoblot assay and/or detection of serum HCV-RNA by polymerase chain reaction, as described⁸.

HBV infection: positive HBsAg, analyzed by ELISA.

Other causes of liver involvement

Drug-related hepatotoxicity [nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAID), antihypertensives, antidiabetic agents, anticonvulsants, lipid-lowering agents, and psychotropic drugs]²⁰; nonautoimmune, nonviral liver processes such as steatosis, chronic cardiopulmonary disease, chronic alcoholic consumption, or Gilbert's syndrome.

Statistical analysis. We used conventional chi-square and Fisher's exact tests to analyze qualitative differences. For comparison of quantitative measures, the Student t test was used in large samples of similar variance and the non-parametric Mann-Whitney U test for small samples. Results of the analysis of continuous variables are indicated as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). A value of $p < 0.05$ indicated statistical significance. Statistical analysis was performed using SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Liver involvement was detected in 129 (27%) out of 475 patients. Chronic viral liver disease was found in 64 (13%) cases, including chronic HCV infection in 63 patients and chronic HBV infection in one. Twenty-four (5%) patients had autoimmune liver diseases, including PBC in 16 patients and type-1 autoimmune hepatitis in 8. The remaining 41 cases had nonautoimmune, nonviral involvement; in 26 patients, liver involvement was related to the chronic use of hepatotoxic drugs, mainly NSAID, statins, and psychotropic drugs. No patient received methotrexate. Analytical evidence of liver involvement was found in 123 patients (26%), with elevated transaminases in 101 (21%) cases, elevated GGT in 92 (19%), raised alkaline phosphatase in 30 (6%), and elevated bilirubin in 24 (5%). Clinical signs of hepatopathy included hepatomegaly in 33 (7%) patients, splenomegaly in 11 (2%), jaundice in 9 (2%), and hepatic decompensation in 9 (2%).

The main hematological and immunological manifestations of patients with SS and liver involvement were compared with the 346 primary SS patients with no evidence of hepatopathy (Table 1). In patients with liver involvement, there was a higher level of erythrocyte sedimentation rate (ESR) > 50 mm/h (44% vs 21%; $p < 0.001$), and a higher mean percentage of circulating gammaglobulins (21.7% vs 18.9%; $p < 0.001$); and a higher frequency of anti-SMA antibodies (66% vs 56%; $p = 0.030$), rheumatoid factor (RF) (54% vs 36%; $p = 0.001$), hypocomplementemia (45% vs 10%; $p < 0.001$), and cryoglobulinemia (45% vs 6%, $p < 0.001$) was found in patients with liver involvement compared to those without, with gammaglobulins and cryoglobulins being significant independent variables in the multivariate analysis.

Characterization of chronic viral liver diseases

HCV infection. Of the 63 patients with chronic HCV infection, 49 (78%) were women and 14 (22%) men, with a mean age of 61.12 years at SS diagnosis and 64.23 years at diagnosis of HCV infection. HCV-RNA determination was available in 40 patients, and was positive in 36 (90%). Analytical evidence of liver involvement was detected in 60 (95%) patients. Only 8 (13%) patients presented clinical manifestations of hepatic decompensation (ascites, encephalopathy, or gastrointestinal bleeding). Biochemical tests showed raised transaminases in

Table 1. Hematological and immunological manifestations of patients with SS and liver involvement compared with the 346 primary SS patients with no evidence of hepatopathy. Data are number (%) or mean $\pm$ SEM.

	Liver Involvement, n = 129	No Liver Involvement, n = 346	p
ESR > 50 mm/h	57 (44)	59 (21)	0.001
Gammaglobulins (mean $\pm$ SEM)	21.61 $\pm$ 0.84	18.98 $\pm$ 0.38	0.001*
Antinuclear antibodies	103 (81)	273/338 (81)	1.000
Anti-SMA	85 (66)	188/334 (56)	0.030
Anti-Ro/SSA	32 (25)	113/339 (33)	0.094
Anti-La/SSB	27 (21)	74/337 (22)	0.900
Rheumatoid factor	66/123 (54)	116/320 (36)	0.001
Hypocomplementemia	54/119 (45)	32/313 (10)	< 0.001
Cryoglobulinemia	52/116 (45)	16/250 (6)	< 0.001*

* Statistically significant in multivariate analysis. Anti-SMA: anti-smooth muscle antibodies.

49 (78%) patients, raised GGT in 44 (70%), raised bilirubin in 15 (24%), and raised alkaline phosphatase in 15 (24%). Liver biopsy was performed in 25 patients with informed consent. The main extraglandular features were articular involvement in 20 (32%) patients, cutaneous vasculitis in 14 (22%), peripheral neuropathy in 11 (18%), thyroiditis in 9 (14%), Raynaud's phenomenon (RP) in 8 (13%), pulmonary fibrosis in 4 (6%), and renal involvement in 3 (5%) patients. Salivary gland biopsy was positive in 17/21 patients. In non-biopsied patients, at least one positive immunological marker was found (ANA, RF, anti-Ro/SSA and/or anti-La/SSB). Hematological data included thrombocytopenia (platelet count < $150 \times 10^9/l$) in 35 (56%) patients and leukopenia (leukocyte count < $4 \times 10^9/l$) in 22 (35%). The main immunologic features were cryoglobulinemia in 42 (67%) patients, hypocomplementemia in 42 (67%), ANA in 41 (65%), RF in 36 (57%), anti-Ro/SSA in 7 (11%), and anti-La/SSB in 7 (11%).

HBV infection. Only one (0.2%) patient presented positive HBsAg. This was a 53-year-old man with a chronic hepatopathy without decompensation. Biochemical tests showed raised transaminases and GGT.

Characterization of autoimmune liver diseases

PBC. Sixteen (4%) patients presented features highly suggestive of PBC. All were women, with a mean age of 49 years at SS onset and 51 years at diagnosis of PBC. All patients presented AMA-M2: 5 had AMA titers of 1/80, 7 of 1/160, 2 of 1/320, and 2 of 1/640. Anti-PDH complex antibodies were confirmed by ELISA in 6 patients. Thirteen (81%) patients had analytical evidence of liver involvement, with elevated GGT in 12 (75%), elevated transaminases in 8 (50%), raised alkaline phosphatase in 5 (31%), and elevated bilirubin in 2 (13%). Liver biopsy was performed in 4 patients with informed consent, with specimens showing a histological pattern compatible with PBC in 3 cases (one had stage 1 and two stage 2) and normal liver structure in one. The main extraglandular SS manifestations consisted of articular involvement in

9 (56%) patients, RP in 7 (44%), and pulmonary involvement in 3 (19%). Anemia (defined as a hemoglobin value < 10 g/dl) was detected in 6 patients, leukopenia in 4 (25%), and thrombocytopenia in 6 (38%). Hypergammaglobulinemia (gamma-globulin percentage > 25%) was detected in 9 (56%) patients, with raised IgM levels (> 2.6 g/dl) in 6 (38%). Other immunologic features were positive ANA in all patients, anti-SMA in 13 (81%), anti-Ro/SSA in 11 (69%), RF in 10 (63%), and anti-La/SSB in 8 (50%).

AIH. Eight (2%) patients presented type-1 AIH. All were women, with a mean age of 53 years at SS onset and of 58 years at diagnosis of AIH. All patients had analytical evidence of liver involvement, with elevated transaminases in all, elevated GGT in 6 (75%), raised alkaline phosphatase in 4 (50%), and elevated bilirubin in one (13%). Liver biopsy was performed in 5 patients with informed consent, with specimens showing a histological pattern compatible with AIH in 4 cases and normal liver structure in one. The main extraglandular SS manifestations consisted of articular involvement in 3 (38%) patients and cutaneous vasculitis in 2 (25%). Anemia was detected in one patient and thrombocytopenia in 3 (38%). Hypergammaglobulinemia was detected in 3 (38%) patients. The main immunologic features were positive ANA in all patients, anti-SMA in 7 (88%), anti-Ro/SSA in 3 (38%), and RF in 3 (38%).

Differentiation between viral and autoimmune liver disease
Demographically, viral liver disease was characterized by a higher frequency of men (23% vs 0%; $p = 0.009$) and an older age at SS diagnosis (67.46 ± 1.18 vs 57.67 ± 2.70 yrs; $p < 0.001$) compared with autoimmune liver disease (Table 2). Although a similar prevalence of the main extraglandular features was found, there was a higher frequency of RP in patients with autoimmune liver disease (33% vs 13%; $p = 0.033$). Liver involvement was expressed similarly, with no differences in the prevalence of altered analytical liver profile, including transaminases, GGT, bilirubin, and alkaline phosphatase (Table 2). In contrast, a clearly differentiated hemato-

Table 2. Epidemiological and clinical features of SS patients with autoimmune liver disease in comparison with patients with chronic viral infections. Data are number (%) or mean $\pm$ SEM.

	Autoimmune Liver Disease, n = 24	Chronic Viral Disease, n = 64	Bilateral p (< 0.05)
Epidemiological features			
Sex (female)	24 (100)	49 (77)	0.009
Mean age, yrs	57.67 $\pm$ 2.70	67.46 $\pm$ 1.18	< 0.001
Extraglandular SS features			
Articular involvement	6 (25)	21 (33)	—
Pulmonary involvement	4 (17)	4 (6)	—
Thyroiditis	4 (17)	9 (14)	—
Cutaneous vasculitis	2 (8)	14 (22)	—
Peripheral neuropathy	1 (4)	11 (17)	—
Raynaud phenomenon	8 (33)	8 (13)	0.033
Renal involvement	1 (4)	3 (5)	—
Liver involvement			
Altered liver profile	21 (87)	61 (95)	—
Raised transaminases	16 (67)	50 (78)	—
Raised gammaglutamyl transferase	18 (75)	44 (69)	—
Raised bilirubin	3 (12)	15 (23)	—
Raised alkaline phosphatase	9 (37)	15 (23)	—
Liver decompensation	1 (4)	8 (13)	—
Hepatocarcinoma	0 (0)	4 (6)	—

logic and immunologic profile was observed (Table 3). SS patients with autoimmune liver disease presented higher mean values of ESR (53.7 vs 39.0; $p = 0.044$), circulating gammaglobulins (26.1% vs 20.2%; $p = 0.007$), and a higher prevalence of ANA (100% vs 66%; $p < 0.001$), AMA (67% vs 6%; $p < 0.001$), anti-SMA (83% vs 55%; $p = 0.026$), anti-Ro/SSA (58% vs 11%; $p < 0.001$), and anti-La/SSB (38% vs 11%; $p = 0.01$), while patients with chronic viral hepatopathy had a higher frequency of cryoglobulinemia (66% vs 9%; $p < 0.001$) and hypocomplementemia (66% vs 17%; $p < 0.001$).

DISCUSSION

Liver involvement was one of the first reported extraglandular manifestations of the systemic expression of SS, although new developments in the field of hepatic diseases have changed the diagnostic approach significantly. In the first studies in SS patients in the 1960s, liver involvement was evaluated by the presence of hepatomegaly, with a prevalence of 20%⁴. AMA were included as a marker of liver disease in SS patients in the 1970s, with later studies finding a closer association between SS and PBC than with other types of

Table 3. Analytical features of SS patients with autoimmune liver disease in comparison with patients with chronic viral infections. Data are number (%) or mean $\pm$ SEM.

	Autoimmune Liver Disease, n = 24	Chronic Viral Disease, n = 64	Bilateral p (< 0.05)
Hematological data			
ESR (mean $\pm$ SEM)	53.71 $\pm$ 6.13	39.05 $\pm$ 3.87	0.044
Leukopenia	4 (17)	22 (34)	—
Thrombocytopenia	9 (37)	35 (55)	—
Gammaglobulins (mean $\pm$ SEM)	26.18 $\pm$ 1.78	20.25 $\pm$ 1.25	0.007
Immunological markers			
ANA	24 (100)	42 (66)	< 0.001
AMA	16 (67)	4 (6)	< 0.001
Anti-SMA	20 (83)	35 (55)	0.026
Anti-Ro/SSA	14 (58)	7 (11)	< 0.001
Anti-La/SSB	9 (38)	7 (11)	0.01
Rheumatoid factor	13 (54)	37 (58)	—
Hypocomplementemia	4 (17)	42 (66)	< 0.001
Cryoglobulinemia	2 (8)	42 (66)	< 0.001

ANA: antinuclear antibodies. AMA: antimitochondrial antibodies. Anti-SMA: antismooth muscle antibodies.

autoimmune liver disease^{6,7}. It was not until the 1990s that the spectrum of liver disease in patients with primary SS, including the evaluation of clinical signs of liver disease, liver function, and a complete panel of autoantibodies^{9,10}, was characterized in 2 studies, both of which identified PBC as the main liver disease. However, patients were not evaluated systematically for chronic viral liver diseases and other causes of hepatopathy.

Chronic HCV infection was the main cause of liver involvement in our patients with SS, with a prevalence of 13%, nearly 3-fold greater than that observed for autoimmune liver involvement. This underlines the importance of chronic HCV infection as a cause of liver disease in SS patients from regions, such as the Mediterranean area, with higher prevalences of HCV infection in the general population. Recent experimental^{21,22}, virological^{23,24}, and clinical evidence²⁵⁻²⁷ has revealed a close association between HCV and SS and, in a recent large multicenter study⁸, SS-HCV was indistinguishable in most cases from the primary form using the most recent sets of classification criteria.

How then should this SS be classified? Current evidence suggests that chronic HCV infection should be considered an exclusion criterion for the classification of primary SS, not because it mimics primary SS, but because it seems to be directly responsible for the development of SS in a specific subset of HCV patients⁸. SS-HCV patients should be considered a separate subset from the primary form, and it would be more appropriate to classify these patients as having "SS associated with HCV." The term "SS secondary to HCV" might be used in those cases in which infection of salivary gland epithelium by HCV is directly observed.

The existence of SS-HCV patients with repeated positive anti-HCV ELISA and negative HCV-RNA was an interesting finding. Four (10%) of 40 SS-HCV patients had negative HCV-RNA viremia, although their characteristics did not differ from those of patients with positive viremia. We think that this finding is probably due to the existence of patients with an undetectable amount of serum HCV-RNA and not to repeated false results of a highly-specific fourth generation anti-HCV ELISA.

Two-thirds of our patients with SS-HCV had cryoglobulinemia, which may be considered the key immunological marker of SS associated with HCV and the main cause of vasculitis in these patients. Cryoglobulins also played a predominant role in the immunological pattern of these patients, having a close association with hypocomplementemia and RF. The RF activity due to HCV-related cryoglobulinemia has additional clinical significance, as it is a criterion for the fulfillment of the 1993 European criteria for SS diagnosis. In spite of the high frequency of cryoglobulins, only 13% of our patients with SS-HCV had RP. The prevalence of RP in large series of patients with cryoglobulinemia varies widely. We found RP in only 5% of our cohort of 443 patients with cryoglobulinemia²⁸, while Ferri, *et al*²⁹ found a prevalence of

36%, a finding that may be related to the definition of RP used in each study. However, it is interesting that we have found a higher frequency of RP in our SS-HCV patients than in our series of cryoglobulinemic patients (13% vs 5%).

The association between SS and other types of chronic viral hepatitis is very infrequent. We found only one case of chronic HBV infection in 475 patients with SS, compared with 63 patients with chronic HCV infection. Only 3 additional cases³⁰⁻³² of HBV-related SS have been reported (one associated with HBV vaccination), compared with more than 300 cases of HCV-related SS³³. Similarly, chronic hepatitis G virus infection also plays an insignificant role in liver disease in patients with SS. This predominant etiopathogenic role of HCV is probably due to its specific lymphotropism and sialotropism^{21,34}, which means it can infect and replicate in both circulating lymphocytes and epithelial cells from the salivary glands³⁵.

After discarding HCV infection, PBC was the main cause of liver disease in our patients with primary SS, similar to the studies of Lindgren, *et al*⁹ and Skopouli, *et al*¹⁰. Although historically these patients have been considered to have "secondary" SS, it seems more rational to use the term "SS associated with PBC," because of the clinical-based evidence that SS is associated with (and not secondary to) other autoimmune diseases. SS patients with AMA-M2 showed a broad spectrum of abnormalities in the analytical liver profile, including 3 patients with no clinical or analytical data suggestive of liver disease, as has been reported in 5 previous cases^{9,10,36}. Previous studies in non-SS patients have shown that AMA-M2 patients with any clinical or analytical sign of liver involvement have a high risk of developing symptomatic PBC³⁷, underlining the key role of AMA-M2 as an early immunological marker of PBC³⁸. Although there are no therapeutic guidelines for these asymptomatic patients, early use of ursodeoxycholic acid may be considered, since some studies in non-SS patients with mild analytical abnormalities have suggested that treatment with ursodeoxycholic acid might prevent a possible progression to liver cirrhosis³⁹. For these reasons, we recommend the inclusion of AMA in the routine immunologic followup of SS patients, independently of whether the analytical liver profile is altered or not, due to the strong association between AMA and the development of PBC.

AIH was the other autoimmune liver disease found in our patients with SS, although less frequently than PBC. There are 51 reported cases of AIH in patients with primary SS (including our 8 cases) and all are type-1 AIH⁴⁰. An additional characteristic of the AIH associated with primary SS is that most of the reported cases (33 out of 51, 65%) are from Japan, Korea, and China. Other autoimmune liver diseases have infrequently been described in patients with primary SS (Table 4), including 13 cases of sclerosing cholangitis, 6 cases of autoimmune cholangitis, and one case of nodular regenerative hyperplasia of the liver⁴¹.

Table 4. Main causes of liver disease in patients with SS: total number of cases reported^{33,40}.

	No. of Cases Reported
Chronic HCV infection	325
Primary biliary cirrhosis	170
Type-1 autoimmune hepatitis	43
Primary sclerosing cholangitis	13
Autoimmune cholangitis	6
Chronic HBV infection	3
Nodular regenerative hyperplasia	1
Type-2 autoimmune chronic hepatitis	0

Detection of an altered liver profile in a patient with SS requires a sequential diagnosis. The first step is to discard processes not associated with SS, mainly the chronic use of potentially hepatotoxic drugs, steatosis, and congestive heart failure, all of which are frequently found in the elderly. The second step is to differentiate between autoimmune and viral liver disease. Evaluation of epidemiological factors may be helpful. For example, HCV infection is more frequently found in SS patients from the Mediterranean area than in those from northern Europe⁴². Similarly, HCV diagnosis is more frequent in older and male SS patients, while younger and female SS patients are more likely to have an associated autoimmune liver disease. The third step is the analytical liver profile, although in our study, this was not useful in differentiating between HCV- and autoimmune-related liver diseases. The fourth step is the immunological profile, which plays a key role in differentiating between the main etiologies: patients with chronic HCV infection have a higher frequency of cryoglobulins and hypocomplementemia, while those with autoimmune liver disease present hypergammaglobulinemia and autoantibodies (ANA, SMA, Ro, and La) more frequently. Of SS patients with autoimmune liver disease, the existence of AMA with a specific M2 pattern indicates PBC, while high titers of ANA and anti-SMA suggest type-1 AIH.

Chronic HCV infection was the main cause of liver involvement in our patients with SS, with a prevalence of 13%, nearly 3-fold greater than that observed for autoimmune liver involvement (PBC and type-1 AIH). No differences in the analytical liver profile or the main extraglandular SS manifestations were found when comparing the 2 types of liver involvement, with the immunological pattern being the main identifying factor in the differentiation of viral (predominance of cryoglobulins and low complement levels) and autoimmune (higher frequency of autoantibodies) liver involvement. The differential diagnosis of liver disease in patients with primary SS (viral versus autoimmune) is clinically important, since the 2 processes have a different therapeutic approach and prognosis.

REFERENCES

1. Fox RI. Sjogren's syndrome. *Lancet* 2005;366:321-31.
2. Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjogren syndrome. *Arch Intern Med* 2004;164:1275-84.
3. Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Font J. Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis* 2005;64:347-54.
4. Bloch KJ, Buchanan WW, Wohl MJ, Bunim JJ. Sjogren's syndrome. A clinical, pathological, and serological study of sixty-two cases. *Medicine Baltimore* 1965;44:187-231.
5. Golding PL, Bown R, Mason AM, Taylor E. "Sicca complex" in liver disease. *BMJ* 1970;4:340-2.
6. Alarcon-Segovia D, Diaz-Jouanen E, Fishbein E. Features of Sjogren's syndrome in primary biliary cirrhosis. *Ann Intern Med* 1973;79:31-6.
7. Tsianos EV, Hoofnagle JH, Fox PC, et al. Sjogren's syndrome in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990;11:730-4.
8. Ramos-Casals M, Loustaud-Ratti V, De Vita S, et al; SS-HCV Study Group. Sjogren syndrome associated with hepatitis C virus: a multicenter analysis of 137 cases. *Medicine Baltimore* 2005;84:81-9.
9. Lindgren S, Manthorpe R, Eriksson S. Autoimmune liver disease in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Hepatol* 1994;20:354-8.
10. Skopouli FN, Barbatis C, Moutsopoulos HM. Liver involvement in primary Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1994;33:745-8.
11. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1993;36:340-7.
12. Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, et al. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine Baltimore* 2002;81:281-92.
13. Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Rosas J, et al. Primary Sjogren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. *Medicine Baltimore* 2002;81:270-80.
14. Ramos-Casals M, Parés A, Jara LJ, et al. Antimitochondrial antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: description of 18 cases and review of the literature. *J Viral Hepat* 2005;12:648-54.
15. Doniach D. Laboratory correlations in liver diseases. In: Vyas GN, Stites DP, Brecher G, editors. *Laboratory diagnosis of immunologic disorders*. New York: Grune & Stratton; 1975:163-82.
16. Talwalkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2003;362:53-61.
17. Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic non-suppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch* 1978;379:103-12.
18. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-38.
19. Czaja AJ. Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease. *Hepatology* 1998;28:360-5.
20. Chitturi S, George J. Hepatotoxicity of commonly used drugs: nonsteroidal antiinflammatory drugs, antihypertensives, antidiabetic agents, anticonvulsants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs. *Semin Liver Dis* 2002;22:169-83.
21. De Vita S, Sansonno D, Dolcetti R, et al. Hepatitis C virus infection within a malignant lymphoma lesion in the course of type II mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1995;86:1887-92.
22. Koike K, Moriya K, Ishibashi K, et al. Sialadenitis histologically resembling Sjogren syndrome in mice transgenic for hepatitis C virus envelope genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:233-6.
23. Arrieta JJ, Rodriguez-Inigo E, Ortiz-Movilla N, et al. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol* 2001;158:259-64.
24. Toussiot E, Le Huec G, Mougin C, Balblanc JC, Bettinger D,

- Wendling D. Presence of hepatitis C virus RNA in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and hepatitis C virus infection. *J Rheumatol* 2002;29:2382-5.
25. Jorgensen C, Legouffe MC, Perney P, et al. Sicca syndrome associated with hepatitis C virus infection. *Arthritis Rheum* 1996;39:1166-71.
 26. Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Cervera R, et al. Hepatitis C virus infection mimicking primary Sjogren syndrome. A clinical and immunologic description of 35 cases. *Medicine Baltimore* 2001;80:1-8.
 27. De Vita S, Damato R, De Marchi G, Sacco S, Ferraccioli G. True primary Sjogren's syndrome in a subset of patients with hepatitis C infection: a model linking chronic infection to chronic sialadenitis. *Isr Med Assoc J* 2002;4:1101-5.
 28. Trejo O, Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, et al. Cryoglobulinemia: study of etiologic factors and clinical and immunologic features in 443 patients from a single center. *Medicine Baltimore* 2001;80:252-62.
 29. Ferri C, Sebastiani M, Giuggioli D, et al. Mixed cryoglobulinemia: demographic, clinical, and serologic features and survival in 231 patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004;33:355-74.
 30. Toussiot E, Lohse A, Wendling D, Mougin C. Sjogren's syndrome occurring after hepatitis B vaccination. *Arthritis Rheum* 2000;43:2139-40.
 31. Iakimtchouk K, Myrnel H, Jonsson R. Serological screening for hepatitis B and C and human herpesvirus 6 in Norwegian patients with primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1999;26:2065-6.
 32. Aprosin ZG, Serov VV, Lopatkina TN. [The hepatitis B virus as a probable etiological factor in Sjogren's disease]. *Ter Arkh* 1993;65:73-8.
 33. Ramos-Casals M, Loustaud-Ratti V, Zeher M. [Hepatitis C virus and autoimmune diseases]. In: Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Rosas J, Calvo J, Font J, editors. *Enfermedades autoinmunes sistémicas y reumatológicas*. Barcelona: Masson; 2005:742-58.
 34. Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Cervera R, Font J. Is hepatitis C virus a sialotropic virus? *Am J Pathol* 2001;159:1593-4.
 35. Ramos-Casals M, Font J. Extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:447-55.
 36. Csepregi A, Szodoray P, Zeher M. Do autoantibodies predict autoimmune liver disease in primary Sjogren's syndrome? Data of 180 patients upon a 5 year follow-up. *Scand J Immunol* 2002;56:623-9.
 37. Prince MI, Chetwynd A, Craig WL, Metcalf JV, James OF. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort. *Gut* 2004;53:865-70.
 38. Abraham S, Begum S, Isenberg D. Hepatic manifestations of autoimmune rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2004;63:123-9.
 39. Beswick DR, Klatskin G, Boyer JL. Asymptomatic primary biliary cirrhosis. A progress report on long-term follow-up and natural history. *Gastroenterology* 1985;89:267-71.
 40. Coll J, Pelusa F, Corominas JM. [Liver involvement in Sjögren's syndrome]. In: Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Anaya JM, et al, editors. *Síndrome de Sjögren*. Barcelona: Masson; 2003:225-32.
 41. Gonzalez-Alvaro I, Carmona-Ortell L, Amigo-Etxenagusia A, Castaneda Sanz S. Nodular regenerative hyperplasia of the liver and primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1994;21:168-9.
 42. Ramos-Casals M, Jara LJ, Medina F, et al; HISPAMEC Study Group. Systemic autoimmune diseases co-existing with chronic hepatitis C virus infection (the HISPAMEC Registry): patterns of clinical and immunological expression in 180 cases. *J Intern Med* 2005;257:549-57.

Characterization and differentiation in autoimmune versus viral liver involvement in patients with Sjögren Syndrome

OBJETIVOS

1. Analizar la prevalencia del compromiso hepático en una extensa cohorte de pacientes con SSp.
2. Describir las características clínicas, inmunológicas e histológicas de los casos encontrados en esta cohorte de pacientes.
3. Focalizarnos en caracterizar y analizar las diferencias existentes entre los pacientes con enfermedad hepática de causa viral y las de causa autoinmune.

PRINCIPALES RESULTADOS

- Se detectó que el 27% de nuestros pacientes con SSp presentaron compromiso hepático siendo la principal etiología la causa viral (13%) fundamentalmente el VHC, seguido por la CBP (5%) como primera causa autoinmune.
- En relación a las diferencias entre enfermedad hepática de causa viral y autoinmune, la enfermedad viral se caracterizó por una mayor frecuencia en hombres y por un diagnóstico de SS a edades más avanzadas. Si bien las principales características extraglandulares fueron muy similares, hubo mayor presencia de fenómeno de Raynaud en la etiología autoinmune.
- Al comparar las manifestaciones inmunológicas entre pacientes con SSp y compromiso hepático frente a pacientes con SSp sin

hepatopatía se observó en los primeros valores más altos de VSG, mayor presencia de gammaglobulinas, de autoanticuerpos anti-SMA, de FR, hipocomplementemia y crioglobulinemias respecto a los que no tenían compromiso hepático.

