

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina

ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DEL PERFIL DE CITOCINES EN BIÒPSIES DE
GLÀNDULES SALIVALS MENORS DE PACIENTS AMB LA SÍNDROME DE SJÖGREN
PRIMÀRIA

Director de la Tesi Doctoral: Professor Joaquim Coll Daroca.

Memòria presentada per Antón-Peter Reth per optar al grau de Doctor en Medicina.

Barcelona, 2002

La família,
arrel bàsica per a tota la vida.

Agraïments

Als meus pares, Johannes i Montserrat, que des de petit creien en la meua capacitat; a les meves germanes, Isabel i Mònica; i als meus cunyats, Michael i Till, que sempre han estat al meu costat al llarg de la meua vida. Sense la seva confiança i suport no hauria arribat a ser metge.

A la família Abelló i Fuster, per ser al meu costat de forma incondicional en tots els moments de la meua vida.

Al Dr. Pere Abelló i Vila, sense el consell del qual no seria avui metge internista.

Al Dr. Joaquim Coll Daroca, el meu adjunt, professor i amic, per la seva capacitat d'estimular, criticar i enfocar la meua carrera professional i per la seva paciència durant els anys d'aquesta tesi doctoral. L'amistat creada perdurarà després d'aquest dia.

Al Servei de Medicina Interna de l'Hospital del Mar, per les facilitats donades per a realitzar aquesta tesi doctoral i, especialment, al Dr. Joan Pedro-Botet Montoya i al Dr. Xavier Nogués, per la seva implicació en la meua formació personal i professional.

Al Servei d'Immunologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol, per l'acollida i ajuda constant rebuda en la realització d'aquesta tesi doctoral, en especial a la Dra. Dolores Jaraquemada Pérez de Guzmán.

A Edgardo Kolkowski i Fabian Pelusa, per la seva ensenyança i paciència en les tasques d'introducció al laboratori.

Al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar, especialment al Dr. Josep M^a Corominas Torres, per l'acollida, la col.laboració i l'ajuda rebudes en l'estudi anatomo-patològic.

Al Servei de Medicina Interna de l'Hospital de l'Esperit Sant de Santa Coloma de Gramanet, per impulsar la continuació de la meva formació.

Al Servei de Medicina Interna del Consorci Sanitari de Mataró, per facilitar el treball de la tesi doctoral. Al Dr. Josep-Anton Capdevila Morell, per la seva ensenyança, la crítica constructiva i la confiança en la meva persona i en la meva professionalitat, i per donar l'impuls final a la tesi doctoral.

Al José, Llanos i Maria, que sempre són a prop meu. Els dono les gràcies per tots aquests anys d'amistat i ajuda, també en els moments difícils.

A la Glòria, per donar-me la confiança i l'estabilitat necessàries en la recta final de la tesi doctoral i per ensenyar-me la importància d'una visió crítica de la medicina.

Aquesta tesi doctoral s'ha realitzat amb el suport de les beques:

- Beca de Recerca per a Residents de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica "CARACTERITZACIÓ DELS LIMFÒCITS T INFILTRANTS EN LA GLÀNDULA SALIVAL I TIROIDAL DE PACIENTS AMB LA SÍNDROME DE SJÖGREN. INVESTIGACIÓ D'UNA RESPOSTA IMMUNOLÒGICA COMÚ". (IMAS 98).
- Beca del *Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social* (FISss) "CARACTERITZACIÓ DELS LIMFÒCITS T INFILTRANTS EN LA GLÀNDULA SALIVAL I TIROIDAL DE PACIENTS AMB LA SÍNDROME DE SJÖGREN. INVESTIGACIÓ D'UNA RESPOSTA IMMUNOLÒGICA COMÚ". (FISss: 97/1134).

INDEX

1.- LA SÍNDROME DE SJÖGREN	pàg. 2
1.1.- Revisió històrica	pàg. 2
1.2.- Concepte de síndrome de Sjögren	pàg. 5
1.3.- Classificació de la síndrome de Sjögren	pàg. 6
1.4.- Epidemiologia de la síndrome de Sjögren	pàg. 9
1.5.- Etiologia de la síndrome de Sjögren	pàg. 11
1.5.1.- Factors genètics	pàg. 11
1.5.2.- Factors vírics	pàg. 12
1.5.3.- Factors hormonals	pàg. 15
1.5.4.- Factors immunològics	pàg. 16
1.5.5.- Apoptosis	pàg. 20
1.5.6.- Citocines	pàg. 22
1.6.- Manifestacions clíniques de la síndrome de Sjögren	pàg. 24
1.7.- Diagnòstic de la síndrome de Sjögren	pàg. 26
1.7.1.- Tests diagnòstics	pàg. 30
1.8.- Citocines	pàg. 35
1.8.1.- Tipus de citocines	pàg. 38
1.8.2.- Citocines i immunitat natural o innata	pàg. 43
1.8.3.- Citocines i immunitat específica o adquirida	pàg. 45
1.8.4.- Citocines i autoimmunitat	pàg. 48
1.8.5.- Citocines i síndrome de Sjögren	pàg. 49

2.- Objectiu	pàg. 51
2.1- Hipòtesi	pag. 51
3.- Pacients i mètodes	pàg. 52
3.1.- Disseny del projecte	pàg. 52
3.2.- Esquema de l'estudi	pàg. 53
3.3.- Població d'estudi	pàg. 54
3.3.1.- Criteris d'inclusió/exclusió	pàg. 54
3.3.2.- Consentiment informat	pàg. 55
3.4.- Protocol d'estudi	pàg. 55
3.5.- Procediment diagnòstic utilitzat	pàg. 58
3.5.1.- Estudi de la xeroftalmia	pàg. 58
3.5.2.- Estudi de la xerostomia	pàg. 59
3.5.3.- Biòpsia de glàndula salival menor	pàg. 60
3.5.4.- Estudi immunològic en sang perifèrica	pàg. 63
3.6.- Criteris diagnòstics de la síndrome de Sjögren	pàg. 63
3.7.- Temps d'evolució clínica	pàg. 64
3.8.- Metodologia experimental	pàg. 65
3.8.1.- Obtenció d'RNA total	pàg. 65
3.8.2.- RT-PCR amb oligosondes específiques	pàg. 66
3.8.2.1.- Digestió amb DNAsa I	pàg. 66
3.8.2.2.- Retrotranscripció	pàg. 67
3.8.2.3.- Reacció en cadena de la polimerasa	pàg. 67

3.8.3.- Normalització del DNAc	pàg. 70
3.8.4.- Electroforesi i transferència	pàg. 70
3.8.5.- Hibridació	pàg. 71
3.8.6.- Densitometria	pàg. 72
3.9.- Metodologia estadística	pàg. 72
4.- Resultats	pàg. 74
4.1.- Expressió de l'RNAm de citocines	pàg. 75
4.2.- Comparació de l'expressió de citocines entre pacients amb la síndrome de Sjögren primària definida i probable	pàg. 76
4.3.- Expressió de citocines segons el grau d'afectació histològica	pàg. 77
4.4.- Expressió de citocines en relació amb la formació o no formació de focus	pàg. 81
4.5.- Expressió de citocines segons el temps d'evolució dels símptomes clínics	pàg. 83
5.- Discussió	pàg. 86
5.1.- Patró Th1: IFN- γ i IL-2	pàg. 87
5.2.- Inductors del patró Th1: Interleuquina 18 (IL-18) i Interleuquina 12 (IL-12)	pàg. 89
5.3.- Patró Th2: Interleuquina 4 (IL-4)	pàg. 91
5.4.- Citocines proinflamatòries:	pàg. 92

5.5.- El balanç Th1 i Th2	pàg. 99
5.5.1.- El balanç Th1/Th2 en malalties autoimmunes	pàg. 101
5.5.2.- El balanç Th1/Th2 en la síndrome de Sjögren	pàg. 102
6.- Conclusions	pàg. 110
7.- Bibliografia	pàg. 111

**ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DEL PERFIL DE
CITOCINES EN BIÒPSIES DE GLÀNDULES SALIVALS
MENORS DE PACIENTS AMB LA SÍNDROME DE
SJÖGREN PRIMÀRIA**

1. LA SÍNDROME DE SJÖGREN

1.1. REVISIÓ HISTÒRICA

Els primers coneixements descrits de la síndrome de Sjögren apareixen al final del segle passat, quan Leber, el 1882, descriu tres casos de queratitis filamentosa a la superfície còrnia, una lesió observada també per Fischer el 1889 en un pacient afectat d'artritis. El 1888, Hadden introdueix el terme *xerostomia* per definir la sequedat bucal i l'associa a la sequedat ocular. Fuchs, el 1919, descriu la presència d'hipertròfia parotídea amb disminució de la secreció salivar en alguns dels seus pacients i relaciona les glàndules salivals amb les lacrimals.

Gougerot, a França, el 1925, descriu un pacient amb sequedat generalitzada, i associa la sequedat ocular, també, amb la bucal, la nasal, la laríngia i la vulvar¹. Stock, el mateix any, relaciona la queratitis filamentosa amb la disminució de la secreció lacrimal. El 1930, Duke-Elder introdueix el terme *queratitis sicca* en lloc de *queratitis filamentosa*, perquè no sempre observa lesions filamentoses en pacients amb sequedat ocular².

Henrik Sjögren, un oftalmòleg suec, és el primer que va relacionar la síndrome seca amb altres manifestacions sistèmiques i el primer que va suggerir-ne un origen immunològic. El 1930 publica el cas d'un pacient amb història de "rheumatismus chronicus" acompanyat de cremor, sensació de cos estrany, sequedat ocular i absència de llàgrimes; també publica quatre casos més³. En els anys següents publica una monografia en la qual aporta

estudis histològics sobre la còrnia, la conjuntiva i la glàndula lacrimal⁴. Sjögren descriu un grup de pacients, bàsicament constituït per dones en edat menopàusica, amb lesions oculars, i amb disminució de la secreció lacrimal i salival, que presenten en alguns casos hipertròfia parotídea. La majoria dels seus pacients presentaven artritis de base. Paral·lelament, Sjögren defineix el Test de Schirmer⁵ com a índex de medició de la secreció lacrimal i l'ús del colorant rosa de Bengala com a mètode diagnòstic de la queratoconjuntivitis sicca. El terme *síndrome de Sjögren* és introduït el 1936 per Von Grosz⁶ en honor de l'oftalmòleg suec.

Fins als anys cinquanta, però, hi va haver certa confusió entre els termes *síndrome de Sjögren* (SS) i *síndrome o malaltia de Mikulicz*. El 1888, Mikulicz va presentar a la Societat de Medicina de Königsberg un pacient de quaranta-dos anys amb hipertròfia de les glàndules lacrimals, submaxilars i parotídees, el qual, però, quan va morir uns mesos més tard després d'una peritonitis, no presentava⁷ cap hipertròfia. El cas d'aquest pacient, publicat el 1892 per Mikulicz, descriu la lesió histològica de les glàndules salivals i lacrimals, mostra atròfia acinar i infiltració massiva del teixit connectiu intersticial per cèl·lules petites, i diferencia aquesta entitat, pel seu curs benigne, d'altres infiltracions tumorals i de processos com la tuberculosi, la leucèmia o el limfoma maligne⁸. A pesar de la descripció histològica detallada, molts autors van introduir de forma errònia el terme *malaltia de Mikulicz* per descriure formes d'hipertròfia de les glàndules salivals en el context de leucèmies, tuberculosi, sarcoidosis, i intoxicacions, entre d'altres, que no s'ajustaven al cas descrit per Mikulicz. No va ser fins al

1927 que Schäffer i Jacobson⁹ i - posteriorment també Morgan i Castelman¹⁰, el 1953- arriben a la conclusió que les malalties considerades com a “malalties de Mikulicz” les patien, en realitat, pacients amb la “síndrome de Sjögren” i que el terme *síndrome de Mikulicz* cal reservar-lo per als pacients amb una infiltració de les glàndules salivals i lacrimals en el curs d’una tuberculosi, una sarcoidosi, una leucèmia o un limfoma. Aquests mateixos autors van definir les característiques de la lesió histopatològica de la síndrome de Sjögren.

1.2. CONCEPTE DE SÍNDROME DE SJÖGREN

La síndrome de Sjögren és una malaltia exocrina autoimmune crònica, caracteritzada per una infiltració limfocitària de les glàndules exocrines, sobretot salivals i lacrimals, que n'origina la destrucció progressiva, disminueix la secreció salival i lacrimal, i dóna lloc a sequedat bucal (xerostomia) i sequedat ocular (xeroftàlmia). La malaltia es pot presentar de forma aïllada, com a síndrome de Sjögren primària, o associada a una altra malaltia autoimmune, com a síndrome de Sjögren secundària.

El ventall de la síndrome de Sjögren inclou des de malalties autoimmunes primàries o secundàries amb afectació organoespecífica, fins a malalties sistèmiques, i, fins i tot, processos limfoproliferatius, especialment limfomes de cèl·lules B.

1.3 CLASSIFICACIÓ DE LA SÍNDROME DE SJÖGREN

SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMÀRIA I SECUNDÀRIA

Els primers criteris diagnòstics de la síndrome de Sjögren van ser introduïts per Block i col.laboradors¹¹ el 1965, que definien la síndrome de Sjögren per la presència de, com a mínim, dos dels tres criteris següents:

- 1.- Queratoconjuntivitis seca
- 2.- Xerostomia
- 3.- Una malaltia crònica autoimmune associada

El terme *síndrome seca* es va introduir per definir la malaltia de pacients que acomplien els dos primers criteris descrits, mentre que el terme síndrome de Sjögren feia referència als pacients que presentaven tots tres criteris. Posteriorment s'ha anat suprimint l'ús del terme *síndrome seca*, perquè hi ha pacients amb manifestacions clíniques de sequedat glandular exocrina que no tenen cap malaltia del teixit connectiu, com per exemple la deshidratació, la irradiació i l'amoloidosi.

El 1978 Frost-Larsen i col.laboradors¹² estableixen la classificació actual:

a) ***Síndrome de Sjögren primària*** afecta pacients que compleixen els dos primers criteris.

b) **Síndrome de Sjögren secundària** afecta pacients que, a més dels dos primers criteris, presenten també el tercer.

Així, en el cas de la síndrome de Sjögren primària, el pacient no presenta cap més malaltia autoimmune o del teixit connectiu associada. En canvi, en el cas de la síndrome de Sjögren secundària, el pacient, a més a més de les manifestacions oculars o salivals, presenta una malaltia associada, com per exemple: artritis reumatoide, lupus eritematos sistèmic, cirrosi biliar primària, vasculitis, esclerodèrmia, tiroiditis autoimmune d'Hashimoto, malaltia de Graves-Basedow, polimiositis, hepatitis crònica activa, colangitis esclerosant, crioglobulinèmia mixta, neumonitis intersticial, púrpura hipergammaglobulinèmica, malaltia mixta del teixit connectiu, fasciitis eosinofílica, malaltia crònica de l'injert contra l'hoste, pènfic vulgar, malaltia de Darier o necròlisi epidèrmica tòxica^{13,14,15,16}.

Tot i que la síndrome de Sjögren és una entitat ben definida, hi ha diferències entre les formes primària i secundària des del punt de vista clínic, immunològic, genètic i histopatològic. Aquestes diferències converteixen l'ús dels conceptes síndrome de Sjögren primària i síndrome de Sjögren secundària en entitats diferents en la pràctica clínica¹⁷.

Clínicament, els pacients amb síndrome primària presenten més simptomatologia de sequedat bucal o ocular, més incidència de tumefacció parotídea i, des del punt de vista extraglandular, més incidència del fenomen de Raynaud, de púrpura i d'adenopaties, per comparació amb els pacients amb síndrome secundària. Immunològicament, les formes primàries destaquen per la titulació més gran d'autoanticossos i per la

hipergammaglobulinèmia, si es comparen amb les formes secundàries, les alteracions biològiques de les quals són més comunes, segons, en cada cas, la patologia de base que presenten. Així trobem factor reumatoide, IgM i immunocomplexes circulants, amb anèmia crònica, i elevació de la VSG en les formes secundàries associades a l'artritis reumatoide¹⁷. La lesió histopatològica de les formes primàries i secundàries és similar, a pesar que alguns autors destaquen més quantitat i més intensitat d'infiltració limfocitària en les formes de la síndrome de Sjögren primària^{18,19}.

1.4. EPIDEMIOLOGIA DE LA SÍNDROME DE SJÖGREN

La síndrome de Sjögren probablement és una de les malalties autoimmunes més freqüents, malgrat la disparitat de criteris diagnòstics que hi ha. Aquests criteris van ser presentats per primera vegada en el First International Symposium on Sjögren's Syndrome²⁰. Actualment, amb la controvèrsia entre els criteris Europeus²¹, els de San Diego²² i els de San Francisco²³, l'estimació aproximativa de la prevalença de xeroftàlmia, de xerostomia i de síndrome de Sjögren és difícil de fer. Això no obstant, prenent com a base els criteris de Copenhague, de Jacobson i col.laboradors²⁴, s'ha calculat una prevalença del 14,9%, entre la població en general, de la queratoconjuntivitis; aproximadament del 5,5% de la xerostomia i del 2,9% de la síndrome de Sjögren.

La freqüència de la síndrome de Sjögren associada a l'artritis reumatoide o al lupus eritematós sistèmic és relativament ben definida. L'artritis reumatoide constitueix més del 50% de les síndromes de Sjögren secundàries descrites, i varia entre el 30% i 71%, segons la població estudiada^{25,26,27}. Moutsopoulos *et al* troben que el 20% de pacients afectats d'artritis reumatoide presenten clínica de sequetat ocular o bucal i el 5% síndrome de Sjögren²⁷. L'estudi realitzat en el nostre medi per Coll *et al*²⁸ demostra una prevalença de la síndrome de Sjögren secundària en el 62% de les artritis reumatoides, en el 71% de les cirrosi biliars primàries i en el 69% de les esclerodèrmies.

La síndrome de Sjögren entre la població geriàtrica, si es compara amb la població general, sol ser subclínica, de curs benigne i relativament freqüent, però la presència d'autoanticossos és molt més petita²⁹, cosa que fa pensar que les alteracions atròfiques de la glàndula salival corresponen més a l'edat avançada que a un procés immunològic.

Estudis necròpsics demostren que el 2% o el 3% d'individus sense connectivopaties conegudes presenten infiltrats limfocitaris en les glàndules salivals, similars als que es troben en la síndrome de Sjögren²⁶.

1.5. ETIOLOGIA DE LA SÍNDROME DE SJÖGREN

D'etiologia encara desconeguda, s'especula que la síndrome de Sjögren és de causa multifactorial, és a dir que depèn de factors genètics, vírics, hormonals i immunològics.

1.5.1. Factors genètics

El 55% dels pacients amb la síndrome de Sjögren primària i secundària a l'artritis reumatoide o lupus eritematós sistèmic presenten el fenotip HLA B8. Hi ha qui pensa que aquesta alta prevalença, no sempre amb significació estadística en tots els estudis, té relació amb la major freqüència del DR3, amb el qual manté una unió en desequilibri^{30,31}. L'associació més constant, en el cas de la SS primària i en el de la secundària al lupus eritematós sistèmic, és amb l'antigen HLA DR3, la prevalença del qual se situa entre el 45% i 65%^{32,33,34,35}, sense aclarir l'especificitat del DR2³⁶. L'HLA DRW52 també presenta una elevada prevalença, tant en la SS primària com en la secundària, que probablement depèn del DR3 i s'associa al DR5, DR6 i DR8, entre d'altres³³. La SS secundària a l'artritis reumatoide presenta una associació gairebé constant a l'HLA DR4, però sense tenir significat, ja que aquest antigen depèn de la presència de la malaltia articular^{34,37}.

També s'ha involucrat en la possible etiologia genètica de la SS, un "gen autoimmune" d'herència autosòmica dominant, de tipus mendelià, amb els seus al·lels localitzats en la regió del sistema HLA-D. Si es modifica

l'expressió d'aquest gen, apareixen les manifestacions clíniques de la síndrome³⁶.

La presència de certs antígens pot condicionar la producció d'una resposta immune aberrant, amb formació d'autoanticossos i citotoxicitat enfront d'antígens propis. Així, alguns estudis han demostrat que hi ha associació entre els nivells d'anticossos anti-Ro en pacients amb la SS i el locus HLA-DQ, com la presència d'anticossos anti SS-A i anti SS-B i el factor reumatoide amb l'expressió de DR3 i DR2^{34,35,36,38,39,40,41,42}.

A més a més de les diferències descrites, també trobem diferències genètiques en comparar ètnies diferents. Pacients japonesos afectats per la SS primària i secundària a l'artritis reumatoide presenten una prevalença més gran de l'antigen HLA DRW53, mentre que la de la població grega correspon a l'HLA-DR5 i la de la població europea caucàsica a l'HLA-DR3 i a l'HLA DRW52^{27,41,42}.

1.5.2. Factors vírics

Multiples estudis i treballs d'investigació han intentat de relacionar els virus i, sobretot darrerament, els retrovirus amb la implicació etiopatogènica de la SS, sense poder-ho demostrar de manera conclouent. A pesar d'aquest fet, molts autors creuen en la possibilitat d'una probable implicació vírica en el desencadenament de la SS.

Els virus són gèrmens patògens intracel·lulars que necessiten la maquinària de la cèl·lula hostessa per a replicar-se. El virus d'Ebstein-Barr (VEB) presenta tropisme pels limfòcits B, produeix una activació policlonal i és capaç d'induir *in vitro* la síntesi d'autoanticossos (factor reumatoide o

anticossos antinuclears), a més d'induir processos limfoproliferatius^{43,44,45,46}. S'han aïllat línies de cèl·lules B de pacients amb SS que presenten una capacitat de creixement espontani i que expressen l'antigen nuclear del virus⁴⁷. També els anticossos anti SS-B poden actuar sobre una proteïna nuclear associada selectivament a l'RNA codificat pel VEB^{48,49}. A més a més, s'han detectat en alguns pacients amb la SS antigens i seqüències d'ADN viral en cèl·lules epitelials i en glàndules salivals mitjançant tècniques de reacció en cadena de polimerasa (PCR)^{50,51,52,53}. Aquestes observacions reforcen les teories víriques en la implicació patogènica de la SS, però molts individus sans també són portadors del VEB sense presentar SS, la qual cosa fa pensar que el VEB actua més com un possible factor coadjuvant que no pas com un agent etiològic propi⁵⁴.

El virus herpes humà tipus 6 (VHH6), també de la família dels *herpesviridae*, és capaç de persistir de manera latent en les glàndules salivals amb capacitat de transformar cèl·lules limfoides⁵⁵, i de suggerir el seu paper etiològic en la SS. Diferents estudis sobre la prevalença d'anticossos anti VHH-6 en pacients amb SS i en la població general presenten, però, resultats discordants^{56,57,58}. Probablement l'alta prevalença en la població general del VHH-6 fa que no es pugui considerar com a factor etiològic pròpiament dit. Trobem resultats semblants quan analitzem la prevalença d'anticossos IgG contra el citomegalovirus⁵⁹.

Haddad *et al*⁶⁰, el 1992, consideren el virus de l'hepatitis C (VHC) com un possible agent en l'etiopatogènia de la SS. S'han fet nombrosos estudis per a avaluar la prevalença de la infecció pel VHC en pacients amb

SS, i hem trobat resultats dispars^{61,62,63,64,65,66,67,68,69,70}. Inicialment, amb l'ús de tècniques d'ELISA, la prevalença era alta, però, en introduir tècniques més específiques, com la RIBA-2, la prevalença del VHC només és, aproximadament, del 10%^{68,71}; és més gran en els pacients amb SS i crioglobulinèmia o amb alteració de la biologia hepàtica en el moment de l'estudi^{72,73}. Avui en dia cal fer servir la tècnica d'ELISA de tercera generació com a cribatge en estudiar pacients sota sospita de malalties autoimmunes i, en cas de resultats positius, cal confirmar-los mitjançant la detecció de l'RNA del VHC⁷⁴. L'estudi immunohistoquímic de la glàndula salival menor d'aquests pacients demostra una sialoadenitis autoimmune semblant a l'observada en la SS primària, però amb una proporció més gran de limfòcits B⁷¹.

El parvovirus B19 descrit per Cossart *et al*⁷⁵ és l'únic parvovirus descrit com a agent patògen humà. La infecció que produeix es relaciona amb múltiples malalties autoimmunes: el LES⁷⁶, l'artritis reumatoide⁷⁷, la malaltia de Still⁷⁸, la granulomatosis de Wegener⁷⁹, la poliarteritis nudosa⁸⁰, la púrpura de Schönlein-Henoch⁸¹ o la malaltia de Kawasaki⁸². No hi ha estudis concloents que relacionin la infecció per parvovirus B19 i la síndrome de Sjögren.

