

Síndrome de Sjögren primario

Características clínicas e inmunogenéticas

Juan Manuel Anaya, Paula A. Correa • Medellín.
Rubén Darío Mantilla • Santafé de Bogotá, Colombia

Objetivo: examinar las características clínicas del síndrome de Sjögren (SS) primario en pacientes colombianos, y analizar la asociación de los genes HLA-DRB1 y DQB1 con la presencia y la severidad de la enfermedad.

Métodos: este fue un estudio transversal y comparativo. Todos los pacientes cumplieron con los criterios europeos para la clasificación del SS primario, incluyendo una biopsia positiva de las glándulas salivales menores (GSM); y fueron evaluados utilizando un registro que incluyó el compromiso exocrino y no exocrino de la enfermedad. Los anticuerpos antinucleares se determinaron por IFI en células Hep-2, los anticuerpos anti-Ro (IgG) y anti-La (IgG) se determinaron por ELISA. El polimorfismo de los genes HLA-DRB1 y DQB1 fue examinado mediante reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencia específica. La severidad de la enfermedad fue determinada por la relación entre el puntaje por focos inflamatorios en GSM (método de Daniels) y la duración de la enfermedad (en años).

Resultados: se estudiaron 74 pacientes (97% mujeres) de Medellín y Santafé de Bogotá, y 76 individuos sanos apareados por edad, sexo y geografía. La enfermedad tuvo una presentación clínica similar a la del resto del mundo, y se asoció con el haplotipo HLA-DRB1*0301- DQB1*0201 (OR: 4.3, IC 95%: 1.6 -12, p=0.002). Este a su vez se asoció con una severidad > 1 (OR: 15.5, IC 95%: 1.8-129, p=0.001), a la presencia de anticuerpos anti-Ro (OR: 3.8, IC 95% 1-15, p=0.04) y de anticuerpos anti-La (OR: 4.3, IC 95%:1.3-14, p=0.01). La frecuencia alélica del HLA-DQB1*0602 fue mayor en los controles (0.303) que en los pacientes (0.121) (OR: 0.3, IC 95%: 0.2 -0.8, p=0.01).

Conclusión: el presente estudio describe las características clínicas del SS primario, confirmando la similitud de éstas en diferentes razas, y muestra, por primera vez en la población colombiana, la asociación del HLA-DRB1*0301-DQB1*0201 a la enfermedad y a su gravedad, así como el papel protector del HLA-DQB1*0602. La presencia de una carga positiva en la posición β 71 del HLA-DRB1*0301 y DQB1*0201 así como una carga negativa en la posición β 74 del HLA-DQB1*0602 permite una explicación funcional del papel de estos alelos en la predisposición y protección de la enfermedad. (*Acta Med Colomb* 1999;24:127-136).

Palabras clave: Síndrome de Sjögren primario, autoinmunidad, genética, HLA.

Introducción

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por un infiltrado linfoplasmocítico benigno de glándulas exocrinas, que conlleva a disminución o ausencia de secreciones glandulares y sequedad de mucosas, en particular de la oftálmica y la oral, ocasionando las manifestaciones clínicas de xeroftalmía y xerostomía (síntomas secos) (1). La etiología del SS es desconocida y los mecanismos patogénicos tienen características autoinmunes, por cuanto la enfermedad se conoce también como epitelitis autoinmune, dado que la célula epitelial de las mucosas es el blanco de la enfermedad (2). El SS se asocia con la producción de autoanticuerpos tales

como el factor reumatoideo, los anticuerpos antinucleares (AAN), anti-alfa-fodrina y anti-receptores muscarínicos (1, 3,4). La enfermedad afecta principalmente a las mujeres en la quinta década de la vida, con una prevalencia aproximada de 3% de la población general (5,6).

El SS puede asociarse a otra enfermedad autoinmune, en particular a la artritis reumatoidea (SS secundario), o presentarse aisladamente como entidad única (SS primario).

Dr. Juan Manuel Anaya y Lic. Paula A. Correa: Unidad de Reumatología, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín; Dr. Rubén D. Mantilla: Unidad de Reumatología, CIB y Clínica de Artritis y Rehabilitación, Santafé de Bogotá.

La presentación del SS primario es insidiosa, siendo los síntomas secos la principal forma de inicio en adultos, mientras que la forma juvenil se manifiesta más frecuentemente con parotidomegalia (7). Además del compromiso exocrino de superficie (síntomas secos), los pacientes con SS primario pueden presentar manifestaciones de compromiso exocrino interno y no exocrino (articular, pulmonar, renal, gástrico, vascular, hematológico y neurológico) (1). Dado su carácter crónico y las características clínicas mencionadas, la enfermedad tiene un efecto adverso sobre la calidad de vida de los pacientes, con repercusiones físicas, psicológicas y sociales (6). El principal factor de morbilidad de la enfermedad es el alto riesgo de transformación hacia linfoma maligno (8).