Los pacientes con enfermedad hepática de causa autoinmune presentaban diferencias en el perfil hematológico e inmunológico estadísticamente significativas como mayor presencia de ANA, AMA, anti-SMA, anti-Ro y anti-La.

CONCLUSIONES

La infección crónica por el VHC fue la principal causa de compromiso hepático en nuestros pacientes con SS, con una prevalencia tres veces mayor con respecto a la causa autoinmune.

Los pacientes SS-HCV deberían ser considerados un subgrupo de la forma primaria por lo que sería más apropiado clasificar a estos pacientes como “SS asociado al HCV”.

Debido a la alta prevalencia en pacientes SS-HCV, las crioglobulinas podrían ser utilizadas como un marcador inmunológico clave en estos pacientes, además de representar la principal causa de vasculitis.

En cuanto a los pacientes con enfermedad hepática autoinmune, mientras que la presencia de AMA patrón M2 indica CBP, los títulos altos de ANA y anti-SMA sugieren HAI tipo 1.

ARTÍCULO IV

Mannose-binding lectin-low genotypes are associated with milder systemic and immunological disease expression in primary Sjögren's syndrome

M. Ramos-Casals¹, P. Brito-Zerón¹, N. Soria¹, N. Nardi¹, A. Vargas¹, S. Muñoz¹, A. Bové¹, B. Suárez² and F. Lozano²

Objective. To investigate the association of mannose-binding lectin (MBL)-low genotypes with the clinical and immunological expression of primary SS.

Methods. Eighty-one patients with primary SS who fulfilled the 2002 classification criteria were included in the study. *MBL2* polymorphisms were investigated by sequence-based DNA typing of the promoter and exon 1. Genotypes 0/0, 0/XA or XA/XA were considered as MBL-low and XA/A, A/0 and A/A as MBL-sufficient. Control groups included 46 patients who exclusively fulfilled the 1993 SS criteria, 114 SLE patients and 104 healthy individuals.

Results. Twelve (15%) SS patients had MBL-low genotypes, of whom six (7%) had genotype 0/XA, five (6%) had genotype 0/0 and one (1%) had genotype XA/XA. A higher prevalence of the XA/A genotype (32 vs 17%, $P=0.01$) was found in primary SS patients in comparison with SLE patients. No patient with primary SS carrying MBL-low genotypes had purpura, glomerulonephritis or neurological involvement (0 vs 29%, $P=0.025$). Immunologically, patients carrying MBL-low genotypes had a lower frequency of anti-Ro/SS-A antibodies (17 vs 55%, $P=0.014$), anti-La/SS-B antibodies (8 vs 48%, $P=0.009$) and low C4/C3 levels (0 vs 32%, $P=0.016$). No patient with primary SS carrying the homozygous MBL-deficient genotype 0/0 had anti-Ro/SS-A or anti-La/SS-B antibodies, low C3/C4 levels or circulating cryoglobulins.

Conclusion. SS patients with MBL-low genotypes have a less pronounced systemic and immunological disease expression in comparison with those carrying MBL-sufficient genotypes. In primary SS, MBL deficiency may represent a protective factor against the development of more aggressive autoimmune damage.

KEY WORDS: Primary Sjögren's syndrome, Mannose-binding lectin, Gene polymorphism, Anti-Ro/SS-A antibodies, Innate immunity.

Introduction

SS is a systemic autoimmune disease that presents with sicca symptomatology of the main mucosa surfaces [1]. The main sicca features (xerophthalmia and xerostomia) are determined by specific ocular (Rose Bengal staining, Schirmer test) and oral (salivary flow measurement, parotid scintigraphy) tests. The histological hallmark is a focal lymphocytic infiltration of the exocrine glands, determined by a biopsy of the minor labial salivary glands [2]. Patients with SS present a broad spectrum of analytical features (cytopenias, hypergammaglobulinaemia, high ESR) and auto-antibodies, of which ANAs are the most frequently detected, anti-Ro/SS-A the most specific, and cryoglobulins and hypocomplementaemia the main prognostic markers [3]. The disease spectrum extends from sicca syndrome to systemic involvement (extraglandular manifestations) [4].

The complement system is a key component of the innate inflammatory response that mediates tissue damage in autoimmune diseases. In addition to the classical and alternative pathways, the complement system can also be activated through the lectin pathway, which is switched on when the mannose-binding lectin (MBL) forms a complex with MBL-associated serine proteases (MASPs) [5]. This complex binds with some carbohydrates motifs on pathogens, facilitating their opsonophagocytosis and/or lysis [6]. The MBL pathway also contributes to the clearance of apoptotic cells and circulating immune

complexes [7], suggesting a possible implication in the aetiopathogenesis of systemic autoimmune diseases (SADs). Accordingly, genetically defined loss-of-function variations of the MBL and *MASP-2* molecules have been reported to influence susceptibility and disease expression of both infections and autoimmune diseases [8, 9]. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) at exon 1 of *MBL2* introducing non-synonymous amino acid changes at codons 52, 54 and 57 (named D, B and C variants, respectively, and collectively referred as O variants) are major determinants of serum MBL levels [10, 11]. The wild-type variant is referred as A. Additional SNP at positions –551 (H/L), –221 (X/Y) and +4 (P/Q) in the 5'-flanking region also influence serum MBL levels in individuals with the wild-type A variant [12]. Of these, two promoter haplotypes (HY, which is associated with high levels of MBL, and LX, which is associated with low MBL levels) appear to be the most important [12]. The exon 1 and promoter polymorphisms are in linkage disequilibrium and give rise to a limited number (seven) of haplotypes (HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, LYQC, LYPB, HYPD), which correlate well with MBL serum levels [12–16]. Genotypes 0/0, 0/XA and XA/XA were considered as MBL-low genotypes according to previous studies [12, 17–20]. The *MBL2* and *MASP2* genes have been located to chromosomes 10q11.1–q21 and 1p36.23–31, respectively [21]. Some studies have suggested a higher risk of developing SLE in patients carrying a specific MBL allele in combination with null alleles for other complement genes located within the MHC class III region (*C4B*) [22].

Hypocomplementaemia is considered one of the key immunological markers of primary SS. Recent studies have described a close association between low complement levels at diagnosis and a higher risk of developing extraglandular features and auto-antibodies, and death [23–25]. It may be hypothesized that genetic variability in proteins involved in the activation of the lectin pathway of the complement system (MBL) could influence the systemic and immunological expression of primary SS. In this

¹Department of Autoimmune Diseases, Laboratory of Autoimmune Diseases 'Josep Font', Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and ²Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

Submitted 8 April 2008; revised version accepted 22 September 2008.

Correspondence to: M. Ramos-Casals, Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clínic, Villarroel, 170, 08036-Barcelona, Spain.
E-mail: mramos@clinic.ub.es

study, we investigated the association between *MBL2* and *MASP2* gene polymorphisms and the clinical and immunological manifestations of primary SS.

Methods

Patients

We analysed 127 consecutive patients diagnosed before 2002 who fulfilled four or more of the 1993 European Classification Criteria for primary SS [26]. A retrospective application of the 2002 American–European criteria [27] identified 81 patients who fulfilled these criteria (77 women and 4 men, mean age at SS diagnosis of 51.4 yrs). The remaining 46 patients, all with negative anti-Ro/La antibodies, were excluded and analysed as a control group. In all patients, an exhaustive evaluation discarding other causes of sicca syndrome (coexisting systemic autoimmune diseases, chronic viral infections, metabolic disorders and pre-existing lymphoma) was performed. Systemic involvement was defined as the presence of at least one of the following features [28, 29]: lung involvement, cardiovascular involvement, nephropathy, vasculitis, peripheral neuropathy or central nervous system involvement. Clinical and laboratory data were collected and computerized according to our standard department protocol [28, 29]. The study was approved by the ethical committee of the Hospital Clinic (Barcelona, Spain) and all patients gave informed, written consent.

MBL2 and MASP2 genotyping

Genomic DNA was extracted from 1.5 ml EDTA-treated whole blood samples from Caucasian SS patients and controls (114 SLE patients and 104 healthy voluntary blood donors from the Hospital Clinic, Barcelona, Spain, mean age of 42 yrs, female: male ratio of 4:1) using the QIAamp DNA blood mini kit following the manufacturer's instructions (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and stored at -20°C until used. Genotyping of *MBL2* and *MASP2* was done by a PCR–sequencing based typing (SBT) technique, as previously reported [20, 28]. In brief, a 969-bp fragment of *MBL2* encompassing a region from the promoter to the end of exon 1 was obtained by PCR amplification using the sense 5'-GGGGAATTCCTGCCAGAAAGT-3' and anti-sense 5'-CATATCCCCAGGCAGTTTCCTC-3' primers and the Expand 20kbPLUS PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Similarly, a 354-bp fragment from exon 3 of *MASP2* was PCR-amplified using the sense 5'-GCG AGTACGACTTCGTCAAGG-3' and anti-sense 5'-CTCGGC TGCATAGAAGGCCTC-3' oligonucleotides and the Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Cycling conditions were: 94°C for 8 min; 35 cycles of 94°C for 45 s, 58°C for 30 s, 72°C for 90 s and, finally, 72°C for 10 min. Five microlitres of each PCR was treated with ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) and subjected to direct sequencing with the BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) following the manufacturer's instructions with the sense and anti-sense gene-specific primers mentioned above. Sequencing reactions were analysed on an automated capillary DNA sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

The SNP D105>G at exon 3 of *MASP2* is known to affect the binding of *MASP-2* to MBL and subsequently reduces the serum levels of *MASP-2* [30]. Individuals were divided into wild-type or mutant categories according to the presence of the D105> variant in either homo- or heterozygosis.

Statistical analysis

Qualitative variables were compared using the χ^2 -test and Fisher's exact tests. Quantitative variables were analysed with the Student's *t*-test, with results indicated as mean $\pm$ S.E.M.

A two-tailed value of $P < 0.05$ was taken to indicate statistical significance. The results of the analysis of quantitative variables are indicated as mean $\pm$ S.E.M. The statistical analysis was performed using the SPSS program (Chicago, IL, USA).

Results

MBL2 polymorphisms

Twelve (15%) patients with primary SS had MBL-low genotypes, of whom six (7%) had genotype 0/XA, five (6%) had genotype 0/0 and one (1%) had genotype XA/XA. Sixty-nine (85%) had other *MBL2* genotypes (XA/A, 0/A, A/A), of whom 19 (23%) had genotype A/A, 24 (30%) had genotype A/O and 26 (32%) had genotype A/XA (Table 1). When we compared the prevalence of *MBL2* genotypes and haplotypes between patients with primary SS and controls, a higher prevalence of the XA/A genotype (32 vs 17%, $P = 0.01$) and a lower frequency of the A/A genotype (23 vs 36%, $P = 0.06$) was found in primary SS patients in comparison with SLE patients.

When we analysed the association between *MBL2* genotypes and the main epidemiological, clinical and immunological characteristics of SS (Table 2), we found a lower prevalence of systemic manifestations in SS patients with MBL-low genotypes (25 vs 41%). Specifically, no patient carrying MBL-low genotypes had purpura, glomerulonephritis or neurological involvement (0 vs 29%, $P = 0.025$). Patients carrying MBL-low genotypes had lower mean levels of CRP, erythrocyte sedimentation rate, β_2 -microglobulin, serum IgG and pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and -10 in comparison with patients carrying MBL-sufficient genotypes, although the differences did not reach statistical significance (Table 3).

TABLE 1. Prevalence of *MBL2* gene polymorphisms in patients with primary SS compared with patients with SLE and controls

<i>MBL2</i> genotypes	Primary SS <i>n</i> = 81	SLE <i>n</i> = 114	Healthy controls <i>n</i> = 104
MBL-low, <i>n</i> (%)	12 (15)	23 (20)	19 (18)
0/0, <i>n</i> (%)	5 (6)	8 (7)	8 (8)
0/XA, <i>n</i> (%)	6 (7)	10 (9)	8 (8)
XA/XA, <i>n</i> (%)	1 (2)	5 (4)	3 (3)
MBL-sufficient, <i>n</i> (%)	69 (85)	91 (80)	85 (82)
XA/A, <i>n</i> (%)	26 (32)*	20 (17)	24 (23)
0/A, <i>n</i> (%)	24 (30)	30 (26)	28 (27)
A/A, <i>n</i> (%)	19 (23)**	41 (36)	33 (32)
<i>MBL2</i> haplotypes			
0, <i>n</i> (%)	40 (25)	56 (24)	52 (25)
XA, <i>n</i> (%)	34 (21)	40 (18)	38 (18)
A, <i>n</i> (%)	88 (54)	132 (58)	118 (57)

* $P = 0.01$ with respect to SLE. ** $P = 0.06$ with respect to SLE.

TABLE 2. Epidemiological, clinical and immunological features in patients with primary SS according to the presence or absence of MBL-low genotypes (0/0, 0/XA, XA/XA)

	MBL-sufficient genotypes <i>n</i> = 69	MBL-low genotypes <i>n</i> = 12	<i>P</i> -value
Gender, female, <i>n</i> (%)	65 (94)	12 (100)	0.520
Age at SS diagnosis, mean $\pm$ S.E.M., yrs	50.96 $\pm$ 1.77	54.17 $\pm$ 2.31	0.462
Parotid scintigraphy grades III or IV, <i>n</i> (%)	45/64 (70)	5/10 (50)	0.179
Parotid enlargement, <i>n</i> (%)	17 (25)	4 (33)	0.377
Systemic involvement, <i>n</i> (%)	28 (41)	3 (25)	0.245
Hypergammaglobulinaemia > 30%, <i>n</i> (%)	12 (18)	0 (0)	0.121
ACLs, <i>n</i> (%)	8/58 (14)	0/11 (0)	0.229
ANAs $\geq$ 1/80, <i>n</i> (%)	64 (93)	10 (83)	0.276
Positive antiRo/SS-A antibodies, <i>n</i> (%)	38 (55)	2 (17)	0.014
Positive antiLa/SS-A antibodies, <i>n</i> (%)	33 (48)	1 (8)	0.009
RF $\geq$ 25 IU/l, <i>n</i> (%)	40 (58)	4 (33)	0.103
Low C3/C4 levels, <i>n</i> (%)	22 (32)	0 (0)	0.016
Cryoglobulins > 1%, <i>n</i> (%)	14 (20)	0 (0)	0.086

TABLE 3. Analytical features in patients with primary SS according to the presence or absence of MBL-low genotypes (0/0, 0/XA, XA/XA)

	MBL-sufficient genotypes	MBL-low genotypes	Two-tailed <i>P</i> -value
CRP levels, mg/dl	2.44 ± 0.55	0.63 ± 0.19	0.224
β2-microglobulin levels, mg/l	2.97 ± 0.31	2.90 ± 0.55	0.934
ESR, mm/h	47.70 ± 3.99	36.83 ± 10.71	0.306
Gammaglobulins, %	21.82 ± 0.97	19.83 ± 1.79	0.427
IgG levels, g/l	15.55 ± 0.06	12.47 ± 2.36	0.304
IgM levels, g/l	1.96 ± 0.31	4.47 ± 3.00	0.062
IgA levels, g/l	2.62 ± 0.19	3.23 ± 0.79	0.343
IL-6 levels, pg/ml ^a	25.36 ± 6.74	22.57 ± 11.80	0.851
IL-10 levels, pg/ml ^a	4.13 ± 1.22	1.67 ± 0.54	0.323

Results are indicated as mean ± S.E.M. ^aMeasured in 35 patients.

Immunologically, patients carrying MBL-low genotypes had a lower frequency of anti-Ro/SS-A antibodies (17 vs 55%, $P=0.014$), anti-La/SS-B antibodies (8 vs 48%, $P=0.009$) and low C4/C3 levels (0 vs 32%, $P=0.016$) in comparison with patients carrying MBL-sufficient genotypes. Only three (25%) patients carrying MBL-low genotypes presented some of the immunological markers closely associated with the main extraglandular features of primary SS (anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, low C3/C4 levels, cryoglobulins and monoclonal serum immunoglobulins) in comparison with 49 (71%) of patients carrying MBL-sufficient genotypes ($P=0.004$). No patient with primary SS carrying the homozygous deficient genotype 0/0 had anti-Ro/SS-A or anti-La/SS-B antibodies, low C3/C4 levels or circulating cryoglobulins.

We also analysed the clinical significance of the MBL2 polymorphisms in the 46 patients who only fulfilled the 1993 criteria (Ro/La-negative patients). Patients carrying MBL-low genotypes had a lower prevalence of systemic manifestations (9 vs 43%, $P=0.04$) and a lower frequency of immunological markers including ANA (64 vs 80%), RF (0 vs 17%), low C3 levels (18 vs 23%), low C4 levels (0 vs 6%) and cryoglobulins (0 vs 9%) in comparison with patients carrying MBL-sufficient genotypes, although the differences did not reach statistical significance. No patient carrying MBL-low genotypes had positive RF, hypocomplementaemia or circulating cryoglobulins.

MASP2 polymorphism

Five (6%) patients with primary SS were heterozygous for the MASP2 D105>G variant, a prevalence similar to that found in SLE patients (8%) but higher than that found in the 1993 SS patients (2%) and in healthy controls (3%). No statistically significant association was found between the MASP2 variant and the main epidemiological, clinical and immunological characteristics of primary SS.

Discussion

MBL is a liver-derived type C lectin protein that binds to certain carbohydrate motifs on the surface of pathogens, damaged host cells and immune complexes [7]. This activates MASPs and results in the formation of C3-convertase, which facilitates removal of pathogens by opsonophagocytosis or complement-mediated lysis. Low MBL levels have been associated with an inadequate innate immune response, increasing the risk of infection especially in immunocompromised subjects [31], while its possible involvement in susceptibility to autoimmune diseases is unclear. Experimental studies have shown that the MBL-deficient murine model does not develop a broad spectrum of autoimmune processes (glomerulonephritis, ANA and dsDNA titres) in comparison with age-matched mice controls [32]. In clinical studies of patients with SLE, investigation of the possible aetiopathogenic role of MBL deficiency initially centered on a hypothetically increased risk of

infection, with controversial results [33, 34]. However, interest has recently turned to the possible influence of MBL deficiency in the clinical expression of SLE, and several studies have described a close association with cardiovascular disease, chronic damage and APS [18, 20, 35].

Regarding the study of genetic susceptibility to primary SS, recent studies suggest that investigation of the clinical significance of MBL variant alleles may be of interest. On the one hand, experimental studies in murine models have demonstrated the up-regulated expression of the MBL-A gene in corneas [36] and lymphoid infiltration of salivary glands in the MBL-null mice model [32]. On the other hand, clinical studies have recently highlighted the key role of hypocomplementaemia in the systemic disease expression and outcomes of patients with primary SS [23–25]. Preliminary studies on the prevalence of MBL genotypes A/A, A/0 and 0/0 in primary SS from Finland, Japan and Australia mainly centered on analysing possible differences in the prevalence of these genotypes with respect to control groups, with contrasting results [37–39]. Wang *et al.* [38] found a lower frequency of polymorphisms of the 54 codon in SS patients in comparison with controls, while Aittoniemi *et al.* [37] and Mullighan *et al.* [39] found no statistically significant differences. In this study, we included additional MBL genotypes (analysing polymorphic positions in the promoter region together with those at codons 52, 54 and 57) and found MBL-low genotypes in 15% of patients with primary SS, a similar prevalence to that seen in SLE patients (20%) and healthy controls (18%). This suggests that MBL-deficient polymorphisms have little influence in genetic susceptibility to primary SS.

In contrast, we found that MBL genotypes were associated with the clinical and immunological expression of primary SS. Clinically, our patients carrying MBL-low genotypes were characterized by a less severe involvement, with a statistical trend for a lower frequency of involvement in parotid scintigraphy and a statistically significantly lower prevalence of extraglandular involvement. Some studies have suggested that high levels of MBL are related to tissue damage [40] and that high levels of MBL in patients carrying wild-type MBL genotypes may facilitate autoimmune tissue damage [41]. It may be hypothesized that, in primary SS, MBL-sufficient levels could be necessary to induce the autoimmune-mediated damage, while patients carrying MBL-low genotypes may be protected against severe autoimmune involvement. Thus, hypothetical blockade of the MBL pathway could reduce chronic autoimmune damage in SS patients, with reduced MBL levels leading to a low degree of complement activation and inflammation, as suggested by the low serum levels of acute-phase reactants and pro-inflammatory cytokines in our patients carrying MBL-low genotypes.

Patients with primary SS carrying MBL-low genotypes had a lower frequency of positive autoantibodies, including ANA, RF and aCLs, especially a lower prevalence of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies. Recent studies have found that SLE patients carrying MBL-low genotypes have a higher frequency of anti-dsDNA, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B but a lower frequency of aCLs, anti-RNP and anti-Sm antibodies in comparison with SLE patients carrying non-deficient genotypes [42, 43]. This suggests that MBL genotypes may induce different patterns of autoantibodies in each autoimmune disease. Therefore, high MBL levels may be important in mounting autoimmune response against Ro and La antigens in patients with primary SS.

None of our patients carrying MBL-low genotypes had low C3/C4 levels or positive cryoglobulins, which are key prognostic factors in primary SS. This is consistent with the functional role of MBL in complement activation. MBL pathway dysfunction in variant allele carriers is associated with reduced MBL ligand binding and a relative increase in low-molecular mass MBL. Roos *et al.* [44] found that sera from individuals with mutations in the MBL2 gene showed significantly less activation of C4 by IgA and mannose than sera from individuals with the wild-type genotype.

Moreover, Seelen *et al.* [45] found that patients with MBL variant alleles have an impaired ability to activate exogenous C4 by MBL/MASP complexes bound to mannose, as well as an impaired capacity to activate the whole complement cascade upon binding of MBL to mannose. Histological studies have shown an increase in the level of heterogeneity of the binding sites for mannose in salivary glands of patients with SS [46], suggesting that genetic MBL heterogeneity may influence the degree of autoimmune damage and inflammation.

This poses the question of whether MBL deficiency could be beneficial in patients with primary SS. Our data suggest that MBL polymorphisms have little influence on genetic susceptibility to primary SS but much more influence on the genetic modification of disease expression, with MBL-deficient genotypes being associated with milder disease. The possible protective role of low MBL levels in inflammatory and autoimmune processes is a hypothesis proposed by Casanova and Abel [47] and supported by recent genetic, experimental and clinical studies. First, the worldwide extension of deleterious *MBL2* haplotypes suggests that carrying MBL-low genotypes may be potentially beneficial and not harmful [48]. Secondly, the MBL-deficient murine model has significant protection against skeletal muscle reperfusion injury [49]. Thirdly, patients with low MBL levels seem to be protected against some intracellular infections such as tuberculosis [50], leishmaniasis [51] or HIV [52]. Fourthly, some patients with autoimmune diseases such as primary biliary cirrhosis have a higher frequency of MBL-high genotypes [53]. Taken together, these data suggest that MBL deficiency may provide some form of protection against the development of some inflammatory or autoimmune processes such as primary SS. However, recent studies have shown that MBL deficiency has been associated with an enhanced susceptibility to cardiovascular and thrombotic events [18, 20, 35]. This suggests that MBL deficiency may play a different role in each autoimmune disease.

This is the first study to analyse the prevalence and clinical significance of the genetic variability of *MASP-2* in patients with a systemic autoimmune disease. We found a low prevalence of *MASP-2* mutations in patients with primary SS, which was similar to that of the control groups. Thus, *MASP-2* polymorphisms seem to have little clinical significance in primary SS.

We also analysed the clinical significance of *MBL2* polymorphisms in a subset of patients with negative anti-Ro/La antibodies who did not fulfil the 2002 criteria [27] due to the lack of salivary gland biopsy. In these patients, MBL-low genotypes were associated with a lower frequency of systemic involvement and immunological markers, similar to that found in patients fulfilling the 2002 criteria. This suggests that genetically induced low levels of MBL may be protective against severe autoimmune involvement not only in primary SS patients fulfilling the 2002 criteria, but also in those with negative Ro/La antibodies who only fulfilled the 1993 criteria.

In conclusion, patients with primary SS carrying MBL-deficient genotypes have a less severe systemic and immunological disease expression in comparison with those carrying MBL-sufficient genotypes. In contrast, *MASP-2* mutations have little clinical significance. In primary SS, insufficient levels of MBL may represent a protective factor against the development of more aggressive autoimmune damage.

Acknowledgements

The authors wish to thank David Buss for his editorial assistance.

Funding: This study was funded by La Marató de TV3 (grant 071810), Spanish Research Network on Infectious Diseases (REIPI, RD06/008/1013) from Instituto de Salud Carlos III and Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 080103).

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

References

- 1 Fox RI. Sjogren's syndrome. *Lancet* 2005;366:321–31.
- 2 Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjogren syndrome. *Arch Intern Med* 2004;164:1275–84.
- 3 Ramos-Casals M, Font J. Primary Sjogren's syndrome: current and emergent aetiopathogenic concepts. *Rheumatology* 2005;44:1354–67.
- 4 Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Font J. Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis* 2005;64:347–54.
- 5 Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin-complement pathway—its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* 2004;198:185–202.
- 6 Takahashi K, Ip WE, Michelow IC, Ezekowitz RA. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Curr Opin Immunol* 2006;18:16–23.
- 7 Saevardottir S, Vikingsdottir T, Valdimarsson H. The potential role of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes. *Scand J Immunol* 2004;60:23–9.
- 8 Arnold JN, Dwek RA, Rudd PM, Sim RB. Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. *Immunol Lett* 2006;106:103–10.
- 9 Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2003;37:1496–505.
- 10 Crosdale DJ, Ollier WE, Thomson W *et al.* Mannose binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids. *Eur J Immunogenet* 2000;27:111–7.
- 11 Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* 2000;2:305–22.
- 12 Madsen HO, Garred P, Thiel S *et al.* Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995;155:3013–20.
- 13 Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency—revisited. *Mol Immunol* 2003;40:73–84.
- 14 Ip WK, Chan SY, Lau CS, Lau YL. Association of systemic lupus erythematosus with promoter polymorphisms of the mannose-binding lectin gene. *Arthritis Rheum* 1998;41:1663–8.
- 15 Crosdale DJ, Ollier WE, Thomson W *et al.* Mannose binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids. *Eur J Immunogenet* 2000;27:111–7.
- 16 Steffensen R, Hoffmann K, Varming K. Rapid genotyping of *MBL2* gene mutations using real-time PCR with fluorescent hybridisation probes. *J Immunol Methods* 2003;278:191–9.
- 17 Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 2006;68:193–209.
- 18 Ohlenschlaeger T, Garred P, Madsen HO, Jacobsen S. Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *New Engl J Med* 2004;351:260–7.
- 19 Mullighan CG, Heatley S, Doherty K *et al.* Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2002;99:3524–9.
- 20 Font J, Ramos-Casals M, Brito-Zerón P *et al.* Association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with antiphospholipid syndrome, cardiovascular disease and chronic damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2007;46:76–80.
- 21 Degn SE, Thiel S, Jensenius JC. New perspectives on mannan-binding lectin-mediated complement activation. *Immunobiology* 2007;212:301–11.
- 22 Davies EJ, Teh LS, Ordi-Ros J *et al.* A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population. *J Rheumatol* 1997;24:485–8.
- 23 Ioannidis JP, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002;46:741–7.
- 24 Theander E, Manthorpe R, Jacobsson LT. Mortality and causes of death in primary Sjogren's syndrome: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004;50:1262–9.
- 25 Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Bove A, Sentis J, Font J. Predicting adverse outcomes in primary Sjogren's syndrome: identification of prognostic factors. *Rheumatology* 2007;46:1359–62.
- 26 Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM *et al.* Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1993;36:340–7.
- 27 Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R *et al.* European Study Group on Classification Criteria for Sjogren's Syndrome. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European consensus group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554–8.