En l'última dècada s'han intensificat els estudis sobre la possible implicació de retrovirus en l'etiologia de la SS^{16,83,84}. Pacients amb infeccions retrovirals conegudes, com les infeccions produïdes pel virus de la immunodeficiència humana tipus I (VIH-I) i pel virus limfotrópic T humà tipus I (HTLV-I), poden presentar característiques clíniques comunes amb la SS, com per exemple la sialadenitis, la limfopènia, la hipergammaglobulinèmia i

el desenvolupament de limfomes. Aquestes manifestacions es poden observar en un petit percentatge de pacients amb infecció per VIH (3%-7%)^{15,85,86,87} i HTLV-I (5%)^{88,89,90}. S'han detectat anticossos antiproteïna gag⁹⁰ i antiproteïnes retrovirals^{91,92,93,94} en pacients amb la SS que no han tingut infeccions per retrovirus humans coneguts. A pesar d'aquests resultats no s'ha pogut demostrar encara la implicació de cap retrovirus concret conegut en la síndrome de Sjögren, tot i que, probablement, tenen relació amb la seva etiopatogènia.

1.5.3.Factors hormonals

La SS és nou vegades més freqüent en dones que en homes, i presenta diferències serològiques i immunogenètiques^{95,96}. Les hormones sexuals tenen capacitat immunoreguladora, les androgèniques són més immunosupressores i les estrogèniques més immunoestimuladores, perquè suggereixen la seva implicació en l'etiopatogènia de la SS. Però el fet que la menopausa i el tractament substitutiu amb estrògens no alteri el curs de la SS⁹⁷, implica la probable presència d'altres factors per a explicar el predomini femení en la SS.

Les glàndules exocrines tenen una regulació complexa, són hormonodependents⁹⁸, en la qual cosa intervenen estructures vasculares, neuronals i secretòries. Això suggereix la intervenció de factors neuroendocrins en l'etiopatogènia de la SS^{99,100}. Alguns estudis demostren la presència d'hiperprolactinèmia¹⁰¹ i de malaltia tiroïdal, sobretot d'hipotiroidisme subclínic, en alguns dels pacients amb la SS¹⁰².

1.5.4. Factors Immunològics

La síndrome de Sjögren presenta diverses alteracions immunològiques que ajuden a diferenciar la forma primària de les secundàries associades a altres malalties autoimmunes. A més a més, l'estudi d'aquestes alteracions ajuda a conèixer la patogènia de la malaltia quan es detecta en pacients amb un risc més gran de presentar manifestacions sistèmiques i de patir una possible malignització limfoide.

1.5.4.1. Immunitat humoral

Les glàndules salivals de pacients amb la SS tenen una infiltració limfoide i una hiperactivitat, generalment policlonal, dels limfòcits B, la qual cosa dóna lloc a la presència d'hipergammaglobulinèmia, de factor reumatoide, d'autoanticossos i d'immunocomplexos circulants.

Hipergammaglobulinèmia

La hipergammaglobulinèmia que es detecta en la SS sol ser policlonal, més freqüent i de més magnitud en les formes primàries que en les secundàries^{11,103,104}. La presència d'hipergammaglobulinèmia monoclonal IgM kappa o de cadenes lliures monoclonals en l'orina sol ser, en relació amb l'extensió de la malaltia, una transformació maligna o limfoproliferativa^{105,106,107}.

Factor reumatoide

El factor reumatoide, que pot ser d'isotip d'IgG, d'IgM o d'IgA, és present en, aproximadament, la meitat dels pacients amb la SS, tant al sèrum com a la saliva. El factor reumatoide de tipus IgM es detecta en el 63 % i l'IgA en el 40% de pacients amb la SS primària¹⁰⁸.

Autoanticossos

En la síndrome de Sjögren podem trobar dues classes d'autoanticossos.

D'una banda, n'hi ha d'organoespecífics, com els anticossos anticèl.lula parietal gàstrica, antimicrosomals, antitiroglobulina, antimúscul llis, antimitocondrials i antiducte salival. En la síndrome de Sjögren secundària es detecten amb més freqüència que en la SS primària, els anticossos antiducte salival, que no tenen, però, cap relació amb la gravetat de la malaltia. Així, en els pacients amb la SS associada a l'artritis reumatoide es detecten els anticossos antiducte salival en el 61% dels casos, mentre que només es detecten en el 29% dels casos de SS primària; fins i tot es poden detectar en pacients amb artritis reumatoide sense SS^{109,110}.

D'altra banda, els anticossos no organoespecífics més relacionats amb la SS són els anticossos antinuclears, anti SS-A/anti-Ro i anti SS-B/anti-La.

- Anticossos antinuclears:

Aproximadament, el 50% dels pacients amb la SS són positius davant els anticossos antinuclears (ANA), sobretot amb un patró motejat. Aquest patró és l'expressió morfològica dels antígens extraïbles del nucli (ENA) i en la

SS la majoria dels anticossos anti-ENA són els anticossos anti SS-A, anti SS-B i anti-SS-C.

Dels diferents tipus d'ANA, els anticossos antiDNA i antihistones són poc freqüents en la SS; fins i tot la SS secundària al LES sol cursar amb negativitat pel DNA natiu¹¹¹. Aquesta detecció d'ANA és inespecífica i compartida amb diverses malalties autoimmunes que poden presentar una positivitat per aquests anticossos.

- Anticossos anti SS-A

Els anticossos anti SS-A o anti-Ro es detecten entre el 30 % i el 70% dels pacients amb SS primària i amb SS secundària al LES (segons la població estudiada i la tècnica utilitzada); el percentatge arriba a ser fins i tot més petit, inferior al 20% en la SS associada a l'AR^{13,109,112,113}. L'antigen SS-A és heterogènic i conté partícules ribonucleiques formades per dos polipeptits de diferent pes molecular. Aquesta proteïna s'ha detectat en fraccions del nucli, del citoplasma i a nivell de les membranes cel·lulars¹¹³. La detecció d'aquests anticossos es relaciona amb el desenvolupament de manifestacions sistèmiques, com fenòmens vasculítics, púrpura, adenopaties, anèmia i leucopènia, com també amb la presència de factor reumatoide, hipergammaglobulinèmia important, ANA, presència de crioglobulines i hipocomplementèmia^{111,112}. Tots els pacients amb detecció positiva d'anticossos anti SS-A solen tenir una biòpsia labial patològica¹³.

- Anticossos anti SS-B

Els anticossos anti SS-B o anti-La només s'observen en, aproximadament, el 50 % (entre el 25% i el 70 %, segons la tècnica utilitzada i la població estudiada)^{109,112,113} dels pacients amb la SS primària i amb la SS associada al LES. En canvi, és excepcional la seva detecció en els pacients amb SS associada a l'AR, en altres malalties autoimmunes o en persones sanes. Per aquest fet els anticossos anti SS-B conformen un bon marcador per a la SS primària i per a l'associada al LES. L'antigen SS B correspon a una proteïna associada a una RNA polimerasa. És una proteïna de localització predominantment nuclear, que configura un patró motejat en la immunofluoresència indirecta. Alguns autors relacionen la presència dels anti SS-B amb una tendència més gran al desenvolupament de pseudolinfomes^{39,114}. A més a més, hi ha una relació genètica entre la presència d'aquests anticossos i aquests gens HLA-DR^{115,116}.

Hi ha una estreta correlació entre els anticossos enfront als antigens SS-A i SS-B. La presència d'aquest últim s'associa de manera gairebé constant a la positivitat de l'SS-A, però no necessàriament a la inversa. L'especificitat de l'SS-A és del 85% i de l'SS-B del 97%, però amb una sensibilitat només del 44% i del 16% respectivament; no són útils com a sistema de despistatge diagnòstic^{117,118}.

- Anticossos anti SS-C

Els anticossos anti SS-C, també coneguts com a RAP (precipitines de l'artritis reumatoide) o RANA (antigen nuclear de l'artritis reumatoide), es

detecten en pacients amb AR associada o no a la SS, però són infreqüents en la SS primària.

Immunocomplexos circulants

En la majoria de pacients (entre el 60% i el 85%) amb la SS primària es poden detectar immunocomplexos circulants. A pesar d'aquesta prevalença, no se n'ha demostrat la relació amb la patogènesi de la malaltia. No hi ha correlació entre els nivells d'immunocomplexos circulants (ICc) i l'activitat de la malaltia, ni amb les manifestacions extraglandulars. Per contra, hi ha relació entre els nivells d'ICc i l'activació del complement^{119,120,121}.

1.5.5.L'apoptosi

Hi ha dos tipus de mort cel.lular: la necrosi i l'apoptosi. La necrosi sempre és un procés patològic; comporta la destrucció cel.lular amb lisi de la cromatina nuclear, i els agents que la desencadenen són sempre factors o condicions tòxiques per a la cèl.lula, amb reacció inflamatòria i tisular concomitant. En canvi, l'apoptosi és una mort cel.lular programada, habitual i necessària per al funcionament fisiològic normal de l'organisme. L'apoptosi avança amb condensació de la cromatina nuclear i els seus desencadenants poden ser presents a l'interior mateix de la cèl.lula o bé procedir de l'espai extracel.lular; a més, sol presentar-se sense reacció tissular o inflamatòria concomitants¹²². L'alteració dels mecanismes fisiològics de l'apoptosi poden convertir aquest procés en patològic. La diferència més gran entre l'apoptosi i la necrosi, des del punt de vista

bioquímic, rau en el fet que l'apoptosi necessita energia, mentre que la necrosi es desenvolupa sense necessitat de metabolisme energètic. A l'organisme, totes les cèl.lules tenen la capacitat intrínseca de desenvolupar l'apoptosi. El que varia d'un òrgan a l'altre és la freqüència amb què les cèl.lules entren en apoptosi, ja que aquesta depèn del grau de diferenciació específica de cada cèl.lula, de l'estímul apoptòtic i de la susceptibilitat a aquest estímul. Cal, sempre, que hi hagi equilibri entre el nombre de mitosis i la mort cel.lular programada. El desequilibri entre aquests dos processos condiciona alteracions fisiopatològiques o l'aparició de malalties.

L'apoptosi o mort cel.lular programada té lloc quan hi ha una lesió cel.lular o una cèl.lula ja no és necessària. Té molta importància en l'embriogènesi, en l'homeostasi normal dels teixits i també en certes circumstàncies patològiques com ara l'oncogènesi, la síndrome de la immunodeficiència adquirida humana (SIDA), algunes malalties neurodegeneratives i l'autoimmunitat¹²³. El terme *apoptosi* va ser introduït per Kerr i col.laboradors el 1972¹²⁴.

Al final, el destí de la cèl.lula depèn del balanç entre estímuls pro-apoptòtics i antiapoptòtics. Els gens implicats en la regulació de la mort programada són de dues classes: els protooncògens -els més importants pertanyen a la família Bcl-2, alguns dels quals són lligats a les mitocòndries i als gens supressors tumorals, com els p53¹²⁵. A part de les influències genètiques, les cèl.lules són influenciades per múltiples estímuls apoptòtics, entre els quals hi ha diverses citocines (IL-4, IL-2, IL-10, entre altres), diferents molècules, circulants o lligades a la membrana cel.lular, que interaccionen amb receptors de membrana. Els receptors prototípus que

intervenen en la regulació de l'apoptosi són el *Fas* i el tumor necrosi factor I i II, amb els seus lligams corresponents, el *FasL* i el tumor necrosi factor alfa (TNF- α) respectivament¹²⁶.

Algunes malalties autoimmunes són conseqüència d'un defecte en l'apoptosi de limfòcits activats, com per exemple el lupus eritematós sistèmic, l'artritis reumatoide, l'esclerodèrmia, algunes miopaties i la síndrome de Sjögren¹²⁵. En la SS, la destrucció de les glàndules exocrines és deguda, en part, a l'apoptosi de les cèl.lules epitelials acinars i ductals¹²⁷. S'ha suggerit que la destrucció glandular, en la SS, és el resultat de l'acció de citocines mitjançant la inducció que fan sobre l'expressió del *FasL* o la sobreexpressió del *Bax* en les cèl.lules acinars glandulars¹²⁸. Mutacions detectades sobre el *Fas* i *FasL* no són crucials per al desenvolupament de la SS¹²⁹. En la SS, la majoria dels infiltrats limfocitaris apareixen per acció de les quimoquines proinflamàtoies i les citocines, i també per una mort cel.lular programada o apoptosi deficient. S'ha demostrat una presència més gran de molècules proapoptòsiques (CD95/*Fas*, *Bax*) que no pas de proteïnes antiapoptòsiques (*Bcl-2*, *Bcl-X*) a les cèl.lules epitelials acinars i ductals, en la SS. A més a més determinades citocines, com l'IFN- γ i la IL-10, són moduladors de l'apoptosi relacionada amb el *Fas* en la SS¹³⁰.

1.5.6. Citocines

L'expressió de citocines a la glàndula salivar menor i en sang perifèrica de pacients amb la síndrome de Sjögren sols s'ha estudiat parcialment.

La base d'aquesta tesi doctoral és l'estudi del patró d'expressió de citocines en la biòpsia de glàndula salival menor de pacients amb la síndrome de Sjögren primària. La descripció de les citocines i de la seva relació amb la síndrome de Sjögren es fa detalladament en l'apartat 1.8 (pàgina: 3448).

1.6.- MANIFESTACIONS CLÍNiques DE LA SINDROME DE SJÖGREN

La SS presenta un espectre clínic ample, des de l'exocrinopatia aïllada, procés autoimmune sistèmic, fins a la síndrome limfoprolifera tiva. Les manifestacions inicials solen ser inespecífiques o bé sequedat de mucoses, i poden passar entre vuit i deu anys fins al desenvolupament de la síndrome completa²⁷. La SS afecta principalment les dones (9:1), sobretot entre la quarta i la sisena dècada de la vida^{13,95,96}, però es pot presentar a qualsevol edat, fins i tot pediàtrica¹³¹. No hi ha diferències clíniques respecte al sexe, però hi ha discrepàncies en diferents estudis sobre l'expressió d'anticossos o del fenotip immunològic^{96,132,133}.

La majoria de pacients amb la SS primària tenen una simptomatologia limitada a l'afectació de les glàndules lacrimals (xeroftalmia) o salivals (xerostomia), que pot, però, involucrar altres glàndules exocrines de l'organisme o fins i tot adquirir un quadre sistèmic¹³⁴. Les manifestacions orals, caracteritzades per la disminució de la secreció salival, inclouen sensació de sequedat bucal, dificultat en la formació del bol alimentari i en la deglució. També es produeix una disminució en la capacitat gustativa i olfactiva. En fases més avançades poden aparèixer fisures a la llengua i als llavis; també pot haver-hi un augment de la incidència d'infeccions orals, per absència del poder antisèptic de la saliva, que indueixi a un increment de la càries dental i fins i tot a la pèrdua de peces dentàries. La hipertròfia parotídea és una manifestació clínica característica i freqüent en pacients amb la SS^{13,17,135}.

Les manifestacions oculars són conseqüència de la dessecació de la còrnia i de la conjuntiva, anomenada queratoconjuntivitis seca, la qual produeix sensació de cos estrany o de “sorreta”, cremor, visió borrosa i disminució del llagimeig. La fotosensibilitat, el prurit conjuntival i la disminució de l’agudesia visual són menys freqüents.

A més de les glàndules lacrimals o salivals, els pacients amb la SS poden tenir afectades altres glàndules exocrines i involucrar el tracte respiratori superior i inferior, el digestiu, el ginecològic i el teixit cutani^{27,133,135,136,137,138,139,140,141,142}. A més a més, ocasionalment, aquests pacients presenten afectacions extraglandulars, amb més incidència en les formes primàries de la SS, i certa varietat de manifestacions clíniques.

Així mateix, els pacients amb la SS primària tenen més risc de patir un procés limfoproliferatiu que no pas la majoria de la població o que la població afectada per altres malalties autoimmunes^{143,144}.

1.7. DIAGNÒSTIC DE LA SÍNDROME DE SJÖGREN

La síndrome de Sjögren és una malaltia crònica d'evolució llarga i amb diagnòstic habitualment retardat. Té manifestacions clíniques múltiples, glandulars i extraglandulars. Per a diagnosticar-la calen, a més de manifestacions clíniques, diferents proves complementàries. Clàssicament el diagnòstic de la SS es basava únicament en la tríada definida per Block i col.laboradors¹¹, caracteritzada per la presència de queratoconjunctivitis sicca, xerostomia, i artritis reumatoide o una altra malaltia del teixit connectiu. Després de Block, diversos grups d'estudi han desenvolupat diferents criteris diagnòstics propis: els criteris de Copenhague²⁰, de Grècia¹⁴⁵, de Califòrnia²² i del Japó¹⁴⁶. El 1993 es presenten els criteris preliminars per al diagnòstic de la SS, proposats pel grup d'estudi de la Comunitat Europea per a la SS²¹ i, des de llavors, s'han fet servir àmpliament a Europa.

Criteris preleminars de "l'European Community Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's syndrome"²¹

1. Síntomes oculars

Una o més respostes positives a una de les preguntes següents:

- Heu tingut molèsties diàries i persistents a causa de sequedat ocular que hagin durat més de tres mesos?

- Heu tingut sensació recurrent de “sorreta” als ulls?
- Feu servir llàgrimes artificials més de tres cops al dia?

2. Síntomes orals

Una o més respostes positives a una de les preguntes següents:

- Heu tingut sensació diària de sequedat bucal durant més de tres mesos?
- Heu tingut de manera recurrent o persistent tumefacció d'alguna glàndula salival a l'edat adulta?
- Ingeriu líquid freqüentment durant els àpats?

3. Signes oculars

Evidència objectiva d'afectació ocular, basada en el resultat positiu de, com a mínim, una de les proves següents:

- Test de Schirmer (< 5 mm en 5 min)
- Rosa de Bengala (> 4, segons la classificació de Vari Bijsterveld)

4. Dades histològiques

- Aparició d'un o més focus en la biòpsia de la glàndula salival menor (el focus es defineix com un agregat de 50 o més cèl.lules)

mononucleades. El nombre de focus es valora per cada 4 mm² de teixit glandular).

4. Afectació de glàndula salival

Evidència objectiva d'afectació de les glàndules salivals, basada en el resultat positiu de, com a mínim, una de les proves següents:

- gammagrafia salival
- sialografia parotídea
- flux salival no estimulat (< 1,5 ml en 15 min).

5. Autoanticossos

Presència en sèrum de, com a mínim, un dels autoanticossos següents:

- autoanticòs contra els antigens Ro/SS-A o La/SS-B
- anticossos antinuclears (ANA)
- factor reumatoide (FR)

Diagnòstic de la Síndrome de Sjögren definida:

Presència de, com a mínim, quatre dels sis criteris (el sisè criteri queda limitat a la presència d'anticossos antiRo (SS-A) i antiLa (SS-B)).

Criteris d'exclusió

Limfoma previ, infecció per al virus de la immunodeficiència humana o una altra infecció vírica, sarcoidosi i malaltia de l'empelt contra l'hoste.

1.7.1. Tests diagnòstics

Diagnòstic de queratoconjuntivitis sicca

LA SS provoca una atròfia progressiva de l'epiteli secretor de les glàndules lacrimals i una infiltració massiva de limfòcits, i produeix una hiposecreció lacrimal amb deficiència de la fase aquosa i una lesió descamativa dels epitelis conjuntival i corni.

a) Estudi de la secreció lacrimal

- quantitatiu: test de Schirmer
- qualitatiu: *break-up time* (BUT)
osmolaritat

b) Estudi de la superfície còrnia

- citològic
- rosa de Bengala

Les dues proves que es fan servir més, entre les esmentades anteriorment, són el test de Schirmer i la tinció ocular amb rosa de Bengala^{147,148,149,150,22}.

La majoria d'autors consideren el test de Schirmer com un bon mètode d'estudi inicial, malgrat tenir una sensibilitat i un valor predictiu positiu baixos; el valor predictiu negatiu, però, és molt fiable i exclou el diagnòstic de xeroftàlmia. Es fa servir paper de filtre de 35 mm de llarg per 5

mm d'ample, col.locat al marge inferior de la parpella inferior, i es llegeix al cap de 5 minuts. Es considera que la prova és positiva si hi ha hiposecreció lacrimal inferior a 5 mm.

La tinció amb rosa de Bengala mesura qualitativament les alteracions de la capa mucínica, mitjançant la tinció de les zones amb lesió còrnia i conjuntival ocasionades per la sequedat ocular. Aquesta tècnica és considerada com la més útil per al diagnòstic de la queratoconjuntivitis sicca.

Diagnòstic de la xerostomia

El diagnòstic de la disfunció de les glàndules salivals es pot fer de maneres diferents: segons el flux salival i la seva composició o segons l'estudi estructural anatòmic, amb tècniques de sialografia, gammagrafia, ecografia¹⁵¹ i, actualment, també amb la ressonància magnètica nuclear¹⁵². En aquesta tesi doctoral s'han emprat la gammagrafia salival i la biòpsia de glàndula salival menor.

a) Tècnica gammagràfica

S'han fet servir tècniques gammagràfiques diferents per a l'estudi de la SS, segons la capacitat de concentrar i segregar elements del grup periòdic VII que tenen les glàndules salivals. Es fa servir sobretot el radioisòtop tecneci⁹⁹ (Tc) i s'estudia la captació i la secreció del traçador. Les tècniques gammagràfiques més significatives són la concentració salival del Tc⁹⁹ i la gammagrafia salival seqüencial. La tècnica gammagràfica visualitza mitjançant una gammacàmera la captació, la concentració i

l'excreció del Tc⁹⁹ de les glàndules salivals majors. És una prova que es basa en la funcionalitat de les paròtides i de les glàndules submaxilars, i que analitza la hiposecreció o el dèficit de captació del traçador, sense ser una prova invasiva, amb una mínima irradiació^{153,154}.

b) Biòpsia de glàndula salival

La biòpsia glandular permet estudiar directament la lesió histopatològica que defineix la SS. Morgan i Castelman¹⁰, el 1953, en arribar a la conclusió que les malalties considerades fins llavors com a “malalties de Mikulicz” corresponien en realitat a pacients amb la “Síndrome de Sjögren”, van descriure la lesió histopatològica de la glàndula salival en pacients amb la SS. Aquesta es caracteritza per la presència d'un infiltrat limfoide focal, d'atròfia acinar i de dilatació dels ductes amb conservació de la mida dels lòbuls^{22,155,156,157,158,159}.

Chisholm i Mason van establir que la lesió histopatològica de les glàndules salivals menors és la mateixa que trobem a les glàndules salivals majors, i que la correlació inclou tant el patró com l'extensió de la inflamació^{160,161}. Des d'aquesta descripció, la biòpsia de glàndula salival menor es considera la tècnica preferible, en lloc de l'estudi de la glàndula salival major, per la accessibilitat fàcil i pels efectes secundaris escassos que comporta.

La valoració de la biòpsia es basa en el nombre de focus limfoides per cada 4 mm² de superfície glandular. Un focus es defineix per la presència d'un agregat de com a mínim 50 cèl.lules

limfomononuclears^{156,162}. La classificació seguida majoritàriament és la de Chisholm i Mason^{160,161}, que estableix quatre graus de lesió.

Graduació histològica de la biòpsia de glàndula salival menor, segons

Chisholm i Mason

<u>GRAU</u>	<u>Infiltració limfocitària per cada 4 mm² de teixit glandular</u>
0	absent
I	discreta infiltració limfocitària difusa (sense focus)
II	moderada infiltració limfocitària difusa (sense focus)
III	formació d'un focus
IV	més d'un focus

(Focus = agregat de més de 50 cèl.lules limfomonocitàries)

Greenspan i col.laboradors¹⁶³, el 1974, van afegir al grau IV un recompte del nombre de focus per cada 4 mm² de teixit examinat. Van obtenir un recompte màxim de 12 i van augmentar així, en crear 11 subgrups, la sensibilitat del grau IV. Tarpley *et al*¹⁸, al mateix temps, van proposar una escala intermèdia entre els dos sistemes descrits anteriorment i van configurar tres categories per biòpsies, amb dos o més focus.

No hi ha cap alteració histològica patognomònica de la SS. Hi ha un 6-9% de falsos positius en una població normal, si considerem la presència de més d'un focus d'infiltració de cèl.lules limfoides^{26,164,165,166,167}. Cal tenir en compte, però, que el 18-40% dels pacients amb la SS no tenen cap o tenen sols un focus d'infiltració en la biòpsia labial^{156,168,169,170,171}. Altres malalties autoimmunes, sense clínica de SS, també poden presentar sialoadenitis focal sense desenvolupar la malaltia de Sjögren¹⁷².

Per a evitar falsos positius cal aplicar criteris d'exclusió rigorosos, com ara l'existència d'obstrucció, la infecció glandular i la neoplàsia limfoproliferativa local. Així mateix cal excloure les mostres de pacients amb malaltia granulomatosa crònica, limfoma, leucèmia, amiloidosi i història d'irradiació sobre la zona^{19,173}.

Caldria exigir la presència de 4 o 5 lòbuls glandulars per a poder fer la lectura histològica correcta i, com suggereix Daniels¹⁵⁶, eliminar les zones d'atròfia acinar i la fibrosi intersticial, perquè no és específica de la SS i pot ser associada únicament a l'edat del pacient.

1.8.CITOCINES

Isaac i Lindeman van identificar la primera citocina el 1957. Inicialment s'anomenaven interleucines, perquè es pensava que els leucòcits n'eren els únics productors. El 1969 s'introdueix el terme *limfocines* per descriure el factor soluble lliure de cèl.lules obtingut del sobrenadant de cultius cel.lulars per la interacció entre limfòcits estimulats i antígens específics¹⁷⁴, que produïa reaccions d'hipersensibilitat retardada¹⁷⁵, era mitogen per als limfòcits¹⁷⁶ i induïa els macròfags a la migració¹⁷⁷. Actualment es fa servir el terme *citocines*, perquè una gran varietat de cèl.lules, i no solament limfocitàries, són capaces de produir-les i segregar-les. Les anomenades limfocines, monocines, interleucines i interferons s'engloben avui dins del terme *citocina*.