Rheumatology key messages

- The possible protective role of low MBL levels in autoimmune processes is supported by recent studies.
- SS patients with MBL-low genotypes have a less pronounced systemic and immunological disease expression in comparison with those carrying MBL-sufficient genotypes.
- In primary SS, MBL-deficient genotypes may represent a protective factor against the development of more aggressive autoimmune damage.

- 28 Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Rosas J *et al*. Primary Sjogren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. *Medicine* 2002;81:270–80.
- 29 Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M *et al*. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine* 2002;81:281–92.
- 30 Lozano F, Suárez B, Muñoz A *et al*. Novel *MASP2* variants detected among North African and Sub-Saharan individuals. *Tissue Antigens* 2005;66:131.
- 31 Bouwman LH, Roos A, Terpstra OT *et al*. Mannose binding lectin gene polymorphisms confer a major risk for severe infections after liver transplantation. *Gastroenterology* 2005;129:408–14.
- 32 Stuart LM, Takahashi K, Shi L, Savill J, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J Immunol* 2005;174:3220–6.
- 33 Garred P, Madsen HO, Halberg P *et al*. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:2145–52.
- 34 Bultink IE, Hamann D, Seelen MA *et al*. Deficiency of functional mannose-binding lectin is not associated with infections in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R183.
- 35 Calvo-Alén J, Alarcón GS, Tew MB *et al*. LUMINA Study Group. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXIV. Deficient mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms are associated with cerebrovascular but not with other arterial thrombotic events. *Arthritis Rheum* 2006;54:1940–5.
- 36 Wang Y, Liu T, Gong H *et al*. Gene profiling in murine corneas challenged with *Aspergillus fumigatus*. *Mol Vis* 2007;13:1226–33.
- 37 Aittoniemi J, Pertovaara M, Hulkkonen J *et al*. The significance of mannan-binding lectin gene alleles in patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 2002;31:362–5.
- 38 Wang ZY, Morinobu A, Kanagawa S, Kumagai S. Polymorphisms of the mannose binding lectin gene in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2001;60:483–6.
- 39 Mullighan CG, Heatley S, Bardy PG, Lester S, Rischmueller M, Gordon TP. Lack of association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2000;43:2851–2.
- 40 Walsh MC, Bourcier T, Takahashi K *et al*. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Immunol* 2005;175:541–6.
- 41 Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 2006;68:193–209.
- 42 Piao W, Liu CC, Kao AH *et al*. Mannose-binding lectin is a disease-modifying factor in North American patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2007;34:1506–13.
- 43 García-Laorden MI, Rúa-Figueroa I, Pérez-Aciego P *et al*. Mannose binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from Canary Islands, Spain. *J Rheumatol* 2003;30:740–6.
- 44 Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol* 2001;167:2861–8.
- 45 Seelen MA, van der Bijl EA, Trouw LA *et al*. A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2005;44:111–9.
- 46 Steinfeld S, Penaloza A, Ribai P *et al*. D-mannose and N-acetylglucosamine moieties and their respective binding sites in salivary glands of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1999;26:833–41.
- 47 Casanova JL, Abel L. Human mannose-binding lectin in immunity: friend, foe, or both? *J Exp Med* 2004;199:1295–9.
- 48 Verdu P, Barreiro LB, Patin E *et al*. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of *MBL2* deficiency alleles. *Hum Mol Genet* 2006;15:2650–8.
- 49 Chan RK, Ibrahim SI, Takahashi K *et al*. The differing roles of the classical and mannose-binding lectin complement pathways in the events following skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Immunol* 2006;177:8080–5.
- 50 Søborg C, Madsen HO, Andersen AB, Lillebaek T, Kok-Jensen A, Garred P. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J Infect Dis* 2003;188:777–82.
- 51 Alonso DP, Ferreira AF, Ribolla PE *et al*. Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. *J Infect Dis* 2007;195:1212–7.
- 52 Dzwonek A, Novelli V, Bajaj-Elliott M, Turner M, Clapson M, Klein N. Mannose-binding lectin in susceptibility and progression of HIV-1 infection in children. *Antivir Ther* 2006;11:499–505.
- 53 Matsushita M, Miyakawa H, Tanaka A *et al*. Single nucleotide polymorphisms of the mannose-binding lectin are associated with susceptibility to primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2001;17:251–7.

Mannose-binding lectin-low genotypes are associated with milder systemic and immunological disease expression in primary Sjögren Syndrome

OBJETIVOS

1. Investigar la asociación de los genotipos deficientes de MBL (*O/O*, *O/XA* y *XA/XA*) con la expresión clínica e inmunológica del SSp diagnosticado según los criterios clasificatorios Americanos-Europeos del año 2002.
2. Comparar los resultados obtenidos frente a grupos controles que incluyen pacientes con SS que cumplen exclusivamente con los criterios europeos clasificatorios de SSp del año 1993, pacientes con LES y pacientes sanos.

PRINCIPALES RESULTADOS

- El 15% de los pacientes con SSp tenían genotipos deficientes de MBL, de los cuales el genotipo *O/XA* fue el más frecuente. Ninguno de estos pacientes tenía púrpura, glomerulonefritis o compromiso neurológico.
- La prevalencia de los genotipos deficientes de MBL en los pacientes con SS fue similar a la encontrada en los pacientes con LES (20%) y los controles sanos (18%).
- Comparando la prevalencia de genotipos de MBL2 y de los haplotipos, los pacientes con SSp tenían con mayor frecuencia el genotipo *XA/A* y con menor frecuencia el *A/A* que los pacientes con LES.

-
- Desde el punto de vista inmunológico, los pacientes con genotipos deficientes de MBL presentaron de forma significativa menor frecuencia de autoanticuerpos anti-Ro, anti-La y niveles menores de las fracciones C3 y C4 del complemento.

CONCLUSIONES

Pudimos observar que nuestros pacientes portadores de genotipos MBL-deficientes se caracterizaron por presentar un compromiso menos severo de la enfermedad con una prevalencia estadísticamente significativa de menor aparición de compromiso extraglandular; lo que podría representar un factor protector contra el desarrollo de una enfermedad autoinmune más agresiva.

La similitud entre la prevalencia de los portadores de genotipos deficientes entre el SS, LES y controles sanos, sugiere que este polimorfismo tiene poca influencia en la susceptibilidad genética para el SSp, pero mucha más influencia en la modificación genética de la expresión de la enfermedad, considerando su asociación con una enfermedad de carácter más leve.

DISCUSIÓN

1. AUTOANTICUERPOS EN EL SÍNDROME DE SJÖGREN: SIGNIFICADO CLÍNICO

1.1. Anticuerpos antinucleares

El SS primario es una enfermedad autoinmune sistémica que afecta fundamentalmente mujeres de mediana edad (relación 14:1), siendo las características más frecuentes, xerostomía, xeroftalmía, con ANA, anti SS-A/Ro y FR positivos (97,209). Uno de los hallazgos más importantes en el presente estudio es la descripción del SS como una enfermedad que puede expresar diversos aspectos inmunológicos, debido a la presencia de una cantidad de autoanticuerpos contra antígenos tanto nucleares como no nucleares, siendo los ANA los autoanticuerpos más frecuentemente detectados. Los pacientes con SS primario también presentaron una alta prevalencia de algunos antígenos no nucleares como el anti-ML (62%), mientras que la presencia de autoantígenos contra antígenos nucleares diferentes de Ro/La fue muy infrecuente, con menos del 2% de los pacientes presentando anticuerpos anti-RNP o anti-Sm.

Se observó la presencia de ANA en más del 80% de nuestros pacientes con SS primario y en cerca de la mitad de los casos a títulos altos ($>1/320$). Los ANA fueron descubiertos durante el estudio del fenómeno de las células LE (318) y han llegado a ser la prueba inmunológica clave para el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes sistémicas (180,319), teniendo menor significado a títulos bajos que a títulos altos (320). Aunque los ANA no fueron incluidos en los criterios clasificatorios del 2002 para el SS, los resultados de esta tesis sugieren que el papel de este anticuerpo en el diagnóstico de los

pacientes con sospecha de SS debería ser reconsiderado por varias razones. En primer lugar, los ANA fueron los anticuerpos detectados con mayor frecuencia en el SSp y su determinación juega un papel central para diferenciar el SS de las causas no autoinmunes de síndrome sicca. En segundo lugar, los ANA estuvieron asociados con varias características extraglandulares y analíticas del SS, como ya fue publicado en otros estudios (321-323); en este estudio también se observa una estrecha asociación entre títulos altos de ANA e hipergammaglobulinemia, VSG aumentada y un alto número de autoanticuerpos ENA.

Con respecto a los valores de dilución de los ANA, encontramos que en pacientes con títulos $\geq 1/80$ estaban asociados con la presencia de Ro/La positivos. Los anticuerpos contra antígenos nucleares diferentes del Ro/La (como los RNP y Sm) fueron detectados fundamentalmente en pacientes con altos títulos de ANA ($\geq 1/320$). Esto sugiere que en pacientes diagnosticados con SS primario, los títulos de ANA mayores o iguales a 1/80 están estrechamente relacionados con la presencia de autoanticuerpos anti-ENA; Además la presencia de ANA a títulos $\geq 1/80$ tiene un excelente valor predictivo positivo (91%) para la clasificación de pacientes con SS primario, acorde a los criterios del 2002. Considerando esta evidencia, creemos que un pacientes con síndrome seco, test ocular positivo y gammagrafía parotídea positiva con ANA $\geq 1/80$ debería ser clasificado como un SS primario en ausencia de una enfermedad autoinmune sistémica coexistente, aún cuando los anticuerpos Ro/La sean negativos.

Encontramos además una alta prevalencia de características analíticas y extraglandulares en pacientes con SS primario con títulos de ANA $\geq 1/80$ y

anticuerpos Ro/La positivos. En estudios previos de series pequeñas de pacientes se encontró una estrecha correlación entre anticuerpos Ro/La positivos y manifestaciones extraglandulares (324-328), marcadores serológicos (324,325,328,329) y un número alto de focos en la biopsia de glándulas salivares (322,330). Probablemente un subgrupo de pacientes con SS primario y anticuerpos Ro/La represente la forma de presentación de una enfermedad clínica e inmunológicamente más “activa”. En estos pacientes debe realizarse un seguimiento clínico mucho más exhaustivo para la identificación y tratamiento temprano de características extraglandulares. Sin embargo, nosotros consideramos que la presencia de Ro/La probablemente identifica un subgrupo específico de la enfermedad y no debería ser considerado *per se* como un criterio obligado para el SS primario. Además, detectamos que algunos de los subgrupos descritos en un estudio previo (97) fueron principalmente Ro/La negativo: 22 (85%) de los 26 pacientes masculinos fueron negativos, como fueron 33 (77%) de los 43 pacientes con SS de comienzo tardío y 91 (68%) de los 134 pacientes con enfermedad limitada a síntomas secos. La inclusión de anticuerpos Ro/La positivos como un criterio obligatorio, limita el diagnóstico de SS primario a un subgrupo muy específico de pacientes, excluyendo la mayoría de los pacientes masculinos, aquellos de comienzo tardío y aquellos sin afectación extraglandular.

1.2. Anticuerpos contra antígenos no nucleares

En contraste con los anticuerpos antinucleares, el significado clínico de los anticuerpos contra antígenos no nucleares no ha sido evaluado en el SS primario. En esta tesis, se han descrito datos relevantes sobre su prevalencia y

significado clínico. En primer lugar, estos anticuerpos son detectados en el SS primario en porcentajes muy diferentes; así, los anti-SMA fueron los segundos anticuerpos más frecuentemente hallados en nuestros pacientes, los anticuerpos ACP fueron encontrados con una frecuencia similar por ejemplo a los anticuerpos anti SS-B/La y los anti LKM-1 fueron negativos en todos los pacientes. En segundo lugar, el significado clínico de estos autoanticuerpos difiere del de aquellos anticuerpos contra antígenos nucleares. Contrariamente a los anticuerpos antinucleares, los cuales están estrechamente asociados con características extraglandulares y analíticas del SS, los anticuerpos contra antígenos no nucleares están muy relacionados con la presencia de enfermedades autoinmunes órgano específicas, principalmente hepática y procesos autoinmunes tiroideos. Los anticuerpos ACP han sido relacionados con gastritis atrófica crónica y anemia perniciosa, aunque esto nunca se ha investigado en pacientes con SS primario. En el año 2002, revisamos manifestaciones hematológicas de nuestra cohorte de pacientes y solo encontramos 2 casos de los 380 (209), con solo 4 casos adicionales que fueron publicados en la literatura (158-160), sugiriendo que la anemia perniciosa es un hallazgo muy infrecuente en el SS primario. Además, existió un pequeño subgrupo de pacientes con SS primario y AMA positivo (8%) un marcador inmunológico estrechamente relacionado con la cirrosis biliar primaria (CBP) (331). Es destacable, que sólo el 50% de nuestros pacientes SS-AMA+ tenían evidencia clínica o analítica de compromiso hepático. Esto sugiere la existencia de una CBP incompleta o incipiente en algunos pacientes con SS primario con AMA, por lo que se le considera un marcador inmunológico temprano de esta enfermedad hepática asociada. A pesar de su significativa prevalencia, los

anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos parecen tener un menor significado clínico comparado con los anticuerpos antinucleares por lo que no recomendamos su determinación de manera rutinaria en pacientes con SS primario, excepto en aquellos con alteraciones analíticas específicas como enzimas hepáticas en el límite o anemia macrocítica.

Una vez descartada la infección por HCV, la CBP ha sido la principal causa de enfermedad hepática en nuestros pacientes con SS primario, en concordancia con el estudio de Lindgren y col. (89) y Skopouli y col. (90). Los pacientes con SS y AMA-M2 positivos, muestran un amplio espectro de alteraciones en el perfil analítico hepático, incluyendo tres pacientes sin clínica ni analítica sugestiva de hepatopatía, como ya ha sido publicado en casos previos (89,90,34). Estudios previos en pacientes sin SS han demostrado que pacientes con AMA-M2 sin datos clínicos o analíticos de compromiso hepático poseen un mayor riesgo de desarrollar una CBP sintomática (332), interpretando el papel clave del AMA-M2 como un marcador inmunológico temprano de CBP (333). Moutsopoulos y col. describieron en pacientes con SSp, un patrón compatible con colestasis hepática en el 8.8% de los casos y vieron que aproximadamente la mitad tanto de los pacientes con AMA positivo (5,1%) como los negativos, tenían una biopsia hepática compatible con CBP, demostrando que es un evento poco frecuente, con una evolución leve y de lenta progresión. (334)

Aunque no existen guías terapéuticas para estos pacientes asintomáticos, debe tenerse en consideración el uso temprano de ácido ursodesoxicólico, dado que algunos estudios en pacientes sin SS con alteraciones analíticas leves han sugerido que el tratamiento con ácido ursodesoxicólico puede prevenir una

posible evolución a cirrosis hepática (335). Por estas razones, nosotros recomendamos la inclusión de AMA en la rutina inmunológica de seguimiento de los pacientes con SS independientemente de si el perfil analítico hepático esté alterado o no, debido a la fuerte asociación que existe entre los AMA-M2 y el desarrollo de CBP.

La HAI ha sido la otra enfermedad hepática autoinmune detectada en nuestros pacientes con SS primario, aunque menos frecuentemente que la CBP. Hay 51 casos reportados de HAI en pacientes con SS primario (incluyendo nuestros 8 casos) y todos son HAI tipo 1 (336). Una característica adicional de la HAI asociada con el SS primario es que la mayoría de los casos publicados (33 de 51, el 65%) son de países orientales. Otras enfermedades autoinmunes hepáticas han sido descritas de manera poco frecuente en pacientes con SS primario incluyendo 13 casos de colangitis esclerosante (CE), 6 casos de colangitis autoinmune y un caso de hiperplasia nodular regenerativa hepática (337).

1.3. Anticuerpos anti-Ro/SS-A

Los anticuerpos contra el antígeno Ro/SSA se describieron por primera vez en 1962 en el suero de pacientes con SSp. Se consideran los autoanticuerpos con mayor especificidad para el diagnóstico del SSp, aunque aparezcan en porcentajes variables (30 - 70%, según la técnica empleada y la cohorte estudiada). Desde un punto de vista clínico, se ha observado una relación entre estos anticuerpos y el desarrollo de diversas manifestaciones extraglandulares e inmunológicas presentes en el SSp. Así, en nuestra cohorte de pacientes encontramos una asociación estadísticamente significativa con la presencia de

adenopatías, vasculitis, neuropatía periférica, parotidomegalia, fenómeno de Raynaud, biopsia salivar positiva, VSG elevada y citopenias hematológicas.

1.3.1. Manifestaciones cutáneas

Dentro de las manifestaciones clínicas, la más conocida es la afección cutánea. En estudios japoneses, prácticamente el 100% de los pacientes con SSp que desarrollan eritema anular producen anti-Ro. Las lesiones de eritema anular son prácticamente similares a las que se observan en el lupus cutáneo subagudo, y diversos autores han sugerido que podrían representar variaciones de un proceso patogénico similar. Por otra parte, los anti-Ro también se han relacionado con la presencia de vasculitis cutánea en pacientes con SSp. Alexander et al describieron una mayor frecuencia de anti-Ro en pacientes con SSp y vasculitis respecto a los que no presentaban afección cutánea (86% frente al 19%), asociación comprobada por otros autores y por nuestro grupo. Incluso, Provost et al definieron 2 tipos de vasculitis en el SSp, una vasculitis leucocitoclástica que cursa con títulos altos de anti-Ro y FR y una vasculitis linfocitaria, habitualmente seronegativa. En nuestros pacientes anti-Ro+ también hemos podido observar una mayor frecuencia de reacciones alérgicas cutáneas y de fotosensibilidad.

1.3.2. Manifestaciones neurológicas

Otra de las manifestaciones extraglandulares del SSp más asociadas con la presencia de anti-Ro/SSA es la afección neurológica. Alexander et al (327) encontraron mayor prevalencia de anti-Ro en pacientes con SSp y enfermedad neurológica activa y progresiva, especialmente en los casos de enfermedad

focal progresiva del SNC, alteraciones en la TC craneal o en la RM, o bien datos sugestivos de angitis de pequeño vaso en la angiografía cerebral. Los estudios *in vitro* realizados por los mismos autores parecen indicar un papel etiopatogénico directo de los anticuerpos anti-Ro/SSA en las lesiones vasculares cerebrales. En otros trabajos también se ha descrito la asociación entre SSp, anti-Ro/SSA y meningitis aséptica.

1.3.3. Afección fetal y neonatal

Por otra parte, existe una clara relación entre la existencia de anticuerpos anti-Ro/SSA maternos y alteraciones tanto en el feto (bloqueo cardíaco congénito) como en el recién nacido (lupus neonatal). Incluso el primer dato sugestivo de SSp en mujeres Ro positivas asintomáticas puede ser el nacimiento de un niño con bloqueo cardíaco congénito, ya que el 60% de las madres están asintomáticas en el momento del diagnóstico de la alteración fetal y/o neonatal.

1.3.4. Alteraciones hematológicas

Además de la asociación del anti-Ro/SSA con manifestaciones extraglandulares del SSp, también se han asociado con la existencia de ciertas hemocitopenias como anemia, leucopenia, linfopenia y plaquetopenia. Recientemente, corroboramos la asociación con leucopenia en un análisis estadístico multivariado. Por otra parte, diversos autores han asociado la existencia de hipergammaglobulinemia con anti-Ro. De todas formas, nuestros resultados no han mostrado un papel pronóstico significativo de estos anticuerpos en la evolución de los pacientes con SSp.

1.3.5. Significado clínico de los anticuerpos contra subunidades Ro52/Ro60

Históricamente, estos autoanticuerpos han sido considerados como un sistema de autoanticuerpos uniforme, sin embargo, estudios recientes proporcionaron evidencia de que el Ro60 y el Ro52 no son parte de un complejo macromolecular estable y que estos anticuerpos tienen diferentes asociaciones clínicas (338).

El Ro52 se ha identificado como una ligasa E3 que media la ubiquitinación de varios miembros de la familia del FRI (factor regulador de interferón) y que está implicada en el papel de los macrófagos de la inmunidad innata (339). El Ro60 kd es un miembro del complejo de ribonucleoproteínas y se vio que su principal epítipo celular B, correspondiente a la región de aminoácidos 169-190 era el blanco principal de la respuesta autoinmune en pacientes con LES. Esta secuencia puede ser potencialmente modificada postraslacionalmente lo cual podría alterar la antigenicidad del anticuerpo. Las modificaciones postraslacionales del principal epítipo de células B Ro/60 puede alterar la unión a autoanticuerpos (340).

En algunos estudios se vio que la prevalencia de anti-Ro52 fue significativamente mayor que la de Ro60 en varias EAS incluidas el SSp y que en esta enfermedad era mayor que en el LES y se relacionaba con la presencia de FR positivo (341).

En estudios experimentales se demostró que el LES asociado a la proteína Ro52 es un importante regulador negativo de la producción de citoquinas inflamatorias y esto proporciona un mecanismo por el cual una función defectuosa del Ro52 puede conducir a la inflamación tisular y a la

autoinmunidad sistémica a través de la vía Th17 de la IL- 23 (342). También se han relacionado polimorfismos en el gen del Ro52 con el SSp y el LES, pero el mecanismo molecular por el cual promueve el desarrollo de una EAS no ha sido estudiado completamente. En estudios con ratones, el Ro52 se relacionó con dermatitis grave y con el desarrollo posterior de autoanticuerpos DNA, proteinuria y compromiso renal (342).

En el embarazo, los niveles de Ro52/60 descienden progresivamente desde estadios más tempranos a tardíos. No se han observado picos ni elevación persistente de niveles de anticuerpos en ningún embarazo con riesgo de bloqueo congénito por lo que algunos estudios concluyen que los niveles maternos de autoanticuerpos Ro52/60 y La tienden más a disminuir que a aumentar durante el embarazo (343). En cambio, en otros casos donde se trataron de identificar epítopes de anti-Ro 52/60 asociados con lupus neonatal y bloqueo cardíaco congénito, se observó que entre la 18ª y la 30ª semana de gestación existía un claro aumento en los niveles de reactividad contra diferentes péptidos del Ro52 y que algunos péptidos tenían una reacción cruzada con residuos de receptores serotoninérgicos del corazón, lo que podría ser un hecho importante desde un punto de vista etiopatogénico. En este sentido existen estudios donde los niveles de estos subgrupos de Ro52 disminuyen al final del embarazo para luego desaparecer. Todo ello nos conduce a concluir que estos anticuerpos podrían representar importantes biomarcadores para predecir una complicación en mujeres lúpicas embarazadas con anticuerpos Ro52 (344) si bien la detección aislada de antiRo 52Kd tiene un valor clínico limitado en la población no obstétrica durante las pruebas estándar de anti ENA (345).

Existen estudios que apoyan el papel de los epítopes como marcadores diagnósticos en el LES y el SSp, como por ejemplo algunos epítopes de SSB/La que reaccionan con el suero de madres con niños con bloqueo cardíaco congénito (346).

La opsonización de cardiocitos apoptóticos por los anticuerpo antiRo/La maternos, contribuye al daño tisular en el síndrome del lupus neonatal. Los anti Ro60 se unen específicamente a las células apoptóticas tempranas y permanecen accesibles sobre la superficie celular desde la apoptosis temprana a la tardía. Por el contrario los antiLa se unen exclusivamente a las células apoptóticas tardías en experimentos controlados, mientras que los Ro52 no estuvieron accesibles para la unión a anticuerpos en ambas poblaciones apoptóticas (347).

Aproximadamente el 20% de los anti-Ro52 o Ro60 pueden ser indetectables si se utiliza una mezcla de los dos antígenos; por lo que algunos estudios sugieren que la detección por separado es preferible en el marco de un diagnóstico clínico (338).

Tzioufas y col. describieron una posible reacción cruzada entre un péptido derivado de una proteína del virus Cocksackie y el autoantígeno Ro60 en pacientes con SSp, reacción que potencialmente podría jugar un papel en la formación de autoanticuerpos y en la perpetuación de la respuesta inmune contra Ro y La (348).

1.4. Anticuerpos anti-La/SS-B

Diversos estudios han analizado la relación entre los anticuerpos anti-La/SSB y las manifestaciones clínicas del SSp. Venables et al encontraron una

asociación entre el anti-La/SS-B, parotidomegalia y el desarrollo de púrpura cutánea (299). Otros autores han descrito su asociación con la leucopenia, la linfopenia, la hipergammaglobulinemia, el FR, la parotidomegalia y la vasculitis(295-298). Por otra parte, se ha descrito mayor afección articular, fenómeno de Raynaud, vasculitis cutánea, afección tiroidea y positividad para ANA, FR y anti-Ro/SS-A en aquellos con anti-La/SSB, además de una posible asociación con linfopenia y trombocitopenia.

Lo habitual es que la detección de anticuerpos anti-La esté invariablemente asociada a la presencia de anticuerpos anti-Ro, aunque en cerca de un 5% de casos podemos observar anticuerpos anti-La en pacientes con anticuerpos anti-Ro negativos.

1.5. Factor reumatoide

El FR es una inmunoglobulina IgM dirigida contra la fracción Fc de inmunoglobulinas autólogas circulantes IgG. En la mayoría de los estudios realizados en pacientes con SSp se ha demostrado un porcentaje elevado de positividad para el FR, cercana al 50%. La prevalencia de FR en nuestra serie es cercana al 40%. Sin embargo, son pocos los trabajos que han analizado la asociación entre la presencia de FR y las manifestaciones clínicas e inmunológicas del SSp.

Los escasos trabajos que han analizado la relación entre el FR y las manifestaciones extraglandulares del SSp, han descrito una asociación entre el FR y el flujo salival estimulado, la infiltración linfocitaria en glándula salival, e incluso se ha descrito que los linfomas de glándulas salivales en pacientes con SSp se originan en células B productoras de FR. En nuestros pacientes hemos

observado una relación estadísticamente significativa con la presencia de afección articular, vasculitis cutánea, positividad para Ro/La y crioglobulinas. Es posible que en algunos pacientes con SSp, la detección de FR esté en relación con la presencia de crioglobulinemia, reflejando la actividad de tipo FR que poseen las crioglobulinas mixtas.

También es obligado realizar diagnóstico diferencial con la artritis reumatoide, sobre todo si los valores de FR son muy elevados o el paciente presenta artritis.

Ante estas situaciones puede ser de utilidad evaluar la presencia de autoanticuerpos como los anticuerpos anticitrulinados (anti-CCP) que han demostrado ser marcadores específicos para el diagnóstico de la AR con una sensibilidad del 82% y una especificidad de entre el 96-98% en contraste con la menor especificidad que posee el FR en los pacientes con AR (74%), o en los pacientes con SSp, que se observa entre el 40 y el 70% según las series (349 y 350). Diversos estudios describen una baja prevalencia de los anti-CCP (entre el 7,5% y el 9,9%) en pacientes con SSp (349-355). En algunos casos se trataba de pacientes con una importante artritis inflamatoria, inclusive con erosiones, pero que no llegaban a cumplir criterios de AR (351). Tal vez, la positividad de anti-CCP en pacientes con SSp pueda ser el predictor de una futura progresión a una AR o simplemente una expresión del proceso inflamatorio del tejido sinovial (353,355).

1.6. Crioglobulinas.

Las crioglobulinas son inmunoglobulinas circulantes que precipitan *in vitro* con el frío. Su prevalencia en los pacientes con SSp oscila entre el 5 y el 15%. El

papel de las crioglobulinas en el SSp se centra en tres importantes aspectos: su clara relación con manifestaciones clínicas de tipo vasculítico, su asociación con el VHC (obliga a descartar dicha infección en todo paciente con SSp y crioglobulinemia) y finalmente, su carácter predictivo en el posible desarrollo a linfoma. Los estudios que han analizado la asociación de las crioglobulinas con las manifestaciones clínicas del SS primario muestran una estrecha relación con la presencia de manifestaciones vasculíticas (vasculitis cutánea, neuropatía periférica o glomerulonefritis) y alteraciones inmunológicas como la hipocomplementemia o el FR (303-305). Posiblemente su principal papel sea el carácter predictivo de morbilidad y mortalidad.

2. AUTOANTICUERPOS TÍPICOS DE OTRAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES: SIGNIFICADO CLÍNICO

El diagnóstico de las EAS es un desafío clínico basado en la aplicación de acuerdos internacionales establecidos como criterios de clasificación, que con frecuencia combinan diversas manifestaciones órgano-específicas con hallazgos de autoanticuerpos circulantes. Aunque estos criterios se utilizan con frecuencia para diferenciar EAS de procesos no autoinmunes, la diferenciación entre las EAS es más compleja, dado que algunos pacientes pueden presentar patrones similares de expresión de la enfermedad. En estos casos, la presencia de un autoanticuerpo específico relacionado con una EAS puede ser útil en la confirmación del diagnóstico. Sin embargo, en algunas EAS existe una hiperreactividad de células de manera predominante, lo cual conlleva a la presencia de múltiples autoanticuerpos y de éstos, el SS primario presenta uno de los patrones inmunológicos más heterogéneos. El significado clínico de los

autoanticuerpos en el SS, considerados típicos de otra EAS es controvertido. Nosotros identificamos 224 casos previamente reportados (296, 300,301,356,383).

Hemos descrito un total de 82 pacientes con SS primario que presentaban anticuerpos relacionados con LES, SAF, ES, EMTC y vasculitis. El análisis conjunto de estos 306 casos nos lleva a sugerir que el significado clínico de esta superposición inmunológica varía ampliamente, con algunos autoanticuerpos relacionados a datos clínicos y analíticos sugestivos de una EAS diferente del SS, mientras que otros tienen una relevancia clínica aparentemente menor.

Algunos autores sugieren que la presencia de SS influye en la expresión clínica de otras EAS como por ejemplo, aumentando la fatiga o el riesgo de linfoma (384).

2.1. Significado clínico de marcadores inmunológicos relacionados con LES

Solo dos trabajos han analizado el significado clínico de los anticuerpos anti-DNA en pacientes con SS primario. Satoh y col (300) describieron a una mujer anciana con SS primario que presentaba anticuerpos anti-Sm y anti-DNA previos al desarrollo de un LES asociado, mientras que Zufferey y col (301) describieron el desarrollo de LES en 2 de 4 pacientes con SS primario en los cuales los anticuerpos anti-DNA fueron detectados entre 2 a 11 años después del diagnóstico de SS primario. El principal criterio de clasificación del LES, los autoanticuerpos anti-DNA fueron encontrados en un total de 26 pacientes con SS primario (21 de nuestra serie y los 5 casos mencionados anteriormente) el

ANA era positivo en todos los casos, leucopenia en 14 (54%) y el compromiso articular en 9 (35%), mientras que otros criterios característicos como compromiso cutáneo específico del LES, compromiso renal y del sistema nervioso central (SNC) fueron poco frecuentes. Después de un seguimiento medio de 6 años (promedio entre 2 a 11 años), 8 (31%) de los 26 pacientes SS-DNA cumplieron 4 o más de los criterios de clasificación para LES y 10 (38%) cumplieron 3 criterios (LES-like). Recientemente, Manoussakis y col. (366) describieron las características clínicas de 26 pacientes con coexistencia de LES y SS. En comparación con los pacientes con LES, los pacientes SS-LES eran de más edad y tenían mayor frecuencia de algunas características (fenómeno de Raynaud, FR y anticuerpos anti Ro/La) pero una baja frecuencia de otras (glomerulonefritis y trombocitopenia). Son varios los autores que coinciden con estos datos y remarcan que en estos pacientes, la evolución del LES es mucho más benigna que en los pacientes sin SS lo que conlleva como consecuencia menor agresividad en el tratamiento (366,385,386). Los autoanticuerpos no fueron de utilidad en la distinción entre los pacientes con LES y los pacientes SS-LES. En comparación de los pacientes con SS primario, los pacientes con SS-LES tenían una forma de presentación clínica muy similar. En un editorial acompañante, David Isenberg (387) deja entrever la superposición sustancial en las características clínicas y serológicas del SS primario y el LES y las consecuentes dificultades para lograr una clara distinción entre las enfermedades con los correspondientes criterios de clasificación. Así pues, existe una delgada línea que separa el SS primario y el SS-LES en pacientes mayores de 50 años (387,388), dado que las principales características relacionadas al LES encontradas en los pacientes SS-LES

(ANA, compromiso articular y citopenias) se observan frecuentemente en el SS primario (97,130,209,389-390). Sin embargo, algunos pacientes SS-DNA pueden desarrollar durante su seguimiento una superposición con el LES, especialmente en aquellos con compromiso articular o leucopenia.

Los anticuerpos anti-Sm raramente son hallados en pacientes con SS primario, con solo 9 casos informados (6 de nuestra propia serie). Después de un promedio de seguimiento cercano a los 5 años, los 3 pacientes SS-Sm previamente reportados desarrollaron LES, mientras que 5 de 6 pacientes SS-Sm presentaron una enfermedad LES-like con el cumplimiento de 3 criterios, 4 presentaban citopenias y 1 artritis sumados a los dos criterios inmunológicos, ANA y anti-Sm). Los 9 pacientes SS-Sm tenían anticuerpos anti-DNA negativos. Nuestros resultados sugieren que los anticuerpos anti-Sm son un evento inmunológico infrecuente, con lo cual, no recomendamos incluir los anticuerpos anti-Sm en el seguimiento inmunológico de rutina de los pacientes con SS primario.

2.2. Significado clínico de los marcadores inmunológicos relacionados con el SAF

Los anticuerpos antifosfolipídicos son los autoanticuerpos atípicos más frecuentemente detectados en el SS primario, con un total publicado de 134 pacientes con AAF, incluyendo los 36 casos descritos en nuestra tesis. Considerando lo frecuente de su hallazgo, su asociación con manifestaciones relacionadas con el SAF es muy infrecuente. Solo 13 (10%) de los pacientes SS-AAF presentaron eventos trombóticos, 12 (9%) trombocitopenia, 8 (6%) pérdida fetales, 2 (1,5%) livedo reticularis y 1 (1%) anemia hemolítica). De

acuerdo con los criterios de clasificación de 1999 (391), solo 12 (9%) de los 134 pacientes SS-AAF presentaron un SAF asociado. Aunque la mayoría de los autores sugieren que los AAF deberían ser considerados marcadores inmunológicos inespecíficos en los pacientes con SS primario, el análisis de las características clínicas e inmunológicas de estos 134 pacientes muestra una relevancia clínica mayor a la supuesta previamente. En primer lugar, estos pacientes presentaron un perfil diferente de AAF en comparación con el SAF, con una detección muy poco frecuente de Acl IgM (357,361,362). En segundo lugar, en una cuarta parte de estos pacientes con SS-AAF mostró un espectro heterogéneo de manifestaciones relacionadas con el SAF; Incluyendo pacientes con historia protrombótica pero con solo una determinación positiva aislada de AAF, pacientes con características hematológica (fundamentalmente trombocitopenia y menos frecuentemente anemia hemolítica), pacientes con AAF pero con complicaciones obstétricas no incluidas en los criterios clasificatorios actuales (menos de 3 pérdida fetales) como también los 12 pacientes que cumplían los criterios clasificatorios para SAF. Aunque solo el 3% de los pacientes con SS primario presentaron un SAF asociado, los AAF son detectados en alrededor del 25% de los casos. También se han descrito pacientes con compromiso del SNC con síndrome parkinsoniano que presentaban niveles altos de antiβ2GP1 IgG, autoanticuerpo fuertemente relacionado con los anticuerpos aCL. (392)

Contrariamente, en los pacientes con LES, los AAF son detectados en el 43% (393) mientras que el 15% cumple los criterios clasificatorios de SAF (393,394). La coexistencia del SS primario y el SAF debería ser considerada como un

evento infrecuente (pero no excepcional) que se produce en uno de cada diez pacientes con SS con AAF positivos.

Por esta razón, nosotros no recomendamos la determinación de manera rutinaria de los AAF en los pacientes con SS primario excepto en aquellos con características clínicas específicas (trombosis o abortos a repetición) o analíticas (trombocitopenia, anemia hemolítica).

2.3. Significado clínico de marcadores inmunológicos relacionados con ES

En esta tesis hemos descrito 2 pacientes con SS y anticuerpos anti-Scl 70. Ningún estudio previo ha analizado la prevalencia y el significado clínico de estos autoanticuerpos en pacientes con SS primario, y solo existen dos casos aislados de reportes de pacientes en los que coexiste SS y ES (395). Ninguno de estos 4 pacientes presentaron características clínicas sugestivas de ES, sugiriendo que estos autoanticuerpos tienen un escaso significado en el SS primario.

Contrariamente, hemos demostrado que los ACA tienen una alta prevalencia y un mayor significado clínico en los pacientes con SS primario, con un total de 48 casos informados (incluyendo nuestros 8 pacientes). El análisis conjunto de estos 48 pacientes sugiere un patrón específico de expresión clínica y evolución. Clínicamente, el análisis de los 38 pacientes SS-ACA con una adecuada descripción, mostró como características predominantes el fenómeno de Raynaud y las telangiectasias, las cuales fueron observadas en el 61% de los pacientes. Inmunológicamente, el patrón predominante consistió en títulos altos de ANA con una baja prevalencia de FR (28%) y especialmente de

anticuerpos anti-Ro/La (7%). Durante el seguimiento, se describió el desarrollo de ES limitada en 7 (25%) de los 28 pacientes, caracterizada por la aparición de cambios cutáneos incipientes de esclerodactilia. De esta manera, nosotros recomendamos realizar la determinación de ACA de manera rutinaria en pacientes con SS primario y fenómeno de Raynaud, especialmente en aquellos casos con altos títulos de ANA y anticuerpos anti-Ro/La negativos, debido a que una cuarta parte de estos puede desarrollar una ES limitada coexistente. Los pacientes SS-ACA pueden presentar un subgrupo clínico específico que inicialmente puede ser clasificado como que tienen un SS primario, pero con una alta probabilidad de desarrollar durante su seguimiento, una ES limitada asociada. En estos pacientes, recomendamos durante sus controles, realizar un examen físico en búsqueda de esos incipientes cambios cutáneos que sugieren una ES localizada, un análisis capilaroscópico subungueal y un seguimiento clínico cercano para poder detectar el posible desarrollo de manifestaciones gastrointestinales o pulmonares sugestivas de ES. Asimismo, existen descripciones de que estos pacientes constituirían un subgrupo de alto riesgo de sufrir manifestaciones extraglandulares y linfoma (396) lo que refuerza aún más la necesidad de un seguimiento exhaustivo. Algunos autores sugieren además la detección de anticuerpos contra antígenos centrómero específico (CENP-C y CENP-B) determinando que el reconocimiento de estos patrones difiere marcadamente entre los pacientes con SSp y en aquellos con esclerodermia limitada (397).

2.4. Significado clínico de los marcadores inmunológicos relacionados con la EMTC.

Solo dos estudios han analizado específicamente la presencia de anticuerpos anti-RNP en pacientes con SS primario, detectando una prevalencia general del 17% (296,367). El análisis de las características clínicas de los 30 pacientes con SS y anticuerpos anti-RNP con una adecuada descripción (incluyendo nuestros 10 pacientes) mostró un patrón específico de expresión de enfermedad, definido por una alta frecuencia de fenómeno de Raynaud (57% de los pacientes), edema de manos en el 27% de los casos y miositis en el 10%. Sin embargo, ningún paciente cumplió los criterios de clasificación de la EMTC. Desde la introducción de los criterios Europeos de 1993, la coexistencia de SS primario y la EMTC ha sido descrita muy raramente, con solo tres pacientes publicados (398-400). Nuestros hallazgos, sugieren que menos del 5% de los pacientes con SS primario pueden presentar un anticuerpo anti-RNP, asociado en algunos casos con características clínicas incluidas en los criterios de clasificación de la EMTC (fenómeno de Raynaud, edema de manos y/o artritis). Por lo que la descripción de una EMTC definida en un paciente diagnosticado de SS primario, es un evento infrecuente y la determinación rutinaria de anticuerpos anti-RNP en estos pacientes, no es recomendable.

2.5. Anticuerpos relacionados con vasculitis sistémica.

Incluyendo nuestros 13 casos, se han descrito un total de 59 pacientes con SS y ANCA positivos. Se destacan tres aspectos específicos del significado clínico de estos autoanticuerpos en pacientes con SS primario: la prevalencia de patrones diferentes de ANCA y especificidades de ELISA, la asociación con características extraglandulares específicas del SS y la superposición con vasculitis sistémica. En primer lugar, los ANCA, han sido detectados en 36

(19%) de los 194 pacientes con SS primario incluidos los 4 de estudios previos (369,370,374,401) aunque, nosotros encontramos una prevalencia menor (6%) en nuestros pacientes. Los patrones de IFI observados en los 59 casos informados fueron pANCA en 47 (80%), mientras que el patrón atípico fue descrito en 11 (9%) y el cANCA en un caso (378). Las especificidades de los ANCA fueron analizadas en 20 casos, donde se observó MPO en 15 (371,372,374,376,377), lactoferrina en 4 (374) y PR3 en uno (378). Las características clínicas de los pacientes SS-ANCA han sido detalladas en 19 de 59 casos, incluida la alta prevalencia de características extraglandulares como el fenómeno de Raynaud y el compromiso pulmonar en alrededor del 50% de los casos, glomerulonefritis necrotizante, neuropatía periférica o vasculitis cutáneas en el 20-30% de los pacientes SS-ANCA, presentando una importante expresión inmunológica, con altos títulos de ANA positivo, anti-Ro/La positivo y/o FR en el 71% de los casos. Por el contrario, la asociación de una vasculitis coexistente debe ser considerada como excepcional. Uno de nuestros pacientes desarrolló una poliangeítis microscópica asociada (PAM); solo han sido reportados previamente 2 casos similares (378,402). Radaeli y col (402) describieron la coexistencia del SS primario y la PAM en una mujer de 72 años con yeyunitis ulcerativa, mientras que Young y col (378) describieron un paciente con SS primario, enfermedad cavitaria pulmonar y cANCA-PR3, sugiriendo una asociación entre la granulomatosis de Wegener y el SS. Estudios recientes describen otros tres casos de pacientes con SSp y presencia de ANCA con compromiso extraglandular (vasculitis cutánea leucocitoclástica con glomerulonefritis membranosa, eritema elevatum diutinum y nefritis intersticial); todos presentaban diferentes patrones de IFI.(L,LL,LL1)

El significado clínico de los ANCA en pacientes con SS primario puede ser resumido por una gran prevalencia de patrón pANCA (con MPO positivo en menos del 20% de los casos), una alta frecuencia de características extraglandulares e inmunológicas y una rara asociación con vasculitis asociada con ANCA. Esto sugiere que la determinación de rutina de ANCA en pacientes con SS primario debe estar limitada a aquellos pacientes con una probable vasculitis sistémica asociada (compromiso inflamatorio pulmonar, glomerulonefritis, isquemia intestinal, púrpura o úlceras cutáneas).

3. INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA GENÉTICA DE MBL EN EL PERFIL INMUNOLÓGICO DEL PACIENTE CON SÍNDROME DE SJÖGREN

De acuerdo a los resultados de la presente tesis doctoral, los genotipos deficientes de lectina ligada a manosa (MBL) se asocian en el síndrome de Sjögren primario con una expresión sistémica e inmunológica leve de la enfermedad.

La MBL es una proteína de origen hepático del tipo C de la lectinas que se une con ciertos carbohidratos expresados en la superficie de los patógenos, células huésped dañadas y complejos inmunes (403). Esto, activa las MASP y se produce entonces la formación de una C3 convertasa, la cual facilita la eliminación de patógenos por opsonofagocitosis o lisis mediada por complemento. Los niveles bajos de MBL se han relacionado con una respuesta inmune innata inadecuada y aumento del riesgo de infección, especialmente en sujetos inmuno comprometidos (404). De todas formas, su posible participación en la susceptibilidad a la respuesta autoinmune es poco clara. Estudios experimentales han demostrado que los modelos murinos con MBL deficiente

no desarrollaron una gran cantidad de procesos autoinmunes (glomerulonefritis, ANA y títulos de DNAs) en comparación con ratones controles cruzados (405). En estudios clínicos de pacientes con LES, la investigación de un posible papel patogénico de la deficiencia de MBL inicialmente focalizado en el hipotético aumento del riesgo de infección, tuvo resultados controvertidos (406,407). Sin embargo, recientemente se ha retomado el interés por la posible influencia de la deficiencia de MBL en la expresión clínica del LES y varios trabajos han descrito una estrecha asociación con la enfermedad cardiovascular, el daño crónico y el SAF (408,409,410).

En relación a los estudios de la susceptibilidad genética en el SS primario, estudios recientes sugieren que puede ser de interés la investigación del significado clínico de las variantes de los alelos de las MBL. Por otro lado, estudios murino experimentales han demostrado la sobre expresión del gen A-MBL en córneas (411) y la infiltración linfocitaria de las glándulas salivares en el modelo murino MBL-null (405). Además, estudios clínicos recientes destacaron el papel clave de la hipocomplementemia en la expresión de las enfermedades sistémicas y en el desarrollo del SS primario (412-413). Estudios preliminares de Finlandia, Japón y Australia sobre la prevalencia de los genotipos A/A, A/O y O/O en el SS primario, centrados principalmente en el análisis de las posibles diferencias en la prevalencia de estos genotipos respecto del grupo control, obtuvieron resultados contrastantes (49,414,415). Wang y col. (49) hallaron una menor frecuencia de polimorfismos del codón 54 en los pacientes con SS en comparación con los grupos controles, mientras que Anttonieni y col. (414) y Mullighan y col. (415) no encontraron diferencias

estadísticamente significativas. En esta tesis, hemos incluido genotipos adicionales de MBL (analizando posiciones polimórficas en la región promotora junto con aquellas de los codones 52,54 y 57) y hallamos genotipos MBL deficientes en el 15% de los pacientes con SS primario, una prevalencia similar a la que se encontró en pacientes con LES (20%) y controles sanos (18%). Esto sugiere que los polimorfismos de MBL deficientes tienen una pequeña influencia en la susceptibilidad genética para el SS primario.

Contrariamente, encontramos que los genotipos de MBL estaban asociados con la expresión clínica e inmunológica del SS primario. Clínicamente, nuestros pacientes portadores de genotipos deficientes de MBL se caracterizaron por un compromiso menos severo, con una tendencia estadística hacia una frecuencia menor de compromiso en la gammagrafía parotídea y una prevalencia significativamente menor de compromiso extraglandular. Algunos estudios sugieren que niveles altos de MBL están relacionados con daño tisular (416) y que niveles altos de MBL en pacientes portadores del genotipo “wild” de MBL puede facilitar el daño tisular (417). Se podría proponer la hipótesis que en el SS, niveles suficientes de MBL podrían ser necesarios para inducir daño mediado por autoinmunidad, mientras que los pacientes portadores de los genotipos deficientes de MBL podrían estar protegidos contra un compromiso autoinmune grave. Entonces, bloqueando de manera hipotética la vía de las MBL se podría reducir el daño autoinmune crónico en pacientes con SS, con disminución de los niveles de MBL lo que conduciría a un grado bajo de activación del complemento e inflamación, como se sugiere en nuestros pacientes portadores de los genotipos deficientes de MBL, dado el bajo nivel sérico de reactantes de fase aguda y de citoquinas proinflamatorias.

Los pacientes con SS primario portadores de genotipos deficientes de MBL tienen una baja frecuencia de autoanticuerpos positivos, incluyendo ANA, FR y anticuerpos anticardiolipinas y especialmente una baja prevalencia de anticuerpos anti-Ro/La. Estudios recientes encontraron que los pacientes con LES portadores de genotipos deficientes de MBL tienen una alta frecuencia de anticuerpos anti-DNAs, anti-Ro/La, pero una baja frecuencia de anticuerpos anticardiolipinas, anti-RNP y anti-Sm en comparación con los pacientes con LES portadores de genotipos no deficientes (418,419). Esto sugiere que los genotipos de MBL pueden inducir diferentes patrones de autoanticuerpos en cada enfermedad autoinmune. Por lo tanto, niveles altos de MBL pueden ser importantes en iniciar la respuesta autoinmune contra antígenos Ro y La en pacientes con SS primario.

Ninguno de nuestros pacientes portadores de genotipos deficientes de MBL tenía niveles bajos de C3/C4 o crioglobulinas positivas, los cuales son claves pronósticas en pacientes con SS primario. Esto es consistente con el papel funcional de las MBL en la activación del complemento. La disfunción de la vía de las MBL en portadores de variantes alélicas se asocia con pocos ligando de MBL ligados a un aumento relativo de la masa molecular baja de las MBL. Roos y col. (420) hallaron que el suero de pacientes con mutaciones en el gen *MBL2* mostraba una activación significativamente menor de C4 para IgA y manosa que el suero de individuos con el genotipo denominado *wild* o “salvaje”. Además, Seelen y col. (421) encontraron que pacientes con variantes alélicas de MBL tenían un empeoramiento en la capacidad para activar C4 exógeno para los complejos MBL/MASP unidos a manosa, como así también un empeoramiento en la capacidad para activar toda la cascada del

complemento sobre la unión de la MBL a la manosa. Estudios histológicos demostraron un aumento en el nivel de heterogeneidad de los sitios de unión para la manosa en las glándulas salivares de los pacientes con SS (422), sugiriendo que la heterogeneidad genética de la MBL puede influenciar el grado de daño e inflamación autoinmune.

4. IMPLICACIONES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA: DEL LABORATORIO AL PACIENTE

4.1. Implicaciones para la clasificación y el diagnóstico del SS.

Los diferentes criterios frecuentemente utilizados para el diagnóstico de SS primario llevan a visiones diferentes de la enfermedad. Los criterios Americanos (423), los cuales son más específicos, identifican fundamentalmente pacientes con una gran expresión extraglandular e inmunológica. Contrariamente, los criterios Europeos de 1993 (180) permiten el diagnóstico del SS con biopsia de glándulas salivares negativas e inmunología negativa. Los criterios de clasificación recientes Europeos-Americanos del 2002 (424) ocupan una posición intermedia, incluyendo tanto una biopsia de glándulas salivares negativas como Ro/La positivos como criterios obligatorios. Nosotros consideramos que esta modificación de criterios es en la actualidad la más apropiada para el diagnóstico de SS primario, aunque a la luz de los resultados de la presente tesis, recomendamos la inclusión de ANA (a títulos $\geq$ 1/80) dentro de los criterios inmunológicos obligatorios de los criterios del 2002.

4.2. Presencia de autoanticuerpos atípicos: ¿qué indican?

Nuestros resultados sugieren que las pruebas para autoanticuerpos atípicos pueden ser de utilidad diagnóstica para determinar una posible superposición entre el SS primario y otra EAS. Aunque todos nuestros pacientes con autoanticuerpos atípicos fueron clasificados inicialmente como que tenían un SS primario (la mayoría de ellos cumplían de manera restringida los criterios de clasificación del 2002), un 20% cumplieron los criterios de clasificación para una EAS adicional durante el seguimiento. Esto sugiere que solo la evolución de la enfermedad en estos pacientes, con el desarrollo de nuevas características únicas e inmunológicas de otra EAS, muestra que es crítica la diferenciación entre el SS primario y el SS asociado a otra EAS y que estos pacientes con SS con anticuerpos atípicos, requieren un seguimiento más estrecho. Sin embargo, el riesgo de desarrollar una EAS adicional difiere de acuerdo al autoanticuerpo que esté presente al momento del diagnóstico de SS “primario”. Los pacientes que tienen anti-DNA y ACA positivos, tienen un riesgo mayor de desarrollar una EAS y requieren un seguimiento cercano en virtud de detectar datos clínicos o analíticos sugestivos de un LES o una ES coexistente. La evolución de otra EAS parece ser muy infrecuente en los pacientes que presentan AAF y ANCA (a pesar de su alta prevalencia) y ha sido un evento excepcional en el caso del anti-RNP, anti-Sm, anti-Scl 70 y anti-Jo1. Nuestros resultados, sugieren que los autoanticuerpos atípicos deben ser buscados, solo en los pacientes con SS primario que presenten un perfil clínico –inmunológico específico o cuando aparezcan durante el seguimiento características específicas clínicas o analíticas sugestivas de una EAS superpuesta.

En resumen, esta tesis muestra una superposición inmunológica en el 20% de los pacientes con SS primario (definida como la presencia de autoanticuerpos

considerados típicos de otras EAS). Sin embargo, el significado clínico de estos autoanticuerpos atípicos en el marco de un SS primario varía ampliamente dependiendo de los autoanticuerpos detectados, con un amplio espectro de prevalencia, patrones clínicos de expresión de enfermedad y evolución hacia una EAS coexistente. La prevalencia de estos autoanticuerpos no se correlaciona con su significado clínico. Así, los autoanticuerpos atípicos más frecuentemente detectados en el SS primario son los AAF y los ANCA con un rango de prevalencia del 10 al 25%, pero dentro de este subgrupo, coexisten SAF o vasculitis sistémica solo entre un 5 al 10% de los casos. Por el contrario, los anti-DNA y los ACA tienen una prevalencia de solo el 5 al 10% pero están más estrechamente relacionados a datos clínicos y analíticos sugestivos de un LES y una ES asociados respectivamente, llevando al cumplimiento de los criterios de clasificación para esas enfermedades en más del 25% de los casos. Finalmente, los anti-RNP, anti-Scl 70 y anti-Jo1 tienen una prevalencia menor del 5% y raramente se asocian al desarrollo de otra EAS, sugiriendo que su implicancia clínica en los pacientes con SS primario es baja.