Les citocines són hormones proteiques de baix pes molecular, habitualment de 15-25 kDa, intervenen en el creixement cel.lular, en les reaccions inflamatòries i immunològiques, en la diferenciació i reparació cel.lular i, algunes, en l'apoptosi. Tenen una acció autocrina, paracrina i, excepcionalment, endocrina. Intervenen en la regulació de l'amplitud i de la durada de la resposta immunologicoinflamatòria, per la qual cosa han de ser produïdes i segregades de forma transitòria, en presència de l'estímul desencadenant. Les citocines són ràpidament degradades. Això explica que la seva mitjana de vida sigui tan curta. La majoria de citocines segregades localment no persisteixen a la circulació a causa d'aquesta acció paracrina o autocrina.

Les citocines actuen, com totes les hormones, a través de receptors cel·lulars situats a la membrana de la cèl·lula efectora. L'expressió dels receptors és regulada per diversos factors, entre els quals intervenen les mateixes citocines. La interacció entre la citocina i el seu receptor activa senyals intracel·lulars que indueixen factors de la transcripció gènica i en promouen l'expressió gènica, els productes de la qual són els efectors del procés.

L'estudi de les citocines és complex perquè una mateixa citocina pot ser produïda per cèl·lules diferents. Són substàncies pleotròpiques, perquè poden tenir múltiples efectes sobre una mateixa cèl·lula diana. Els seus efectes poden ser redundants i la seva acció pot ser additiva, sinèrgica o antagònica en presència d'altres citocines.

El sistema immunològic és un conjunt organitzat per diferents cèl·lules i molècules amb diferents funcions en la defensa immunològica. Hi ha principalment dues formes de defensa en les quals intervenen també les citocines davant la invasió de microorganismes: la immunitat natural o innata i l'adquirida.

Durant el creixement, el sistema d'immunitat innata apareix abans que el sistema d'immunitat adquirida. En la immunitat innata, el reconeixement de l'antigen es fa per mitjà de receptors engendrats des de les cèl·lules germinals i es transmet així a la descendència. Per contra, en la immunitat adquirida, els receptors dels antígens no són engendrats des de les cèl·lules germinals, sinó per un procés adquirit de nou en cada organisme¹⁷⁸. La immunitat natural té lloc sempre de la mateixa manera davant d'un agent infeccios determinat. En la resposta innata intervenen

cèl.lules fagocítiques (neutròfils, monòcits, macròfags), mediadors de la inflamació (basòfils, mastòcits, eosinòfils), i també cèl.lules natural killer (NK). Els components moleculars que intervenen en la resposta natural són formats pel complement, proteïnes de fase aguda (proteïna C reactiva, proteïna A amiloide del sèrum, inhibidors de la proteinassa i de la coagulació) i algunes citocines, com els interferons. En canvi, la immunitat adquirida o adaptativa es desenvolupa i millora amb cada nova exposició a l'agressor, necessita l'acció i la proliferació de cèl.lules B i T antigenoespecífiques. Hi intervenen les anomenades cèl.lules presentadores de l'antigen. Els limfòcits B produeixen i segreguen immunoglobulines, és a dir anticossos específics responsables d'eliminar el microorganisme extracel.lular. La immunitat natural i l'adquirida actuen conjuntament en la defensa i per eliminar els agressors¹⁷⁹.

1.8.1. Tipus de citocines

En les últimes dues dècades s'han descrit moltes citocines, amb moltes funcions, entre les quals s'inclouen les interleucines, factors de necrosi tumoral, interferons i altres^{180,181,182}.

a) Interleucines

La interleucina 1 (IL-1) és segregada per macròfags i monòcits, actua sobre limfòcits Th2 CD4⁺ estimulant la producció de citocines. Indueix els limfòcits T CD8⁺ a la producció de citocines i activa l'acció citotòxica, mentre

potencia la formació de cèl.lules B i les indueix a la diferenciació, la proliferació i la producció d'anticossos.

La interleucina 2 (IL-2) només és produïda per limfòcits Th1 CD4⁺. Actua sobre cèl.lules T induint l'expansió clonal antigenoespecífica, provocant la producció, la diferenciació i l'expansió de citocines i intervé en la maduració de cèl.lules T CD8⁺ i NK.

La interleucina 3 (IL-3), segregada per limfòcits T, intervé sobre cèl.lules stem de l'hematopoesi i les indueix a la proliferació i la diferenciació.

La interleucina 4 (IL-4) –sintetitzada per limfòcits Th2 CD4⁺, mastòcits, basòfils i eosinòfils– activa limfòcits B per induir-los a la diferenciació, a la proliferació i a la producció d'immunoglobulines i anticossos, entre les quals hi ha la IgE. Inhibeix la diferenciació de limfòcits Th1 i la seva producció d'INF- γ , i activa en canvi els limfòcits Th2 i les cèl.lules CD8⁺.

La interleucina 5 (IL-5), produïda per limfòcits Th2 CD4⁺ i T CD8⁺, actua sobre la diferenciació dels eosinòfils i n'estimula l'acció.

La interleucina 6 (IL-6) i la interleucina 11 (IL-11) també són produïdes per cèl.lules Th2 CD4⁺ i macròfags, i activen la diferenciació de limfòcits B a cèl.lula plasmàtica; inhibeixen l'expressió dels lipopolisacàrids

en els macròfags i monòcits. A més a més promouen la producció de proteïna C reactiva.

La interleucina 7 (IL-7), segregada per les cèl.lules estromals de la medul.la òssia, potencia la proliferació de les cèl.lules pre-B i de limfòcits T activats.

La interleucina 8 (IL-8), produïda per macròfags, és quimiotàctica, principalment per als neutròfils.

La interleucina 9 (IL-9) és produïda per cèl.lules T CD4⁺, sobretot Th2, i potencia la resposta de la IL-4.

La interleucina 10 (IL-10), segregada per cèl.lules CD4⁺ Th0, Th1, Th2 i CD8⁺, actua sobre la diferenciació dels monòcits en macròfags, sobre els quals, a la vegada, actua inhibint l'expressió del CMH tipus II i de molècules d'adhesió. Inhibeix la producció de l'INF- γ i del factor de necrosi tumoral (TNF), i indueix el canvi del patró Th1 al Th2, a més a més d'inhibir la producció d'IL-4 per les cèl.lules Th2.

La interleucina 12 (IL-12), segregada per monòcits i macròfags, activa les cèl.lules NK, indueix les cèl.lules Th0 a la producció i a la proliferació de la IL-2, i les indueix a diferenciar-se en el patró Th1 de

limfòcits amb la producció d'INF- γ i TNF- α , a més a més d'inhibir la producció d'IL-4, IL-5 i IL-10 i, així, del patró Th2 limfocitari.

La interleucina 13 (IL-13), segregada per cèl.lules Th2 CD4⁺, estimula els limfòcits B i la seva diferenciació, la producció d'IgE, i també el CMH II i les integrines, i inhibeix, en canvi, la producció d'IL-1 i TNF.

La interleucina 14 (IL-14) és produïda per cèl.lules T activades i fa la funció d'expandir clons de cèl.lules B amb supressió de la secreció d'immunoglobulines.

La interleucina 15 (IL-15) és segregada per monòcits i macròfags, i incrementa la citotoxicitat de les cèl.lules T i NK.

La interleucina 16 (IL-16) és produïda per limfòcits T CD8⁺, i és factor de creixement sobre cèl.lules T CD4⁺ i quimiotàctica.

La interleucina 17 (IL-17) és segregada per limfòcits T CD4⁺ de memòria, i indueix a la proliferació i a l'activació de factors autocrins dels limfòcits T CD4⁺.

La interleucina 18 (IL-18) és produïda per macròfags, actua sobre limfòcits B activats, inhibeix la producció d'IgE en incrementar la producció d'INF- γ , i és inductor del patró Th1 de limfòcits i inhibidor del Th2.

b) Interferons

L'interferó α (IFN- α) i l'interferó β (IFN- β) són produïts per macròfags i monòcits com a resposta a infeccions per virus, els quals els indueixen a resistir la mateixa infecció vírica i n'impedeix la replicació.

L'interferó γ (IFN- γ) és produït per cèl.lules Th1 CD4⁺, per altres limfòcits, per cèl.lules NK i per algunes cèl.lules CD8⁺. Actua sobre els macròfags i n'estimula la diferenciació i activació, augmentant l'expressió dels receptors de superfície Fc γ . A més a més incrementa la presència dels CMH I i II, i la síntesi d'òxid nítric, d'IL-1 i de TNF. Estimula la citotocixitat de les cèl.lules CD8⁺ i l'acció de les cèl.lules NK. Així mateix incrementa l'expressió dels receptors per a la IL-2, i indueix el patró Th0 a diferenciar-se en un patró Th1, amb la supressió del patró Th2.

c) Factors de necrosi tumoral (TNF)

El factor de necrosi tumoral α (TNF- α) és produït per macròfags i cèl.lules T, mentre que el factor de necrosi tumoral β (TNF- β) és només segregat per limfòcits. Tots dos factors tenen activitat citotòxica tumoral, antiviral i antiparasitària, activen cèl.lules fagocitàries i indueixen a la producció d'IFN- γ , TNF- α , IL-1 i IL-6, i també a la formació de proteïna C reactiva. Els TNF també intervenen en el xoc endotòxic.

d) Altres citocines

El factor de conversió de creixement β (TGF- β) és segregat tant per cèl.lules B com T, macròfags i mastòcits, amb activitat immunosupressora i inhibeix la proliferació de receptors de la IL-2 i de la secreció de la IL-2 mateix.

El factor d'estimulació de colònies de granulòcits, produït per monòcits, fibroblasts i cèl.lules epitelials, intervé en la maduració i diferenciació dels neutròfils.

El factor d'estimulació de colònies de macròfags, segregat per macròfags i cèl.lules T activades, promou la diferenciació, la proliferació i l'activació dels eosinòfils, dels neutròfils i dels macròfags, i augmenta la producció de citocines i la degranulació dels eosinòfils.

1.8.2. Citocines i immunitat natural o innata

El sistema immunitari innat engloba tota la defensa que no necessita memòria immunològica. Aquesta resposta s'ha desenvolupat abans que l'adquirida en l'evolució filogenètica. En la resposta de la immunitat natural, hi intervenen cèl.lules fagocítiques, cèl.lules que alliberen mediadors inflamatoris i cèl.lules natural killer (NK). Els components moleculars de la immunitat natural són formats pel complement, proteïnes de fase aguda i citocines inflammatòries. Les citocines són mediadors solubles que actuen com a missatgers dins del sistema immunitari i, a més a més, entre el

sistema immunològic i altres sistemes de l'organisme, i constitueixen una xarxa integrada i altament involucrada en la resposta immunològica¹⁸³. A part d'actuar com a missatgers, algunes citocines intervenen directament en la defensa. La resposta immunològica natural de l'organisme com a defensa a una infecció vírica o bacteriana és mediada per les citocines, que tenen un paper fonamental en la defensa immunològica antiviral. Són importants en la inducció i l'orquestració de la resposta antiviral, incloent-hi la inducció a l'expressió del complex major d'histocompatibilitat (CMH)^{184,185}, estimulació de molècules d'adhesió¹⁸⁶ i molècules coestimuladores¹⁸⁷, i també l'activació o desactivació de cèl.lules immunològiques^{188,189}. Aquests canvis condueixen a l'activació de la resposta cel.lular antiviral i actuen sobre cèl.lules NK, limfòcits T citotòxics i anticossos antivirals¹⁹⁰. A més a més, algunes citocines, com és el TNF- α o l'IFN- γ , poden suprimir directament la replicació viral^{191,192} i crear una resistència antiviral en les cèl.lules circumdants. Les citocines també intervenen en la regulació de la resposta inflamatòria davant de bacteries en la immunitat natural, actuant com a nexa amb la immunitat adquirida. EL TNF- α , la IL-1 i la IL-6 són els més representatius i intervenen en la reacció inflamatòria^{193,194}. El TNF- α i la IL-1 són alguns dels responsables del xoc sèptic. L'acció proinflamatòria d'aquests mediadors és regulada per altres citocines segregades en el transcurs de la resposta immunològica.

El sistema immunològic innat té un nombre limitat de receptors amb especificitat conservada per estructures microbianes. El reconeixement d'aquestes estructures pel sistema immunològic innat indueix els

coestimuladors, citocines i quimoquines, que recluten i activen limfòcits i antigens específics; per això, la immunitat adquirida necessita, per ser activada, la presència de la immunitat innata¹⁷⁸.

1.8.3. Citocines i immunitat específica o adquirida

El desenvolupament dels limfòcits i de la línia mieloide, a partir de les cèl·lules stem primordials en el fetge fetal i en la medulla òssia, és guiat per la interacció de cèl·lules estromals i citocines¹⁹⁵. En les fases inicials del desenvolupament dels limfòcits no es requereix la presència d'un antigen, però un cop expressen un receptor madur per un antigen, la supervivència i posterior diferenciació depèn de la presència de l'antigen. En la immunitat adquirida intervé la proliferació de les cèl·lules B i T, que són antigens específics i es desencadenen amb la unió de l'antigen amb el seu receptor de superfície¹⁷⁸. Els limfòcits B segreguen immunoglobulines, anticossos específics per a la defensa davant de microorganismes extracel·lulars. Els limfòcits T ajuden en la formació, en les cèl·lules B, dels anticossos i, a més a més, intervenen en la defensa davant de patògens intracel·lulars. El sistema immunològic adquirit és capaç de reconèixer virtualment tots els antigens possibles per la generació casual dels seus receptors quan entra en contacte amb l'antigen. Però el preu que paga per aquesta capacitat diversitària és que no és capaç de diferenciar entre antigens externs i autoantígens.

L'inici, manteniment i regulació de la resposta immune específica està condicionada també per les citocines. Les cèl·lules T CD4⁺ són principalment cèl·lules T helper, secretores de citocines, mentre que les

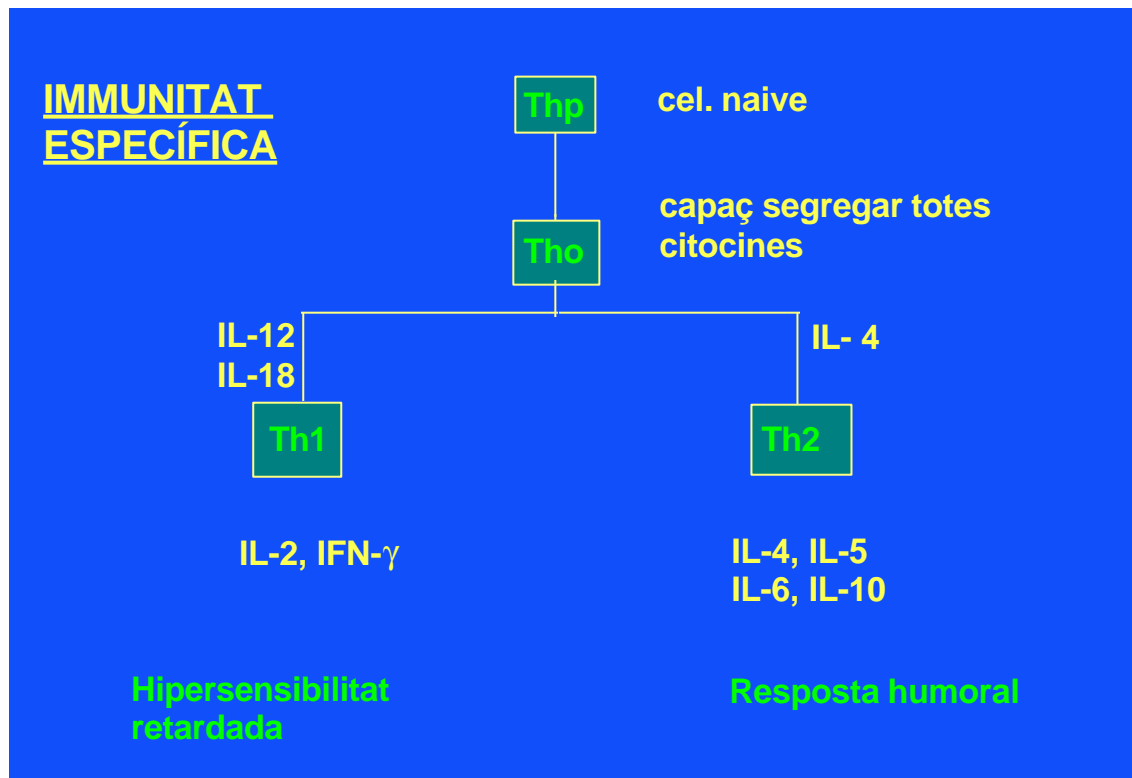
cèl.lules T CD8⁺ són sobretot cèl.lules citotòxiques. Les cèl.lules que controlen i dirigeixen la resposta immune específica són els limfòcits T CD4⁺ (T helper). Després del contacte amb l'antigen es produeixen una sèrie de citocines que determinen la diferenciació del limfòcit Th virgen o naive (Th0) a limfòcit Th1 o Th2, procés exclouent un de l'altre *in vitro*. Mosmann *et al* en 1986 va demostrar que cèl.lules T CD4⁺ es podien diferenciar en poblacions diferents segons les citocines que produïen¹⁹⁶. Els limfòcits CD4⁺ Th0, Th1 i Th2 només es poden identificar o diferenciar entre sí mitjançant el patró de citocines que segreguen. Les cèl.lules Th0 tenen el potencial de produir i segregar totes les citocines i, segons l'estímul antígenic, es diferencien en limfòcits Th1 o Th2. Els limfòcits CD4⁺ Th1 són productors de IFN- γ i IL-2 però no IL-4, IL-5 o IL-6. En canvi les cèl.lules Th2 produeixen IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10, però no IL-2 o IFN- γ ^{197,198,199} (Figura 1). La resposta limfocitària Th1 seria més efectiva en reaccions d'hipersensibilitat retardada, reacció d'importància per combatre patògens de creixement intracel·lular. En canvi la resposta Th2 ajuda els limfòcits B en la resposta d'anticossos, en particular de IgE^{200,201}. Algunes de les citocines segregades per cada patró intervien en la pròpia autoregulació i en la contraregulació del patró oposat.

El patró Th0 de citocines és més demostrable *in vivo* en fases inicials de l'activació limfocitària²⁰², mentre els patrons Th1 i Th2 es detecten més clarament en l'estimulació antigènica persistent, com en el cas de malalties cròniques²⁰³. Aquest mateix fenomen es demostra *in vitro*, on una estimulació antigènica persistent sobre cèl.lules T amb un receptor únic

transgènic per l'antigen incrementa la polarització i irreversibilitat de les poblacions Th1 i Th2^{204,205}.

La IL-12, produïda per macròfags i cèl·lules dendrítiques, és un dels principals inductors de la diferenciació dels limfòcits Th0 a Th1^{206,207}, en què també intervé, en menor grau, l'IFN- γ ²⁰⁸ i la IL-18. En canvi la IL-4 intervé com a inductor del patró Th2.

Figura 1: Diferenciació dels límfocits T helper naive i Th0 en límfocits Th1 o Th2.



Les citocines tenen una funció central en la resposta immunològica òptima en la defensa i protecció davant de diferents tipus d'agents infecciosos i, a més a més, disminueixen la resposta al·lèrgica i autoimmunitària en condicions normals. Les citocines formen una xarxa complexa

interconnectada entre diferents elements del sistema immunològic que determina quin mecanisme efector actua en un moment determinat contra un estímul antigènic i coordina l'amplitud de la resposta immunològica d'acord amb el grau d'agressió sofert per neutralitzar-la, sense incórrer, en la mesura que sigui possible, en un dany tisular propi. L'alteració d'aquest equilibri complex pot comportar altres tipus de patologies, com són les malalties granulomatoses, reaccions al·lèrgiques i asma, processos limfoproliferatius i processos autoimmunes.

1.8.4. Citocines i autoimmunitat

L'investigació sobre el paper de les citocines en les malalties autoimmunes ha augmentat de forma espectacular en els últims anys, gràcies, en part, a la demostració del patró de citocines en teixits d'animals transgènics i en teixits obtinguts per biòpsies (com el nostre grup que treballa amb biòpsies de glàndula salival menor). En aquests estudis s'ha demostrat el patró de citocines en malalties autoimmunes diferents, desglossant un patró Th1 en moltes de les malalties autoimmunes òrgan específic. Treballs recents demostren la importància del balanç Th1/Th2 en les malalties autoimmunes. La majoria de les malalties autoimmunes òrgan específic tenen un patró de cèl.lules Th1 de citocines que són activadors de macròfags i de la producció d'anticossos fixadors de complement que intervenen en processos inflamatoris i així en el dany tisular. El patró Th2 de citocines és antiinflamatori, inhibeix l'activació macrofàgica i retarda

reaccions d'hipersensibilitat. Així és possible que les cèl·lules Th2 intervinguin en la regulació de malalties autoimmunes.

Quan hi ha una estimulació antigènica es creu que hi ha una activació tant dels limfòcits Th1 com dels Th2 per combatre l'agressió antigènica. El problema sorgeix quan apareix un desequilibri en aquest balanç de citocines i apareixi un patró de predominància Th1, que pot donar lloc a l'aparició d'una determinada malaltia autoimmune segons l'estímul antigènic inicial i el desbalanç produït entre el patró Th1/Th2.

En l'encefalitis autoimmune experimental les cèl·lules autopatogèniques són cèl·lules T CD4⁺ amb fenotip Th1 d'expressió de citocines^{209,210}. Un patró similar es troba en la diabetis no obesa de ratolins, on la transferència de cèl·lules CD4⁺ transgèniques específiques per a autoantígens pancreàtics amb patró Th1 induïx, in vitro, al desenvolupament de la malaltia²¹¹.

Així, probablement moltes malalties autoimmunes òrgan específic presenten un patró Th1. És el cas de l'artritis reumatoide, de la diabetis mellitus insulíndependent, de l'esclerosi múltiple i d'algunes de les malalties tiroïdals autoimmunes, així com la síndrome de Sjögren, l'esclerodèrmia, la psoriasi o la malaltia inflamatòria intestinal^{212,213}.

1.8.5.Citocines i síndrome de Sjögren

En la síndrome de Sjögren s'ha estudiat parcialment l'expressió de citocines en la glàndula salivar menor i en sang perifèrica de pacients amb la SS. Així Fox *et al*²¹⁴ i Boumba *et al*²¹⁵ descriuen un patró predominant Th1

de citocines en biòpsies de glàndules salivals menors de pacients amb la síndrome de Sjögren. Ohyama *et al*¹⁶ també troba un patró Th1 de citocines, però conjuntament amb la presència d'IL-10, IL-6 i TGF- β en la inducció o manteniment de la SS, detecta també citocines Th2 en algunes de les seves mostres, i suggereix que el patró Th2 detectat actui com a component de progressió de la SS, sobretot en l'activació local de cèl·lules B.

La base d'aquesta tesi doctoral és l'estudi del perfil de citocines en les biòpsies de glàndula salival menor de pacients amb la síndrome de Sjögren primària, per demostrar la predominància del patró Th1 de citocines. Volem demostrar la presència d'IL-2 i IFN- γ en la biòpsia de glàndula salival menor de pacients amb la síndrome de Sjögren primària per confirmar el patró Th1 en aquesta malaltia òrgan específica, com també la presència d'IL-12 i IL-18, ambdues citocines inductores d'aquest patró. L'absència d'IL-4 reforçaria la predominància del patró Th1. A més a més analitzem la presència de la IL-10, TNF- α i TGF- β , citocines proinflamatòries i inhibidors del procés inflamatori.

2. OBJECTIU

Anàlisi de l'expressió del perfil de citocines en biòpsies de glàndules salivals menors de pacients amb la síndrome de Sjögren primària.

2.1. HIPÒTESI

1. El patró d'expressió de citocines és similar en la glàndula salival menor de pacients amb la síndrome de Sjögren primària definida com en la síndrome de Sjögren primària probable.

2. Hi ha un patró predominant Th1 d'expressió de citocines en pacients amb la síndrome de Sjögren primària.

3. La presència de la IL-12 i IL-18 reafirma la predominància del patró Th1 en la síndrome de Sjögren primària.

4. El temps d'evolució de la simptomatologia clínica de la síndrome de Sjögren primària influeix en l'expressió de citocines en la glàndula salival menor.

3. PACIENTS I MÈTODES

3.1. Disseny del projecte

L'objectiu de l'estudi és analitzar i comparar el patró de citocines en les glàndules salivals menors de pacients afectats de la síndrome de Sjögren primària (SSp). Hem estudiat dos grups de pacients, un amb criteris de SSp definida i l'altre, amb criteris de SSp probable. Partint de la hipòtesi que no hi ha diferència en l'expressió de citocines entre aquests dos grups de pacients i que probablement corresponen a moments evolutius diferents de la mateixa malaltia, hem analitzat:

1. L'expressió d'un perfil de citocines en la glàndula salival menor.
2. L'expressió d'aquest perfil de citocines en relació amb el temps d'evolució de la simptomatologia clínica.
3. L'expressió d'aquest perfil de citocines en relació amb el grau d'afectació histològica de la glàndula salival.