Existe una muy llamativa superposición clínica e inmunológica entre el SS primario y otras EAS. Sin embargo, el significado clínico de estas características de superposición no está bien establecido. La principal problemática clínica en los pacientes con SS incluyen la artritis, el fenómeno de Raynaud, características cutáneas (LECS, púrpura, livedo reticularis, eritema nodoso), fibrosis pulmonar o citopenias (leucopenia y trombocitopenia). Inmunológicamente, los pacientes con SS presentan con frecuencia autoanticuerpos incluidos en los criterios de clasificación de otras EAS (ANA,

AAF, FR) o estrechamente relacionados con vasculitis sistémicas (ANCA, crioglobulinas).

El mayor grado de superposición se produce entre el LES, AR, ES y EMTC. Con respecto al LES, existen fundamentalmente dos problemas diagnósticos: la diferenciación entre LES de comienzo en el anciano y el SS primario y el significado clínico del LECS en pacientes con SS primario. En pacientes que se presentan con síndrome seco, artritis y FR en ciertas oportunidades es difícil de determinar cuando estos pacientes tienen SS primario con compromiso articular o AR asociada con SS. Con respecto a la ES, algunos pacientes que presentan fenómeno de Raynaud tienen ACA positivos, en cuyo caso, podría sospecharse una presentación temprana de ES limitada. Un estudio multicéntrico reciente demostró que las enfermedades autoinmunes que más se asocian con la ES son el SS y la tiroiditis, siendo la frecuencia de dicha asociación del 12% y del 6% respectivamente. (425)

Finalmente, pacientes con SS primario pueden presentar manifestaciones clínicas que incluyen criterios de clasificación de la EMTC, tales como edema de manos, sinovitis y fenómeno de Raynaud, con lo que la diferenciación entre el SS y la EMTC puede ser difícil.

Otras situaciones de superposición ocurren con menor frecuencia. Ellas incluyen la sarcoidosis (forma de comienzo de un síndrome semejante al SS como una manera de presentación de la sarcoidosis versus la coexistencia de dos enfermedades), vasculitis sistémica (SS asociado a MVV, crioglobulinemia) y SAF (características relacionadas con el SAF). Las asociaciones entre el SS primario y otras EAS como las miopatías inflamatorias, enfermedad de Still de

comienzo en el adulto, policondritis recidivante o enfermedad de Behçet son muy infrecuentes, sugiriendo una asociación casual o dos EAS independientes. Estudios recientes han analizado el significado clínico de los autoanticuerpos considerados característicos de otras EAS en pacientes con SS primario. Nosotros encontramos una superposición inmunológica en el 20% de los pacientes con SS primario. El significado clínico de estos autoanticuerpos atípicos varía ampliamente, con un amplio rango de prevalencia, patrones clínicos de expresión de enfermedad y evolución entre las EAS coexistentes. Sin embargo, la prevalencia de estos autoanticuerpos no se correlaciona con su significado clínico, aunque algunos autores sugieren que una detección cuantitativa y más sensible de autoanticuerpos podría revelar un marcador biológico de la actividad de la enfermedad y de esta manera permitir una mayor comprensión de la patogénesis de la propagación de la respuesta de autoanticuerpos (426)

Los anticuerpos antifosfolípidos, los ANCA y las crioglobulinas son halladas con frecuencia en los pacientes con SS primario, con un rango de prevalencia de entre el 10 y el 20%, pero entre este subgrupo de pacientes, la coexistencia del SAF o de una vasculitis sistémica solo es detectada en alrededor del 10% de los casos. Contrariamente, los anti-DNA y los ACA tienen una prevalencia de solo el 5 al 10% pero se relacionan más estrechamente con otras características de LES y de ES, respectivamente, llevando al cumplimiento de los criterios clasificatorios para esas enfermedades en más del 25% de los casos. Finalmente, los anti-Sm, anti-RNP y anti Scl70 tienen una prevalencia menor del 5% y raramente se asocian con el desarrollo de una EAS, sugiriendo que su significado clínico es bajo en pacientes con SS primario.

Esto sugiere que estos autoanticuerpos atípicos deberían ser determinados en pacientes con SS primario que presenten perfiles clínicos e inmunológicos sugestivos de una superposición o cuando presentes características específicas de una EAS durante el seguimiento .

La amplia variedad de manifestaciones clínicas e inmunológicas presentada por los pacientes con SS primario con frecuencia ocasiona problemas diagnósticos con otra EAS, especialmente con el LES, AR y la ES limitada. Estas superposiciones marca la diferenciación entre el SS primario y el SS asociado con EAS y las presentaciones LES-like de algunas EAS, sugiriendo que los criterios de clasificación actuales son útiles en la diferenciación entre procesos autoinmunes y no autoinmunes, pero fracasan para una diferenciación clara entre las EAS.

4.3. Utilidad del perfil inmunológico en el diagnóstico diferencial de la afección hepática en el paciente con síndrome de Sjögren

Nuestros resultados muestran que ante la detección de un perfil hepático alterado en un paciente con SS, se debe realizar un proceso de diagnóstico secuencial. El primer paso es descartar procesos no asociados con el SS, principalmente el uso crónico de drogas potencialmente hepatotóxicas, esteatosis y enfermedades cardiopulmonares crónicas, todas situaciones que son encontradas frecuentemente en los pacientes ancianos. El segundo paso es diferenciar entre enfermedad hepática viral y autoinmune. La evaluación de factores epidemiológicos puede ser de ayuda. Por ejemplo, la infección por el HCV es detectada más frecuentemente en pacientes con SS de la zona del Mediterráneo que en aquellos pacientes del Norte Europeo (336). Igualmente,

el diagnóstico del HCV es más frecuente en pacientes con SS, hombres y ancianos mientras que las mujeres con SS y jóvenes tienden a ser más proclives a tener una enfermedad hepática autoinmune asociada. El tercer paso es el perfil hepático analítico, aunque en nuestra tesis, esto no fue útil para la diferenciación entre HCV y enfermedad autoinmune relacionada con enfermedad hepática. El cuarto paso es el perfil inmunológico, el cual juega un papel clave en la diferenciación entre las principales etiologías; los pacientes con infección crónica por el HCV tienen una mayor frecuencia de crioglobulinas, hipocomplementemia y autoanticuerpos (ANA, AML, Ro y La). En cuanto a los pacientes con SS, con enfermedad hepática autoinmune, la existencia de AMA con un patrón específico M2 indica CBP, mientras que títulos altos de ANA y anti ML sugieren HAI tipo 1.

En conclusión, la infección crónica por HCV es la principal causa de compromiso viral en nuestros pacientes con SS, con una prevalencia del 13% casi tres veces mayor a lo observado para el compromiso autoinmune hepático (CBP, HAI tipo 1). No existen diferencias en el perfil hepático analítico o en las principales manifestaciones extraglandulares del SS cuando se comparan los dos tipos de compromiso hepático, siendo el patrón inmunológico, el principal factor en la identificación de compromiso viral (predominio de crioglobulinas e hipocomplementemia) y autoinmune (alta frecuencia de autoanticuerpos). El diagnóstico diferencial de enfermedad hepática en pacientes con SS primario (viral dado que los dos procesos tienen un enfoque terapéutico y pronóstico diferente versus autoinmune) es clínicamente importante, debido a que los dos procesos tienen un enfoque terapéutico y pronóstico diferente.

4.4. Significado de la deficiencia de MBL en la práctica clínica

Nuestros datos sugieren que el polimorfismo de la MBL tiene una influencia pequeña en la susceptibilidad genética para el SS primario, pero mucha más influencia en la expresión clínica e inmunológica de la enfermedad, con los genotipos de MBL deficiente asociándose con una enfermedad leve. El posible papel protector de los niveles bajos de MBL en los procesos autoinmunes inflamatorios es una hipótesis propuesta por Casanova y Abel (427)] y apoyada por estudios genéticos experimentales y clínicos recientes. En primer lugar, la extensión global de los haplotipos *MBL2* deletéreos sugiere que los portadores de los genotipos deficientes de MBL pueden ser potencialmente beneficiados y no perjudicados (428). En segundo lugar, el modelo murino MBL deficiente presentaba una significativa protección contra el daño por reperusión del músculo esquelético (429). En tercer lugar, los pacientes con niveles bajos de MBL se encuentran protegidos contra algunas infecciones intracelulares como la tuberculosis (430), leishmaniasis (431) o VIH (432). En cuarto lugar, algunos pacientes con enfermedades autoinmunes como la cirrosis biliar primaria tienen una mayor frecuencia de genotipos altos de MBL (433). Tomando todo en consideración, estos datos sugieren que la deficiencia de MBL puede ofrecer una cierta protección contra el desarrollo de algunos procesos inflamatorios o autoinmunes como el SS primario. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la deficiencia de MBL estaría asociada con un aumento de la susceptibilidad a los eventos cardiovasculares y trombóticos (408,409,410). Esto sugiere que la deficiencia de MBL puede tener un papel diferente en cada enfermedad autoinmune.

Esta tesis es el primer estudio que analiza la prevalencia y el significado clínico de la variabilidad genética de las MASP-2 en pacientes con una enfermedad

autoinmune sistémica. Encontramos una baja prevalencia de mutaciones de MASP-2 en pacientes con SS primario, lo cual es muy similar a la de los grupos controles (5%). De esta manera, se vio que los polimorfismos del MASP-2 tienen una muy baja implicación clínica en el SS primario. También analizamos el significado clínico de los polimorfismos de *MBL2* en un subgrupo de pacientes con anticuerpos Ro/La negativos que no cumplían los criterios del año 2002 (424) debido a la falta de biopsia de glándulas salivares. En estos pacientes, los genotipos deficientes de MBL se relacionaron con una frecuencia baja de compromiso sistémico y de marcadores inmunológicos, semejantes a los que se hallaron en los pacientes que cumplían criterios de enfermedad del 2002. Esto sugiere que los niveles bajos genéticamente inducidos de MBL pueden ser de protección contra un compromiso autoinmune grave no solo en los pacientes con SS primario que si cumplían criterios de enfermedad del 2002, sino también en aquellos con anticuerpos Ro/La negativos que solo cumplen los criterios del año 1993.

En conclusión, los pacientes con SS primario portadores de los genotipos deficientes de MBL tienen una expresión sistémica e inmunológica menos grave en comparación con los genotipos MBL suficientes. Contrariamente, las mutaciones de MASP-2 tienen una menor implicación clínica. En el SS primario, los niveles insuficientes de MBL pueden representar un factor de protección contra el desarrollo de un daño autoinmune más agresivo.

5. GLOSARIO DE AUTOANTICUERPOS EN EL SÍNDROME DE SJÖGREN: PRINCIPALES UTILIDADES Y RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRESENTE TESIS.

- **ANTICITOPLASMA DE NEUTRÓFILO (ANCA).** Su prevalencia puede oscilar entre el 5-10%. De los 60 casos de pacientes con SSp y ANCA+, el 80% presenta un patrón pANCA (solo un 20% con positividad MPO) y el resto un patrón atípico. Solo se ha descrito un paciente con SSp y ANCA-PR3. La presencia de ANCA en el paciente con SSp se asocia a una mayor afección extraglandular y a la positividad de otros marcadores inmunológicos (ANA, anti-Ro, anti-La, FR)
- **ANTICUERPOS ANTI-JO1.** Los anticuerpos anti-Jo1, relacionados con la afectación pulmonar que pueden presentar los pacientes con miopatía inflamatoria, no suelen detectarse en pacientes con SSp, y sólo se han descrito 2 pacientes de forma aislada.
- **ANTICUERPOS ANTI-TOPOISOMERASA-1.** Solo se han descrito dos pacientes con anticuerpos anti-Scl70/topoisomerasa I, y ninguno presentó manifestaciones sugestivas de esclerodermia.
- **ANTIFOSFOLIPÍDICOS (AAF).** Se han detectado en 120 (20%) de los 589 pacientes con SSp analizados en distintos estudios. En nuestra serie detectamos 36 pacientes (13%), con un espectro muy amplio de manifestaciones relacionadas con el SAF (trombosis, **plaquetopenia**, pérdidas fetales, livedo reticularis y **anemia hemolítica**), aunque solo 4 (10%) de estos 36 pacientes cumplían los criterios clasificatorios vigentes de SAF.
- **ANTIMITOCONDRIALES (AMA).** El frecuente solapamiento entre la **cirrosis biliar primaria** (CBP) y el SSp motiva que la detección de AMA en un paciente con SSp sugiera la existencia de una CBP asociada. La prevalencia de AMA en pacientes con SSp oscila entre el 5 y el 11%. En nuestra serie, solo la mitad de los pacientes con AMA presentaban datos clínicos y/o analíticos sugestivos de CBP, sugiriendo la existencia en el resto de una CBP “asintomática” o “incompleta”.

-
- **ANTINUCLEARES (ANA).** La determinación de los anticuerpos antinucleares (ANA) suele ser el principal dato inmunológico a solicitar cuando se sospecha la existencia de una enfermedad autoinmune. La positividad de los ANA en pacientes con SSp suele ser superior al 80%, y es por tanto el autoanticuerpo detectado con más frecuencia. Su presencia se asocia a la afección extraglandular y a las principales manifestaciones analíticas (hipergammaglobulinemia, VSG, autoanticuerpos). Un paciente que refiere con claridad un síndrome seco, que se objetiva mediante pruebas oculares, gammagrafía parotídea compatible y que presenta ANA positivos debe ser considerado como un paciente con SS tras descartar otras causas. La presencia de ANA negativos apoya más el diagnóstico de síndrome seco asociada a otras etiologías no autoinmunes, aunque en un 5% de pacientes ANA negativos pueden detectarse anticuerpos anti-Ro y/o anti-La.
 - **BANDA MONOCLONAL SÉRICA.** La existencia de **inmunoglobulinas monoclonales circulantes** se ha asociado generalmente con el desarrollo de procesos linfoproliferativos, ya sea manifiestos (**mieloma múltiple, linfoma**) o como un factor predictivo (**gammapatía monoclonal de significado incierto**). En los pacientes con SS primario y de acuerdo a los hallazgos encontrados en estudios recientes, la detección de inmunoglobulinas monoclonales no sólo puede contribuir a identificar aquellos pacientes con riesgo de linfoproliferación, como clásicamente se ha descrito, sino que también su presencia se ha asociado con determinadas manifestaciones extraglandulares.
 - **CÉLULA PARIETAL GÁSTRICA (ANTICUERPOS ANTI-CÉLULA PARIETAL GÁSTRICA).** Los anticuerpos contra la célula parietal gástrica (CPG) se describieron por primera vez en 1962 en pacientes con **anemia perniciosa**. En el SSp se detectan en un 27-33% de los pacientes. Se ha descrito su asociación con afectación tiroidea y hepática autoinmunes, así como con infección por **H. pylori**.
 - **CENTRÓMERO (ANTICUERPOS ANTICENTRÓMERO).** Pueden detectarse en un 5-10% de pacientes, y deben considerarse como

indicativo de un dato inicial de posible evolución a ES limitada, que puede ocurrir hasta en un 25% de los casos. Deben evaluarse cuidadosamente datos de esclerodermia incipientes (Figura), por medio de la capilaroscopia. Es aconsejable detectar los anticuerpos anticentrómero en todo paciente con SS y **fenómeno de Raynaud**, especialmente en aquellos casos con ANA a títulos elevados con negatividad para Ro/La.

- **COMPLEMENTO.** La hipocomplementemia es un dato inmunológico que con frecuencia presentan los pacientes con SSp (10-15%). Suele observarse un descenso del CH50, sobretodo a expensas del descenso de C4, siendo más raro el descenso de C3. Desde un punto de vista clínico, la hipocomplementemia se ha asociado con la existencia de las principales manifestaciones extraglandulares del SSp, como la afectación cutánea, neurológica y renal, y con la presencia de una infección por el **virus hepatitis C (VHC)** asociada. Finalmente, la hipocomplementemia ha demostrado estar relacionada con un mayor desarrollo de procesos linfoproliferativos y una mayor mortalidad en pacientes con SSp. La estrecha relación entre la hipocomplementemia y el desarrollo de **linfoma** podría estar directamente relacionada con la presencia concomitante de **crioglobulinemia**, aunque ningún estudio ha analizado esta posible asociación.
- **CRIOGLOBULINAS.** Las crioglobulinas son inmunoglobulinas circulantes que precipitan in vitro con el frío. (Figura). Se ha descrito una prevalencia que oscila entre el 10 y el 20% según las distintas series. Debe destacarse el papel de las crioglobulinas en el SSp en cuatro importantes aspectos: su clara relación con manifestaciones clínicas de tipo vasculítico, su asociación con el VHC, lo que obliga a descartar dicha infección en todo paciente con SSp y crioglobulinemia, su carácter predictivo como dato serológico de posible desarrollo a linfoma y recientemente, su estrecha asociación con una mayor mortalidad. La presencia de crioglobulinas en un paciente con SSp obliga a un mayor control clínico del paciente.

-
- **DNA (ANTI-dsDNA).** Los anticuerpos antiDNA nativo constituyen uno de los criterios diagnósticos de LES, y no suelen detectarse en pacientes con SSp. Así, títulos elevados de antiDNA en pacientes con SSp puede indicar una posible evolución a LES. De los 26 pacientes descritos con SSp y títulos positivos de antiDNA, 8 (31%) acabaron cumpliendo criterios de LES tras un seguimiento medio de 6 años y 10 (38%) desarrollaron un síndrome lúpico (3 criterios). Es importante estudiar los anti-DNA en el paciente con SSp y sospecha clínica de evolución a LES, especialmente ante la presencia de **artritis** o **leucopenia/linfopenia**.
 - **FACTOR REUMATOIDE.** El factor reumatoide (FR) es una inmunoglobulina IgM dirigida contra la fracción Fc de inmunoglobulinas IgG autólogas circulantes. En la mayoría de estudios realizados en pacientes con SSp se demuestra una positividad para el FR en un porcentaje cercano al 50%. Se ha descrito una relación significativa entre la presencia de FR y el **flujo salivar estimulado**, mientras que otros autores relacionan la positividad de FR con un mayor infiltrado linfocitario en la **biopsia salival** y con la presencia de afectación articular, **vasculitis** cutánea y positividad para anticuerpos anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B. Es posible que en algunos de los pacientes con SSp la detección de FR esté en relación con la presencia de **crioglobulinemia**, reflejando la actividad de tipo FR que poseen dichas crioglobulinas. En 1972, Anderson y Talal describieron la negativización del FR en el momento de transición de un pseudolinfoma a linfoma. Estudios recientes no han confirmado estos hallazgos e incluso no se ha demostrado que la presencia o ausencia de los ANA o FR sea un factor que predisponga al desarrollo de linfoproliferación en los pacientes con SS primario.
 - **GAMMAPATÍA MONOCLONAL.** La existencia de una gammapatía monoclonal es un dato frecuente en pacientes con síndrome de Sjögren (20%). De los 129 pacientes descritos en la literatura, 56 (43%) presentaron **inmunoglobulinas monoclonales circulantes** de tipo mIgG, 36 (28%) mIgM, 14 (11%) mIgA y 22 (17%) cadenas ligeras.

-
- **HIPERGAMMAGLOBULINEMIA POLICLONAL.** La hipergammaglobulinemia policlonal es uno de los datos analíticos más característicos del síndrome de Sjögren primario y es el reflejo directo de la hiperactividad linfocitaria característica de la enfermedad. Su prevalencia oscila entre el 30 y el 50% de los pacientes. Los trastornos ocasionados por la elevación de las gammaglobulinas son excepcionales y no suelen observarse fenómenos clínicos de hiperviscosidad ni defectos en la acidificación renal causados por la hipergammaglobulinemia, aunque se ha descrito un paciente con una importante hipergammaglobulinemia que murió por un tromboembolismo pulmonar. La existencia de hipergammaglobulinemia se ha relacionado con la positividad de los **anticuerpos anti-Ro/SSA**.
 - **HIPOGAMMAGLOBULINEMIA.** La presencia de hipogammaglobulinemia en pacientes con síndrome de Sjögren se ha considerado clásicamente como presagio de **linfoma** maligno a raíz de ciertos casos publicados en los años 60 y 70. Estudios recientes han detectado niveles bajos de gammaglobulinas en un determinado subgrupo de pacientes, asociado a una menor frecuencia de anticuerpos anti Ro y anti La.
 - **La (ANTICUERPOS ANTI-LA/SS-B).** La positividad para los anticuerpos anti La/SS-B se encuentra casi invariablemente ligada a la positividad para los antiRo/SS-A, siendo excepcional la positividad para anti-La/S-B en ausencia de anti-Ro/SS-A. Incluso se ha descrito la positivización del antiLa/SS-B años después de detectar los anti-Ro/SS-A. Diversos estudios han relacionado los anti-La/SS-B con una mayor afectación articular, fenómeno de Rauynaud, vasculitis cutánea, afectación tiroidea y positividad para ANA, FR y anti-Ro/SS-A, además de una relación con la existencia de linfopenia y trombocitopenia.
 - **LKM-1(ANTICUERPOS ANTI-MICROSOMAS HEPÁTICOS/RENALES).** Los anticuerpos contra microsomas hepáticos y renales (anti-LKM) se describieron por primera vez en 1973 en pacientes con hepatitis crónica activa. No se ha descrito ningún caso de positividad en pacientes con SS.

-
- **MÚSCULO LISO (ANTICUERPOS ANTI-MÚSCULO LISO).** En nuestra serie su frecuencia es del 60%, aunque la mayoría a títulos $\leq 1/80$. No encontramos ninguna asociación estadísticamente significativa con las principales manifestaciones clínicas o analíticas, excepto para los ANA.
 - **PÉPTIDOS CITRULINADOS (ANTICUERPOS ANTI-CCP).** Estudios recientes sugieren su utilidad en diferenciar si la **artritis** del paciente con SSp puede estar relacionada con la aparición de una AR, aunque su prevalencia en el paciente con SSp sin artritis puede ser del 5-7%.
 - **RIBOSOMA (ANTICUERPOS ANTIRIBOSOMALES).** Los anticuerpos antirribosoma P se han asociado clásicamente con la existencia de manifestaciones neuropsiquiátricas en pacientes con LES. Sólo se ha publicado un estudio en pacientes con SSp. Ninguno de los 131 pacientes con SSp, tuvieran o no clínica neuropsiquiátrica, presentaban positividad para dichos autoanticuerpos, mientras que 6 pacientes con SS asociado (en 4, asociado a LES) fueron positivos.
 - **RNP (ANTICUERPOS ANTI-RNP).** En estudios preliminares su prevalencia en pacientes con SS fue del 17-28%, aunque se incluyeron tanto primarios como asociados a otras EAS. En las grandes series la prevalencia es inferior al 5%. En la literatura se han descrito 30 pacientes con SS-RNP+, que presentaban una mayor frecuencia de **fenómeno de Raynaud**, edema de manos y **miositis**, aunque ninguno de ellos cumplía criterios clasificatorios de enfermedad mixta del tejido conectivo, lo que sugiere un solapamiento de ambas entidades en estos pacientes.
 - **Ro (ANTICUERPOS ANTI-RO/SS-A).** Se consideran los autoanticuerpos con una mayor especificidad para el diagnóstico del SSp, aunque aparezcan en porcentajes variables (30-70%, según técnica empleada y cohorte estudiada). Existen técnicas capaces de cuantificar los niveles de estos autoanticuerpos, y se ha descrito la existencia de variaciones cuantitativas en los niveles de anticuerpos anti-Ro60kDA y anti-Ro52kDA, aunque dichos niveles permanecieron relativamente estables durante largos períodos de tiempo en la mayoría de los pacientes estudiados. Desde un punto de vista clínico, se ha observado una relación

entre el hallazgo de este tipo de anticuerpos y el desarrollo de varias de las principales manifestaciones extraglandulares e inmunológicas presentes en el SSp, especialmente cutáneas (**eritema anular, lupus neonatal**), afectación neurológica, **miositis, anemia, leucopenia, linfopenia y plaquetopenia**. Habitualmente la positividad de los anticuerpos anti-Ro/SS-A se asocia con la presencia simultánea de otros autoanticuerpos, como ANA positivos, FR positivo, anti-La/SS-B, y biopsia salival positiva.

- **Sm (ANTICUERPOS ANTI-SM).** Los anticuerpos antiSm se consideran altamente específicos del LES, aunque su prevalencia no suele superar el 30%. La alta especificidad de los antiSm para el diagnóstico de LES excluye prácticamente el diagnóstico de otra enfermedad autoinmune distinta, y su detección en pacientes con SSp debe ser negativa. Su determinación en pacientes con SSp debe realizarse ante sospecha de evolución a LES, especialmente si se acompañan de niveles elevados de anticuerpos antiDNA.
- **TIROIDEOS (ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS).** Los estudios que han analizado la prevalencia de anticuerpos antitiroideos en el SSp (principalmente anticuerpos antitiroglobulina -Tg- y anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea -TPO-) muestran que la prevalencia para los anti-Tg oscila entre el 13 y el 40%, y para los anti-TPO entre el 13 y el 45%. Algunos trabajos han detectado anticuerpos contra las hormonas periféricas T3 y T4.

BIBLIOGRAFÍA

-
1. Leber T. Ueber die Entstehung der Netzhautablosung. Ver Versamml Optical Ges Stuttg 1882;14:165.
 2. Mikulicz J. Brl. Klin. Whonschr 1888; 25:411.
 3. Hadden WB. On dry mouth, or supresión of the salivary and bucal secretions. Trans Clin Soc London 1888;21:176.
 4. Gougerot H. Insuffisance progressive et atrophie des glandes salivaires et muqueuses de la bouche, des conjoncyves (et parfois des muqueuses nasale, laryngee, vulvaire) secheresse de la bouche, des conjunctives, etc. Bull Med (Par) 1926;40:360.
 5. Houwer AWM. Keratitis filamentosa and chronic arthritis. Tr Ophtal UK 1927;47:88.
 6. Albright K. Filiform keratitis due to insufficient secretion of lacrimal grands. 3 cases. Arch Ophthalmol 1928;121:402.
 7. Sjögren H. Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca (Keratitis Filiformis bei Hypofunktion der Tränendrüsen). Acta Ophthalmol (Copen). 1933;11 (suppl 2):1-151.
 8. Morgan AD, Raven RW. Sjogren's syndrome: a general disease. Br J Surg. 1952;40:154-62.
 9. Morgan WS, Castleman B. A clinico-pathologic study of Mikulicz's disease. Am J Pathol 1953;29:471.
 10. Jones BR. Lacrimal and salivary precipitating antibodies in Sjögren's syndrome. Lancet. 1958;2:773-6.
 11. Bunim JJ, Talal NN. The association of malignant lymphoma with Sjögren's syndrome. Trans Assoc Am Physicians 1963;76:45.