Aquest estudi s'ha realitzat entre els anys 1996 i 1999.

3.2 Esquema de l'estudi.

Es tracta d'un estudi prospectiu, observacional i descriptiu subdividit en les fases següents:

- Selecció de pacients amb la SS.
- Confirmació diagnòstica de la SS primària.
- Assignació dels pacients als dos grups preestablerts: un amb criteris de SSp definida i l'altre amb criteris de SSp probable.
- Estudi de laboratori: estudi de l'RNAm de les citocines mitjançant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa via transcriptasa inversa (PCR-RT).
- Descripció dels resultats.
- Anàlisi estadística.
- Avaluació i comparació dels resultats.

3.3. Població d'estudi

La mostra de 42 pacients va ser formada per 39 dones i 3 homes, amb una mitjana d'edat de 58.76 anys (± 13.13 ; rang de 31 a 90 anys). La mitjana de temps d'evolució va ser de 56.33 mesos (± 55.27 ; rang de 0 a 240 mesos). Cap d'aquests pacients tenia una altra malaltia autoimmune associada, evidència de limfoma o infecció pel VIH ni VHC en el moment de l'estudi.

3.3.1 Criteris d'inclusió i d'exclusió

S'**inclouen** en el grup d'estudi:

- Pacients amb la síndrome de Sjögren primària definida: presenten 4 o més dels criteris preliminars del grup d'estudi europeu de la síndrome de Sjögren²¹, incloent-hi necessàriament el criteri anatomopatològic de tenir ≥ 1 focus d'infiltració limfocitària en la glàndula salival menor.
- Pacients amb la síndrome de Sjögren primària probable: complien 3 criteris Europeus²¹, però no el criteri anatomopatològic. En la biòpsia de la glàndula salival menor només presenten una infiltració limfocitària difusa, sense la formació de focus.

La inclusió en aquest estudi va ser independent del temps d'evolució, de la gravetat i de la intensitat de la malaltia. Tots els pacients van ser estudiats

de forma correlativa i controlats en un dispensari monogràfic que hi ha per aquesta malaltia en el Departament de Medicina Interna de l'Hospital del Mar de Barcelona.

3.3.2. Consentiment informat dels pacients

Tots els pacients van ser informats de les característiques de l'estudi, de les proves complementàries i de la biòpsia glandular que es farien. Només es va prosseguir amb l'estudi en aquells pacients que van donar el seu consentiment informat per escrit previ a la inclusió.

3.4. Protocol d'estudi

Els pacients que complien els criteris d'inclusió per la síndrome de Sjögren primària, van ser estudiats aplicant el protocol següent en tots els casos:

1. Qüestionari sobre l'existència de xeroftàlmia i/o xerostomia.
2. Valoració del temps d'evolució de la simptomatologia clínica de la xeroftàlmia i/o xerostomia.
3. Test de Schirmer i rosa de Bengala.
4. Anàlisi general, immunologia (ANA, Ro i La), virologia per VHC i VIH.
5. Gammagrafia de glàndules salivars amb Tc⁹⁹.
6. Biòpsia de glàndula salival menor de mucosa labial.
7. Estudi anatomopatològic.
8. Anàlisi de l'expressió del perfil de citocines en la biòpsia de glàndula salival per PCR-TR.

3.5. Procediment diagnòstic utilitzat

3.5.1. Estudi de la xeroftàlmia

Pel diagnòstic de la xeroftàlmia es va practicar:

a) Anamnesi de la simptomatologia clínica:

Es va aplicar el qüestionari sobre les possibles molèsties oculars a tots els pacients, segons els criteris europeus, al qual contestaven sí o no. El qüestionari constava de tres preguntes:

1. Ha tingut molèsties diàries i persistents de sequedat ocular de més de 3 mesos d'evolució?
2. Ha tingut sensació recurrent de sorreta als ulls?
3. Utilitza llagrimas artificials més de 3 cops al dia?

b) Test de Schirmer

L'examen oftalmològic, el va fer el Servei d'Oftalmologia de l'Hospital del Mar. Es va utilitzar el test de Schirmer tipus I, que es basa en el mètode de Schirmer²¹⁷. Una tira de paper secant milimetrat tipus Whatman de 5 mm d'amplada i 35 mm de llarg es col.loca en el fons del sac conjuntival al nivell de la fenedura palpebral interna dels dos ulls. La lectura del recorregut de la humidificació es mesura en milímetres al cap de 5 minuts.

c) Rosa de Bengala

La valoració de la coloració, després de la instil·lació d'una gota de rosa de Bengala en solució a l'1% en ambdós ulls, es realitza a simple vista i amb làmpada de fenedura. D'acord amb els criteris d'Holms¹⁴⁹ la coloració es diferencia en tres tipus:

- **Tipus A:** Coloració de la conjuntiva en forma triangular, amb base al limbe corni. La còrnia també queda acolorida. És la imatge més característica objectivable en els casos més avançats de queratoconjuntivitis sicca.
- **Tipus B:** Coloració linial de la conjuntiva. La coloració còrnia és prop del limbe.
- **Tipus C:** Coloració dispersa per la conjuntiva que afecta la zona còrnia inferior.

3.5.2. Estudi de la xerostomia

Per l'estudi de la xerostomia es va aplicar:

a) Anamnesi de la simptomatologia clínica:

A tots els pacients, se'ls va fer el qüestionari sobre la possible sequedat bucal, segons els criteris europeus, al qual contestaven sí o no.

El qüestionari constava de tres preguntes:

1. Ha tingut sensació diària de sequedat bucal durant més de 3 mesos?
2. Ha tingut de forma recurrent o persistent tumefacció d'alguna glàndula salival en edat adulta?
3. Ingereix líquid freqüentment amb els menjars?

b) Gammagrafia Salivar:

Aquesta exploració s'ha fet en el Servei de Medicina Nuclear de l'Hospital del Mar. S'ha dut a terme una gammagrafia salival seqüencial mitjançant una injecció intravenosa de 10 mCu de sodium Pertechnatate⁹⁹ Tc^m (Tc⁹⁹) i lectura amb una gammacàmera (Picker Dyna 4). Els resultats s'han classificat en quatre graus, d'acord amb els criteris dels estudis de Schall²¹⁸ i Rampson²¹⁹:

- Grau I: normal
- Grau II: dinàmica salivar gairebé normal, però amb captació globalment disminuïda, o amb captació normal però amb retard en l'excreció.
- Grau III: retard en la captació del trassador. Gairebé sense activitat oral amb notable disminució de l'excreció.
- Grau IV: absència absoluta de captació en totes les exposicions.

3.5.3. Biòpsia de glàndula salival menor

La biòpsia va ser feta pel Servei de Cirurgia Maxilo-fascial de l'Hospital del Mar. Es va practicar, amb anestèsia local, una incisió de 10 mm en el llavi inferior que permet l'extracció de les glàndules salivals menors de la fàscia limitant. La biòpsia permetia l'obtenció de com a mínim tres fragments. Cada un d'ells contenia entre 5-6 glàndules, material suficient per al correcte estudi histopatològic, immunohistoquímic i tècniques de PCR.

El material obtingut va ser processat de forma immediata. Una part de la mostra es va congelar, aïllat en un recipient estèril, directament amb nitrogen líquid i conservat a -80°C . L'altra part de la mostra es va dipositar en un criomolde banyat en OCT (Miles Lab. USA) i posteriorment es va congelar la peça via nitrogen líquid i es va conservar a -80°C en un congelador de les instal·lacions del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar.

L'estudi histològic convencional es va realitzar en el Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar, amb tincions d'hematoxilina-eosina. Totes les mostres incloses presentaven com a mínim 4 lòbuls per mostra. La classificació histològica es basava en els patrons descrits per Chisholm¹⁶¹:

- Grau I: Absència d'infiltració limfohistocitària.
- Grau II: Moderada infiltració limfohistocitària difosa sense la formació de focus.
- Grau III: Presència d'un sol focus d'infiltració limfohistocitària per cada 4 mm² de glàndula salival observada. Grau moderat d'atròfia dels conductes. Es considera com a focus la presència de, com a mínim, 50 limfòcits agrupats.

- Grau IV: Presència de més d'un focus d'infiltració limfocítica per cada 4 mm² de glàndula observada. Important atrofia dels conductes.

3.5.4. Estudi immunològic en sang perifèrica

Els anticossos no òrgan específics més relacionats amb la síndrome de Sjögren són els anticossos antinuclears (ANA), els anti-Ro i anti-La. La determinació dels ANA, anti-Ro i anti-La s'ha fet mitjançant l'analítica rutinària practicada a tots els pacients. La detecció dels anticossos s'ha fet en el Laboratori de Referència de Catalunya. S'ha utilitzat la tècnica de la immunofluorescència indirecta per a la determinació dels ANA, i la de l'enzima immunoassaig (ELISA) pels anti-Ro i anti-La.

3.6. Criteris diagnòstics de la Síndrome de Sjögren

En el nostre estudi s'ha aplicat la classificació europea²¹, segons la qual s'accepta la presència d'una síndrome de Sjögren primària definida, quan es compleixen 4 dels 6 criteris (queda el criteri 6 limitat a la presència d'anticossos anti-Ro o anti-La) no presentant criteris d'exclusió.

Tots els pacients del nostre estudi presentaven una síndrome de Sjögren primària. Quan complien com a mínim 4 criteris, incloenthi una biòpsia amb grau III o IV, van ser catalogats com a SS primària definida. Quan presentaven només 3 criteris i una biòpsia amb grau II van ser catalogats com a SS primària probable.

3.7. Temps d'evolució clínica

El temps d'evolució clínica de la malaltia va ser estimat, des de l'aparició de la simptomatologia clínica apreciada pel propi pacient, fins al moment de la realització de la biòpsia labial. Hem considerat un punt arbitrari de tall els 12 mesos d'evolució de la simptomatologia clínica per comparar el patró d'expressió de citocines en les glàndules salivals menors de pacients amb menys i amb més de 12 mesos d'evolució clínica.

3.8. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

L'estudi de l'expressió de citocines s'ha dut a terme a la Unitat d'Immunologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol. S'ha analitzat la presència de la IL-2 i l'IFN- γ com a patró d'expressió Th1, la IL-12 i la IL-18 com a inductors d'aquest patró. La falta de detecció de la IL-4 és per descartar el patró Th2 de citocines i les altres citocines estudiades, la IL-10, TGF- β i el TNF- α , representen citocines proinflamatòries i reguladores.

L'expressió del RNAm de citocines és estudiada a partir de mostres completes de RNA, obtingudes de les biòpsies de glàndula salival menor dels pacients amb la síndrome de Sjögren primària, mitjançant la tècnica de la retrotranscripció i de la reacció en cadena de la polimerasa.

3.8.1. Obtenció d' RNA total

El protocol utilitzat per a l'extracció d'RNA total té com a base el mètode de Chomczynski²²⁰, però amb diverses modificacions.

Els pellets cel·lulars (10^6 - 10^7 cèl.lules) es van resuspendre amb solució 1:1 de solució desnaturalitzant de tiocianat de guanidina freda (Solució D: isotiocianat de guanidina 4M, acetat sòdic 50mM a pH=4, N-lauril sarcosina sòdica 0.5% i 4% de 2-mercaptoetanol 100mM) i fenol àcid saturat amb aigua a una relació 2ml de solució per 10^7 cèl.lules. Els pellets homogeneïtzats amb pipeta es deixa ven 5min en gel per tal que es dissociessin els complexos nucleoproteics i s'hi afegien 0.2vol de cloroform-

isoamilalcohol (49:1). Es van homogeneïtzar les cèl·lules per inversió (30'') i es van deixar 15min en gel. Tot seguit es centrifugaven (10000xg durant 30min a 4°C) i es recuperava la fase aquosa que es precipitava amb 1vol d'isopropanol durant 4h a -20°C. El pellet d'RNA s'obtenia per centrifugació a 10000xg a 4°C durant 30min. Un cop obtingut el pellet d'RNA es va rentar tres vegades amb etanol 75% fred, es va assecar i es va resuspendre amb 10-20µl de H₂O-DEPC (H₂O destil·lada tractada durant 20h amb dietilpirocarbonat 0.1% [Sigma Chemical Co., St Louis, USA] a 37°C i autoclavada).

La concentració i la puresa de les preparacions d'RNA es va determinar per espectrofotometria amb lectura a 260nm i la relació A_{260}/A_{280} (± 2) respectivament. La integritat de l'RNA es va comprovar en un gel d'agarosa on es visualitzava per tinció amb bromur d'etidi. Les mostres d'RNA es van conservar a -70°C.

3.8.2.- RT-PCR amb oligosondes específiques

3.8.2.1.Digestió amb DNAsa I

La digestió amb DNAsa I s'ha fet bàsicament per evitar interferències produïdes per DNA genòmic contaminant. Les mostres (10µg) es tractaven amb 40µl d'una solució de 10U DNAsa I (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), 20U RNAsin (inhibidor de la ribonucleasa), DDT 5mM final, tampó 1x (Tris-HCl 50mM, KCl 75mM, MgCl₂ 3mM pH=8.3 [de Life Technologies, Gaithersburg, USA]), 0.5µg/µl glucogen (Boehringer Mannheim, Mannheim,

Alemanya), durant 30 min a 37°C en un bany. Després del tractament es va quantificar i comprovar la integritat de l'RNA.

3.8.2.2. Retrotranscripció

La síntesi de l'DNA complementari (DNAc) de cadena simple es va fer a partir de mostres completes de RNA desnaturalitzat. Es va utilitzar oligo-dT i transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosi d'Avian (Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase: AMVRT).

Es va incubar 1µg de RNA total desnaturalitzat (durant 5min a 68°C) amb: oligo-d(T)₁₈ 0.5µg de RNA, 20U RNAsin, 1mM de cada dNTP, AMVRT (15U de RNA) i tampó 1x (10mM Tris-HCl pH8.8, 5mM MgCl₂, 50mM KCl, Tritó X-100 0.1% [de Promega, Madison, USA]) en un volum final de 20µl durant 1h a 42°C en bany d'aigua. Per aturar la reacció es va mantenir la mostra 3 min a 95°C i 3 min en gel.

3.8.2.3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Encebadors i oligosondes

Els encebadors per a les diferents citocines (taula 3.1) corresponen a les seqüències comercialitzades per Stratagene i Clontech (Palo Alto, USA). Els corresponents a GAPDH foren dissenyats pel Dr. O. Domínguez. Els oligonucleòtids van ésser sintetitzats per Pharmacia (Uppsala, Suècia). Cada parell d'encebadors estava dissenyat de manera que incloïa un intró, de manera que fos detectable l'amplificació d'DNA genòmic si era el cas.

Taula 3.1: Encebadors i oligosondes utilitzades per l'amplificació de les citocines en la reacció en cadena de polimerasa.

<u>Citocina</u>	<u>Seqüència (5'-3')</u>	<u>T^a hibridació</u>
<u>IL-2:</u>	5' 5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT-3'	
	3' 5'-GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC-5'	
	sonda 5'-TCTAGACACTGAAGATGTTTC-3'	53°C
<u>IFN-γ:</u>	5' 5'-ATGAAATATAACAAGTTATATCTTGGCTTT-3'	
	3' 5'-TTACTGGGATGCTCTTCGACCTCGAAACAGCAT-3'	
	sonda 5'-GCTCTGCATCGTTTTGGGTT-3'	49°C
<u>IL-4:</u>	5' 5'-ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT-3'	
	3' 5'-CGAACACTTTGAATATTTCTCTCTCAT-3'	
	sonda 5'-TCATGGTGGCTGTAGAACTGC-3'	63°C
<u>IL-10:</u>	5' 5'-AAGCTGAGAACCAAGACCCAGACATCAAGGCG-3'	
	3' 5'-AGCTATCCCAGAGCCCCAGATCCGATTTTGG-3'	
	sonda 5'-CATTCTTCACCTGCTCCACGG-3'	57°C
<u>IL-12:</u>	5' 5'-GCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGA-3'	
	3' 5'-TTAGGAAGCATTTCAGATAGCTCGTCA-3'	
	sonda 5'-GTCTTGAACCTCCACCTGGTAC-3'	42°C
<u>IL-18:</u>	5' 5'-GCTTCCTCTCGCAACAACTA-3'	
	3' 5'-GTCCTGGGACACTTCTCTGAA-3'	
	sonda 5'-GGCTGTAACCTATCTCTGTGAA-3'	47°C
<u>TNF-α:</u>	5' 5'-GACGTGGAGCTGGCCGAG-3'	
	3' 5'-CACCAGCTGGTTATCTCTCAGCTC-3'	
	sonda 5'-AGCCTCTTCTCCTTCCTGATCGTG-3'	53°C
<u>TGF-β:</u>	5' 5'-GCCCTGGACACCAACTATTGCT-3'	
	3' 5'-AGGCTCCAAATGTAGGGGCAGG-3'	
	sonda 5'-AGTCAATGTACAGCTGCCGCA-3'	55°C
<u>GAPDH:</u>	5' 5'-CTTCTTTTGCCTCGCCAG-3'	
	3' 5'-AGCCCCAGCCTTCTCCA-3'	

Protocol de procediment de la reacció en cadena de polimerasa

Les reaccions en cadena de polimerasa (PCR) consistien en la incubació de 1µl de DNAC amb una solució que incloïa: 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5mM, WT-1 0.05%, tampó 1x (Tris-HCl [ph=9] 10mM, KCl 50mM, Tritó X-100 0.1%), 1mM de cadascun dels encebadors específics i 1.25U de Taq polimerasa en un volum final de 15-20µl segons el tipus d'amplímer, volum al qual s'afegien 30µl d'oli mineral per evitar l'evaporació. L'amplificació es feia en un termociclador Perkin-Elmer Cetus 480 (Emerville, USA). Com a control negatiu sempre s'incloïa un tub amb tots els reactius excepte el DNAC.

Cada mostra estudiada va ser incubada durant 5 minuts a 95°C, 5 minuts a 60°C seguit de número (n) cicles, habitualment 40, cadascun de 90 segons a 72°C, 45 segons a 95°C i 45 segons a 60°C. Al final dels cicles s'aplicava un període d'extensió de 10 minuts a 72°C en el termociclador. El nombre de cicles de cada PCR depenia, en cada cas, del llindar de succesibilitat de cada sonda específica per cada citocina, que en el nostre estudi va ser de 40 en tots els casos. La potència del DNAC de cada sonda es va ajustar a priori segons la quantitat del contingut del gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenase (GAPDH) en l'RNAm (expressió constitutiva).

Hem utilitzat línies cèl.lulars CD4 i CD8 (Th1 i Th2) ben definides com a controls positius de la IL-2, INF-γ, IL-4, IL-10, TNF-α, TGF-β. Com a

controls positius per IL-12 i IL-18 hem utilitzat monòcits de línies cel.lulars THP1 i una línia cel.lular B transformada via Virus d'Epstein Barr (EBV).

3.8.3. Normalització del DNAC

La normalització de les quantitats de DNAC es van fer segons l'expressió del gen constitutiu GAPDH per poder comparar els resultats de l'amplificació entres les diferents mostres. Es van fer dilucions seriades de cada mostra de DNAC i 2 μ l de cadascuna es van amplificar amb primers específics per a GAPDH a 22 cicles (la reacció d'amplificació és a la fase exponencial). Es va escollir per a cada mostra aquella dilució de DNAC que donava una intensitat de banda semblant a les altres en un gel d'agarosa tenyit amb bromur d'etidi.

3.8.4. Electroforesi i transferència

10-15 μ l del producte de PCR, al qual s'afegia 1 μ l de tampó de blau de bromofenol 10x (10% Ficoll, 0.5% blau de bromofenol i 5M EDTA), s'analitzava en un gel d'agarosa al 2% en tampó TAE1x (Tris, àcid acètic glacial, EDTA) tenyit amb bromur d'etidi (0.4 μ g/ml). Es visualitzava en un transil.luminador de llum ultraviolada.

Les mostres de PCR es van transferir per capil.laritat a una membrana de niló Hybond-N+ (Amersham, Buckinghamshire, UK) durant 16h amb la utilització d'un tampó de transferència: 20xSSC per a la transferència d'amplímers de les citocines, perquè augmentava la retenció a membrana. Posteriorment es va desnaturalitzar durant 5 min la membrana

amb una solució de 1.5M NaCl, 0.5N NaOH i després es va neutralitzar amb una solució de 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH 7.2) i 1mM EDTA a un pH 7.

Després de la transferència es va fixar el DNA a la membrana per irradiació amb llum ultraviolada (Stratalinker, Stratagene, San Diego, USA).

3.8.5. Hibridació

Marcatge de les oligosondes:

Les oligosondes es van marcar durant 1h a 37°C en un bany sec amb (γ -P³²) dATP (Amersham) i amb la utilització de l'enzim polinucleòtid quinasa T4 (T4PNK, New England Biolabs, Beverly, USA). La solució de marcatge incloïa: 20 pmols d'oligosonda, tampó (70mM Tris -HCl pH 7.6, 10mM MgCl₂, 5mM DTT), 15U de T4PNK i 20 μ Ci de (γ -P³²) dATP.

Després del marcatge es va eliminar el nucleòtid radioactiu no incorporat amb columnes MicroSpinTM (Pharmacia, Uppsala, Suècia) i es va quantificar la radioactivitat incorporada amb un comptador beta Betamatic IV (Kontrom).

Prehibridació, hibridació i rentats:

Prehibridació: Es va equilibrar la membrana 2 min amb 2xSSC i tot seguit es va posar en contacte amb la solució de prehibridació (SSC2x, Denhardt's 5x, SDS 1% i ssDNA [8.5ml de DNA d'esperma de salmó 1%], 1.5ml HCL 9.5M deixat 5 min a T^a ambient i afegir 3.5ml NaOH 4M). La

membrana es va prehibridar durant 1h amb rotació contínua a la temperatura d'hibridació $T_m-10^{\circ}\text{C}$) per a cada citocina.

Hibridació: Es va afegir a la solució de prehibridació la sonda radioactiva (10^6cpm/ml de solució) i es va mantenir durant 4h a la temperatura d'hibridació en rotació contínua.

Rentats: per a eliminar la sonda no incorporada es va fer un rentat de 20 min amb $2\times\text{SSC}/1\%\text{SDS}$ a T^a amb i un rentat final de 20 min a la T^a d'hibridació amb $2\times\text{SSC}/1\%\text{SDS}$.

Quantificació: per exposició de la membrana a una pel·lícula radiogràfica Cronex Xray film (DuPont) a -70° .

3.8.6. Densitometria

Els criteris utilitzats per classificar una mostra positiva o negativa per a l'expressió de citocina es basaven en els resultats de la hibridació. L'anàlisi densitomètric es va fer directament en un Phosphorimager (Personal Molecular Image, BioRad) i el programa Quantity One.

3.9. Metodologia estadística

L'anàlisi estadística s'ha realitzat a la Unitat d'Estadística de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) de Barcelona. Les variables qualitatives van ser analitzades mitjançant el χ^2 (chi-quadrat) o test exacte

de Fisher. Les variables quantitatives es van calcular amb la utilització del t -test de Student o el U test de Mann-Whitney.

Una $P \leq 0.05$ es considera amb significat estadístic.

4.- RESULTATS

Hem analitzat un total de 42 biòpsies de glàndula salival menor de pacients amb la síndrome Sjögren primària (SSp). Dels 42 pacients 39 eren dones i 3 homes, amb una mitjana d'edat de 58.76 anys (\pm 13.13). D'entre aquestes 42, 30 presentaven una SSp definida i 12 una SSp probable. De les 42 mostres estudiades, 11 van ser classificades, d'acord amb la classificació histològica de Chisholm¹⁶⁰, com a grau II, 11 com a grau III i 17 com a grau IV. Les tres mostres restants presentaven un predomini de teixit fibrós. La mitjana de temps d'evolució de la simptomatologia clínica del grup de pacients amb la SSp definida va ser de 58.13 (rang 0-240) mesos i el del grup de pacients amb la SSp probable de 44.75 (rang 3-180) mesos. De tots els pacients analitzats, n'hi havia nou amb \leq 12 mesos d'evolució clínica en el moment de la biòpsia, dels quals 4 presentaven en el teixit biopsiat un grau II, 1 un grau III, 3 un grau IV i 1 un predomini de teixit fibrós. Els 33 pacients restants tenien $>$ 12 mesos d'evolució clínica, 7 dels quals mostraven en el teixit de la biòpsia un grau II, 10 un grau III, 14 un grau IV i 2 un predomini de teixit fibrós.

Totes les biòpsies demostraven un infiltrat cel.lular de predomini mononuclear, fins i tot aquelles amb teixit fibrós. Vam trobar entre un 10 i 20% de cèl.lules B (CD 20⁺) i cap mostra presentava un centre germinal. Entre les cèl.lules CD3⁺, predominaven les cèl.lules CD4⁺ i la freqüència de cèl.lules CD8⁺ variava entre un 1 i 20%.

4.1.Expressió de l' RNAm de citocines

a. En el total de mostres analitzades

L'expressió de citocines en la totalitat de les mostres analitzades va demostrar una expressió de la IL-2 en 28 dels 40 pacients testats (70%), l'IFN- γ en 13 de 40 (32.5%), la IL-4 en cap dels 41 pacients, la IL-10 en 37 de 40 (92.5%), el TNF- α en 31 de 39 (79.5%), el TGF- β en 39 de 39 (100%), la IL-18 en 33 de 40 (82.5%) i la IL-12 en 31 de 40 (77.5%). Hi havia una coexpressió de la IL-2 i de l'IFN- γ en 12 de 40 pacients (30%). La majoria de mostres demostraven un patró Th1 de citocines, demostrable amb la presència de la IL-2 i IFN- γ , que coincidia amb una àmplia expressió dels inductors del patró Th1 (IL-12 i IL-18) i amb l'absència de la IL-4, principal citocina del patró Th2 (Taula 4.1).

Taula 4.1: Expressió de citocines en pacients amb la Síndrome de Sjögren primària

Citocina (n)	SSp
IL-2 (40)	*70.0 (28/40)
IFN-g (40)	32.5 (13/40)
IL-4 (41)	0 (0 /41)
IL-10 (40)	92.5 (37/40)
TNF-a (39)	79.5 (31/39)
TGF-b (39)	100 (39/39)
IL-18 (40)	82.5 (33/40)
IL-12 (40)	77.5 (31/40)
IL-2+IFN-g (40)	30.0 (12/40)

* Els resultats són expressats com a percentatge de mostres positives, amb la fracció de positivitat/nombre total de mostres analitzades en parèntesis.

b. En pacients amb la síndrome de Sjögren primària definida:

L'expressió de citocines en el grup de la SSp definida va demostrar l'expressió de la IL-2 en 22 de 28 pacients testats (78.6%), l'IFN- γ en 10 de 28 (35.7%), la IL-4 en cap dels 29 pacients, la IL-10 en 27 de 28 (96.4%), el TNF- α en 21 de 27 (77.8%), el TGF- β en 27 de 27 (100%), la IL-18 en 23 de 28 (82.1%) i la IL-12 en 23 de 28 (82.1%). Hi havia una coexpressió de la IL-2 amb l'IFN- γ en 9 de 28 pacients (32.1%) (Taula 4.2).

c. En pacients amb la síndrome de Sjögren primària probable:

L'expressió de citocines del grup amb la SSp probable detecta la IL-2 en 6 de 12 pacients testats (50%), l'IFN- γ en 3 de 12 (25%), la IL-4 en cap dels 12 pacients, la IL-10 en 10 de 12 (83.3%), el TNF- α en 10 de 12 (83.3%), el TGF- β en 12 de 12 (100%), la IL-18 en 10 de 12 (83.3%) i la IL-12 en 8 de 12 (66.7%). Hi havia una coexpressió de la IL-2 amb l'IFN- γ en 3 de 12 pacients (25%) (Taula 4.2).

4.2. Comparació de l'expressió de citocines entre pacients amb la síndrome de Sjögren primària definida i probable

No hi ha diferència significativa entre els dos grups de pacients estudiats. Les citocines relacionades amb el patró Th1 (IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-18, TNF- α) van ser expressades en gran part de les mostres estudiades, en

canvi la IL-4 (patró Th2) no va ser detectada en cap biòpsia. Altres citocines amb activitat reguladora (TGF- β , IL-10) són àmpliament en les biòpsies dels dos grups de pacients. La IL-2 es detecta amb més freqüència que l'IFN- γ , encara que la majoria de productors de IFN- γ també presenten, a la vegada, una expressió de la IL-2 (Taula 4.2).

Taula 4.2: Expressió del RNAm de citocines en pacients amb síndrome de Sjögren primària definida i probable

Citocina (n)	SSpd	SSpp	p
IL-2 (40)	*78.6 (22/28)	50.0 (6/12)	0.130
IFN-g (40)	35.7 (10/28)	25.0 (3/12)	0.716
IL-4 (41)	0	0	
IL-10 (40)	96.4 (27/28)	83.3 (10/12)	0.209
TNF-a (39)	77.8 (21/27)	83.3 (10/12)	1.0
TGF-b (39)	100 (27/27)	100 (12/12)	1.0
IL-18 (40)	82.1 (23/28)	83.3 (10/12)	1.0
IL-12 (40)	82.1 (23/28)	66.7 (8/12)	0.411
IL-2+IFN-g (40)	32.1 (9/28)	25.0 (3/12)	0.725

* Els resultats són expressats com a percentatge de mostres positives, amb la fracció de positivitat/nombre total de mostres analitzades en parèntesis.

(SSpd = síndrome de Sjögren primària definida. SSpp = síndrome de Sjögren primària probable. p = probabilitat).

4.3. Expressió de citocines segons el grau d'afectació histològica:

Descrivim l'expressió de l'RNAm de citocines en la glàndula salival menor en el conjunt de pacients amb la SSp, tan definida com probable, en relació amb el grau d'afectació histològica.

a. grau II:

La IL-2 va ser expressada en 5 d'11 pacients testats (45.5%), l'IFN- γ en 2 d'11 (18.2%), l'IL-4 en cap dels 11 pacients, l'IL-10 en 9 d'11 (81.8%), el TNF- α en 9 d'11 (81.8%), el TGF- β en 11 d'11 (100%), la IL-18 en 9 d'11 (81.8%) i la IL-12 en 7 d'11 (63.6%). Hi havia una coexpressió d'IL-2 amb IFN- γ en 2 dels 11 pacients (18.2%).

b. grau III

La IL-2 es detecta 8 de 10 pacients testats (80%), l'IFN- γ en 4 de 10 (40%), la IL-4 en cap dels 11 pacients, la IL-10 en 10 de 10 (100%), el TNF- α en 7 de 9 (77.8%), el TGF- β en 9 de 9 (100%), la IL-18 en 7 de 10 (70%) i la IL-12 en 7 de 10 (70%). Hi havia una coexpressió de IL-2 amb IFN- γ en 3 de 10 pacients (30%).

c. grau IV

En aquest grup, la IL-2 va ser expressada en 12 de 16 pacients testats (75%), l'IFN- γ en 6 de 16 (37.5%), la IL-4 en cap dels 16 pacients, la IL-10 en 15 de 16 (93.8%), el TNF- α en 12 de 16 (75%), el TGF- β en 16 de 16 (100%), la IL-18 en 15 de 16 (93.8%) i la IL-12 en 15 de 16 (93.8%). Hi havia una coexpressió de IL-2 amb IFN- γ en 6 de 16 pacients (37.5%).

d. teixit fibrós:

La IL-2 estava present en 3 de 3 pacients testats (100%), l'IFN- γ en 1 de 3 (33.3%), la IL-4 en cap dels 3 pacients, la IL-10 en 3 de 3 (100%), el

TNF- α en 3 de 3 (100%), el TGF- β en 3 de 3 (100%), la IL-18 en 2 de 3 (66.7%) i la IL-12 en 2 de 3 (66.75%). Hi havia una coexpressió de IL-2 amb IFN- γ en 1 de 3 pacients (33.3%).

No es va trobar cap diferència significativa estadísticament entre els diferents graus d'afectació histològica de les mostres analitzades ni en relació amb les mostres amb un predomini de teixit fibrós. Únicament cal destacar un increment linial, però sense significat estadístic, en la coexpressió de la IL-2 i de l'IFN- γ , que podia estar en relació amb un increment en la presència del patró Th1, a major grau d'afectació histològica (Taula 4.3).

Taula 4.3: Expressió de l'RNAm de citocines en la glàndula salival menor en el conjunt de pacients amb la síndrome de Sjögren primària, tant definida com probable, en relació amb el grau d'afectació histològica.

Citocina (n)	II	III	IV	Fibr
IL-2 (40)	*45.5 (5/11)	80.0 (8/10)	75.0 (12/16)	100 (3/3)
IFN-g (40)	18.2 (2/11)	40.0 (4/10)	37.5 (6/16)	33.3 (1/3)
IL-4 (41)	0 (0/11)	0 (0/11)	0 (0/16)	0 (0/3)
IL-10 (40)	81.8 (9/11)	100 (10/10)	93.8 (15/16)	100 (3/3)
TNF-a (39)	81.8 (9/11)	77.8 (7/9)	75.0 (12/16)	100 (3/3)
TGF-b (39)	100 (11/11)	100 (9/9)	100 (16/16)	100 (3/3)
IL-18 (40)	81.8 (9/11)	70.0 (7/10)	93.8 (15/16)	66.7 (2/3)
IL-12 (40)	63.6 (7/11)	70.0 (7/10)	93.8 (15/16)	66.7 (2/3)
IL-2+IFN-g (40)	18.2 (2/11)	30.0 (3/10)	37.5 (6/16)	33.3 (3/3)

* Els resultats són expressats com a percentatge de mostres positives, amb la fracció de positivitat/nombre total de mostres analitzades en parèntesis.

II = infiltració limfocitària difusa; III = un focus limfocitari ; IV = dos o més focus limfocitari; fibr = teixit fibrós.

4.4. Expressió de citocines en relació amb la formació o no de focus:

Analitzem l'expressió de citocines en les biòpsies de glàndula salival menor segons la formació o no de focus. De les 42 mostres, 14 no formaven cap focus, 11 d'ells quals tenien un infiltrat limfocitari difus i tres un predomini de teixit fibrós amb escassa presència de limfòcits, tots ells sense formació de focus; les altres 28 mostres presentaven ≥ 1 focus d'infiltrat limfocitari.

a. Mostres sense formació de focus

L'anàlisi de la IL-2 va ser positiva en 8 de 14 mostres testades (57.1%), l'IFN- γ en 3 de 14 (21.4%), la IL-4 en cap dels 14 pacients, la IL-10 en 12 de 14 (85.7%), el TNF- α en 12 de 14 (85.7%), el TGF- β en 14 de 14 (100%), la IL-18 en 11 de 14 (78.6%) i la IL-12 en 9 de 14 (64.3%). Hi havia una coexpressió d' IL-2 amb IFN- γ en 3 de 14 pacients (21.4%).

b. Mostres amb un o més focus

L'expressió de la IL-2 es demostra en 20 de 26 biòpsies testades (76.9%), l'IFN- γ en 10 de 26 (38.5%), la IL-4 en cap dels 27 pacients testats, la IL-10 en 25 de 26 (96.2%), el TNF- α en 19 de 25 (76%), el TGF- β en 25 de 25 (100%), la IL-18 en 22 de 26 (84.6%) i la IL-12 en 22 de 26 (84.6%). Hi havia una coexpressió de IL-2 amb IFN- γ en 9 de 26 pacients (34.6%).

c. Comparació entre 0 focus i ≥ 1 focus

No es va trobar cap diferència estadística significativa en l'expressió de les citocines, ni en el patró de predominància Th1 en comparar l'expressió de citocina en relació amb la formació o no de focus d'infiltració limfocitària. Es demostra només una tendència no significativa en l'expressió de citocines Th1 i dels seus inductors (IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18) en les mostres amb formació de focus (Taula 4.4).

Taula 4.4: Expressió de citocines en la glàndula salivar menor de pacients amb la síndrome de Sjögren primària en relació amb la formació o no de focus.

Citocina (n)	Focus 0	Focus ≥ 1	p
IL-2 (40)	*57.1 (8/14)	76.9 (20/26)	0.281
IFN-g (40)	21.4 (3/14)	38.5 (10/26)	0.316
IL-4 (41)	0 (0/14)	0 (0/27)	
IL-10 (40)	85.7 (12/14)	96.2 (25/26)	0.276
TNF-a (39)	85.7 (12/14)	76.0 (19/25)	0.686
TGF-b (39)	100 (14/14)	100 (25/25)	1.0
IL-18 (40)	78.6 (11/14)	84.6 (22/26)	0.679
IL-12 (40)	64.3 (9/14)	84.6 (22/26)	0.234
IL-2+IFN-g (40)	21.4 (3/14)	34.6 (9/26)	0.484

* Els resultats són expressats com a percentatge de mostres positives, amb la fracció de positivitat/nombre total de mostres analitzades en parèntesis.

p = probabilitat.

4.5. Expressió de citocines segons el temps d'evolució dels símptomes clínics:

Hem analitzat i comparat l'expressió de citocines en les biòpsies de glàndula salival menor de pacients amb la SSp segons els temps d'evolució clínica. El temps d'evolució clínica va ser estimat des de l'inici de la simptomatologia apreciada pel pacient fins al moment de la realització de la biòpsia. Hem agafat un punt de tall arbitrari de 12 mesos d'evolució clínica. Dels 42 pacients estudiats, 9 pertanyen al grup amb ≤ 12 mesos d'evolució i 33 amb > 12 mesos.

a. Pacients amb ≤ 12 mesos d'evolució

En 3 de 9 pacients testats (33.3%) es detecta la IL-2 i l'IFN- γ , però la IL-4 en cap dels 9 pacients, la IL-10 en 7 de 9 (77.8%), el TNF- α en 5 de 9 (55.6%), el TGF- β en totes les mostres (100%), la IL-18 en 8 de 9 (88.9%) i la IL-12 en 6 de 9 (66.7%). Hi havia una coexpressió de IL-2 amb IFN- γ en cap dels 9 pacients.

b. Pacients amb més de 12 mesos d'evolució clínica

La IL-2 va ser expressada en 25 de 31 pacients testats (80.6%), l'IFN- γ en 13 de 31 (41.9%), la IL-4 en cap dels 32 pacients, la IL-10 en 30 de 31 (96.8%), el TNF- α en 26 de 30 (86.7%), el TGF- β en totes les mostres (100%), la IL-18 en 25 de 31 (80.6%) i la IL-12 en 25 de 31 (80.65%). Hi havia una coexpressió de IL-2 amb IFN- γ en 12 de 31 pacients (38.7%).

c. Comparació de l'expressió de citocines entre els grups de pacients amb ≤ 12 mesos i de > 12 mesos d'evolució de la simptomatologia clínica

Utilitzant un punt de tall arbitrari de 12 mesos, demostrem un increment estadísticament significatiu en l'expressió de la IL-2 i de l'IFN- γ en les mostres amb més temps d'evolució clínica. La IL-2 va ser expressada en el 33.3% (3/9) de mostres de ≤ 12 mesos, comparat amb el 80.6% (25/31) de pacients amb > 12 mesos d'evolució clínica ($p=0.012$). En cap mostra (0/9) del primer grup es detectava IFN- γ , comparat amb el 41.9% (13/31) del segon grup ($p=0.019$). Aquesta diferència es manté en valorar la coexpressió de la IL-2 i de l'IFN- γ ; 0/9 mostres expressaven conjuntament la IL-2 i de l'IFN- γ en el primer grup, comparat amb el 38.7% (12/31) del segon grup ($p=0.037$).

Les dues citocines inductores del patró Th1 (IL-12, IL-18) es detecten amb una gran expressió en tots dos grups de mostres estudiades. Hi havia una expressió concomitant de la IL-12 i de la IL-18 en 29/40 mostres, i en cinc mostres no s'expressava cap de les dues citocines. Només sis mostres demostraven una discordància en aquesta expressió (Taula 4.5).

Taula 4.5: Expressió de l'RNAm de citocines en la glàndula salival menor de pacients amb la síndrome de Sjögren primària en relació al temps d'evolució de la simptomatologia clínica

Citocina (n)	≤ 12 m	> 12 m	p
IL-2 (40)	*33.3 (3/9)	80.6 (25/31)	0.012
IFN-g (40)	0 (0/9)	41.9 (13/31)	0.019
IL-4 (41)	0 (0/9)	0 (0/32)	
IL-10 (40)	77.8 (7/9)	96.8 (30/31)	0.121
TNF-a (39)	55.6 (5/9)	86.7 (26/30)	0.065
TGF-b (39)	100 (9/9)	100 (30/30)	
IL-18 (40)	88.9 (8/9)	80.6 (25/31)	1.0
IL-12 (40)	66.7 (6/9)	80.6 (25/31)	0.394
IL-2+IFN-g (40)	0 (0/9)	38.7 (12/31)	0.037

* Els resultats són expressats com a percentatge de mostres positives, amb la fracció de positivitat/nombre total de mostres analitzades en parèntesis.

p = probabilitat. m = mesos.

5. DISCUSSIÓ

En aquesta tesi doctoral es compara l'expressió de l'RNAm d'una sèrie de citocines en la glàndula salival menor de 42 pacients amb la Síndrome de Sjögren primària (SSp) definida i probable. Posteriorment s'analitza aquesta expressió en relació amb el grau d'afectació histològica, infiltració limfocitària i en relació amb el temps d'evolució clínica des de l'inici de la simptomatologia clínica fins al moment de la biòpsia. Hem analitzat el tipus d'expressió de citocines en la glàndula salival menor dels pacients amb la SSp per confirmar la predominància d'un patró Th1 de citocines.

Els nostres resultats demostren que no hi ha diferència en l'expressió de citocines entre els pacients amb la SSp definida i la SSp probable. Així mateix, ni el grau d'afectació histològica, ni el grau d'infiltració limfocitària fa variar aquesta expressió de l'RNAm de citocines a nivell de la glàndula salival menor en la SSp. Confirmem una predominància a favor del patró Th1 de l'expressió de citocines en la SSp, patró més evident en el grup de pacients amb més temps d'evolució clínica.

L'esquema de la discussió es basa en una anàlisi dels resultats de cada citocina, agrupat d'acord amb el patró Th1/Th2 i de les citocines proinflamàtores en relació amb la SSp definida i probable, al grau d'afectació histològica i al temps d'evolució clínica.

5.1. Patró Th1: IFN- γ i IL-2

- **Interferó gamma (IFN- γ)**

L'IFN constitueix una família multigènica amb diferents tipus d'IFN: IFN- α , IFN- β i IFN- γ . Actuen sobre receptors cel·lulars modulant la resposta gènica²²¹. L'IFN- α i IFN- β són produïts per la majoria de cèl·lules en resposta a una infecció viral o per estimulació d'una doble cadena d'RNA natural o sintètica. Tenen gran activitat antiviral, però, a altes concentracions, el seu efecte és antiproliferatiu davant de cèl·lules normals i tumorals. Augmenten l'expressió del complex major d'histocompatibilitat (CMH) I i l'activitat de les cèl·lules natural killer (NK)²²². En canvi l'IFN- γ és un potent immunoregulator, segregat per limfòcits T i B, i per cèl·lules NK²²³ en resposta a una estimulació antigènica o mitògena. A més a més en la transcripció gènica de l'IFN- γ actuen de forma sinèrgica la IL-12 i la IL-18²²⁴. El gen que codifica per l'IFN- γ es troba en el cromosoma 12. Entre les accions de l'IFN- γ destaquen l'activació de macròfags, l'augment de l'expressió del CMH I i II, la producció de novo del CMH II i la realització d'una funció de contraregulació del patró Th2 limfocitari²²³.

En l'anàlisi de les nostres mostres trobem una expressió positiva per l'IFN- γ en una part de les biòpsies analitzades, sense detectar diferències entre la SSp definida i probable. Aquesta expressió tampoc és influenciada pel grau d'afectació histològic ni per la infiltració limfocitària.

En canvi hi ha una major expressió, amb significat estadístic, en les mostres obtingudes de pacients amb la SSp amb més temps d'evolució

clínica. L'IFN- γ és una citocina d'expressió Th1, present en una part de les mostres dels pacients amb la SSp, que contribueix en la confirmació de la presència del patró Th1 en la SSp, més evident a més temps d'evolució clínica.

- **IL-2**

La IL-2 és una glicoproteïna codificada per un únic gen situat en el cromosoma 4. És produïda per limfòcits T activats, sobretot CD4⁺, i es activador dels limfòcits T, cèl.lules NK i macròfags²²³. La IL-2 és una citocina del patró Th1 d'expressió citocínica. Interactua amb receptors de la IL-2 (IL-2R) de superfície i indueix a una activació, diferenciació i creixement de línies hematopoiètiques²²⁵ diferents. L'infiltrat limfocitari i les cèl.lules epitelials de les glàndules salivars menors de pacients amb la SS expressen l'IL-2R²²⁶.

La majoria de les mostres analitzades dels nostres pacients amb la SSp expressaven l'RNAm de la IL-2, sense diferències estadístiques entre la SSp definida i probable, independentment del grau d'afectació histològic i de la formació o no de focus. En canvi hi ha una major expressió, amb significat estadístic, en les mostres obtingudes de pacients amb més temps d'evolució clínica. La IL-2, citocina del patró Th1, confirma amb la seva positivitat aquest patró en la SSp.

- **IFN- γ i IL-2**

Les cèl·lules Th1 produeixen IFN- γ i IL-2, que són mediadors de la hipersensibilitat retardada i tenen capacitat de coestimular cèl·lules B, induïnt la producció d'Ig, sobretot IgG1 i IgG3. El reconeixement dels limfòcits Th1 només es pot realitzar mitjançant la identificació de les citocines, que són la IL-2 i l'IFN- γ . La IL-2 és produïda per limfòcits Th1 i és activador dels limfòcits T, cèl·lules NK i macrofags. L'IFN- γ pot ser segregat per limfòcits T i B, com també per cèl·lules NK, i activa els macròfags, augmenta l'expressió del CMH I i II, i realitza una funció de contraregulació del patró Th2²²³. Aquestes dues citocines intervenen també en la diferenciació de limfòcits T CD8⁺ cap a cèl·lules citotòxiques actives²²⁷. L'activació proinflamatòria de les cèl·lules Th1, a través de les citocines com a mediadors, indueix al desenvolupament de l'agressió tisular en les malalties autoimmunes òrgan específiques^{228,229}.

Hi ha una expressió de l' RNAm de l'IFN- γ i, en major grau, de la IL-2 en les glàndules salivals menors dels nostres pacients amb la SSp. Aquest és el patró Th1 d'expressió de citocines en les glàndules salivals menors de pacients amb la SSp, més evident en les mostres de pacients amb més temps d'evolució clínica. L'augment d'expressió del patró Th1 en les mostres amb més temps d'evolució clínica confirma un major grau de polarització Th1/Th2 trobada en la cronicitat de la resposta immunològica²³⁰ també en la SS.

5.2. Inductors del patró Th1: Interleucina 18 (IL-18) i Interleucina 12 (IL-12)

La IL-18 s'expressa en una varietat de cèl·lules entre les quals es troben les cèl·lules de Kupffer, macròfags, cèl·lules T i B, osteoblastes, queratinocits, cèl·lules dendrítiques, astrocits i microglia. En canvi la IL-12 és segregada per cèl·lules presentadores d'antigen activades, com són les cèl·lules dendrítiques, macròfags i cèl·lules de Langerhans²³¹. La IL-18 comparteix propietats biològiques amb la IL-12, com és l'estimulació de la producció d'IFN- γ , la intensificació de la citotoxicitat de les cèl·lules NK i la inducció a la diferenciació del patró Th1. A pesar de la similitud funcional, la IL-18 no té relació estructural amb la IL-12²³². Les cèl·lules T i NK són estimulades per produir IFN- γ per acció de la IL-18, en col·laboració amb la IL-12. Encara que la IL-18 per si sola no és capaç d'induir la producció d'IFN- γ a partir de cèl·lules T naïve, ja que no expressen el receptor de la IL-18 (IL-18R), hi ha un gran sinergisme entre la IL-18 i la IL-12 en la inducció a la producció d'IFN- γ . Aquest sinergisme es basa en la potenciació de l'expressió de receptors de la IL-18 en la superfície de les cèl·lules T naïve per acció de la IL-12^{233,234} i en l'estimulació de l'expressió de receptors de la IL-12 per acció de la IL-18²³⁵. Com a conseqüència de l'acció de la IL-12 i IL-18 hi ha una up-regulació recíproca dels seus receptors²³⁶. La IL-12 i la IL-18 probablement també actuen de forma sinèrgica a nivell de la transcripció del gen de l'IFN- γ ²²⁴. L'acció combinada de factors de transcripció diferents, activats de forma sinèrgica per la IL-12 i la IL-18, activen els promotors de l'IFN- γ . Ratolins amb el doble dèficit de IL-12 i IL-18 (double-knockout mice) sofreixen d'un major defecte de la resposta Th1 en comparació amb ratolins

amb un sol dèficit (single-knockout mice)²³⁷. Això demostra la importància de la IL-12 i de la IL-18 en la resposta Th1.

El nostre estudi demostra l'expressió, tant de la IL-12 com de la IL-18, en la glàndula salival menor de pacients amb la SS primària, independentment de si es tractava d'un SSp definit o probable. Tampoc el grau d'afectació histològica influenciava, ni el temps d'evolució clínica canviava el grau d'expressió d'aquestes dues citocines. Quasi totes les nostres mostres analitzades expressaven la IL-12 i la IL-18. Aquests resultats confirmen l'actuació dels inductors del patró Th1 en la glàndula salival menor de pacients amb la SS primària i demostren així la seva presència en la SSp.

5.3. Patró Th2: Interleucina 4 (IL-4)

La IL-4 és segregada principalment per cèl.lules T CD4⁺, mastòcits i basòfils. Actua sobre receptors de membrana de cèl.lules T CD4⁺, CD8⁺, mastòcits i cèl.lules B²²⁷. La IL-4 és necessària per la diferenciació de les cèl.lules Th naive en el subtipus Th2. Múltiples estudis han demostrat *in vitro* que l'addició d'IL-4 a cultius de cèl.lules T naive CD4⁺ indueix a l'expressió del gen de la IL-4 i d'altres gens de citocines específiques relacionades amb els limfòcits Th2^{238,239}. A part d'una regulació positiva, hi ha elements descrits en la regulació negativa del gen de la IL-4. Hi ha probablement un element Th1 específic en la regió 3' no transcrita del gen de la IL-4 que té activitat repressora per a la producció d'IL-4 en cèl.lules Th1, però no en

cèl.lules Th2²⁴⁰. Aquest estudi proposa l'activació de l'inhibidor del gen de la IL-4 en les cèl.lules amb activitat Th1.