-
12. Bloch KJ, Buchanan WW, Wohl MJ and Bunim JJ. Sjogren's syndrome a clinical, pathological and serological study of 62 cases. *Medicine (Baltimore)* 1965;44:187-231.
 13. Chisholm DM, Waterhouse JP, Mason DK. Lymphocytic sialadenitis in the major and minor glands: a correlation in postmortem subjects. *J Clin Pathol.* 1970;23:690-4.
 14. Moutsopoulos HM, Mann DL, Johnson AH, Chused TM. Genetic differences between primary and secondary sicca syndrome. *N Engl J Med.* 1979;301:761-3.
 15. Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:162-5.
 16. Uhlig T, Kvien TK, Jensen JL, Axell T. Sicca symptoms, saliva and tear production, and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999;58:415-22.
 17. Andonopoulos AP, Drosos AA, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome in rheumatoid arthritis and progressive systemic sclerosis. A comparative study. *Clin Exp Rheumatol.* 1989;7:203-5.
 18. Coll J, Rives A, Griño MC, Setoain J, Vivancos J, Balcells A. Prevalence of Sjögren's syndrome in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 1987;46:286-9.
 19. Gilboe IM, Kvien. TK, Uhlig T, Husby G. Sicca symptoms and secondary Sjogren's syndrome in systemic lupus erythematosus: comparison with rheumatoid arthritis and correlation with disease variables. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:1103-9.

-
20. Setty YN, Pittman CB, Mahale AS, Greidinger EL, Hoffman RW. Sicca symptoms and anti-SSA/Ro antibodies are common in mixed connective tissue disease. *J Rheumatol.* 2002;29:487-9.
 21. Coll J, Ferrando J, Vivancos J, Balcells A.[Incidence of Sjogren's syndrome in systemic scleroderma] *Rev Clin Esp.* 1985;177:438-42.
 22. de Seze J, Devos D, Castelnovo G, et al. The prevalence of Sjogren syndrome in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Neurology.* 2001;57:1359-63.
 23. Iltanen S, Collin P, Korpela M, Holm K, Partanen J, Polvi A, Maki M. Celiac disease and markers of celiac disease latency in patients with primary Sjogren's syndrome. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:1042-6.
 24. Whaley K, Williamson J, Wilson T, McGavin DD, Hughes GR, Hughes H, et al. Sjogren's syndrome and autoimmunity in a geriatric population. *Age Ageing.* 1972;1:197-206.
 25. Drosos AA, Andonopoulos AP, Costopoulos JS, Papadimitriou CS, Moutsopoulos HM. Prevalence of primary Sjogren's syndrome in an elderly population. *Br J Rheumatol.* 1988;27:123-7.
 26. Jacobsson LT, Axell TE, Hansen BU, Henricsson VJ, Larsson A, Lieberkind K, et al. Dry eyes or mouth—an epidemiological study in Swedish adults, with special reference to primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun.* 1989;2:521-7.
 27. Zhang NZ, Shi CS, Yao QP, Pan GX, Wang LL, Wen ZX, et al. Prevalence of primary Sjogren's syndrome in China. *J Rheumatol.* 1995;22:659-61.
 28. Miyasaka N. [Epidemiology and pathogenesis of Sjogren's syndrome] *Nippon Rinsho.* 1995;53:2367-70.

-
29. Dafni UG, Tzioufas AG, Staikos P, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Prevalence of Sjogren's syndrome in a closed rural community. *Ann Rheum Dis*. 1997;56:521-5.
 30. Thomas E, Hay EM, Hajeer A, Silman AJ. Sjogren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact. *Br J Rheumatol*. 1998;37:1069-76.
 31. Tomsic M, Rozman B. Sjogren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact—comment on the article by Thomas et al. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38:685-6.
 32. Pillemer SR, Matteson EL, Jacobsson LT, Martens PB, Melton LJ 3rd, O'Fallon WM, Fox PC. Incidence of physician-diagnosed primary Sjogren syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc*. 2001;76:593-9.
 33. Plesivcnik Novljan M, Rozman B, Hocevar A, Grmek M, Kveder T, Tomsic M. Incidence of primary Sjogren's syndrome in Slovenia. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:874-6.
 34. Sánchez-Guerrero J, Pérez-Dosal MR, Cárdenas-Velázquez F, Pérez-Reguera A, Celis Aguilar E, Soto-Rojas AE, Avila-Casaso C. Prevalence of Sjögren's síndrome in ambulatory patients according to the American-European Consensus Group criteria. *Rheumatology* 2005 ;44 :235-40.
 35. Alamanos Y, Tsifetaki N, Voulgari PV, Venetsanopoulou AI, Siozos C, Drosos AA. Epidemiology of primary Sjogren's syndrome in north-west Greece, 1982-2003. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:187-91.
 36. Kolkowski EC, Reth P, Pelusa F, Bosch J, Pujol-Borrell R, Coll J, Jaraquemada D. Th1 predominance and perforin expression in minor

-
- salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun.* 1999;13:155-62.
37. Witte T, Matthias T, Arnett FC, Peter HH, Hartung K, Sachse C, et al. IgA and IgG autoantibodies against alpha-fodrin as markers for Sjogren's syndrome. *Systemic lupus erythematosus. J Rheumatol.* 2000;27:2617-20.
38. Kobayashi I, Kawamura N, Okano M, Shikano T, Mizumoto M, Hayashi Y, Kobayashi K. Anti-alpha-fodrin autoantibody is an early diagnostic marker for childhood primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol.* 2001;28:363-5.
39. Maeno N, Takei S, Imanaka H, Oda H, Yanagi K, Hayashi Y, Miyata K. Anti-alpha-fodrin antibodies in Sjogren's syndrome in children. *J Rheumatol.* 2001;28:860-4.
40. Raina S, Preston GM, Guggino WB, Agre P. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem* 1995;270:1908-12.
41. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 1999;274:20071-4.
42. Steinfeld S, Cogan E, King LS, Agre P, Kiss R, Delporte C. Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjogren's syndrome patients. *Lab Invest* 2001;81:143-8.
43. Tsubota K, Hirai S, King LS, Agre P, Ishida N. Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjogren's syndrome. *Lancet* 2001;357:688-9.
44. Azuma T, Takei M, Yoshikawa T, Nagasugi Y, Kato M, Otsuka M, et al. Identification of candidate genes for Sjogren's syndrome using MRL/lpr

-
- mouse model of Sjogren's syndrome and cDNA microarray analysis. *Immunol Lett.* 2002;81:171-6.
45. Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Lahdenperhoja N, Pasternack A, Hurme M. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2001;44:176-9.
46. Font J, Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Aldea AI, Cervera R, Ingelmo M, et al. The role of interleukin-10 promoter polymorphisms in the clinical expression of primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41:1025-30.
47. Anaya JM, Correa PA, Herrera M, Eskdale J, Gallagher G. Interleukin 10 (IL-10) influences autoimmune response in primary Sjogren's syndrome and is linked to IL-10 gene polymorphism. *J Rheumatol.* 2002;29:1874-6.
48. Tapinos NI, Polihronis M, Thyphronitis G, Moutsopoulos HM. Characterization of the cysteine-rich secretory protein 3 gene as an early-transcribed gene with a putative role in the pathophysiology of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002;46:215-22.
49. Wang ZY, Morinobu A, Kanagawa S, Kumagai S. Polymorphisms of the mannose binding lectin gene in patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:483-6.
50. Garcia-Carrasco M, Garcia-Carrasco A, Flores V, Ramos-Casals M, Font J. Papel etiopatogénico de las infecciones virales. En "Síndrome de Sjögren", eds Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Ed. Masson, Barcelona 2003, pp53-72.

-
51. Soto-Rojas AE, Villa AR, Sifuentes-Osornio J, Alarcon-Segovia D, Kraus A. Oral candidiasis and Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1998;25:911-15.
 52. Belenguer R, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, del Pino J, Sentis J, Aguiló S, Font J. Influence of clinical and immunological parameters on the health-related quality of life of patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23:351-6.
 53. Giles I, Isenberg D. Fatigue in primary Sjögren's syndrome: Is there a link with the fibromyalgia syndrome? *Ann Rheum Dis* 2000. 59:875-8.
 54. Anttonen JA, Markula KP, Pertovaara MI, Pasternack AI. Adverse drug reactions in Sjogren's syndrome. Frequent allergic reactions and a specific trimethoprim-associated systemic reaction. *Scand J Rheumatol*. 1999;28:157-9.
 55. Tishler M, Paran D, Yaron M. Allergic disorders in primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1998;27:166-9.
 56. Trejo O, Ramos-Casals M, Campoy A, Herrero C. Afección cutánea. En "Síndrome de Sjögren", eds Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Ed. Masson, Barcelona 2003, pp175-190.
 57. Lindvall B, Bengtsson A, Ernerudh J, Eriksson P. Subclinical myositis is common in primary Sjogren's syndrome and is not related to muscle pain. *J Rheumatol*. 2002;29:717-25.
 58. Morales JE, Jimenez S, Barbera JA, Xaubet A. Afección pulmonar. En "Síndrome de Sjögren", eds Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Ed. Masson, Barcelona 2003, pp203-212.

-
59. Linstow M, Kriegbaun N, Backer V, Ulrik C, Oxholm P. Followup study of pulmonary function in patient with primary Sjögren syndrome. *Rheumatol Int* 1990;10:47-9.
 60. Davidson BKS, Kelly CA, Griffiths ID. Ten year follow up of pulmonary function in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 709-12.
 61. Salaffi F, Manganelli P, Carotti M, Baldelli S, Blasetti P, Subiaco S, et al. A longitudinal study of pulmonary involvement in primary Sjögren's syndrome: relations between alveolitis and subsequent lung changes on high-resolution computed tomography. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 263-9.
 62. Hatron PY, Wallaert B, Gosset D, Tonnel AB, Gosselin B, Voisin C, Devulder B. Subclinical lung inflammation in primary Sjögren's syndrome. Relationship between bronchoalveolar lavage cellular analysis finding and characteristics of the disease. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1226-31.
 63. Ogihara T, Nakatani A, Ito H, Irokawa M, Ban S, Takahashi A, et al. Sjögren's syndrome with pleural effusion. *Intern Med* 1995; 34: 811-14.
 64. Quismorio FP, Jr. Pulmonary involvement in primary Sjögren's syndrome. *Curr Opin Pulm Med* 1996; 2: 424-8.
 65. Lambert M, Hebbar M, Viget N, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B. Bronchiolitis obliterans with organized pneumonia: a rare complication of primary Gougerot-Sjögren's syndrome. *Rev Med Interne* 2000; 21: 74-7.
 66. Wong BC, Wong KL, Ip MS, Wang EP, Chan KW, Cheng LC. Sjogren's syndrome with amyloid A presenting as multiple pulmonary nodules. *J Rheumatol*. 1994;21:165-7.

-
67. Tavoni A, Vitali C, Cirigliano G, Frigelli S, Stampacchia G, Bombardieri S. Shrinking lung in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2249-2250.
 68. Gyongyosi M, Pokorny G, Jambrik Z, Kovacs L, Kovacs A, Makula E, Csanady M. Cardiac manifestations in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1996;55:450-4.
 69. Rantapää-Dahlqvist S, Backman C, Sandgren H, Ostberg Y. Echocardiographic findings in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1993;12:214-8.
 70. Levin MD, Zoet-Nugteren SK, Markusse HM. Myocarditis and primary Sjögren's syndrome. *Lancet* 1999;354:128-9.
 71. Garcia-Carrasco M, Siso A, Ramos-Casals M, Rosas J, de la Red G, Gil V, et al. Raynaud's phenomenon in primary Sjogren's syndrome. Prevalence and clinical characteristics in a series of 320 patients. *J Rheumatol.* 2002;29:726-30.
 72. Andonopoulos AP, Christodoulou J, Ballas C, Bounas A, Alexopoulos D. Autonomic cardiovascular neuropathy in Sjogren's syndrome. A controlled study. *J Rheumatol.* 1998;25:2385-8.
 73. Niemela RK, Pikkujamsa SM, Hakala M, Huikuri HV, Airaksinen KE. No signs of autonomic nervous system dysfunction in primary Sjorgen's syndrome evaluated by 24 hour heart rate variability. *J Rheumatol.* 2000;27:2605-10.
 74. Barendregt PJ, Tulen JH, van den Meiracker AH, Markusse HM. Spectral analysis of heart rate and blood pressure variability in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:232-6.

-
75. Tsianos EB, Tzioufas AG, Kita MD, Tsolas O, Moutsopoulos HM. Oesophageal dysfunction in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1985;44:610-3.
 76. Anselmino M, Zaninotto G, Costantini M, Ostuni P, Ianniello A, Boccu C, et al. Esophageal motor function in primary Sjögren's syndrome; correlation with dysphagia and xerostomia. *Digest Dis Sci* 1997;42:113-8.
 77. Hradský M, Hybásek I, Cernoch V. Oesophageal abnormalities in Sjögren's syndrome. *Scand J Gastroenterol* 1967;2:200-3.
 78. Maury CPJ, Törnroth T, Teppo AM. Atrophic gastritis in Sjögren syndrome. Morphologic, biochemical and immunologic findings. *Arthritis and Rheum* 1985;28:388-94.
 79. Collin P, Karnöven AL, Korpela M, Laippala P, Helin H. Gastritis classified in accordance with the Sydney system in patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Gastroentero* 1997;32:108-111.
 80. Pal B, Griffiths ID, Junglee D, Dandova P. Salivary amylase and pancreatic enzymes in Sjögren's syndrome. *Clin Chem* 1987;33:305-7.
 81. Coll J, Navarro S, Tomas R, Elena M, Martinez E. Exocrine pancreatic function in Sjogren's syndrome. *Arch Intern Med*. 1989;149:848-52.
 82. Navarro S, Elena M, Coll J. More on enzymes in Sjögren's syndrome. *Clin Chem* 1988;34:2179.
 83. Constantopoulos SH, Tsianos EV, Moutsopoulos HM. Pulmonary and gastrointestinal manifestations of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin N Am* 1992;18:617-35.
 84. Tsianos EV, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome and the gut. *Baillieres Clin Rheumatol* 1989;3:357-70.

-
85. Fenster LF, Buchanan WW, Laster L. Studies of pancreatic function in Sjögren's syndrome. *Ann Intern Med* 1964;61:498-508.
 86. Alarcón-Segovia D, Diaz-Jovanen, Fishbein E. Features of Sjögren's syndrome in primary biliary cirrhosis. *Ann Intern Med* 1973;31:31.
 87. Tsianos EV, Hoofnagle JH, Fox PC. Sjögren's syndrome in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990;11:730.
 88. Coll J, Ramos-Casals. Síndrome de Sjögren. En "Tratado de Medicina Interna Farreras-Rozman", Decimoquinta edición, Editorial Elsevier España, Madrid 2004, páginas 1103-05.
 89. Lindgren S, Manthorpe R, Eriksson S. Autoimmune liver disease in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Hepatol* 1994;20:354-8.
 90. Skopouli FN, Barbatis C, Moutsopoulos HM. Liver involvement in primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1994;33:745-8.
 91. Biasi D, Caramasch P, Carletto A, Casaril M, Colombari R, Zeminian S, Bambara LM. Sjögren's syndrome associated with autoimmune hepatitis. A case report. *Clin Rheumatol* 1997;16:409-12.
 92. Montefescu PP, Geiss AC, Bronzo RL, Randall S, Kahn E, McKinley MJ. Sclerosing cholangitis, chronic pancreatitis and Sjögren's syndrome; a syndrome complex. *Am J Surg* 1984;184:822-6.
 93. Gonzalez-Alvaro I, Carmona-Ortell L, Amigo-Etxenagusia A, Castaneda Sanz S. Nodular regenerative hyperplasia of the liver and primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1994;21:168-9.
 94. Eriksson P, Denneberg T, Larsson L, Lindstrom F. Biochemical markers of renal disease in primary Sjögren's syndrome. *Scand J Urol Nephrol* 1995;29:383-92.

-
95. Pokorny G. Sonkodi S. Ivanyi B. Mohacsi G. Csati S. Ivanyi T. Ormos J. Renal involvement in patients with primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1989;18:231-4.
 96. Goules A, Masouridi S, Tzioufas AG, Ioannidis JPA, Skopouli F, Moutsopoulos HM. Clinically significant and biopsy-documented renal involvement in primary Sjögren's syndrome. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:241-9.
 97. 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;81:270-80.
 98. Enestrom S, Denneberg T, Eriksson P. Histopathology of renal biopsies with correlation to clinical findings in primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:697-703.
 99. Tsokos M, Lazarou S, Moutsopoulos HM. Vasculitis in primary Sjögren's syndrome. *Am J Pathol* 1987;88:26-31.
 100. Siamopoulos K, Mavridis A, Elisaf M, Drosos A, Moutsopoulos HM. Kidney involvement in primary Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1986;Suppl 61:156-60.
 101. Moutsopoulos HM. Cledes J. Skopouli FN. Elisaf M. Youinou P. Nephrocalcinosis in Sjogren's syndrome: a late sequelae of renal tubular acidosis. *J Intern Med* 1991;230:187-91.
 102. Siamopoulos KC, Elisaf M, Drosos AA, Mavridis AA, Moutsopoulos HM. Renal tubular acidosis in primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1992;11:226-30.

-
103. Aasarod K, Haga HJ, Berg KJ, Hammerstrom J, Jorstad S. Renal involvement in primary Sjogren's syndrome. *QJM*. 2000;93:297-304.
104. Talal, Zisman E, Schur P. Renal tubular acidosis, glomerulonephritis and immunologic factors in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1968;11:774-86.
105. Gamron S, Barberis G, Onetti CM, Strusberg I, Hliba E, Martellotto G, et al. Mesangial nephropathy in Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 2000;29:65-7.
106. Font J, Cervera R, López-Soto A, Darnell A, Ingelmo M. Mixed membranous and proliferative glomerulonephritis in primary Sjögren's syndrome. *Brit J Rheumatol* 1989;28:548-50.
107. Blanco Y, Allende R, Rodriguez I, Abud C. Afección del sistema nervioso central. En "Síndrome de Sjögren", eds Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Ed. Masson, Barcelona 2003, pp253-278.
108. Coates T, Slavotinek JP, Rischmueller M, Schultz D, Anderson C, Dellamelva M, et al. Cerebral white matter lesions in primary Sjogren's syndrome: a controlled study. *J Rheumatol*. 1999;26:1301-5.
109. Escudero D, Latorre P, Codina M, Coll-Canti J, Coll J. Central nervous system disease in Sjogren's syndrome. *Ann Med Interne (Paris)*. 1995;146:239-42.
110. Malinow KL, Molina R, Gordon B, Selnes OA, Provost TT, Alexander EL. Neuropsychiatric dysfunction in primary Sjogren's syndrome. *Ann Intern Med* 1985;103:344-50.

-
111. de la Red G, Ramos-Casals M, Valls J, Graus F, Font J. Afección del sistema nervioso periférico. En "Síndrome de Sjögren", eds Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Ed. Masson, Barcelona 2003, pp 279-94.
112. Font J, Valls J, Cervera R, Ingelmo M, Graus F. Pure sensory neuropathy in patients with primary Sjögren syndrome: clinical, immunological, and electromyographic findings. *Ann Rheumatic diseases* 1990; 49:775-8.
113. Kaltreider HB, Talal N. The neuropathy in Sjögren syndrome. Trigeminal nerve involvement. *Ann Intern Med* 1969; 70:751-2.
114. Alexander EL. Neuromuscular complications of primary Sjögren's syndrome. In: Talal N, Moutsopoulos HM, Kassan SS, eds. *Sjögren syndrome. Clinical and immunological aspects*. Heidelberg, Germany: Springe-Verlag, 1987: 61-82.
115. Karsh J, Pavlidis N, Weintraub BD, Moutsopoulos HM. Thyroid disease in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 1326-9.
116. Kelly CA, Foster H, Pal B, Griffiths I. Primary Sjögren's syndrome in north east England- a longitudinal study. *Br J Rheumatol* 1991; 30:437-42.
117. Bouanani M, Bataille R, Piechaczyk M, Salhi SL, Pau B, Bastide M. Autoimmunity to human thyroglobulin. Respective epitopic specificity patterns of anti-human thyroglobulin autoantibodies in patients with Sjögren's syndrome and patients with Hashimoto's thyroiditis. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1585-93.
118. Perez EB, Kraus A, Lopez G, Cifuentes M, Alarcón-Segovia D. Autoimmune thyroid disease in primary Sjogren's syndrome. *Am J Med* 1995; 99: 480-4.

-
119. Punzi L, Ostuni PA, Betterle C, De Sandre P, Botsois C, Gambari PF. Les affections thyroïdiennes dans le syndrome de Gougerot-Sjogren primitif. *Rev Rhum (Ed Fr)* 1996; 63: 943-8.
120. Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Cervera R, Gaya J, Halperin I, Ubieta I, et al. Thyroid disease in primary Sjögren syndrome. Study in a series of 160 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79: 103-8.
121. Coll J, Anglada J, Tomas S, Reth P, Goday A, Millan M, et al. High prevalence of subclinical Sjogren's syndrome features in patients with autoimmune thyroid disease. *J Rheumatol.* 1997;24:1719-24.
122. Caballero M, Martinez P, Bernal M. Afección otorrinolaringológica. En "Síndrome de Sjögren", eds Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Ed. Masson, Barcelona 2003, pp305-310.
123. Kahn M.F., Peltier A.P., Meyer O, Piette J.C. Les Maladies systemiques. Gougerot Sjogren's syndrome. *Flammation De 3^a, 2^a tiraje*, 1991:517-8.
124. Davidson B.K.S, Kelly C.A, Griffiths I.D. Primary Sjogren's syndrome in the North East of England: a long-term follow-up study. *Rheumatology* 1999;38:245-53.
125. Pertovaara M, Korpela M, Uusitalo H, Pukander J, Miettinen A, Helin H, Pasternack A. Clinical follow up study of 87 patients with sicca symptoms (dryness of eyes or mouth, or both). *Ann Rheum Dis* 1999;58:423-7.
126. Youinou P, Fauquert P, Pennec YL, Bendaoud B, Katsikis P, Le Goff P. Raised C-reactive protein response in rheumatoid arthritis patients with secondary Sjogren's syndrome. *Rheumatol Int* 1990;10:39-41.

-
127. Martínez-Lavin M, Vaughan J, Tan E. Autoantibodies and the spectrum of Sjogren's syndrome. *Ann Intern Med* 1979;91:185-90.
128. Alexander EL, Arnett FC, Provost TT, Stevens MB. Sjogren's Syndrome: association of Anti-Ro(SS-A) antibodies with vasculitis, hematologic abnormalities, and serologic hyperactivity. *Ann Intern Med* 1983;98:155-9.
129. Sutcliffe N, Inanc M, Speight P, Isenberg D. Predictors of lymphoma development in primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 1998;28:80-7.
130. Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of Primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000;29:296-304.
131. Katayama I. Clinical analysis of recurrent hypergammaglobulinemic purpura associated with Sjogren's syndrome. *J Dermatol* 1995;22:186-90.
132. Malaviya AN, Kaushik P, Budhiraja S, al-Mutairi M, Nampoory MR, Hussein A, Akanji AO. Hypergammaglobulinemic purpura of Waldenstrom: report of 3 cases with a short review. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:518-22.
133. Ramos-Casals M, Fernández M, García Carrasco et al. Prevalencia y significado clínico de las hipogammaglobulinemia en pacientes con SSp. *Rev Esp Reumatol* 2001;8 (Suppl):147.
134. Amman AJ, Hong R. Selective IgA deficiency: presentation of 30 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 197;50:226-36.
135. Rodriguez-Cuartero A, Ceballos A, Gómez del Cerro. Síndrome de Sjogren primario y deficiencia de IgA. Letter. *Rev Clin Esp* 1991;198:299-300.

-
136. Perez Pena F, Martinez Santos P, Sanchez Ramos A, Mateos Sanchez A, Lopez Alonso G. Deficiencia selectiva de IgA. *Rev Clin Esp* 1978;148:521-3.
137. Matter L, Wilhelm J, Angehrn W. Selective antibody deficiency and recurrent pneumococcal bacteremia in a patient with Sjogren's syndrome. Hyperimmunoglobulinemia G, and deficiencies of IgG2 and IgG4. *N Engl J Med* 1985;312:1039-42.
138. Montecucco C, Cherie-Ligniere EL, Rosso R, Longhi M, Riccardi A. Sjogren-like syndrome in kappa chain deficiency. *Arthritis Rheum* 1986;29:1532-3.
139. Eriksson P, Almroth G, Denneberg T, Lindstrom FD. IgG2 Deficiency in primary Sjogren's syndrome and Hypergammaglobulinemic Purpura. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;70:60-5.
140. Steuer A, McCrea DJ, Colaco CB. Primary Sjogren's syndrome, ulcerative colitis and selective IgA deficiency. *Postgrad Med J* 1996;72:499-500.
141. Ramos-Casals M, Cervera R, Yagüe J, García-Carrasco M, O. Trejo, Jiménez S et al. Cryoglobulinemia in primary SS: prevalence and clinical characteristics in a series of 115 patients. *Semin Arthritis Rheum* 1998;28:200-5.
142. Talal N, Moutsopoulos H.M., Kassan SS (Eds) Sjogren's syndrome, clinical and immunological aspects. Lymphoid malignancy and monoclonal proteins. Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1987:129-36.
143. Sugai S, Shimizu S, Tachibana J, Sawada M, Hirose Y, Takiguchi T, Konda S. Monoclonal gammopathies in patients with Sjogren's syndrome. *Jpn J Med* 1988;27:2-9.

-
144. Michalski JP, Daniels TE, Talal N, Grey HM. β 2 microglobulin and lymphocytic infiltration in Sjogren's syndrome. *N Engl J Med* 1975; 293:1228-31.
 145. Bianucci G, Campana G, Maddali-Bongi S, D'Agata A, Pradella F, Colafranceschi M, Castagnoli A. Serum beta 2-microglobulin and HLA alloantigens in primary Gougerot-Sjogren syndrome. A possible relation with HLA-DR3 specificity. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1991;58:339-42.
 146. Lahdensuo A, Korpela M. Pulmonary findings in patients with primary Sjogren's syndrome. *Chest* 1995;102:316-9.
 147. Pertovaara M, Korpela M, Kouri T, Pasternack A. The occurrence of renal involvement in primary Sjogren's syndrome: a study of 78 patients. *Rheumatology* 1999;38:1113-20.
 148. Ramakrishna R, Chaudhuri K, Sturges A, Manoharan A. Haematological manifestations of primary Sjogren's syndrome: a clinicopathological study. *Q J Med* 1992;84:547-54.
 149. Schattner A, Friedman J, Klepfish A, Berrebi A. Immune cytopenias as the presenting finding in primary Sjogren's syndrome. *Q J Med* 2000;93:825-9.
 150. Chudwin DS, Daniels TE, Wara DW, Ammann AJ, Barrett DJ, Whitcher JP, Cowan MJ. Spectrum of Sjogren's syndrome in children. *J Pediatr* 1981;98:213-7.
 151. Boling EP, Wen J, Reveille JD, Bias WB, Chused TM, Arnett FC. Primary Sjogren's syndrome and autoimmune hemolytic anemia in sisters. *Am J Med* 1983;74:1066-71.
 152. Schattner A, Shtalrid M, Berrebi A. Autoimmune hemolytic anemia preceding Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1983;10:482-4.

-
153. Montane de la Roque P, Arlet P, Chartier JP, Cornu JJ, Juchet H, Ollier S, Le Tallec Y. Autoimmune hemolytic anemia disclosing primary Gougerot-Sjogren syndrome. *Rev Med Interne* 1993;14:133-4.
154. Usui K, Anzai C, Sano K. Primary Sjogren's syndrome with pulmonary hypertension. *Nihon Koyuki Gakkai Zasshi* 1998;36:478-81.
155. Fye KH, Daniels TE, Zulman J, Michalski JP, Jaffe R, Talal N. Aplastic anemia and lymphoma in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1980;23:1321-5.
156. Yoshida H, Wakashin M, Okuda K. Successful treatment of aplastic anemia associated with chronic thyroiditis and Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*. 1986;13:1189-90.
157. Quiquandon I, Morel P, Lai JL, Bauters F, Dresch C, Gluckman E, et al. Primary Sjogren's syndrome and aplastic anaemia. *Ann Rheum Dis* 1997;56:438-41.
158. Williamson J, Paterson RW, McGavin DD, Greig WR, Whaley K. Sjogren's syndrome in relation to pernicious anaemia and idiopathic Addison's disease. *Br J Ophthalmol*. 1970;54:31-6.
159. Wegelius O, Fyhrquist F, Adner PL. Sjogren's syndrome associated with vitamin B12 deficiency. *Acta Rheum Scand* 1970;16:184-90.
160. Pedro-Botet J, Coll J, Tomas S, Soriano JC, Gutierrez-Cebollada J. Primary Sjogren's syndrome associated with chronic atrophic gastritis and pernicious anemia. *J Clin Gastroenterol* 1993;16:146-8.
161. Giordano N, Senesi M, Battisti E, DeRegis FM, Gennari C. Sjogren's syndrome and pure red cell aplasia. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:344-5.

-
162. Ibkhatra S, Jacobson L, Manthorpe R. The association of pure red cell aplasia and primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15:119-20.
163. Aoki A, Ohno S, Ueda A. Hematological abnormalities of primary Sjogren's syndrome. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2000;23:124-8.
164. Henrikson G, Manthorpe R, Bredberg A. Antibodies to CD4 in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:142-7.
165. Starkebaum G, Dancey JT, Arend WP. Chronic neutropenia: possible association with Sjogren's syndrome. *J. Rheumatol.* 1981;8:679-84.
166. Yamato E, Fujioka Y, Masugi F, Nakamaru M, Tahara Y, Kurata Y, Ogihara T. Autoimmune Neutropenia with anti-neutrophil autoantibody associated with Sjogren's syndrome. *Am J Med Sci* 1990;300:102-3.
167. Goske J, Askari AD, Dickman E, Forman WB, Crum ED. Granulocytopenia with marked lymphocytosis manifesting Sjogren's syndrome. *Am J Hematol* 1980;9:435-7.
168. Petrasovicova V, Pavelka K Jr, Neuwirtova R, Korinkova P. Agranulocytosis in a patient with primary Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1990;9:530-4.
169. Boros P, Odin JA, Chen J, Unkeless JC. Specificity and class distribution of Fc γ R-specific autoantibodies in patients with autoimmune disease. *J. Immunol* 1994;152:302.
170. Lamour A, Le Corre R, Pennec YL, Cartron J, Youinou P. Heterogeneity of neutrophil antibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *Blood* 1995;86:3553-9.

-
171. Lamour A, Le Corre R, Pennec YL, Youinou P. Anti-Fc gamma receptor autoantibodies is related to the clinical presentation of primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1995;22:2241-5.
172. Lamour A, Soubrane C, Ichen M, Pennec YL, Khayat D, Youinou P. Fc-gamma receptor III shedding by polymorphonuclear cells in primary Sjogren's syndrome. *Eur J Clin Invest* 1993;23:97-101.
173. Sugai S, Tachibana J, Shimizu S, Konda S. Thrombocytopenia in patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1989;32:234-5.
174. Haro T, Shimoike E, Horiuchi T, Maruyama T, Niho Y. Severe thrombocytopenia caused by digitoxin intoxication in a patient with heart failure associated with Sjogren's syndrome. *Jpn Circ J* 2000;64:309-11.
175. Berrebi A, Shtalrid M, Talmor M, Vorst E. Thrombocytopenia in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1982;25:1510.
176. Berrebi A, Schattner A. Sjogren's syndrome with IgG kappa paraprotein and thrombocytopenia. *Arthritis Rheum* 1981;24:1451-2.
177. Salaffi F, Argalia G, Carotti M, Giannini FB, Palombi C. Salivary gland ultrasonography in the evaluation of primary Sjogren's syndrome. Comparison with minor salivary gland biopsy. *J Rheumatol*. 2000;27:1229-3126.
178. Niemela RK, Paakko E, Suramo I, Takalo R, Hakala M. Magnetic resonance imaging and magnetic resonance sialography of parotid glands in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2001;45:512-8.
179. Manthorpe R, Andersen V, Jensen OA, Oxholm P, Prause JU, Schiødt M. Editorial comments to the four sets of criteria for Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1986;61:31-5.

-
180. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993;36:340-7.
181. Fox RI, Saito I. Criteria for diagnosis of Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 1994;20:391-407.
182. Ostuni P, Botsios C, Sfriso P, De Sandre P, Semerano L, Todesco S. Diagnosis and classification of primary Sjögren's syndrome. Comparison of 3 criteria sets in 219 cases. *Recenti Prog Med* 2001;92:32-6.
183. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Coll J, Gerli R, Hatron PY, et al. Assessment of the European classification criteria for Sjögren's syndrome in a series of clinically defined cases: results of a prospective multicentre study. The European Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's Syndrome. *Ann Rheum Dis* 1996;55:116-21.
184. Brennan MT, Fox PC. Sex differences in primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol.* 1999;26:2373-6.
185. Lee M, Rutka JA, Slomovic AR, McComb J, Bailey DJ, Bookman AA. Establishing guidelines for the role of minor salivary gland biopsy in clinical practice for Sjogren's syndrome. *J Rheumatol.* 1998;25:247-53.
186. Manthorpe R, Benoni C, Jacobsson L, Kirtava Z, Larsson A, Liedholm R, et al. Lower frequency of focal lip sialadenitis (focus score) in smoking patients. Can tobacco diminish the salivary gland involvement as judged by histological examination and anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies in Sjogren's syndrome?. *Ann Rheum Dis.* 2000;59:54-60.

-
187. Zandbelt MM, van den Hoogen FH, de Wilde PC, van den Berg PJ, Schneider HG, van de Putte LB. Reversibility of histological and immunohistological abnormalities in sublabial salivary gland biopsy specimens following treatment with corticosteroids in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:511-3.
188. Cervera R, Font J, Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Rosas J, Morla RM, et al. Primary Sjogren's syndrome in men: clinical and immunological characteristics. *Lupus.* 2000;9:61-4.
189. Haga HJ, Jonsson R. The influence of age on disease manifestations and serological characteristics in primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol.* 1999;28:227-32.
190. Garcia-Carrasco M, Cervera R, Rosas J, Ramos-Casals M, Morla RM, Siso A, et al. Primary Sjogren's syndrome in the elderly: clinical and immunological characteristics. *Lupus.* 1999;8:20-3.
191. Pourmand N, Wahren-Herlenius M, Gunnarsson I, Svenungsson E, Lofstrom B, Ioannou Y, et al. Ro/SSA and La/SSB specific IgA autoantibodies in serum of patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1999;58:623-9.
192. Coll J, Porta M, Rubies-Prat J, Gutierrez-Cebollada J, Tomas S. Sjogren's syndrome: a stepwise approach to the use of diagnostic tests. *Ann Rheum Dis.* 1992;51:607-10.
193. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Garcia-Carrasco M, Font J. Sarcoidosis or Sjogren Syndrome?: Clues to Defining Mimicry or Coexistence in 59 Cases. *Medicine.* 2004;83:85-95.

-
194. Coll J, Gambus G, Corominas J, Tomas S, Esteban JI, Guardia J. Immunohistochemistry of minor salivary gland biopsy specimens from patients with Sjogren's syndrome with and without hepatitis C virus infection. *Ann Rheum Dis*. 1997;56:390-2.
195. Grosbois B, Jegou P, Leblay R. [Syndrome de Gougerot-Sjögren et syndromes lymphoprolifératifs malins]. *Rev Méd Interne* 1998 ;19 :319-24.
196. Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, Hoover R, Kimberly RP, Budman DR, et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med* 1978;89:888-92.
197. Shearn MA. Sjogren's syndrome. *Sjögren's syndrome. Major Probl Intern Med*. 1971;2:1-262.
198. Whaley K, Webb J, McAvoy BA, Hughes GR, Lee P, MacSween RN, Buchanan WW. Sjögren's syndrome. II. Clinical associations and immunological phenomena. *Q J Med* 1973;42:513-48.
199. McCurley TL, Collins RD, Ball E, Collins RD. Nodal and extranodal lymphoproliferative disorders in Sjogren's syndrome: a clinical and immunopathologic study. *Hum Pathol* 1990;21:482-92.
200. Pariente D, Anaya JM, Combe B, Jorgensen C, Emberger JM, Rossi JF, Sany J. Non-Hodgkin's lymphoma associated with primary Sjogren's syndrome. *Eur J Med* 1992;1:337-42.
201. Pavlidis NA, Drosos AA, Papadimitriou C, Talal N, Moutsopoulos HM. Lymphoma in Sjogren's syndrome. *Med Pediatr Oncol* 1992;20:279-83.
202. Zufferey P, Meyer OC, Grossin M, Kahn MF. Primary Sjogren's syndrome (SS) and malignant lymphoma. A retrospective cohort study of 55 patients with SS. *Scand J Rheumatol* 1995;24:342-5.

-
203. Kruize AA, Hene RJ, van der Heide A, Bodeutsch C, de Wilde PC, van Bijsterveld OP, et al. Long-term follow-up of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:297-303.
204. Hernandez JA, Olive A, Ribera JM, Tena X, Cuxart A, Feliu E. Probability of the development of non-Hodgkin's lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1996;25:396-7.
205. Valesini G, Priori R, Bavoillot D, Osborn J, Danieli MG, Del Papa N, et al. Differential risk of non-Hodgkin's lymphoma in Italian patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1997;24:2376-80.
206. Gannot G, Lancaster HE, Fox PC. Clinical course of primary Sjogren's syndrome: salivary, oral, and serologic aspects. *J Rheumatol*. 2000;27:1905-9.
207. Pertovaara M, Pukkala E, Laippala P, Miettinen A, Pasternack A. A longitudinal cohort study of Finnish patients with primary Sjögren's syndrome: clinical, immunological and epidemiological aspects. *Ann Rheum Dis* 2001;60:467-72.
208. Baldini C, Tavoni A, Merlini G, Sebastiani M, Bombardieri S. [Primary Sjogren's syndrome: clinical and serological feature of a single centre] *Reumatismo*. 2005;57:256-61.
209. Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, Brito MP, Rosas J, Calvo-Alen J, et al. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81:281-92.
210. 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 Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:767-72.

211. Kauppi M, Pukkala E, Isomaki H. Elevated incidence of hematologic malignancies in patients with Sjögren's syndrome compared with patients with rheumatoid arthritis. *Cancer Causes Control* 1997;8:201-4.
212. Ramos-Casals M, Cervera R, Font J, Garcia-Carrasco M, Espinosa G, Reino S, et al. Young onset of primary Sjögren's syndrome: clinical and immunological characteristic. *Lupus* 1998, 7:202-6.
213. Godwin JT. Benign lymphoepithelial lesion of the parotid gland (adenolymphoma, chronic inflammation, lymphoepithelioma, Mikulicz's disease): report of 11 cases. *Cancer* 1952;5:1089-103.
214. Talal N, Sokoloff L, Barth WF. Extrasalivary lymphoid abnormalities in Sjogren's syndrome (reticulum cell sarcoma, "pseudolymphoma," macroglobulinemia). *Am J Med* 1967;43:50-65.
215. DeAlmeida PC, Harris NI, Bhan AK. Characterization of immature sinus histiocytes (monocytoid cells) and reactive lymph nodes by use of monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 1984;15:330-5.
216. Stein H, Lennert K, Mason DY, Liangru S, Ziegler A. Immature sinus histiocytes. Their identification as a novel B-cell population. *Am J Pathol* 1984;117:44-52.
217. van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C, De Vos R, Desmet VJ. Immature sinus histiocytosis: light- and electron-microscopic features, immunologic phenotype, and relationship with marginal zone lymphocytes. *Am J Pathol* 1985;118:266-77.

-
218. Hansen LA, Prakash UB, Colby TV. Pulmonary lymphoma in Sjogren's syndrome. *Mayo Clin Proc* 1989;64:920-31.
219. De Vita S, Ferraccioli G, De Re V, Dolcetti R, Carbone A, Bartoli E, Boiocchi M. The polymerase chain reaction detects B cell clonalities in patients with Sjogren's syndrome and suspected malignant lymphoma. *J Rheumatol* 1994;21:1497-501.
220. Isaacson P, Spencer J. Autoimmunity and malignancy. In: Isenberg DA, Horsfall AC (ed): *Autoimmune Disease. Focus on Sjogren's syndrome*. Oxford England, Bios Scientific Publishers 1994,pp 189-204.
221. Isaacson PG, Spencer J. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Histopathology* 1987;11:445-62.
222. Sheibani K, Burke JS, Swartz WG, Nademanee A, Winberg CD. Monocytoid B-cell lymphoma. Clinicopathologic study of 21 cases of a unique type of low-grade lymphoma. *Cancer* 1988;62:1531-8.
223. Shin SS, Sheibani K, Fishleder A, Ben-Ezra J, Bailey A, Koo CH, et al. Monocytoid B-cell lymphoma in patients with Sjogren's syndrome: a clinicopathologic study of 13 patients. *Hum Pathol* 1991;22:422-30.
224. Isaacson PG, Wright DH. Extranodal malignant lymphoma arising from mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer* 1984;53:2515-24.
225. Isaacson PG, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue: a distinctive B cell lymphoma. *Cancer* 1983;52:1410-6
226. Cogliatti SB, Lennert K, Hansmann ML, Zwingers TL. Monocytoid B cell lymphoma: clinical and prognostic features of 21 patients. *J Clin Pathol* 1990;43:619-25.

-
227. Burke JS, Sheibani K. Hairy cells and monocytoid B lymphocytes: are they related?. *Leukemia* 1987;1:298-300.
228. Traweek ST, Sheibani K, Winberg CD, Mena RR, Wu AM, Rappaport H. Monocytoid B-cell lymphoma: its evolution and relationship to other low-grade B-cell neoplasms. *Blood* 1989;73:573-8.
229. Sheibani K, Koo C, Bailey A et al. Progression of monocytoid B-cell lymphoma to large cell lymphoma: report of six cases. *Lab Invest* 1990;62:92^a (abstract).
230. Ortiz-Hidalgo C, Wright DH. The morphological spectrum of monocytoid B-cell lymphoma and its relationship to lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Histopathology* 1992;21:555-61.
231. Shearn KA, Moutsopoulos HM, Sawada S, Gak C. Sjögren's syndrome with light chain myeloma. *West J Med* 1975;123:496-7.
232. Bourbigot B, Potel G, Barrier J, Dubigeon P, Hauptmann G, Guenel J. [Association of partial genetic C4 deficiency, Sjogren's syndrome and myeloma]. *Presse Med* 1983;12:3006.
233. Casaril M, Venturini L, Pecci R, Bonazzi L, Menestrina F, Gabrielli GB, Corrocher R. A case of parotideal myeloma in Sjogren's syndrome. *Haematologica* 1987;72:167-70 .
234. Iijima M, Suzuki N, Arata M et al. A case of Sjögren's syndrome associated with extramedullary myeloma. *Jpn J Med* 1989;78:618.
235. Villanueva JL, Rivera J, Ogea JL, Ortega C, Lopez-Beltran A, Pena J, Santamaria M. Evolution of extramedullary plasmacytoma in a patient with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1990;33:150-1.

-
236. Ota T, Wake A, Eto S, Kobayashi T. Sjogren's syndrome terminating with multiple myeloma. *Scand J Rheumatol* 1995;24:316-8.
237. Rodriguez-Cuartero A, Salas-Galan A. Sjogren's syndrome and multiple myeloma. *Eur J Cancer* 1997;33:167-8.
238. Fadilah SAW, Cheong SK. Multiple myeloma presenting as Sjögren's syndrome. *Am J Hematol* 1999;61:217-8.
239. Gal I, Zeher M. [Sjogren's syndrome and multiple myeloma]. *Orv Hetil.* 2000;141:2087-9.
240. Terpos E, Angelopoulou MK, Variami E, Meletis JC, Vaiopoulos G. Sjogren's syndrome associated with multiple myeloma. *Ann Hematol.* 2000;79:449-51.
241. Shokri F, Mageed RA, Maziak BR, Talal N, Amos N, Williams BD, Jefferis R. Lymphoproliferation in primary Sjögren's syndrome. Evidence of selective expansion of a B cell subset characterized by the expression of cross-reactive idiotypes. *Arthritis Rheum* 1993;36:1128-36.
242. Jonsson V, Wiik A, Hou-Jensen K, Christiansen M, Ryder LP, Madsen HO, et al. Autoimmunity and extranodal lymphocytic infiltrates in lymphoproliferative disorders. *J Intern Med.* 1999;245:277-86.
243. Wilke WS, Tubbs RR, Bukowski RM, Currie TE, Calabrese LH, Weiss RA, et al. T cell lymphoma occurring in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1984;27:951-5.
244. Schuurman HJ, Gooszen HC, Tan IW, Kluin PM, Wagenaar SS, van Unnik JA. Low-grade lymphoma of immature T-cell phenotype in a case of lymphocytic interstitial pneumonia and Sjogren's syndrome. *Histopathology* 1987;11:1193-204.

-
245. Isenberg DA, Griffiths MH, Rustin M, Webb FWS, Souhami RL. T-cell lymphoma in a patient with longstanding rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1987;30:115-7.
246. Rustin MH, Isenberg DA, Griffiths MH, Gilkes JJ. Sjogren's syndrome and pleomorphic T-cell lymphoma presenting with skin involvement. *J R Soc Med* 1988;81:47-9.
247. Fredenrich A, Fuzibet JG, Lasserre M, Taillan B, Raynaud S, Gratecos N, Dujardin P. Non-Hodgkin's malignant T-cell lymphoma in Gougerot-Sjogren syndrome. *Ann Med Interne (Paris)* 1989;140:428.
248. van der Valk PG, Hollema H, van Voorst Vander PC, Brinker MG, Poppema S. Sjogren's syndrome with specific cutaneous manifestations and multifocal clonal T-cell populations progressing to a cutaneous pleomorphic T-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1989;92:357-61.
249. Chevalier X, Gaulard P, Voisin MC, Martigny J, Farcet JP, Larget-Piet B. Peripheral T cell lymphoma with Sjogren's syndrome: a report with immunologic and genotypic studies. *J Rheumatol* 1991;18:1744-6.
250. Ros S, Gomez C, Nolla JM, Roig-Escofet D. Linfoma pulmonar angiocéntrico de células T asociado a síndrome de Sjögren primario. *Med Clin (Barc)* 1996;107:117-8.
251. Dubin DB, Hurowitz JC, Brettler D, Bernhard JD, Kadin ME, Wallace JE, et al. Adnexotropic T-cell lymphoma presenting with generalized anhidrosis, progressive alopecia, pruritus, and Sjögren's syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:493-7.

-
252. Goya K, Murakami A, Koseto M, Tatekawa T, Fujii T, Suzuki T. [Adult T-cell leukemia/lymphoma following Sjogren's syndrome]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 2001;90:127-9.
253. 261. Royer B, Cazals-Hatem D, Sibilia J, Agbalika F, Cayuela JM, Soussi T, et al. Lymphomas in patients with Sjögren's syndrome are marginal zone B-cell neoplasms, arise in diverse extranodal and nodal sites, and are not associated with viruses. *Blood* 1997;90:766-75.
254. Freimark B, Fantozzi R, Bone R, Bordin G, Fox R. Detection of clonally expanded salivary gland lymphocytes in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1989;32:859-69.
255. Voulgarelis M, Dafni UG, Isenberg DA, Mousopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. A multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:1765-72.
256. Garcia-Carrasco M, Brito-Zerón P, Garcia-Martinez MA, Ramos-Casals M, Lopez-Guillermo A. Procesos linfoproliferativos en el síndrome de Sjögren. En "Síndrome de Sjögren", eds Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Ed. Masson, Barcelona 2003, pp495-528.
257. Hornbaker JH Jr, Foster EA, Williams GS, Davis JS. Sjogren's syndrome and nodular reticulum cell sarcoma. *Arch Intern Med* 1966;118:449-52.
258. Miller DG. The association of immune disease and malignant lymphoma. *Ann Intern Med* 1967;66:507-21.

-
259. Waldmann TA. Rearrangement of immunoglobulin and T-cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Adv Immunol* 1987;40:247-51.
260. Borowitz MJ. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometry. *Clin Immunol Newsletter* 1993;13:53-60.
261. Wormsly SB, Varki NM. Immunophenotypic characterization of chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Immunol Newsletter* 1993;13:60-3.
262. Fishleder A, Tubbs R, Hesse B, Levine H. Uniform detection of immunoglobulin-gene rearrangement in benign lymphoepithelial lesions. *N Engl J Med* 1987;316:1118-21.
263. Carbone A, De Re V, Gloghini A, Volpe R, Taviani M, Tirelli U, et al. Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and in situ immunophenotyping in lymphoproliferative disorders. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1989;414:223-30.
264. Weiss LM, Spagnolo DV. Assessment of clonality in lymphoid proliferations. *Am J Pathol* 1993;142:1679-82.
265. Bodeutsch C, de Wilde PC, Kater L, van den Hoogen FH, Hene RJ, van Houwelingen JC, et al. Monotypic plasma cells in labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome: prognosticator for systemic lymphoproliferative disease. *J Clin Pathol* 1993;46:123-8.
266. Yamamoto K, Masuko K, Takahashi S, Ikeda Y, Kato T, Mizushima Y, et al. Accumulation of distinct T cell clonotypes in human solid tumors. *J Immunol* 1995;154:1804-9.
267. Theofilopoulos AN, Balderas RS, Baccala R, Kono DH. T-cell receptor genes in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 681: 33-46.

-
268. Diss TC, Peng H, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Pan L. Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the polymerase chain reaction is dependent on primer selection and lymphoma type. *J Pathol* 1992;169:291-5.
269. Speight PM, Jordan R, Colloby P, Nandha H, Pringle JH. Early detection of lymphomas in Sjogren's syndrome by in situ hybridisation for kappa and lambda light chain mRNA in labial salivary glands. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994;30:244-7.
270. Rosas J, Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Bermejo A. Tratamiento de la afección oral. En "Síndrome de Sjögren", eds Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Ed. Masson, Barcelona 2003, pp531-538.
271. Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z, LeVeque FG, Salisbury PL 3rd, Tran Johnson TK, et al. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren's syndrome. *Arch Intern Med* 1999;159:174-81.
272. Papas A, Charney M, Goden H, et al. The effectiveness of oral pilocarpine-HCl tablets for the treatment of dry mouth symptoms associated with Sjögren's syndrome. A dose-titration study. *Arthritis Rheum* 1997;40 Suppl 9:S202.
273. Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Nardi N, Font J. [Resultados del tratamiento con pilocarpina oral en 100 pacientes con síndrome de Sjögren primario]. *Med Clin (Barcelona)*. 2006;126:637.

-
274. Fife RS, Chase WF, Dore RK, Wiesenhutter CW, Lockhart PB, Tindall E, Suen JY. Cevimeline for the treatment of xerostomía in patients with Sjögren syndrome. *Arch Intern Med* 2002;162:1293-300.
275. Petrone D, Condemi JJ, Fife R, Gluck O, Cohen S, Dalgin P. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of cevimeline in Sjögren's syndrome patients with xerostomía and keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 2002;46:748-54.
276. Arturi AS, Marcos JC, Ramos-Casals M. Tratamiento de la afección extraglandular. En "Síndrome de Sjögren", eds Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Ed. Masson, Barcelona 2003, pp555-564.
277. Shiozawa S, Morimoto I, Tanaka Y, Shiozawa K. A preliminary study on the interferon-alpha treatment for xerostomia of Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol*. 1993;32:52-4.
278. Steinfeld SD, Demols P, Van Vooren JP, Cogan E, Appelboom T. Zidovudine in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38:814-17.
279. Price EJ, Rigby SP, Clancy U, Venables PJ. A double blind placebo controlled trial of azathioprine in the treatment of primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1998;25:896-99.
280. Voulgarelis M, Petroutsos G, Moutsopoulos HM, Skopouli FN. 2-chloro-2'-deoxyadenosine in the treatment of Sjogren's syndrome-associated B cell lymphoproliferation. *Arthritis Rheum*. 2002;46:2248-49.
281. Stewart A, Bleukinsopp PT, Henry K. Bilateral parotid MALT lymphoma and Sjögren's syndrome. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988;32:318-22.

-
282. Ramos M, Cervera R, Garcia-Carrasco M, Miret C, Munoz FJ, Espinosa G. Síndrome de Sjögren primario: características clínicas e inmunológicas en una serie de 80 pacientes. *Med Clin (Barc)* 1997;108:652-7.
283. Fox RI, Howell FV, Bone RC, Michelson PE. Primary Sjögren's syndrome: clinical and immunopathologic features. *Semin Arthritis Rheum* 1984;14:77.
284. Kunkel HG, Agnello V, Joslin FG, Winchester RJ, Capra JD. Cross idiotypic specificity among monoclonal IgM proteins with anti-gamma-globulin activity. *J Exp Med* 1973;137:331-42.
285. Agnello V, Arbetter A, Ibanez de Kasep G, Powell R, Tan EM, Joslin F. Evidence for a subset of rheumatoid factor that cross-react with DNS-histone and have a distinct cross-idiotype. *J Exp Med* 1980;151:1514-27.
286. Fox RI, Chen P, Carson DA, Fong S. Expression of a cross-reactive idiotype on rheumatoid factor in patients with Sjogren's syndrome. *J Immunol* 1986;136:477-83.
287. Kipps TJ, Tomhave E, Chen PP, Fox RI. Molecular characterization of a major auto-antibody associated cross-reactive idiotype in Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1989;142:4261-8.
288. Yancopoulos GD, Desiderio SV, Paskind M, Kearney JF, Baltimore D, Alt FW. Preferential utilization of the most Jh-proximal Vh gene segments in pre-B cell lines. *Nature* 1984;311:727-33.
289. McKean D, Huppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3180-4.

-
290. Berard C, Greene M, Jaffe E, Magrath I, Ziegler J. A multidisciplinary approach to non-Hodgkin's lymphoma: NIH conference. *Ann Intern Med* 1981;94:218.
291. Waldman T, Johnson J, Talal N. Hypogammaglobulinemia associated with accelerated catabolism of IgG secondary to interaction with an IgG reactive monoclonal IgM. *J Clin Invest* 1971;50:951.
292. Schrohenloher RE, Koopman WJ, Moldoveanu Z, Solomon A. Activity of rheumatoid factors of different molecular sizes: comparison of autologous monomeric and polymeric monoclonal IgA rheumatoid factors. *J Immunol* 1985;134:1469.
293. Simmons-O'Brien E, Chen S, Watson R, Antoni C, Petri M, Hochberg M, et al. One hundred anti-Ro(SS-A) antibody positive patients: a 10-year follow-up. *Medicine (Baltimore)* 1995;74:109-30.
294. Alexander EL, Josifek L, Provost TT, Alexander GE. Myositis/vasculitis in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1982;25:S75.
295. Tishler M, Yaron I, Shirazi I, Yaron M. Clinical and immunological characteristics of elderly onset Sjögren's syndrome: a comparison with younger onset disease. *J Rheumatol* 2001;28:795-7.
296. Tsuzaka K, Ogasawara T, Tojo T, Fujii H, Tsukatani Y, Kubo A, Homma M. Relationship between autoantibodies and clinical parameters in Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1993;22:1-9.
297. Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, et al. Anti-Ro(SS-A) and anti-La(SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986;29:196-206.