En concordància amb aquests supòsits, no hem trobat expressió de l'RNAm de la IL-4 en cap mostra estudiada, independentment del grau d'afectació histològica, de la infiltració limfocitària, ni en relació amb el temps d'evolució clínica. Aquesta absència de l'RNAm d'IL-4 va ser absoluta i confirmada amb controls positius i amb la utilització de clons de cèl.lules Th2 que expressen la IL-4²⁴¹. Així no hi ha expressió de la IL-4 en les nostres mostres de glàndula salival menor de pacients amb la SSp. Ja que la IL-4 és el principal representant de cèl.lules Th2, podem afirmar una predominància del patró Th1 en demostrar també l'absència de la IL-4.

5.4.Citocines proinflamatòries

Interleucina 10 (IL-10), Transforming Growth Factor β (TGF- β) i Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α)

- **IL-10**

La IL-10 es relaciona amb la immunopatogènesi d'una sèrie de malalties, entre les quals s'inclouen el xoc sèptic, la SIDA, processos limfoproliferatius i malalties autoimmunes^{242,243}. S'ha demostrat que la IL-10 produeix una falta o disminució de la resposta immune, tant *in vitro* com *in vivo*^{244,245}. La immunosupressió que produeix la IL-10 s'atribueix, en part, a la seva capacitat d'inhibir la síntesi de citocines com la IL-2, la IL-12 i l'INF- γ ^{242,246,247}. La IL-10, considerada inicialment com a citocina Th2, és produïda en humans també per cèl.lules B, monòcits i cèl.lules Th1. Per tant,

avui en dia està demostrat que no és una citocina únicament derivada de cèl.lules T²⁴⁸.

Quasi totes les mostres analitzades en aquest estudi eren positives per l'expressió de l'RNAm de la IL-10, independentment del grau d'afectació histològica, de la formació o no de focus, ni variava en relació amb el temps d'evolució clínica de la malaltia. Les sondes utilitzades en aquest estudi per la detecció de l'expressió de la IL-10 tenien menys d'un 50% d'homologia amb qualsevol gen del virus d'Epstein Barr (VEB). Així podem afirmar que la positivitat en les nostres mostres per la IL-10 no corresponia a una homologia amb el gen BRCF1 del VEB, com suggeria Boumba *et al*¹⁵ prèviament. La IL-10 va ser definida inicialment com a citocina Th2, però posteriorment s'ha demostrat que també és produïda per macròfags²⁴⁹, limfòcits B²⁵⁰, queratinocits²⁵¹, en la placenta²⁵² i probablement en altres texits o fins i tot per limfòcits Th1, a part dels Th2. Llorente *et al*²⁵³ va demostrar que els limfòcits B i els monòcits poden expressar la IL-10 en la síndrome de Sjögren, artritis reumatoide i lupus eritematos sistèmic. Probablement, en pacients amb la SS primària, l'expressió de la IL-10 a nivell de la glàndula salival menor reflecteix una contraregulació o down-regulació de la predominància dels limfòcits Th1, més que una expressió d'un patró de limfòcits Th2. Així, podem afirmar que no és una contradicció de trobar una alta expressió d'IL-10 en les mostres analitzades i, probablement, aquesta expressió d'IL-10 en la SSp és un exemple de la complexitat de regulació de les respostes immunològiques *in vivo*, demostrant la interrelació dels diferents patrons immunològics.

- **TGF- β**

El TGF- β és produït per cèl.lules epitelials i endotelials de diferents teixits, per macròfags i limfòcits activats, i algunes cèl.lules mesenquimals com els fibroblasts activats^{254,255,256}. El TGF- β és quimiotàctic pels fibroblasts i cèl.lules inflamatòries, però, a més a més, té propietats immunosupressores i inhiuix en cert grau la proliferació i diferenciació de limfòcits T i B²⁵⁴ i inhiuix també la producció d'enzims proteolítics en malalties autoimmunes²⁵⁷. Així, el TGF- β és una citocina amb múltiples funcions, involucrada en la immunoregulació, però també intervé en el desenvolupament embriològic, en la tumorigenesi, curació de ferides i en la fibrosi²⁵⁸. Actualment es creu que hi ha un subgrup de cèl.lules anomenades Th3 que es defineixen per la producció del TGF- β amb activitat supressora de la resposta autoimmune^{259,260}. Les glàndules salivals, tant de persones sanes com de pacients amb la SS produeixen TGF- β ^{215,261}. Probablement el TGF- β actua com a immunoregulador natural en les glàndules salivals i podia actuar negativament davant de la progressió de la malaltia en la SS²⁶². A favor d'aquest concepte va l'estudi amb TGF- β knock-out mice, en els quals es desenvolupa una clínica de SS²⁶³. En aquest context, l'expressió del TGF- β pot significar una contraregulació de l'activitat inflamatòria en la SS.

Totes les nostres mostres expressaven el TGF- β , independent de si es tractava de pacients amb la SS primària definida o probable i del grau d'afectació histològica. Tampoc el temps d'evolució de la malaltia tenia

influència sobre l'expressió d'aquesta citocina. Aquestes troballes suggereixen un efecte compensatori i antiinflamatori del TGF- β , per contrarrestar l'efecte immunològic de les citocines Th1 amb la seva acció inflamatòria i de lesió tisular. Els nostres resultats estan en concordança amb els resultats de Koski *et al*²⁶⁴, que detecta TGF- β tant en pacients amb la SS primària com secundària.

- **IL-10 i TGF- β**

La forma com la IL-10 i el TGF- β indueixen a una acció d'immunosupressió *in vivo* no és ben coneguda. Aquestes dues citocines tenen propietats característiques d'immunosupressió, tant a nivell de la inducció com en la fase efectora de la resposta inflamatòria mediada per cèl.lules T^{265,266}. In vitro la IL-10 inhibeix la proliferació i secreció de citocines induïda per antígens i disminueix la síntesi de citocines inflamatòries^{267,268} i, a més a més, té un efecte directe sobre cèl.lules T CD4⁺, i suprimeix la secreció de la IL-2 i del TNF- α ²⁶⁹. Igual que la IL-10, el TGF- β actua sobre les cèl.lules presentadores d'antigen, amb disminució dels nivells de la IL-12²⁷⁰. Actualment es creu en l'existència d'una tercera població limfocitària Th3 reguladora, secretora sobretot de la IL-10 i del TGF- β , amb propietats immunosupressores. Aquesta resposta immunomoduladora és tant a nivell de malalties amb patrons de predominància Th1, com demostra la presència d'IL-10 i de TGF- β en la colitis de ratolins amb la immunodeficiència combinada²⁷¹, com en malalties amb patró Th2, com és el cas de la nefritis autoimmune²⁷² o en la tiroiditis autoimmune²⁷³.

L'alt grau d'expressió de la IL-10 i del TGF- β en la glàndula salival menor de pacients amb la SS demostra la necessitat de regulació o contraregulació del procés immunològic, probablement com un intent de frenar l'afectació autoimmune i de la lesió tisular produïda en la SS. Podem afirmar la presència de la IL-10 i del TGF- β en la SS, probablement produïdes per limfòcits reguladors o Th3.

- **Tumor necrosis factor α (TNF- α)**

El TNF- α és una proteïna produïda per cèl·lules T, B, natural killer cells, macròfags i mastòcits²²³. Té activitat proinflamatòria en el xoc endotòxic, en la inflamació tisular i en les malalties autoimmunes, però l'exposició prolongada al TNF- α podia tenir també efectes antiinflamatoris i protectors²⁷⁴. La producció del TNF- α influeix en la resposta Th1, en conjunció amb la IL-12 i el IFN- γ , activa en la malaltia de Crohn cèl·lules T de la mucosa intestinal i demostra un perfil Th1 característic²⁷⁵. El TNF- α intervé també en altres malalties òrgan específiques amb un patró Th1 d'expressió de citocines, com és la artritis reumatoide i l'esclerosi múltiple, amb activitat proinflamatòria, de diferenciació i de mort cel·lular²⁷⁶. Sobre les cèl·lules T activades el TNF- α incrementa el número de receptors per a la IL-2, i augmenta la proliferació i la producció d'INF- γ induïdes per la IL-2²⁷⁷.

En les mostres de les glàndules salivals dels nostres pacients amb la SS primària, la majoria expressaven el TNF- α , independent de si es tractava d'un SS primari definit o probable, del grau d'afectació histològica o de la infiltració limfocitària. Però hi havia una tendència a una major expressió del TNF- α , sense significat estadístic, en les mostres de pacients amb més de 12 mesos de temps d'evolució de la simptomatologia clínica. Aquests resultats confirmen també en la SS primària la tendència a l'expressió del TNF- α , amb major expressió a més temps d'evolució, com passa amb les citocines del patró Th1, analitzades en aquest estudi. No podem demostrar si l'augment d'expressió del TNF- α al llarg del temps és per acció

proinflamatòria o per contrarestar l'efecte inflamatori com suggereix Cope²⁷⁴ en algunes malalties autoimmunes. Però l'augment d'expressió en el temps, tant del TNF- α com de la IL-2 i IFN- γ en els nostres pacients amb la SSp, suggereix que l'expressió del TNF- α és en relació amb l'activitat inflamatòria i no fa pensar en una activitat supressora de la malaltia autoimmune.

5.5. El balanç Th1 i Th2

Als anys 60 el descobriment de les cèl.lules B i T van marcar la immunologia, als 70 eren les cèl.lules T reguladores, sobretot el compartament CD4. Als 80 es va demostrar que aquests compartaments podien ser subdividits i apareixien els marcadors fenotípics de superfície, com les isoformes CD45. Es descobreixen les diferents funcions de les cèl.lules T CD4⁺, amb les activitats helper i supressora. Intervé la funció del complex major d'histocompatibilitat (CMH) i posteriorment apareix l'evidència que gens no relacionats amb el CMH regulen el balanç Th1/Th2. Així cada cop creix la importància de les citocines i del fet que diferents tipus de citocines eren responsables de diferents respostes immunològiques²⁷⁸. El descobriment decisiu és la separació del patró de citocines en dos subtipus, Th1 i Th2²⁷⁹. Des d'aquest temps, el paradigma Th1/Th2 cada cop es consolida més i també el descobriment de la seva funció.

Les cèl.lules Th1 actuen en la hipersensibilitat retardada, en la inflamació crònica i intervenen en la protecció enfront de patògens intracel.lulars, mentre les cèl.lules Th2 estimulen la resposta mediada per anticossos, sobretot IgE i intervenen en la defensa de patògens extracel.lulars. La majoria de cèl.lules en persones sanes estan en repòs i no produeixen cap citocina. Quan s'estimulen i depenen del tipus d'estimulació, una part d'aquestes cèl.lules, naive o de memòria, produeixen i segreguen un dels marcadors característics, IFN- γ i IL-2 pel patró Th1 o IL-4 pel patró Th2. La proporció de cèl.lules Th1 i Th2 varia en respostes immunològiques diferents i en relació amb el tipus de malaltia immunològica i, probablement,

pot ser per si mateixa una causa de malaltia i no només una conseqüència. D'aquí la importància del concepte del balanç Th1/Th2²⁸⁰. La iniciació de la divisió cel·lular després de l'activació mitjançant el receptor cel·lular dels limfòcits T (TCR) és el pas crític per l'expressió gènica de citocines que marcarà l'expressió fenotípica^{281,282}. Les cèl·lules T amb capacitat de segregar citocines tant del patró Th1 com Th2 i d'altres són les cèl·lules T precursors, anomenades cèl·lules Th0²⁸³, que a la vegada deriven de cèl·lules T naïve o virgen. Sota la influència de factors ambientals, d'estímuls antigènics, de la via d'entrada de l'antigen, de la forma física i de la dosi de l'antigen, com dels factors coadjuvants, es determina la diferenciació de les cèl·lules T i del patró de citocines que aquestes cèl·lules produeixen²⁸⁴. La presència inicial de la IL-4 és l'estímul més potent per la diferenciació Th2, mentre que la IL-12, IL-18 i l'IFN- γ ho són per al desenvolupament del patró Th1²⁸⁵. Les citocines produïdes per cada subgrup actuen com el seu propi factor de creixement autocrí i a la vegada com a contrareguladores del patró contrari^{286,287}.

Els limfòcits Th1 s'identifiquen perquè són productors d'IFN- γ i IL-2, a part de poder segregar també TNF- β . Les cèl·lules Th2 s'identifiquen per la detecció sobretot d'IL-4, a part de poder sintetitzar IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13. La IL-12 i la IL-18 són inductores del patró Th1, mentre que el TNF- α té activitat proinflamatòria. Actualment es creu que hi ha un subgrup de cèl·lules T, anomenades Th3, que es defineixen per la producció del TGF- β i l'IL-10, amb activitat supressora de la resposta autoimmune. La IL-10, considerada inicialment com a citosina Th2, es produïda en humans també per cèl·lules

B, monocits i cèl.lules Th1 i té activitat immunoreguladora. Per tant no es pot considerar com a citocina únicament derivada de cèl.lules T.

5.5.1. El balanç Th1/Th2 en malalties autoimmunes

En l'encefalitis autoimmune experimental les cèl.lules autopatogèniques son cèl.lules T amb fenotip Th1 d'expressió de citocines^{288,289}. Un patró similar es troba en la diabetis no obesa de ratolins, on la transferència de cèl.lules T CD4⁺ transgèniques específiques per a autoantígens pancreàtics amb patró Th1 indueix *in vitro* al desenvolupament de la malaltia²⁹⁰. Així, probablement moltes malalties autoimmunes òrgan específiques presenten un patró Th1. És el cas de l'artritis reumatoide, de la diabetis mellitus insulíndependent, de l'esclerosi múltiple, d'algunes de les malalties tiroïdals autoimmunes i de la malaltia inflamatòria intestinal, entre altres. En canvi trobem un patró predominantment Th2 en les afectacions al·lèrgiques, com l'asma, en l'esclerodèrmia, en el LES, en l'embarç i en la infecció pel VIH²⁹¹.

Actualment el balanç Th1/Th2 és el factor més important en la inducció i regulació de l'autoimmunitat. La majoria de malalties òrgan específiques s'inicien per cèl.lules Th1, que activen macròfags i estimulen la producció d'anticossos fixadors del complement, responsables de la inflamació i del dany tisular. En canvi, cèl.lules Th2 produeixen citocines amb activitat antiinflamatòria, igual que el TGF- β , la IL-10 i el TNF- α ²⁹². El desequilibri d'aquest balanç és la causa probable d'alteracions immunològiques.

5.5.2. El balanç Th1/Th2 en la Síndrome de Sjögren

Oxholm *et al*²⁹³ el 1992, descriu l'expressió de citocines en pacients amb la SS primària i la compara amb la de pacients sans. Demostra per tècniques immunohistoquímiques i no per tècnica de la reacció en cadena de polimerasa prèvia conversió de l'RNAm en DNAc via transcriptasa inversa (RCP-TR), la presència, entre altres, de TNF- α i d'IFN- γ en la glàndula salival menor de pacients amb la SSp. El grup control no expressava aquestes citocines i ho atribueix a la infiltració limfocitària amb la formació de focus en la glàndula salival de pacients amb la SSp. El nostre estudi confirma la presència d'aquestes citocines en la glàndula salival menor de pacients amb la SSp, però demostra que la presència d'aquestes citocines és conseqüència de l'infiltrat limfocitari, i no de la formació de focus, com indica la mateixa presència d'aquestes citocines en pacients amb la SSp amb i sense formació de focus.

El grup de Fox i col.laboradors²¹⁴, el 1994, estudia la presència de citocines en la glàndula salival menor, en sang perifèrica i en saliva de pacients amb la SSp amb tècnica quantitativa RCP-TR. Detecta la presència d'IL-2, d'IL-10 i d'IFN- γ en la glàndula salival en pacients amb la SS, amb absència de IL-4 i IL-5, i suggereix un patró Th1. Demostra una diferència entre els nivells locals de la producció de citocines en l'òrgan diana i els nivells d'aquestes en sang perifèrica, i suggereix la importància de la detecció del patró de citocines en l'òrgan diana ja que no hi ha un patró equiparable en sang perifèrica. També demostra la producció d'IL-10 per

part dels limfòcits T CD4⁺ i d'IL-1, d'IL-6 i de TNF- α per part de les cèl·lules epitelials. Tal com descriu Fox, el nostre estudi presenta una concordança amb el seu i amplia la preponderància del patró Th1, al demostrar la presència dels inductors d'aquest patró, la IL-12 i la IL-18.

Boumba *et al*²¹⁵, el 1995, utilitza tècniques d'hibridació *in situ* en combinació amb la d'immunohistoquímica i detecta a les glàndules salivals menors de pacients amb la SSp la presència del TNF- α i de la IL-1 β , produïts tant per macròfags com per limfòcits, essent mediadors importants dels fenòmens immunològics i inflamatoris. Només detecta en tres mostres una expressió d'IFN- γ i del TGF- β i en algunes poques la presència d'IL-4, a diferència d'una ampla expressió de la IL-2. Dels 12 pacients amb la SSp inclosos en aquest estudi, només en tres s'havia estudiat la IL-10 i no la detecta en cap d'ells. Suggereix que en els estudis previs realitzats per Fox²¹⁴ amb una alta prevalença de la IL-10 en pacients amb SSp, aquesta prevalença podia ser a causa de la utilització de sondes en la PCR amb una alta homologia de seqüències dels gens del virus d'Epstein-Barr. Les sondes utilitzades en aquesta tesi doctoral per a la detecció de la IL-10 només tenien una homologia de menys del 50% amb qualsevol gen del VEB i per tant la presència elevada de la IL-10 en les nostres mostres no és a causa de l'homologia del gen BCRF1 del VEB, com suggeria Boumba sobre l'estudi de Fox.

Ohyama *et al*²¹⁶, el 1996, descriu l'expressió de citocines en la glàndula salival de 15 pacients amb la SS primària i secundària amb la utilització de les tècniques de la PCR-TR. Detecta a totes les mostres IL-2,

IFN- γ , IL-10, TGF- β i IL-6 i suggereix un paper d'aquestes citocines en la inducció o manteniment d'aquesta malaltia autoimmune. També detecta en 8 i 6 dels 15 pacients IL-4 i IL-5 respectivament, però amb pacients amb una major proporció de cèl.lules B en la glàndula salival menor, i considera aquesta major presència de citocines Th2 en relació amb una possible expansió de cèl.lules B amb activitat o resposta humoral. Tots els seus pacients presentaven una expressió Th1 de citocines independent de la presència o no d'IL-4 o IL-5. La presència d'IL-10 en totes les mostres, com a l'estudi de Fox²¹⁴, fa pensar que les cèl.lules T CD4⁺ siguin també productores de la IL-10 en la SS. També estudia la presència d'IL-12 i la demostra en la majoria de mostres, considerant-la com a accelerador de l'activitat Th1.

Konttinen i col.laboradors²⁹⁴ presenten, el 1999, un estudi realitzat en pacients amb la SS i controls sans, on confirmen la presència, en la majoria de glàndules salivals menors de pacients amb la SS, d'IFN- γ i l'absència d'IL-4, i suggereixen també un patró Th1. Però a més a més detecten IFN- γ en pacients sans i consideren que la producció local d'IFN- γ no és específic de la SS i proposen que les glàndules salivals normals formin un "locus minoris resistentiae", a causa de la síntesi basal d'IFN- γ . A part, troben una menor producció d'IL-2 en les seves mostres, i consideren l'existència d'una baixa proporció de cèl.lules amb positivitat per al receptor de la IL-2. Aquests resultats contrasten amb els obtinguts prèviament pel nostre grup amb l'expressió del receptor de la IL-2 en pacients amb la SS en l'infiltrat limfocitari i en cèl.lules epitelials, amb l'absència de l'expressió esmentada

en el grup control²²⁶. Els nostres resultats estan en concordança amb la presència d'un patró Th1, però trobem una major expressió de IL-2 que d'IFN- γ , més evident en pacients amb més temps d'evolució clínica. En els dos estudis s'ha utilitzat la tècnica de la PCR-TR per l'amplificació i detecció d'RNAm. La diferència ètnica entre els pacients del nostre grup (conca mediterrània) i les estudiades del grup de pacients de Konttinen (finlandesos, anglosaxons) podia haver influït en la diferència de resultats obtinguts. A pesar de les diferències observades, no hi ha discrepància en la predominància d'un patró Th1, amb l'expressió de la IL-2 i de l'IFN- γ i l'absència d'IL-4.

Els diferents estudis desenvolupats en els últims anys sobre l'expressió de citocines en la síndrome de Sjögren primària demostra, en línies generals, la presència d'un patró Th1 amb la detecció d'IL-2 i d'IFN- γ i la menor prevalença o absència d'IL-4. Els resultats de la tesi confirmen la presència d'aquest patró Th1, amb la major presència d'aquestes dues citocines, IL-2 i IFN- γ . Aquest patró Th1 es reforça amb l'absència de la IL-4 en totes les mostres dels nostres pacients amb SSp. Aquesta absència d'IL-4 contrasta amb els resultats obtinguts per Ohyama²¹⁶, però concorda àmpliament amb els estudis de Fox²¹⁴, Boumba²¹⁵ i Konttinen²⁹⁴. L'absència d'IL-4 en les mostres analitzades en aquesta tesi va ser absoluta i ben confirmada, utilitzant clons de cèl·lules T amb expressió Th2 com controls positius²⁴¹. A més a més es reafirma aquest patró Th1 amb la detecció de la IL-12 i la IL-18. La majoria de les glàndules salivals estudiades presenten la IL-12 i quasi totes la IL-18, per primera vegada estudiada en la SSp.

Aquestes dues citocines són inductores del desenvolupament i diferenciació del patró Th1. Una coexpressió de les dues citocines es troba en la majoria de mostres, cosa que suggereix la seva participació en la inducció i manteniment de la dominància Th1 en la SS. Part de les mostres de pacients amb la SSp expressen l'IFN- γ i la majoria IL-2, d'acord amb els estudis prèviament descrits^{214,215,216,294}, independentment de si es tracta d'una SSp definida o probable. En agafar el conjunt de mostres amb la SSp, en no detectar diferències entre els dos grups, tampoc es demostren diferències segons el grau d'afectació histològica ni en relació amb el nombre de formació de focus limfocitaris. La coexpressió d'IL-2 i IFN- γ en les biòpsies de pacients amb més temps d'evolució clínica es relaciona de forma significativa amb una major expressió d'aquestes citocines. Aquest increment en l'expressió de les citocines efectores del patró Th1 (IL-2 i IFN- γ) en pacients amb evolució llarga de la malaltia, no és detecta pels seus inductors (IL-12, IL-18) que són presents en la majoria dels casos, independent del temps d'evolució clínica. Aquest fet podia significar que l'expressió Th1 en la SSp sigui una conseqüència de l'estimulació seqüencial dels limfòcits *in situ* al llarg del temps. Un estímul ideopàtic inicial donaria lloc a la producció *in situ* de les citocines inductores de malalties òrgan específiques per part de macròfags o altres cèl.lules inflamatòries i, en una segona fase, es produiria, mitjançant la transcripció gènica en els limfòcits i sota la influència de les citocines inductores, la síntesi i alliberament de les citocines Th1.

Quasi totes les biòpsies estudiades en aquest treball expressaven la IL-10. Hi ha una certa discordança amb les descripcions fetes per Boumba *et al*²¹⁵, que no detecta IL-10 en cap de les seves mostres estudiades i suggereix que els resultats anteriorment publicats per Fox i col.laboradors²¹⁴ podien tenir relació amb una major homologia de les seves sondes per detectar IL-10 amb seqüències gèniques del VEB i presentar una expressió falsament positiva. Els resultats descrits en aquesta tesi confirmen la presència d'IL-10 en la majoria de mostres, i les sondes utilitzades presentaven menys d'un 50% d'homologia amb la seqüència gènica del VEB. A més a més, si analitzem detalladament les dades sobre la falta d'expressió d'IL-10 en l'estudi de Boumba es dedueix que dels pacients amb la SSp estudiats, únicament en 3 de les 12 mostres s'ha testat la presència per la IL-10. Com que només es va estudiar la IL-10 en un nombre reduït de pacients descrits, no es pot treure cap afirmació sobre la IL-10 en la SS de l'estudi Boumba. Els nostres resultats confirmen i estan en concordança amb les afirmacions anteriors de Fox²¹⁴ i Ohyama²¹⁶ sobre l'expressió d'IL-10 en la SSp. Probablement l'expressió d'IL-10 és més una conseqüència de la seva producció per macròfags, limfòcits B o limfòcits Th1, que no pas una expressió Th2 like.

La detecció del TNF- α en la majoria de mostres és similar als resultats observats per Boumba²¹⁵ que troba una àmplia producció per part de les cèl.lules limfocitàries i dels macròfags. El TNF- α , com la IL-1 i IL-6, intervenen en fenòmens immunològics i inflamatoris i la seva producció local intervé en la destrucció tisular local²⁹⁵. Fox *et al*²¹⁴ demostra la producció

del TNF- α per part de les cèl.lules epitelials de les glàndules salivals en pacients amb la SS. La producció de citocines proinflamatòries a nivell de les cèl.lules epitelials fa pensar que les cèl.lules epitelials tinguin un rol actiu en la resposta autoimmune.