-
298. Cavazzana I, Franceschini F, Belfiore N, Quinzanini M, Caporali R, Calzavara-Pinton P, et al. Undifferentiated connective tissue disease with antibodies to Ro/SSa: clinical features and follow-up of 148 patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2001;19:403-9.
299. Venables PJ, Charles PJ, Buchanan RR, Yi T, Mumford PA, Schrieber L, et al. Quantitation and detection of isotypes of anti-SS-B antibodies by ELISA and Farr assays using affinity purified antigens: an approach to the investigation of Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1983;26:146-55.
300. Satoh M, Yamagata H, Watanabe F, Nakayama S, Ogasawara T, Tojo T, Akizuki M. Development of anti-Sm and anti-DNA antibodies followed by clinical manifestation of systemic lupus erythematosus in an elderly woman with long-standing Sjögren's syndrome. *Lupus* 1995;4:63-5.
301. Zufferey P, Meyer OC, Bourgeois P, Vayssairat M, Kahn MF. Primary systemic Sjögren syndrome preceding systemic lupus erythematosus: a retrospective study of 4 cases in a cohort of 55 SS patients. *Lupus* 1995;4:23-7.
302. Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Font J, Vives J. Interpretación de las pruebas inmunológicas en el síndrome de Sjögren. En "Síndrome de Sjögren", eds Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Ed. Masson, Barcelona 2003, pp445-466.
303. Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M. Biological and clinical significance of cryoglobulins: a report of 86 cases. *Am J Med* 1974;57:775-88.

-
304. Gorevic PD, Kassab HJ, Levo Y, Kohn R, Meltzer M, Prose P, Franklin EC. Mixed cryoglobulinemia: clinical aspects and long-term follow-up of 40 patients. *Am J Med* 1980;69:287-308.
305. Bett DCG. Gougerot's maladie trysymptomatique avec cryoglobulinemia. *Proc R Soc Med* 1958;51:325.
306. Schmid U, Helbron D, Lennert K Primary malignant lymphomas localized in salivary glands. *Histopathology* 1982;6:673-87.
307. Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, Bai MK et al. Association of IgMk monoclonicity in patients with Sjögren's syndrome with an increased proportion of k positive plasma cells infiltrating the labial minor salivary glands. *Ann Rheum Dis* 1990;49:929-31.
308. Shokri F, Mageed RA, Kitas GD, Katsikis P, Moutsopoulos HM, Jefferis R. Quantitation of cross reactive idiotype positive rheumatoid factor produced in autoimmune rheumatic diseases: an indicator of clonality and B-cell proliferative mechanisms. *Clin Exp Immunol* 1991;85:20-7.
309. Vitali C, Tavoni A, Bombardieri S. La sindrome di Sjögren primitiva. *Reumatismo* 1987;39:69-74.
310. Alexander EL, Arnett FC, Provost TT, Stevens MB. Sjogren's syndrome Cryoglobulinemia in autoimmune rheumatic disease: evidence for circulating monoclonal cryoglobulins in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986;29:1098-104.
311. Riches PG. Immunological investigation and identification of paraprotein. In Delamore IW: Multiple myeloma and other paraproteinemias. Edinburgh, Melbourne, New York, Churchill Livingstone, 1986;56-74.

-
312. Moutsopoulos HM, Steinberg AD, Fauci AS, Lane HC, Papadopoulos NM. High incidence of free monoclonal light chains in the sera of patients with Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1983;130:2263-5.
313. Walters MT, Stevenson FK, Herbert A, Cawley MI, Smith JL. Urinary monoclonal free light chains in primary Sjogren's syndrome: an aid to the diagnosis of malignant lymphoma. *Ann Rheum Dis* 1986;45:210-9.
314. Fox RI, Kang HI. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:517-38.
315. Tzioufas AG, Moutsopoulos HM, Talal N. Lymphoid malignancy and monoclonal proteins. In: Talal N, Moutsopoulos HM, Kassan SS, eds. *Sjögren's syndrome. Clinical and Immunological aspects*. Berlin: Springer-Verlag. 1987:129-36.
316. Pablos JL, Carreira PE, Morillas L, Montalvo G, Ballestin C, Gomez-Reino JJ. Clonally expanded lymphocytes in the minor salivary glands of Sjogren's syndrome patients without lymphoproliferative disease. *Arthritis Rheum* 1994;37:1441-4.
317. Falzon M, Isaacson PG. The natural history of benign lymphoepithelial lesion of the salivary gland in which there is a monoclonal population of B cells. *Am J Surg Pathol* 1991;15:59-65.
318. Hollingsworth PN, Pummer SC, Dawkins RL. Antinuclear Antibodies 1996. In Peter JB, Shoenfeld Y (eds) *Antobodies*. Elseviere, Amsterdam, pp 74-90.
319. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erithematosus. 1997;40:1725

-
320. Adams BB, Mustasim DF. The diagnostic value of antinuclear antibody testing. *Int J Dermatol* 2000; 39:887-891
321. Asmussen K, Andersen V, Bendixen G, et al. A new model for classification of disease manifestations in primary Sjogren's syndrome. *J Intern Med*.1996; 239:474-482.
322. Wise CM, Woodruff RD. Minor salivary gland biopsies in patients investigated for classification of disease manifestations in primary Sjogren's syndrome. A review of 187 patients. *J Rheumatol*. 1993; 20:1515-1518.
323. Shah F, Rapini RP, Arnett FC, Warner NB, Smith CA. Association of labial salivary gland histopathology with clinical and serologic features of connective tissue diseases. *Arthritis Rheum*. 1990;33:1682-1687.
324. Davidson BKS, Kelly CA, Griffiths ID. Primary Sjogren's syndrome in the north east of England: a long-term follow-up study. *Rheumatology*.1999;38:245-253.
325. Moutsopoulos HM, Zerva LV. Anti-Ro (SS-A)/La (SS-B) antibodies and Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1990;9(suppl 1):123-130.
326. Alexander EL, Arnett FC, Provost TT, Stevens MB. Sjogren's syndrome: association of anti-Ro (SS-A) antibodies with vasculitis, hematologic abnormalities and serologic hyperreactivity. *Ann Intern Med*.1983;98:155-159.
327. Alexander EL, Provost TT, Stevens MB, Alexander GE. Neurologic complications of primary Sjogren's syndrome. *Medicine (Baltimore)*.1982;61:247-257.

-
328. Harly JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M et al. Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1986; 29:196-206.
329. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Pange PJ, Moutsopoulos HM. Serological profile in subgroups of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol.* 1986;61:89-92.
330. Markusse HM, Veldhoven, CH, Swaak AJ, Smeenk RT. The clinical significance of the detection of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B autoantibodies using purified recombinant proteins in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatol Int.* 1993;13:147-150
331. Talwalkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 2003;362:53-61.
332. Prince MI, Chetwynd A, Creig WL, Metcalf JV, James OF. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort. *Gut.* 2004;53:865-70.
333. Abraham S, Begum S, Isenberg D. Hepatic manifestations of autoimmune rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:123-9.
334. Hatzis GS, Fragoulis GE, Karatzaferis A, Delladetsima I, Arbatis C, Moutsopoulos HM. Prevalence and long term course of primary biliary cirrhosis in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 2008; 35(10):2012-6.
335. Beswick DR, Klatskin G, Boyer JL. Asymptomatic primary biliary cirrhosis. A progress report on a long-term follow-up and natural history. *Gastroenterology.* 1985;89:267-71.

-
336. Coll J, Pelusa F, Corominas JM.[Liver involvement in Sjögren's syndrome]. In: Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Anaya JM, et al, editors. *Síndrome de Sjögren*. Barcelona:Mason;2003:225-32
337. Gonzalez-Alvaro I, Carmona-Ortell L, Amigo-Etxenagusia A, Castaneda Sanz S. Nodular regenerative hiperplasia of the liver and primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*.1994;21:168-169.
338. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev*. 2009; 8(7):632-7.
339. Kong HJ, Anderson DE, Lee CH, Jang MK, Tamura T, Tailor P, Cho HK, Cheong J, Xiong H, Morse HC 3rd, Ozato K. Cutting edge: autoantigen Ro52 is an interferon inducible E3 ligase that ubiquitinates IRF-8 and enhances cytokine expression in macrophages. *J Immunol*. 2007;179(1):26-30.
340. Terzoglou AG, Routsias JG, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Post-translational modifications of the major linear epitope 169-190aa of Ro 60 kDa autoantigen alter the autoantibody binding. *Clin Exp Immunol*. 2006; 146(1):60-5.
341. Dugar M, Cox S, Limaye V, Gordon TP, Roberts-Thomson PJ. Diagnostic utility of anti-Ro52 detection in systemic autoimmunity. *Postgrad Med J*. 2010; 86:79-82.
342. Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ, Sjöstrand M, Eloranta ML, Ní Gabhann J, Winqvist O, Sundelin B, Jefferies CA, Rozell B, Kuchroo VK, Wahren-Herlenius M. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic

-
- autoimmunity by disregulating the IL-23-Th 17 pathway. *J Exp Med*. 2009; 206(8):1661-71.
343. Strandberg L, Salomonsson S, Bremme K, Sonesson S, Wahren-Herlenius M. Ro52, Ro60 and La IgG autoantibody levels and Ro52 IgG subclass profiles longitudinally throughout pregnancy in congenital heart block risk pregnancies. *Lupus*. 2006;15(6):346-53.
344. Frisch C, Hoebeke J, Dali H, Ricchiuti V, Isenberg DA, Meyer O, Muller S. 52-kDa Ro-SSA epitopes preferentially recognized by antibodies from mothers of children with neonatal lupus and congenital heart block. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(1):R4.
345. Langguth DM, Morris S, Clifford L, Wilson RJ, Neil J, Hogan PG, Wong RC. Specific testing for "Isolated" anti 52-kDa SSA/Ro antibodies during standard anti-extractable nuclear antigen testing is of limited clinical value. *J Clin Patol*. 2007;60(6):670-3.
346. Reed JH, Jackson MW, Gordon TP. B cell epitopes of the 60-kDa Ro/SSA and La/SSB autoantigens. *J Autoimmun*. 2008;31(3):263-7.
347. Reed JH, Neufing PJ, Jackson MV, Clancy RM, Macradle PJ, Buyon JP, Gordon TP. Different temporal expression of immunodominant Ro60/60 kDa-SSA and La/SSB. *Clin Exp Immunol*. 2007;148(1):153-60.
348. Stathopoulou EA, Routsias JG, Stea EA, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Cross-reaction between antibodies to the major epitope of Ro60 kD autoantigen and a homologous peptide of Coxsackie virus 2B protein. *Clin Exp Immunol*. 2005; 141(1):148-54.

-
349. Tobón GJ, Correa PA, Anaya JM. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(5):791-2.
350. van Noord C, Hooijkaas H, Dufour-van den Goorbergh BC, van Hagen PM, van Daele PL, van de Merwe JP. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies to detect rheumatoid arthritis in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(1):160-2.
351. Mohammed K, Pope J, Le Riche N, Brintnell W, Cairns E, Coles R, Bell DA. Association of severe inflammatory polyarthritis in primary Sjögren's syndrome: clinical, serologic, and HLA analysis. *J Rheumatol.* 2009;36(9):1937-42.
352. Iwamoto N, Kawakami A, Tamai M, Fujikawa K, Arima K, Aramaki T, Kawashiri S, Ichinose K, Kamachi M, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Eguchi K. Determination of the subset of Sjögren's syndrome with articular manifestations by anticyclic citrullinated peptides antibodies. *J Rheumatol.* 2009;36(1):113-5.
353. Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Lama N, Bonacci E, Bobbio-Pallavicini F, Montecucco C, Caporali R. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in primary Sjögren's syndrome may be associated with non-erosive synovitis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:R51.
354. Kamali S, Polat NG, Kasapoglu E, Gul A, Ocal L, Aral O, Konice M, Badur S, Inanc M. Anti-CCP and antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis, primary Sjögren's syndrome and Wegener's granulomatosis. *Clin Rheumatol.* 2005;24:673-6.

-
355. Gottenberg JE, Mignot S, Nicaise-Rolland P, Cohen-Solal J, Aucouturier F, Goetz J, Labarre C, Meyer O, Sibila J, Mariette X. Prevalence of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-keratin antibodies in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64:114-7.
356. Fauchais AL, Lambert M, Launay D, Michon-pasturel U, Queyrel V, Nguyen N, et al. Antiphospholipid antibodies in primary Sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance in a series of 74 patients. *Lupus* 2004;13:245-8
357. Manoussakis MN, Gharavi AE, Drosos AA, Kitridou RC, Moutsopoulos HM. Anticardiolipin antibodies in unselected autoimmune rheumatic disease patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;44:297-307.
358. Ingram SB, Goodnight Jr, SH Bennet RM, An unusual syndrome of a devastating noninflammatory vasculopathy associated with anticardiolipin antibodies: report of two cases. *Arthritis Rheum* 1987;30:1167-72.
359. Arroyo RA, Ridley J, Brey RL, Houk R, Higgs J, Boswell N. Anticardiolipin antibodies in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1989;32(suppl):Abstract B141.
360. Pennec YL, Magadur G, Jouquan J, Youinou P. Serial measurements of anticardiolipin antibodies in primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1991;9:165-7.
361. Asherson RA, Fei HM, Staub HL, Khamashta MA, Hughes GR, Fox RI. Antiphospholipid antibodies and HLA association in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1992;51:495-8..

-
362. Jedryka-Goral A, Jagiello P, D'Cruz DP, Malykowska H, Khamashta MA, Hughes GR, et al. Isotype profile and clinical relevance of anticardiolipin antibodies in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1992;51:889-91.
363. Biyajima S, Osada T, Daidoji H, Hisaoka T, Sakakibara Y, Tajima J, et al. Pulmonary Hypertension and antiphospholipid antibodies in a patient with Sjögren's syndrome. *Intern Med* 1994; 33:768-72.
364. Merkel PA, Chang Y, Pierangeli SS, Convery K, Harris EN, Polisson RP. The prevalence and clinical association of anticardiolipin antibody in a large inception cohort of patients with connective tissue diseases. *Am J Med* 1996; 101:576-83.
365. Katayama Y, Kohriyama K, Kirizuka K, Nishizaki H, Fujii H, Tanji Y. Sjögren's syndrome complicated with autoimmune hepatitis and antiphospholipid antibody syndrome. *Intrn Med* 200;39:73-6.
366. Manoussakis MN, Georgopoulou C, Zintzaras E, Spyropoulou M, Stavropoulou A, Skopouli FN, et al. Sjögren's syndrome associated with systemic lupus erithematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjögren's syndrome. *Athritis Rheum* 2004;50:882-91.
367. Ohtsuka E, Nonaka S, Shingu M, Yasuda M, Nobunaga M. Sjögren's syndrome and mixed connective tissue disease. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10:339-44.
368. Schmidt WA, Wetzel W, Friedlander R, Lange R, Sorensen HF, Lichey HJ et al. Clinical and serological aspect of patients with anti-Jo-1 antibodies: an evolving spectrum of disease manifestation. *Clin Rheumatol* 200;19:371-7.

-
369. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies-associated diseases: a rheumatologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 1991;18:175-9.
370. Fukase S, Ohta N, Inamura K, Kimura Y, Aoyagi M, Koike Y, Diagnostic specificity of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in otorhinolaryngological diseases. *Acta Otolaryngol Suppl* 1994;511:204-7.
371. Hiromura K, Kitahara T, Kuroiwa T, Hayashi J, Tsukada Y, Kanai H, et al. [Clinical analysis of 14 patients with anti-myeloperoxidase antibody positive rapid progressive glomerulonephritic syndrome]. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1995; 37:573-9.
372. Hernandez JL, Rodrigo E, De Francisco AL, Val F, Gonzalez-Macias J, Riancho JA. ANCA associated pauci-immune crescentic glomerulonephritis complicating Sjögren's syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:2313-15.
373. Merkel PA, Polisson RP, Chang Y, Skates SJ, Niles JL. Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue disease. *Ann Intern Med* 1997; 126:866-73.
374. Nishiya K, Chikazawa H, Hasimoto K, Miyawaki S. Antineutrophil cytoplasmic antibody in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol*;1999;18:268-71.
375. Kamachi M, Migita K, Tominaga M, Ichinose Y, Nakamura H, Origuchi T, et al. Sjögren's syndrome complicated by MPO-ANCA positive crescentic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1033-4.
376. Tatsumi H, Tateno S, Hiki H, Kobayashi Y, Crescentic glomerulonephritis and primary Sjögren's syndrome. *Nephron* 2000;86:505-6.

-
377. Akposso K, Martinant de Preneuf H, Larousserie F, Sraer JD, Rondeau E. [Rapidly progressive acute renal failure. A rare complication of primary Sjögren's syndrome]. *Presse Med* 2000;29:1647-9.
378. Young C, Hunt S, Watkinson A, Beynon H. Sjögren's syndrome, cavitating lung disease and high sustained levels of antibodies to serine proteinase 3. *Scand J Rheumatol* 2000;29:267-9.
379. Tubach F, Hayem G, Elias A, Nicase P, Haim T, Kahn MF, et al. Anticentromere antibodies in rheumatologic practice are not consistently associated with scleroderma. *Rev Rhum Engl Ed* 1997;64:362-7.
380. Tektonidou M, Kaskani E, Skopuli FN, Moutsopoulos HM. Microvascular abnormalities in Sjögren's syndrome: nailfold capillaroscopy. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:826-30.
381. Caramaschi P, Biasi D, Carletto A, Manzo T, Randon M, Zeminian S, et al. Sjögren's syndrome with anticentromere antibodies. *Rev Rhum (Engl Ed)* 1997;64:785-8.
382. Chan HL, Lee YS, Hong HS, Kuo TT. Anticentromere antibodies (ACA) clinical distribution and disease specificity. *Clin Exp Dermatol* 1994;19:298-302.
383. Katano K, Kawano M, Koni I, Sugai S, Muro Y. Clinical and laboratory features of anticentromere antibodies positive primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2000;28:2238-44.
384. Theander E, Jacobsson LT. Relationship of Sjögren's syndrome to other connective tissue and autoimmune disorders. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34:935-47.

-
385. Xu D, Tian X, Zhang W, Zhang X, Liu B, Zhang F. Sjögren's syndrome-onset lupus patients have distinctive clinical manifestations and benign prognosis: a case-control study. *Lupus*. 2010;19:197-200.
386. Szanto A, Szodoray P, Kiss E, Kapitany A, Szegedi G, Zeher M. Clinical, serologic and genetic profile of patients with associated Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*. 2006;67:924-30.
387. Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. Historical perspective and ongoing concerns. *Arthritis Rheum* 2004;50:681-3.
388. Bell DA. SLE in the elderly- is it really SLE or systemic Sjögren's syndrome? *J Rheumatol* 1988;15:723-4.
389. Ramos-Casals M, Anaya JM, Garcia-Carrasco M, Rosas J, Bove A, Claver G, et al. Cutaneous vasculitis in primary Sjogren's syndrome: classification and clinical significance of 52 patients. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:96-106
390. Theander E, Manthorpe R, Jacobsson LT. Mortality and causes of death in primary Sjogren's syndrome: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1262-9.
391. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.

-
392. Hassin-Baer S, Levy Y, Langevitz P, Nakar S, Ehrenfeld M. Anti β 2-glycoprotein I in Sjögren's syndrome is associated with parkinsonism. *Clin Rheumatol*. 2007;26:743-7.
393. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Ugalde J, Aguirre C. High impact of antiphospholipid syndrome on irreversible organ damage and survival of patients with systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* 2004;164:77-82.
394. Perez-Vazquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J, Alarcon-Segovia D. Influence of disease duration, continued follow-up and further antiphospholipid testing on the frequency and classification category of antiphospholipid syndrome in a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheum* 1993;20:437-42.
395. Al Attia, HN, D'Souza MS. Antitopoisomerase I antibody in patients with systemic lupus erythematosus/sicca syndrome without a concomitant scleroderma: two cases reports. *Clin Rheumatol* 2003;22:70-2.
396. Gulati D, Kushner I, File E, Magrey M. Primary Sjögren's syndrome with anticentromere antibodies a clinically distinct subset. *Clin Rheumatol*. 2010;29:789-91.
397. Gelber AC, Pillemer SR, Baum BJ, Wigley FM, Hummers LK, Morris S, Rosen A, Casciola-Rosen L. Distinct recognition of antibodies to centromere proteins in primary Sjögren's syndrome compared with limited scleroderma. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1028-32.
398. Kmiecik L, Corguille M, Rocher P, Eugene C, Lemaire E, Tennenbaum R et al. [Autoimmune hepatitis, acute pancreatitis, mixed connective tissue

-
- disease and Sjogren's syndrome. A case report]. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27:840-1.
399. Brandt J, Maier T, rudwaleit M, Kuhl U, Hiepe F, Sieper J, et al. Co-occurrence of spondyloarthropathy and connective tissue disease: development of Sjogren's syndrome and mixed connective tissue disease (MCTD) in a patient with ankylosing Spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:80-4.
400. Min JK, Han NI, Kim JA, Lee YS, Cho CS, Kim HY. A case of cholestatic autoimmune hepatitis and acute liver failure: an unusual hepatic manifestation of mixed connective tissue disease and Sjogren's syndrome. *J Korean Med Sci* 2001;16:512-5.
401. Font J, Ramos-Casals M, Cervera R, Bosch X, Mirapeix E, Garcia-Carrasco M, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary Sjogren's syndrome: prevalence and clinical significance. *Br J Rheumatol* 1998;37:1287-91.
402. Radaeli F, Meucci G, Spinzi G, Terruzzi V, Imperiali G, Lenoci N, et al. Acute self-limiting jejunitis as the first manifestation of microscopic polyangiitis associated with Sjogren's disease: report of one case and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:931-4.
403. Saevarsdottir S, Vikingsdottir T, Valdimarsson H. The potential of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes. *Scand J Immunol* 2004;60:23-9.
404. Bouwman LH, Roos A, Terpstra OT et al. Mannose binding lectin gene polymorphisms confer a major risk for severe infections after liver transplantation. *Gastroenterology* 2005;129:408-14.

-
405. Stuart LM, Takahashi K, Shi L, Savill J, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J Immunol* 2005;174:3220-6.
406. Garred P, Madsen HO, Halberg P et al. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:2145-52.
407. Bultink IE, Hamann D, Seelen MA et al. Deficiency of functional Mannose-binding lectin is not associated with infection in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R183.
408. Ohlenschlaeger T, Garred P, Madsen HO, Jacobsen S. Mannose-binding lectin variant alleles and risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *New Engl J Med* 2004; 351:260-7.
409. Font J, Ramos-Casals M, Brito-Zerón P et al. Association of Mannose-binding lectin gene polymorphisms with antiphospholipid syndrome, cardiovascular disease and chronic damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2007;46:76-80.
410. Calvo-Alén J, Alarcon GS, Tew MB et al. LUMINA study group. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXIV. Deficient Mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms are associated with cerebrovascular but not with other arterial thrombotic events. *Arthritis Rheum* 2006;54:1940-5.
411. Wang Y, Liu T, Gong H et al. Gene profiling in murine corneas challenged with *aspergillus fumigatus*. *Mol Vis* 2007;13:1226-33.

-
412. Ioannidis JP, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2002;46:741-7.
413. Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Bove A, Sentis J, Font J. Predicting adverse outcomes in primary Sjögren's syndrome; Identification of prognosis factor. *Rheumatology* 2007;46:1359-62.
414. Aittoniemi J, Pertovaara M, Hulkkonen J et al. The significance of mannan-binding lectin gene alleles in patients with Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 2002;31:362-5.
415. Mullighan CG, Heatley S, Bardy PG, Lester S, Rischmueller M, Gordon TP. Lack of association between mannose-binding lectin in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2000;43:2851-2.
416. Walsh MC, Bourcier T, Takahashi K et al. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Immunol* 2005;175:541-6.
417. Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity; past, present and future. *Tissue Antigens* 2006;68:193-209.
418. Piao W, Liu CC, Kao AH et al. Mannose-binding lectin is a disease modifying factor in North America patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2007;34:1506-13.
419. García-Laorden MI, Rúa-Figueroa I, Perez-Aciego P et al. Mannose-binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from Canary Islands, Spain. *J Rheumatol* 2003;30:740-6.

-
420. Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol* 2001;167:2861-8.
421. Seelen MA, van der Bijl EA, Trouw LA, et al. A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2005;44:111-9.
422. Steinfeld S, Penaloza A, Ribai P, et al. D- mannose and N-acetylglucosamine moieties and their respective bindings sites in salivary glands of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1999;26:833-41.
423. Fox RI, Robinson C, Curd J, Michelson P, Bone R, Howell FV. First International symposium on Sjögren's syndrome: suggested criteria for classification. *Scand J Rheumatol* 1986;61:28-30.
424. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-58.
425. Avouac J, Airó P, Dieude P, Caramaschi P, Tiev K, Diot E, Sibilia J, Capelli S, Granel B, Vacca A, Wipff J, Meyer O, Kahan A, Matucci-Cerinic M, Allanore Y. Associated autoimmune diseases in Systemic Sclerosis define a subset of patients with Milder disease: Results from 2 large cohorts of European Caucasian patients. *J Rheumatol*. 2010
426. Candon S, Gottenberg JE, Bengoufa D, Chatenoud L, Mariette X. Quantitative assessment of antibodies to ribonucleoproteins in primary Sjögren's syndrome: correlation with B-cell biomarkers and disease activity. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:1208-12.

-
427. Casanovas JL, Abel L. Human mannose-binding lectin in immunity : friend, foe or both?. *J Exp Med* 2004;199:1295-9.
428. Verdu P, Barreiro LB, Patin E, et al. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL deficiency alleles. *Hum Mol Genet* 2006;15:2650-8.
429. Chan RK, Ibrahim SI, Takahashi K, et al. The differing roles of the classical and mannose-binding lectin complement pathways in the events following skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Immunol* 2006;177:8080-5.
430. Soborg C, Madsen HO, Andersen AB, Lillebaek T, Kok-Jensen A, Garred P. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J Infect Dis* 2003;188:777-82.
431. Alonso DP, Ferreira AF, Ribolla PE, et al. Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. *J Infect Dis* 2007;195:1212-7.
432. Dzwonek A, Novelli V, Bajaj-Elliott M, Clapson M, Klein N. mannose-binding lectin in susceptibility and progression of HIV-1 infection in children. *Antivir Ther* 2006;11:499-505.
433. Matsushita M, Miyakawa H, Tanaka A, et al. Single nucleoside polymorphisms of the mannose-binding lectin are associated with susceptibility to primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2001;17:251-7.