L'estudi sobre l'expressió de citocines fetes en les glàndules salivals menors de pacients amb la SSp definida i probable demostra que no hi ha diferència en l'expressió de citocines, en les citocines inductores, ni en el patró de predominància Th1 entre els dos grups. Aquests resultats suggereixen que la formació de focus d'infiltració limfocitària no és, en definitiva, el marcador diagnòstic histològic de la SS, sinó que l'estudi molecular i, en concret, l'estudi de l'expressió de citocines hauria de ser el criteri diagnòstic. Probablement caldria analitzar el patró d'expressió de citocines en les biòpsies de glàndula salival menor de pacients amb la SS i demostrar la presència d'un patró Th1 pel diagnòstic de la SS. L'anàlisi de la presència de la IL-2 i del IFN- γ i l'absència de la IL-4 serien suficients per demostrar aquest patró.

L'anàlisi de l'expressió de citocines en la SSp en relació amb els diferents graus d'afectació histològica no van donar lloc a cap diferència estadística, i van demostrar el patró Th1 i la presència de les seves citocines inductores en les diferents mostres, independentment del grau d'afectació histològica. No es va demostrar cap diferència a major grau d'afectació histològica, ni tampoc en les tres mostres amb predominància de teixit fibrós. La presència de la IL-10 i del TGF- β en la majoria de les mostres de glàndula salival menor de pacients amb la SSp fa suposar la presència, a part del

patró Th1, de limfòcits amb activitat immunosupressora o immunoreguladora.

6. CONCLUSIONS

1. No hi ha diferència en l'expressió de l'RNAm de citocines en la glàndula salival menor en pacients amb la Síndrome de Sjögren primària definida i probable.

2. El patró predominant d'expressió de citocines en la glàndula salival menor en pacients amb la Síndrome de Sjögren primària és un patró Th1.

3. La IL-12 i la IL-18 són inductores del patró Th1 en la síndrome de Sjögren.

4. L'expressió de l'RNAm de citocines no varia en relació amb el grau d'afectació histològica ni en relació amb el nombre de formació de focus.

5. Els pacients amb la síndrome de Sjögren primària amb més temps d'evolució clínica presentaven un increment significatiu de l'expressió del patró Th1.

7.- BIBLIOGRAFIA

¹ Gougerot H. Insuffisance progressive et atrophie des glandes salivares et muqueuses de la bouche, de conjunctives et parfois des muqueuses nasale, larygee,vulvaire: "Secherese" de la bouche, des conjunctives, etc. Bull Soc Franc Derm Syph 1925;32:376-379.

² Duke-Elder WS. Keratitis sicca. Brit J Ophtalmol 1930;14:61.

³ Sjögren H. Keratoconjunctivitis sicca. Hygiea 1930;92:829.

⁴ Sjögren H. Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca (Keratitis filiformis bei Hypofunktion der Tränendrüsen). Acta Ophtalmol (Copenh) 1933; 11(supl 2):1-151.

⁵ Haldelberg GP, Berens C. Standardized Schirmer tear test kit. Am J Ophthalmo 1961;51:840-842.

⁶ Von Grosz S. Aetiologie und Therapie der Keratoconjunctivitis sicca. Klin Mbl Augenheilk 1936;97:472.

⁷ Mikulicz J. Discussion beim Verein für Wissenschaftliche Heilkunde zu Königsberg. Berlin Klin Wachschr 1888;25:759.

⁸ Mikulicz J. Über eine eigenartige symmetrische Erkrankung der Tränen und Mundspeicheldrüsen. Beitr Chir Fortsch, Gewidmet Theodor Billroth, Stuttgart 1892:610-630.

⁹ Schäffer AJ, Jacobsen AW. Mikulicz's disease. A report of ten cases. Am J Dis Child 1927;34:327.

¹⁰ Morgan WS, Castelman B. A clinicopathologic study of "Mikulicz's disease". Am J Pathol 1953;29:471.

¹¹ Block K, Buchanan W, Wohl M, Bunim J. Sjögren's syndrome: a clinical, pathological and serological study of 62 cases. *Medicine (Baltimore)* 1965;44:187-231.

¹² Frost-Larsen K, Isager H, Manthorpe R, Pruase J. Sjögren's syndrome. *Ann Ophtalmol* 1980;12:836-846.

¹³ Moutsopoulos HM, Chused TM, Mann DL, Klippel JH, Fauci AS, Frank MM, Lawley TJ, Hamburger MI. Sjögren's syndrome (Sicca Syndrome): current issues. *Ann Intern Med* 1980;92(2Pt1):212-226.

¹⁴ Talal N. Sjögren's syndrome: historical overview and clinical spectrum of disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:507-515.

¹⁵ Itescu S, Brancato LJ, Gregersen PK, Rizk CC, Croxson TS, Solomon GE et al. A diffuse infiltrative CD8 lymphocytosis syndrome in human immunodeficiency virus (HIV) infection: a host immune response associated with HLA-DR5. *Ann Intern Med* 1990;112:3-10.

¹⁶ Coll J, Tomás S, Corominas JM, Gutiérrez J. Sicca syndrome associated with human immunodeficiency virus infection: an immunohistochemical study. *Arthritis Rheum* 1993;36:875-876.

¹⁷ Villar Ortiz J, Palomino Nicas J, Conde Garcia J, Piedra Priego J, Manso Garcia F, Lapetra Peralta J. Síndrome de Sjögren. Análisis de 43 pacientes. *Rev Clin Esp* 1985;176:442-447.

¹⁸ Tarpley TM, Anderson LG, White CL. Minor salivary gland involvement in Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974;37:64-74.

¹⁹ Daniels TE, Silverman S, Michalski JP, Greenspan JS, Sylvester RA, Talal N. The oral component of Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1975;39:875-885.

-
- ²⁰ Manthorpe R, Andersen V, Jensen OA, Oxholm P, Prause JU, Schiødt M. Editorial comments to the four sets of criteria for Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol Suppl* 1986;61:31-35.
- ²¹ Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Coll J. European Community Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's Syndrome. Assessment of the European classification criteria for Sjögren's syndrome in a series of clinically defined cases: results of a prospective multicentre study. *Ann Rheum Dis* 1996;55:116-121.
- ²² Fox RI, Robinson CA, Curd JG, Kozin F, Howell FV. Sjögren's syndrome. Proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum* 1986;29:577-585.
- ²³ Daniels TE, Whichter JP. Association of patterns of labial salivary gland inflammation with keratoconjunctivitis sicca. Analysis of 618 patients with suspected Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1994;37:869-877.
- ²⁴ Jacobsson LT, Axell TE, Hansen BU, Hemricsson VJ, Larsson A, Lieberkind K, Lilja B, Manthorpe R. Dry eyes or mouth. An epidemiological study in Swedish adults, with special reference to primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 1989;2:521-527.
- ²⁵ Branson-Geokas B, Epstein M, Quismorio F, Friou G. Sjögren's syndrome, clinical and laboratory studies. *Arthritis Rheum* 1971;14:152-158.
- ²⁶ Takeda Y, Komori A. Focal lymphocytic infiltration in the human labial salivary glands: a postmortem study. *J Oral Pathol* 1986;15:83-86.
- ²⁷ Moutsopoulos HM, Talal N. New developments in Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1989;1:332-338.

-
- ²⁸ Coll J, Rivas A, Griñó MC, Setoain J, Vivancos J, Bacells A. Prevalence of Sjögren's syndrome in autoimmune disease. *Ann Rheum Dis* 1987;46:286-289.
- ²⁹ Drosos AA, Andonopoulos AP, Costopoulos JS, Papadimitriou CS, Moutsopoulos HM. Prevalence of primary Sjögren's syndrome in an elderly population. *Br J Rheumatol* 1988;27:123-127.
- ³⁰ Manthorpe R, Frost-Larsen K, Isager H, Prause JU. Sjögren's syndrome. A review with emphasis on immunological features. *Allergy* 1981;36:139-153.
- ³¹ Klein J, Sato A. The HLA System. *N Engl J Med* 2000;343:782-786.
- ³² Fox RI, Howell FV, Bone RC, Michelson P. Primary Sjögren's syndrome: clinical and immunopathologic features. *Semin Arthritis Rheum* 1984;14:77-105.
- ³³ Moutsopoulos HM, Mann DL, Johnson AH, Chused TM. Genetic differences between primary and secondary sicca syndrome. *N Engl J Med* 1979;301:761-763.
- ³⁴ Vitali C, Giuggioli C, Monti P, Rossi G, Wu DH, d'Ascanio A, Chiellini S, Gabriele M, Bombardieri S. Statistical evaluation of different clinical and serological parameters for the diagnosis of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheum* 1989;7:191-195.
- ³⁵ Arnett FC, Goldstein R, Duvic M, Reveille JD. Major histocompatibility complex genes in systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome and polymyositis. *Am J Med* 1988;85:38-41.
- ³⁶ Reveille JD, Wilson RW, Provost TT, Bias WB, Arnett FC. Primary Sjögren's syndrome and other autoimmune disease in families: prevalence

and immunogenetic studies in six kindreds. *Ann Intern Med* 1984;101:748-756.

³⁷ Martinez Castro E, Olive Marques A, Bonet Llorach M, Carbonell Abelló J, Cobo Valeri E, Juncá Valdor S. Artritis reumatoide y síndrome de Sjögren. Referencia especial al tiempo de evolución de la artritis reumatoide. *Med Clin (Barc)* 1990;94:655-659.

³⁸ Venables PJW, Rigby S, Mumford PA, Markwick J, Maini RN. Autoimmunity to La (SS-B) in vitro is related to HLA-DR3 in healthy subjects. *Ann Rheum Dis* 1988;47:22-27.

³⁹ Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, Yamagata H, Arnett FC. Anti Ro (SS-A) and anti La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986;29:196-206.

⁴⁰ Arnett FC, Hamilton RG, Reveille JD, Bias WB, Harley JB, Reichlin M. Genetic studies of Ro (SS-A) and La (SS-B) autoantibodies in families with systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1989;32:413-419.

⁴¹ Reveille JD, Arnett FC. The immunogenetics of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:539-550.

⁴² Pease CT, Shattles W, Charles PJ, Venables PJ, Maini RN. Clinical, serological and HLA phenotype subsets in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:185-190.

⁴³ Slaughter L, Carson DA, Jensen FC, Holbrook TL, Vaughan JH. In vitro effects of Epstein-Barr virus on peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and normal subjects. *J Exp Med* 1978;148:1429-1434.

⁴⁴ Demman AM. Virus and autoimmune disease. *Clin Immunol Allergy* 1981;1:17-39.

⁴⁵ Deppler JM, Bluestein HG, Zvaifler NJ. Impaired regulation of Epstein-Barr virus-induced lymphocyte proliferation in rheumatoid arthritis is due to a T cell defect. *J Immunol* 1981;127:1899-1902.

⁴⁶ Flescher E, Talal N. Do viruses contribute to the development of Sjögren's syndrome? *Am J Med* 1991;90:283-285.

⁴⁷ Takei M, Dang H, Dauphinee MJ, Talal N. Autostimulatory growth factors produced by Sjögren's syndrome B-cell lines. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;53:123-135.

⁴⁸ Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:805-809.

⁴⁹ Fox RI, Kang HI. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:517-538.

⁵⁰ Fox RI, Pearson G, Vaughan JH. Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1986;137:3162-3168.

⁵¹ Marriette X, Gozlan J, Clerc D, Bisson M, Morinet F. Detection of Epstein-Barr virus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome. *Am J Med* 1991;90:286-290.

-
- ⁵² Venables PJ, Teo CG, Baboonian C, Griffin BE, Hughes RA. Persistence of Epstein-Barr virus in salivary gland biopsies from healthy individuals and patients with Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1989;75:359-364.
- ⁵³ Saito I, Serenius B, Compton T, Fox RI. Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J Exp Med* 1989;169:2191-2198.
- ⁵⁴ Merne ME, Syrjanen SM. Detection of Epstein-Barr virus in salivary gland specimens from Sjögren's syndrome patients. *Laryngoscope* 1996;106:1534-1539.
- ⁵⁵ Baboonian C, Venables PJ, Maini RN, Kangro HO, Osman HK. Antibodies to human herpesvirus-6 in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1990;33:1749-1751.
- ⁵⁶ Fillet AM, Raguin G, Agut H, Boisnic S, Agbo-Godeau S, Robert C. Evidence of human herpesvirus 6 in Sjögren's syndrome and sarcoidosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:564-566.
- ⁵⁷ Ranger-Rogez S, Vidal E, Liozon F, Denis F. Primary Sjögren's syndrome and antibodies to human herpesvirus type 6. *Clin Infect Dis* 1994;6:1159-1160.
- ⁵⁸ Ranger-Rogez S, Vidal E, Labrousse F, Riche A, Vidal J, Collineau M et al. Large-scale study suggests no direct link between human herpesvirus-6 and primary Sjögren's syndrome. *J Med Virol* 1995;3:198-203.
- ⁵⁹ Venables PJ, Ross MG, Charles PJ, Melsom RD, Griffiths PD, Main RN. A seroepidemiological study of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis and sicca syndrome. *Ann Rheum Dis* 1985;44:742-746.

⁶⁰ Haddad J, Deny P, Munz-Gotheil C, Ambrosini JC, Trinchet JC, Pateron D, Mal F, Callard P, Beaugrand M. Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 1992;339:321-323.

⁶¹ Aceti A, Taliani G, Sorice M, Amendolea MA. Hepatitis C virus and Sjögren's syndrome. *Lancet* 1992;339:1425-1426.

⁶² Jorgensen C, Legouffe MC, Perney P, Coste J, Tissot B, Segarra C, Bologna C, Bourrat L, Combe B, Blanc F, Sany J. Sicca syndrome associated with hepatitis C virus infection. *Arthritis Rheum* 1996;1166-1171.

⁶³ Kaplan G. Hepatite virale, VHC et syndrome de Gougerot-Sjögren. *L'Actualité Rhumatologique* 1993;11-13.

⁶⁴ Marson P, Ostuni PA, Vicarioto M, Ongaro G, Gambari PF. Anti-hepatitis C virus serology in primary Sjögren's syndrome: no evidence of cross-reactivity between rheumatoid factor and specific viral proteins. *Clin Exp Rheum* 1991;6:661-662.

⁶⁵ Mariette X, Zerbib M, Jaccard A, Schenmetzler C, Danon F, Clauvel JP. Hepatitis C virus and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1993;36:280-281.

⁶⁶ Vitali C, Sciuto M, Neri R, Greco F, Mavridis AK, Tsioufas AG, Tsianos EV. Anti-hepatitis C virus antibodies in primary Sjögren's syndrome: false positive results are related to hyper-gamma-globulinaemia. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10:103-104.

⁶⁷ Ferri C, Greco F, Longombardo G, Palla P, Moretti A, Marzo E, Mazzoni A, Pasero G, Bombardieri S, Highfield P et al. Association between hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol* 1991;9:621-624.

⁶⁸ Wattiaux MJ. Gougerot Sjögren's syndrome and hepatitis C virus: what kind of relation? *Presse Med* 1997;26:652-655.

⁶⁹ Garcia-Carrasco M, Ramos M, Cervera R, Font J, Vidal J, Muñoz FJ, Miret C, Espinosa G, Ingelmo M. Hepatitis C virus infection in primary Sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance in a series of 90 patients. *Ann Rheum Dis* 1997;56:173-175.

⁷⁰ Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Cervera R, Rosas J, Trejo O, De la Red G. Hepatitis C virus infection mimicking primary Sjögren syndrome. A clinical and immunological description of 35 cases. *Medicine (Baltimore)* 2001 ;80 :1-8.

⁷¹ Coll J, Gambús G, Corominas J, Tomás S, Esteban JL, Guardiola J. Immunohistochemistry of minor salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome with and without hepatitis C virus infection. *Ann Rheum Dis* 1997;56:390-392.

⁷² Loustaud-Ratti V, Vidal E, Delaire L. Gougerot-Sjögren, syndrome sec et hépatite C. *Rev Med Interne* 1992;13:346.

⁷³ Agnello V, Chung RT, Karan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Eng J Med* 1992;327:1490-1497.

⁷⁴ Ramos-Casals M, Font J, Ingelmo M. Prevalencia y significado clínico de la infección crónica por el virus de la hepatitis C en las enfermedades autoinmunes sistémicas. *Med Clin (Barc)* 2001;116:701-709.

⁷⁵ Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975;1:72-73.

-
- ⁷⁶ Cope AP, Jones A, Brozovic M, Shafi MS, Maini RN. Possible induction of systemic lupus erythematosus by human parvovirus. *Ann Rheum Dis* 1992;51:803-804.
- ⁷⁷ Kerr JR, Cartron JP, Curran MD, Moore JE, Elliott JR, Mollan RA. A study of the role of parvovirus B19 in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995;34:809-813.
- ⁷⁸ Godeau B, Palazzo E, Morinet F, Deplanche M, Deforge L, Schaeffer A, Kahn MF. Is Still's disease associated with parvovirus B19 infection? *Lancet* 1994;345:59-60.
- ⁷⁹ Nikkari S, Mertsola J, Korvenranta H, Vainionpaa R, Toivanen P. Wegener's granulomatosis and parvovirus B19 infection. *Arthritis Rheum* 1994;11:1707-1710.
- ⁸⁰ Corman LC, Dolson DJ. Polyarteritis nodosa and parvovirus B19 infection. *Lancet* 1992;339:491.
- ⁸¹ Ferguson PJ, Saulsbury FT, Dowell SF, Torok TJ, Erdman DD, Anderson LJ. Prevalence of human parvovirus B19 infection in children with Henoch-Schönlein purpura. *Arthritis Rheum* 1996;39:880-881.
- ⁸² Holm JM, Hansen LK, Oxhoj H. Kawasaki disease associated with parvovirus B19 infection. *Eur J Pediatr* 1995;154:633-634.
- ⁸³ Price EJ, Venables PJ. The etiopathogenesis of Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 1995;25:117-133.
- ⁸⁴ Mariette X. Sjögren's syndrome and virus. *Rev Med Interne* 1994;15:601-606.

⁸⁵ Kazi S, Cohen PR, Williams F, Schempp R, Reveille JD. The diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome: clinical and immunogenetic features en 35 patients. *AIDS* 1996;10:385-391.

⁸⁶ Kordossis T, Paikos S, Aroni K, Kitsanta P, Dimitrakopoulos A, Kavouklis E, Alevizou V, Kyriaki P, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Prevalence of Sjögren's-like syndrome in a cohort of HIV-1-positive patients: descriptive pathology and immunopathology. *Br J Rheumatol* 1998;37:691-695.

⁸⁷ Williams FM, Cohen PR, Jumshyd J, Reveille JD. Prevalence of the diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome among human immunodeficiency virus type 1-positive outpatients. *Arthritis Rheum* 1998;41:863-868.

⁸⁸ Terada K, Katamine S, Eguchi K, Moriuchi R, Kita M, Shimada H, Yamashita I, Iwata K, Tsuji Y, Nagataki S et al. Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-I in Sjögren's syndrome. *Lancet* 1994;344:1116-1119.

⁸⁹ Nakamura H, Eguchi K, Nakamura T, Mizokami A, Shirabe S, Kawakami A, Matsuoka N, Migita K, Kawabe Y, Nagataki S. High prevalence of Sjögren's syndrome in patient with HTLV-1 associated myelopathy. *Ann Rheum Dis* 1997;56:167-172.

⁹⁰ Talal N, Dauphinée MJ, Dang H, Alexander SS, Hart DJ, Garry RF. Detection of serum antibodies to retroviral proteins in patients with primary Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Arthritis Rheum* 1990;33:774-781.

⁹¹ Brookes SM, Pandolfino YA, Mitchell TJ, Venables PJ, Shattles WG, Clark DA, Entwistle A, Maini RN. The immune response to and expression of cross-reactive retroviral gag sequences in autoimmune disease. *Br J Rheumatol* 1992;31:735-742.

⁹² Yamano S, Renard JN, Mizuno F, Narita Y, Uchida Y, Higashiyama H, Sakurai H, Saito I. Retrovirus in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Clin Pathol* 1997;50:223-230.

⁹³ Deas JE, Liu LG, Thompson JJ, Sander DM, Soble SS, Garry RF, Gallaher WR. Reactivity of sera from systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome patients with peptides derived from human immunodeficiency virus p24 capsid antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:181-185.

⁹⁴ Coll J, Palazon J, Yazbeck H, Gutierrez J, Aubo C, Benito P, Jagiello P, Maldyk H, Marrugat J, Anglada. Antibodies to human immunodeficiency virus (HIV-1) in autoimmune diseases: primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and autoimmune thyroid diseases. *Clin Rheumatol* 1995;14:451-457.

⁹⁵ Coll Daroca J. Nuevos conceptos del síndrome de Sjögren. *Med Clin (Barc)* 1987;89:108-11.

⁹⁶ Molina R, Provost TT, Arnett FC, Bias WB, Hochberg MC, Wilson RM, Alexander EL. Primary Sjögren's syndrome in men. Clinical, serological and immunogenetics features. *Am J Med* 1986;80:23-31.

⁹⁷ Lehrer S, Bogursky E, Yemini M, Kase NG, Birkenfeld. Gynecologic manifestations of Sjögren's syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:835-837.

⁹⁸ Warren D. Hormonal influences on the lacrimal gland. *Int Ophtalmol Clin* 1994;34:19-34.

⁹⁹ Konttinen YT, Hukkanen M, Kemppinen P, Segerberg M, Sorsa T, Malmstrom M, Rose S, Itescu S, Polak JM. Peptide-containing nerves in

labial salivary glands in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1992;35:815-820.

¹⁰⁰ Fox RI, Saito. Sjögren's syndrome: immunologic and neuroendocrine mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:609-621.

¹⁰¹ Allen SH, Sharp GC, Wang G, Conley C, Takeda Y, Conroy SE, Walker SE. Prolactin levels and antinuclear antibody profiles in women tested for connective tissue disease. *Lupus* 1996;5:30-37.

¹⁰² Coll J, Anglada J, Tomás S, Reth P, Goday A, Millan M, Pujol-Borrell R, Corominas J. High prevalence of subclinical Sjögren's syndrome features in patients with autoimmune thyroid disease. *J Rheumatol* 1997;24:1719-24.

¹⁰³ Moutsopoulos HM. New insights into the physiopathology of primary Sjögren's syndrome. *Ann Med Interne (Paris)* 1990;141:53-56.

¹⁰⁴ Coll J, Costas J, Cabrer B, Rives A, Vivancos J, Balcells A. Síndrome de Sjögren: concepto actual, manifestaciones clínicas y su evolución. *Rev Clin Esp* 1976;143:243-251.

¹⁰⁵ Moutsopoulos HM, Costello R, Drossos AA, Mavridis AK, Papadopoulos NM. Demonstration and identification of monoclonal proteins in the urine of patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum dis* 1985;44:109-111.

¹⁰⁶ Grosbois B, Jegou P, Leblay R. Gougerot-Sjögren syndrome and malignant lymphoproliferative syndromes. *Rev Med Interne* 1998;19:319-324.

¹⁰⁷ Mariette X. Lymphomas in patients with Sjögren's syndrome: review of the literature and physiopathologic hypothesis. *Leuk Lymphoma* 1999;33:93-99.

¹⁰⁸ Atkinson JC, Fox PC, Travis WD, Popek E, Katz RW, Balow JE, Pillemer SR. IgA-rheumatoid facator and IgM-containing immune complexes in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1989;16:1205-1210.

¹⁰⁹ Moutsopoulos HM. New insights into the physiopathology of primary Sjögren's syndrome. *Ann Med Interne* 1990;141:53-56.

¹¹⁰ Feltkamp T, Van Rossum A. Antibodies to salivary ducts cells, and other autoantibodies in patients with Sjögren's syndrome and other idiopathic autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 1968;3:1-16.

¹¹¹ Pigrau Serrallach C, Guardia Massó J. Anticuerpos antinucleares. *Med Clin* 1983 (Barc); 80:850-858.

¹¹² Valesini G, Priori R, Borsetti A, Tiberti A, Moncada A, Pivetti-Pezzi P. Clinical serological correlations in the evaluation of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:197-202.

¹¹³ Chan EKL, Andrade LEC. Antinuclear antibodies in Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North America* 1992;18:551-570.

¹¹⁴ Talal N. Maintenance of autoimmunity. *J Autoimmun* 1988;1:703-709.

¹¹⁵ Venables PJW, Rigby S, Mumford PA, Markwick J, Maini RN. Autoimmunity to La (SS-B) in vitro is related to HLA-DR3 in healthy subjects. *Ann Rheum Dis* 1988;47:22-27.

¹¹⁶ Van Bijsterveld OP, Mackor AJ. Sjögren's syndrome and tear function parameters. *Clin Exp Rheum* 1989;7:151-154.

¹¹⁷ Venables PJW, Shattels W, Pease CT, Ellis JE, Charles PJ, Maini RN. Anti-La (SS-B): a diagnostic criterion for Sjögren's syndrom?. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:181-184.

¹¹⁸ Sauvezie B, Janin-Mercier A, Veyre A, Peyronnet R, Lafaye C, Lafaye M, Rigal D, Rampon S. Diagnostic du syndrome de Gourgerot-Sjögren en rhumatologie. I. Evaluation des principaux examens complémentaires. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1984;51:545-552.

¹¹⁹ Fischbach M, Char D, Christensen M, Daniels T, Whaley K, Alspaugh M, Talal N. Immune complexes in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1980;23:791-795.

¹²⁰ Hamburger MI, Moutsopoulos HM, Lawley TJ, Frank MM. Sjögren's syndrome: a defect in reticuloendothelial systems Fc-receptor-specific clearance. *Ann Intern Med* 1979;91:534-538.

¹²¹ Thomsen BS, Oxholm P, Manthorpe R, Nielson H. Complement C3b receptors on erythrocytes, circulating immune complexes, and complement C3 split products in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986;29:857-862.

¹²² Thomas EA. The Apoptotic Syndromes. *Am J Med.* 1999;107:488.

¹²³ Strasser A, Huang DC, Vaux DL. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta.* 1977;1333:F151-F178.

¹²⁴ Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-257.

¹²⁵ Grodzicky T, Elkon KB. Apoptosis in Rheumatic Diseases. *Am J Med.* 2000;108:73-82.

¹²⁶ Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*.1995;267:1449-1456.

¹²⁷ Robinson CP, Yamachika S, Alford CE, Cooper C, Pichardo EL, Shah N, Peck AB, Humphreys-Beher MG. Elevated levels of cysteine protease activity in saliva and salivary glands of the non-obese diabetic (NOD) mouse model for Sjögren syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:5767-5771.

¹²⁸ Kong L, Ogawa N, McGuff HS, Nakabayashi T, Sakata KM, Masago R, Vela-Roch N, Talal N, Dang H. Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome: involvement of Bax in salivary gland destruction. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;88:133-141.

¹²⁹ Bolstad AI, Wargelius A, Nakken B, Haga HJ, Jonsson R. Fas and Fas ligand gene polymorphisms in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2000;27:2397-2405.

¹³⁰ Patel YI, McHugh NJ. Apoptosis-new clues to the pathogenesis of Sjögren's syndrome? *Rheumatology*. 2000;39:119-121.

¹³¹ Anaya JM, Ogawa N, Talal N. Sjögren's syndrome en childhood. *J Rheumatol* 1995;22:1152-1158.

¹³² Anaya JM, Liu DT, D'Souza E, Ogawa N, Luan N, Talal N. Primary Sjögren's syndrome in men. *Ann Rheum Dis* 1995;45:748-751.

¹³³ Ramos M, Cervera R, García-Carrasco M, Miret C, Muñoz FJ, Espinosa G, Font J, Ingelmo M. Síndrome de Sjögren primario: estudio clínico e inmunológico de 80 pacientes. *Med Clin (Barc)* 1997;108:652-657.

¹³⁴ Selva O'Callaghan A, Bosch Gil JA, Solans Laque R, Segura García A, Armadans Gil L, Mijares Boeckh-Behrens, Viladrell Tarrés M. Síndrome de

Sjögren primario: características clínicas e inmunológicas de 114 pacientes. *Med Clin (Barc)* 2001;116:721-725.

¹³⁵ Ramos-Casals M, Cervera R, Font J, García-Carrasco M, Espinosa G, Reino S, Pallares L, Ingelmo M. Young onset of primary Sjögren's syndrome: clinical and immunological characteristics. *Lupus* 1998;7:202-206.

¹³⁶ Constantopoulos SH, Papadimitriou CS, Moutsopoulos HM. Respiratory manifestations in primary Sjögren's syndrome. *Chest* 1985;88:226-229.

¹³⁷ Cain HC, Noble PW, Matthay RA. Pulmonary manifestation of Sjögren's syndrome. *Clin Chest Med* 1998;19:687-699.

¹³⁸ Vitali C, Tavoni A, Vieggi G, Begliomini E, Agensi A, Bombardieri S. Lung involvement in Sjögren's syndrome: a comparison between patients with primary and with secondary syndrome. *Ann Rheum Dis* 1985;44:455-461.

¹³⁹ Coll J, Navarro S, Tomas R, Elena M, Martinez E. Exocrine pancreatic function in Sjögren's syndrome. *Arch Intern Med* 1989;149:848-852.

¹⁴⁰ D'Ambrosi A, Verzola A, Buldrini P, Vavalle C, Panareo S, Gatto S, La Corte R, Vicentini L, Boccafogli A, Scolozzi R. Pancreatic duct antibodies and subclinical insufficiency of the exocrine pancreas in Sjögren's syndrome. *Recenti Prog Med* 1998;89:504-509.

¹⁴¹ Maury CPJ, Törnroth T, Teppo AM. Atrophic gastritis in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1985;28:388-394.

¹⁴² Tholl U, Hartung K, Helmchen U, Anlauf M. Primary Sjögren's syndrome and glomerulonephritis. *Dtsch Med Wochenschr* 1998;123:1541-1546.

¹⁴³ Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Cervera R, Font J. Síndrome de Sjögren y linfoproliferación. *Med Clin (Barc)* 2000;114:740-746.

¹⁴⁴ Voulgarelis M, Dafin UG, Isenberg DA, Moutsopoulos HM, and the Members of the European Concerted Action on Sjögren's Syndrome. Malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. A multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:1765-1772.

¹⁴⁵ Skopouli FN, Drosos AA, Papaioannou T, Moutsopoulos HM. Preliminary diagnostic criteria for Sjögren's syndrome. *J Rheumatology* 1986; suppl 61:22-25.

¹⁴⁶ Homma M, Tojo T, Akizuki M, Yamagata H. Criteria for Sjögren's syndrome in Japan. *Scand J Rheumatology* 1986; suppl 61:26-27.

¹⁴⁷ Coll J, Porta M, Rubies-Prat j, Gutierrez-Cebollada J, Tomás S. Sjögren's syndrome: a stepwise approach to the use of diagnostic tests. *An Rheum Dis* 1992;5:607-610.

¹⁴⁸ Paschides CH, Kitsios G, Karakostas KX, Psillas C, Moutsopoulos HM. Evaluation of tear break up time, Schirmer's-I test and rose Bengal staining as confirmatory test for keratoconjunctivitis sicca. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:155-157.

¹⁴⁹ Holm S. Keratoconjunctivitis sicca and the sicca syndrome. *Acta Ophtalmol suppl (Copenh)* 1949;33:1-230.

¹⁵⁰ Van Bijsterveld O. Diagnostic test in the sicca syndrome. *Arch Ophtalmol* 1969;86:10-14.

¹⁵¹ Mandel L, Orchowski YS. Using ultrasonography to diagnose Sjögren's syndrome. *J Am Dent Assoc* 1998;129:1129-1133.

-
- ¹⁵² Tonami H, Ogawa Y, Matoba M, Kuginuki Y, Yokota H, Higashi K, Okimura T, Yamamoto I, Sugai S. MR sialography in patients with Sjögren's syndrome. *AAJNR Am J Neuroradiol* 1998;19:1199-1203.
- ¹⁵³ Umehara I, Yamada I, Murata Y, Takahashi Y, Okada N, Shibuya H. Quantitative evaluation of salivary gland scintigraphy in Sjögren's syndrome. *J Nucl Med* 1999;40:64-69.
- ¹⁵⁴ Hermann GA, Vivino FB, Shnier D, Krumm RP, Mayrin V. Diagnostic accuracy of salivary scintigraphic indices in xerostomic populations. *Clin Nucl Med* 1999;24:167-172.
- ¹⁵⁵ Coll J. Síndrome de Sjögren: Métodos diagnósticos y su incidencia en distintas enfermedades. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona, 1978.
- ¹⁵⁶ Daniels T. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome: assesment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984;27:147-156.
- ¹⁵⁷ Fox RI, Robinson CA, Curd JG, Kozin F, Howell FV. Sjögren's syndrome. Proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum* 1986;29:577-589.
- ¹⁵⁸ Janin A, Gosselin B, Gosset D, Hatron PY, Sauvezie B. Histological criteria of Sjögren's syndrome in scleroderma. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:167-170.
- ¹⁵⁹ LeRoy JP, Pennec YL, Jouquan J, Lelong A, Youinaud P. Relations of the histopathology of sublingual and labial salivary glands to the clinical presentation in primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:171-174.

¹⁶⁰ Chisholm D, Mason D. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Pathol* 1968;21:656-660.

¹⁶¹ Chisholm DM, Waterhouse JM, Mason DK. Lymphocytic sialoadenitis in the major and minor glands: a correlation in postmortem subjects. *J Clin Pathol* 1970;23:690-694.

¹⁶² Schully C. Oral parameters in the diagnosis of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:113-118.

¹⁶³ Greenspan J, Daniels T, Talal N, Sylvester R. The histopathology of Sjögren's syndrome in labial biopsies. *Oral Surg* 1974;37:217-230.

¹⁶⁴ De Wilde PCM, Baak JPA, Van Houwelingen JC, Kater L, Slootweg PJ. Morphometric study of histologic changes in sublabial salivary glands due to aging process. *J Clin Pathol* 1986;39:406-417.

¹⁶⁵ Whaley K, Chisholm DM, Goudie RB, Downie WW, Dyc WC, Boyle JA. Salivary duct autoantibodies in Sjögren's syndrome: a correlation with focal adenitis in the labial mucosa. *Clin Exp Immunol* 1986;4:273-282.

¹⁶⁶ Vitali C, Tavoni A, Simi U, Marchetti G, Vigorito P, d'Ascanio A, Neri R, Cristofani R, Bombardieri S. Parotid sialography and minor salivary gland biopsy in the diagnosis of Sjögren's syndrome. A comparative study of 84 patients. *J Rheumatol* 1988;15:262-267.

¹⁶⁷ Segerberg-Konttinen M. Focus score in sialolithiasis. *Scand J Rheumatol* 1988;17:87-89.

¹⁶⁸ De Wild PCM, Kater L, Baak JPA, Van Houwelingen JC, Hené RJ, Slootweg PJ. A new and highly sensitive immunohistologic diagnostic criterion for Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1989;32:1214-1220.

¹⁶⁹ Linnvall AM, Jonsson R. The salivary gland component of Sjögren's syndrome: an evaluation of diagnostic methods. *Oral Surg* 1986;62:32.

¹⁷⁰ Daniels TE, Fox PC. Salivary and oral components of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:571-590.

¹⁷¹ Alspaugh M, Whaley K. Sjögren's syndrome. En: Kelly W Harris Eds. *Textbook of Rheumatology*. New York: sunders,1982 pp 971-997.

¹⁷² Lindahl G, Hefords E. Lymphocytic infiltrates and epithelial HLA-DR expression in lip salivary glands in connective disease patients lacking sicca. *Br J Rheumatol* 1989;28:293-298.

¹⁷³ Waterhouse J, Doniach I. Postmortem prevalence of focal lymphocytic adenitis of submandibular gland. *J Pathol* 1966;91:53-81.

¹⁷⁴ Dumonde DC, Wolstencroft RA, Panayi GS, Mathew M, Morley J, Howson WT. "Lymphokines": non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature* 1969;224:38-42.

¹⁷⁵ Bennett B, Bloom BR. Reactions in vivo and in vitro produced by a soluble substance associated with delayed-type hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;59:756-762.

¹⁷⁶ Kasakura S. Heterogeneity of blastogenic factors produced in vitro by antigenically stimulated and unstimulated leukocytes. *J Immunol* 1970;105:1162-1167.

¹⁷⁷ Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966;153:80-82.

¹⁷⁸ Medzhitov R, Janeway Ch. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-344

-
- ¹⁷⁹ Delves PJ, Roitt IM. The Immune system. *N Engl J Med*. 2000;343:37-49
- ¹⁸⁰ Tilg H, Diehl MA. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000;343:1467-1476.
- ¹⁸¹ Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344:350-362.
- ¹⁸² Kay AB. Allergy and allergic diseases. *N Engl J Med* 2001;344:30-37.
- ¹⁸³ Mire-Sluis AR, Thorpe R, eds. Cytokines. San Diego, Calif.:Academic Press,1998.
- ¹⁸⁴ Wong GHW, Clark-Lewis U, McKimm-Breschkin JL, Harris AW, Schrader JW. Interferó- γ induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage and myeloid cell lines. *J Immunol* 1983;131:788-793.
- ¹⁸⁵ Bukowski JF, Welsh RM. Interferó enhances the susceptibility of virus-infected fibroblasts to cytotoxic T cells. *J Exp Med* 1985;161:257-262.
- ¹⁸⁶ Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-314.
- ¹⁸⁷ Croft M. Activation of naive, memory and effector cells. *Curr Opin Immunol* 1994;6:431-437.
- ¹⁸⁸ Stout RD. Macrophage activation by T cells: cognate and non-cognate signals. *Curr Opin Immunol* 1993;5:398-403.
- ¹⁸⁹ Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-251.
- ¹⁹⁰ Zinkernagel RM. Immunity to viruses. In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*. New York: Raven Press;1993. p 1211-1250.

-
- ¹⁹¹ Czarniecki CW, Fennie CW, Powers DB, Estell DA. Synergistic antiviral and antiproliferative activities of Escherichia coli-derived human alpha, beta and gamma interferons. *J Virol* 1984;49:490-496.
- ¹⁹² Wong GHW, Goeddel D. Tumor necrosis factors α and β inhibit virus replication and synergise with interferons. *Nature* 1986;323:819-822.
- ¹⁹³ Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991;77:1627-1652.
- ¹⁹⁴ Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990;8:253-278.
- ¹⁹⁵ Metcalf D, Nicola N. Colony stimulating factors. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1995.
- ¹⁹⁶ Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.
- ¹⁹⁷ Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793.
- ¹⁹⁸ Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, de Vries JE, Yssel H. *J Exp Med* 1996;184: 473-483.
- ¹⁹⁹ Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *N Engl J Med* 2000;343:108-117.

²⁰⁰ Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.

²⁰¹ Bottomly K. A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes. *Immunol Today* 1988;9:268-274.

²⁰² Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today* 1995;12:374-379.

²⁰³ Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227-257.

²⁰⁴ Croft M, Swain SL. Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *J Immunol* 1995;154:4269-4282.

²⁰⁵ Murphy E, Shibuya K, Hosken N, Openshaw P, Maino V, Davis K, Murphy K, O'Garra A. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med* 1996;183:901-913.

²⁰⁶ Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6115-6119.

²⁰⁷ Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:251-276.

²⁰⁸ Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635-673.

-
- ²⁰⁹ Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579-621.
- ²¹⁰ Kuchroo VK, Martin CA, Greer JM, Ju ST, Sobel RA, Dorf ME. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid proein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1993;151:4371-4382.
- ²¹¹ Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995;268:1185-1188.
- ²¹² Miltenburg AMM, van Laar JM, de Kupier R, Daha MR, Breedveld FC. T cells cloned from human rheumatoid synovial membrane functionally represent the Th1 subset. *Scand J Immunol* 1992;35:603-610.
- ²¹³ Quayle AJ, Chomarat P, Miossec P, Kjeldsen-Kragh J, Forre O, Natvig JB. Rheumatoid inflammatory T-cell clones express mostly Th1 but also Th2 and mixed (Th0-like) cytokine patterns. *Scand J Immunol* 1993;38:75-82.
- ²¹⁴ Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1994;152: 5532-5539.
- ²¹⁵ Boumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1995;34: 326-333.
- ²¹⁶ Ohyama Y, Nakamura S, Matsuzaki G, Shinohara M, Hiroki A, Fujimura T, Yamada A, Itoh K, Nomoto K. Cytokine messenger RNA expression in the labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:1376-1384.

²¹⁷ Schirmer O. Studien zur physiologie und pathologie der Traenenabsonderung und Traenenabfuhr: Arch Ophtal 1903;56:197.

²¹⁸ Schall G, Anderson L, Wolf R, Herdt JR, Tarpley TM Jr, Cummings NA, Zeiger LS, Talal N. Xerostomia in Sjögren's Syndrome. Evaluation by sequential salivary scintigraphy. Jama 1971;216:2109-2116.

²¹⁹ Rampson S, Bussiere JL, Sauvezie B, Hullin JP, Veyre A, Lafaye C, Rivier A. Etude systématique de la scintigraphie salivaire sequentielle au cours des polyarthrites rhumatismales et des collagénoses: a propos de cent cinquante examens. Rev Rhum 1975;24:185-194.

²²⁰ Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 1987;162:156-159.

²²¹ Balkwill FR. Interferons. Lancet 1989;13:1060-1063.

²²² Hamblin AS. Cytokine and cytokine receptors. INFOCUS 2 Edition 1994;21-23.

²²³ Delves PJ, Roitt IM. The immune system. N Eng J Med 2000;343:108-117.

²²⁴ Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath MF. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN- γ promoter in primary CD4⁺ T lymphocytes. J Immunol 1998;160:3642-3647.

²²⁵ O'Garra A. Interleukins and the immune system. Lancet 1989;1:943-946.

-
- ²²⁶ Coll J, Tomàs S, Vilella R, Corominas J Interleukin-2 receptor expression in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1995;22:1488-1491.
- ²²⁷ Abbas AK, Kennet MM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793.
- ²²⁸ Scott B, Liblau R, Degermann S, Marconi LA, Ogata L, Caton AJ, McDevitt Ho, Lo D. A role for non-MHC genetic polymorphism in susceptibility to spontaneous autoimmunity. *Immunity* 1994;1:73-83.
- ²²⁹ von Herrath MG, Guerder S, Lewicki H, Flavell RA, Oldstone MB. *Immunity* 1995;3:727-738.
- ²³⁰ Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol.*1994;12:227-257.
- ²³¹ Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh C-S, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1995;154:5071.
- ²³² Shizuo Akira. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Op Immunol* 2000; 2:59-63.
- ²³³ Ahn HJ, Maruo S, Tomura M, Mu J, Hamaoka T, Nakanishi K, Clark S, Kurimoto M, Okamura H, Fujiwara H. A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN- γ inducing factor in enhanced production of IFN- γ . *J Immunol* 1997;159:2125-2131.
- ²³⁴ Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T

cells, Th1 cells, B cells: synergism with IL-18 for IFN- γ production. *J Immunol* 1998;161:3400-3407.

²³⁵ Shevach EM, Chang JT, Segal BM. The critical role of IL-12 and the IL-12R β 2 subunit in the generation of pathogenic autoreactive Th1 cells. *Springer Semi Immunopathol* 1999;21:249-262.

²³⁶ Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH, Liew FY. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 1998;188:1485-1492.

²³⁷ Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 1998;8:383-390.

²³⁸ Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992;176:1091-1098.

²³⁹ Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990;145:3796-3806.

²⁴⁰ Kubo M, Ransom J, Webb D, Hashimoto Y, Tada T, Nakayama T. T-cell subset-specific expression of the IL-4 gene is regulated by a silencer element and STAT6. *EMBO J* 1997;16:4007-4020.

²⁴¹ Roura-Mir C, Catálfamo M, Sospedra M, Alcalde L, Pujol-Borrell R, Jaraquemada D. Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease. *Eur J Immunol* 1997;27:3290-302.

-
- ²⁴² De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down regulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-924.
- ²⁴³ Gerad C, Bruyns C, Marchant A. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxaemia. *J Exp Med* 1993; 177:547-550.
- ²⁴⁴ Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo M-G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1994;184:19-29.
- ²⁴⁵ Bacchetta R, Bigler M, Touraine J-L, Parkman R, Tovo P-A, Abrams J, de Waal Malefyt R, Roncarolo M-G. High levels of interleukine 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1994;179:493-502.
- ²⁴⁶ Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukine 10. *J Clin Immunol* 1992;12:239-247.
- ²⁴⁷ Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993;150:353-360.
- ²⁴⁸ De Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 1993;150:4754-4765.
- ²⁴⁹ De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor C, De Vries J. Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an

autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-1220.

²⁵⁰ Burdin N, Péronne C, Banchereau J, Rousset F. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J Exp Med* 1993;177:295-304.

²⁵¹ Enk AH, Katz SI. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* 1992;149:92-95.

²⁵² Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993;151:4562-4573.

²⁵³ Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Morel Fourrier B, Galanaud P, Emilie D. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994;37:1647-1655.

²⁵⁴ Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.

²⁵⁵ Kehrl JH. Transforming growth factor- β : an important mediator of immunoregulation. *Int J Cell Cloning* 1991;9:438-450.

²⁵⁶ Border WA, Noble NA. Transforming growth factor-beta in tissue fibrosis. *New Engl J Med* 1994;334:1286-1292.

²⁵⁷ Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggitt HD, Palladino MA, Thorbecke GJ. Protective effect of transforming growth factor-beta 1 on experimental autoimmune disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2918-2921.

-
- ²⁵⁸ Wahl SM, McCartney-Francis N, Mergenhagen ST. Inflammatory and immunoregulatory roles of TGF- β . *Immunol Today* 1989;23: 258-261.
- ²⁵⁹ Miossec P, Van den Berg W. Th1/Th2 cytokine balance in Arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;12:2105-2115.
- ²⁶⁰ Nicholson LB, Kuchroo VK. Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 1996;8:837-842.
- ²⁶¹ Ogawa N, Dang H, Lazaridis K, Aufdemore TB, Talal N. Analysis of transforming growth factor beta and other cytokines in autoimmune exocrinopathy (Sjögren's syndrome). *J Interferon Cytokine Res* 1995;15:759-767.
- ²⁶² Skopouli F, Moutsopoulos HM. Cytokines in Sjögren's syndrome. *Ann Med Interne* 1995;146: 219-222.
- ²⁶³ Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman Ch, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman T. Targeted disruption of mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359: 693-699.
- ²⁶⁴ Koski H, Kontinen YT, Gu X-H, Hietanen J, Malmström M. Transforming growth factor- β in labial salivary glands in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1995;54:744-747.
- ²⁶⁵ Moore KW, O'Garra A, Waal Malefyt R, de Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-190.
- ²⁶⁶ Wahl S. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* 1994;180:1587-1590.

-
- ²⁶⁷ Ding L, Shevach EM. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 1992;148:3133-3139.
- ²⁶⁸ Fiorentino D, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;146:3444-3451.
- ²⁶⁹ Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992;148:1143-1148.
- ²⁷⁰ Takeuchi M, Alard P, Streilein JW. TGF- beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol* 1998;160:1589-1597.
- ²⁷¹ Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, Vries JE de, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742.
- ²⁷² Bridoux F, Badou A, Saoudi A, Bernard I, Druet E, Pasquier R, Druet P, Pelletier L. Transforming growth factor beta (TGF-beta)-dependent inhibition of T helper cell 2 (Th2)-induced autoimmunity by self-major histocompatibility complex (MHC) class II-specific, regulatory CD4⁺ T cell lines. *J Exp Med* 1997;185:1769-1775.
- ²⁷³ Seddon B, Mason D. Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4⁺ CD45RC⁻ cells and CD4⁺ CD8⁻ thymocytes. *J Exp Med* 1999;189:279-288.
- ²⁷⁴ Cope AP. Regulation of autoimmunity by proinflammatory cytokines. *Curr Opin Immunol* 1998;10:669-676.

²⁷⁵ Plevy SE, Landers CJ, Prehn J. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997;159:6276-6282.

²⁷⁶ Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. The function of tumor necrosis factor and receptors models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis* 1999;58: (Suppl I) 132-139.

²⁷⁷ Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411-453.

²⁷⁸ Arthur R, Mason D. T cells that help B cell responses to soluble antigen are distinguishable from those producing interleukin 2 on mitogenic or allogenic stimulation. *J Exp Med.* 1986;163:774.

²⁷⁹ Mosmann T, Cherwinski H, Bond M, Giedlin M, Coffman R. Two types of murine helper T cell clon. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348.

²⁸⁰ Mitchison NA, Schubauer D, Müller B. Natural and induced regulation of Th1/Th2 balance. *Springer Semin Immunopathol* 1999;21,199-210.

²⁸¹ Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang C-R, Reiner SL. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 1998;9:229-237.

²⁸² Gett AV, Hodgkin PD. Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9488-9493.

²⁸³ Mosamnn TR, Schumacher JH, Street NF, Budd R, O'Garra A, Fong TAT, Bomd MW, Moore KWM, Sher A, Fiorentino DF. Diversity of cytokine

synthesis and function of mouse CD4⁺ T cells. *Immunol Rev* 1991;123:209-229.

²⁸⁴ Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297-322

²⁸⁵ Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635-673.

²⁸⁶ Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-251.

²⁸⁷ Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227-257.

²⁸⁸ Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579-621.

²⁸⁹ Kuchroo VK, Martin CA, Greer JM, Ju ST, Sobel RA, Dorf ME. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1993;151:4371-4382.

²⁹⁰ Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995;268:1185-1188.

²⁹¹ Miossec P, Van den Berg W. Th1/Th2 cytokine balance in Arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;12:2105-2115.

²⁹² Nicholson LA, Kuchroo VK. Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 1996;8:837-842.

²⁹³ Oxholm P, Daniels TE, Bendtzen K. Cytokine expression in labial salivary glands from patients with primary Sjögren's Syndrome. *Autoimmunity* 1992;12:185-192.

²⁹⁴ Konttinen YT, Kemppinen P, Koski H, Li T-F, Jumppanen M, Hietanen J, Santavirta, Larsson A, Hakala M, Sorsa T. Th1 cytokines are produced in labial salivary glands in Sjögren's syndrome, but also in healthy individuals. *Scand J Rheumatol* 1999;28:106-112.

²⁹⁵ Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986;320:584-588.