El SS primario en individuos caucásicos, es una de las enfermedades autoinmunes asociadas a los genes HLA-DR3 (9-16). Sin embargo, esta asociación no ha sido observada en otros grupos étnicos (17-22). El HLA-DR3 corresponde a la especificidad determinada por serología; a la cual, por análisis molecular, corresponden 16 subtipos, dados por las variables alélicas que se presentan en el gen DRB1. Las moléculas HLA clase II están conformadas por un heterodímero de dos cadenas, la α o pesada, y la cadena β o liviana, cada una de las cuales tiene dos dominios: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$. Los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ conforman la fosa de enlace para los péptidos que son presentados al receptor de los linfocitos T CD4. Los genes que codifican para las moléculas clase II están ubicados en el brazo corto del cromosoma 6. Dentro de este grupo están los genes para las moléculas DR, DQ, DP, DN/DO y DM. Las moléculas DR son codificadas por el gen DRA para la cadena α , y el DRB1 para la β . Mientras el gen DRA es conservado el DRB1 es altamente polimórfico. Las moléculas DQ son codificadas por el gen DQA1 para la cadena α y el DQB1 para la β . Aunque ambos genes DQ son polimórficos, el gen DQB1 lo es en mayor grado (23).

La importancia del análisis de los genes del sistema HLA en enfermedades autoinmunes radica no sólo en encontrar la asociación de éstos con la susceptibilidad o protección que pueden conferir a una determinada enfermedad, sino en la influencia que pueden tener en la severidad de la misma, y por lo tanto, al papel predictivo que puede tener su análisis en pacientes con diagnóstico temprano. En el presente estudio evaluamos las características clínicas e inmunogenéticas del SS primario en 74 pacientes colombianos.

Material y métodos

Pacientes y controles

Este fue un estudio multicéntrico, transversal y controlado, en el que los pacientes fueron incluidos de manera consecutiva, y atendidos en la unidad de reumatología de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) en Medellín, y en la Clínica de Artritis y Rehabilitación, en Santafé de Bogotá. Fueron incluidos todos los pacientes

con sospecha clínica de SS que cumplieron con al menos cuatro de los criterios europeos de la clasificación para SS primario (24) (Tabla 1) (incluyendo biopsia positiva de glándulas salivales accesoria). Fueron excluidos los pacientes con enfermedad inflamatoria o autoinmune reumatólogica distinta al SS (artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia), embarazo, lactancia, antecedente de linfoma maligno, enfermedad infecciosa (ej. SIDA, malaria, tuberculosis), inmunosupresión (trasplante de órgano), historia de abuso de drogas o alcohol, y aquellos con evidencia de actitud no cooperativa.

Los controles necesarios para el estudio de HLA, fueron personas, exentas de enfermedad inflamatoria, apareados a los pacientes por edad (± 5 años), sexo y geografía. En ningún caso fueron familiares de los pacientes.

Consentimiento oral y uso de la información obtenida

Cada paciente involucrado en el presente estudio fue informado de los fines y propósitos de éste. Se garantizó la absoluta reserva de la identidad y, previa información completa del estudio, se solicitó el consentimiento oral para la toma de muestras y revisión de historias clínicas. El presente estudio fue aprobado por el comité de ética de la CIB.

VARIABLES CLÍNICAS

Para la realización del presente estudio se empleó un registro que incluyó variables demográficas, manifestaciones de compromiso exocrino y no exocrino de la enfermedad, antecedentes y comorbilidad. Dado que los centros que participaron en este estudio son de tercer nivel, las historias clínicas previas fueron revisadas cada vez que fue necesario. Sólo se registraron las manifestaciones clínicas evidentes. Se prestó particular atención en la diferenciación de artritis y artralgias. La artritis fue considerada cuando el examen físico la reveló. Se consideró la miositis sólo en caso de aumento de las enzimas y la biopsia musculares en favor de tal diagnóstico. Las manifestaciones dermatológicas consideradas fueron xerodermia, fotosensibilidad, púrpura y urticaria. A pesar de que estas dos últimas pueden corresponder histológicamente a una vasculitis leucocitoclástica, la presencia de vasculitis fue considerada con base en la biopsia reportada como tal. Se consideró como fenómeno de Raynaud la presencia de la crisis paroxística típica (25). La acidosis tubular distal fue registrada en caso de pH urinario >7 y bicarbonato sérico <20 mEq/dL (26). En ningún caso se practicó biopsia renal. El compromiso neurológico asociado se consideró en caso de síndrome del túnel del carpo evidente al examen clínico, con la presencia de la prueba de Tinel positiva y/o confirmación electromiográfica, la que también fue requisito para confirmar una neuropatía periférica. El compromiso tiroideo fue confirmado por análisis hormonal. El compromiso pulmonar fue evaluado por el interrogatorio, el examen físico y la radiografía del tórax. La xerostráquea/tos fue evaluada inde-

pendientemente de la presencia o el antecedente de tabaquismo. La disfagia fue evaluada por el interrogatorio. Se consideró la presencia de gastritis asociada a la enfermedad cuando, además de los síntomas de epigastralgia, la endoscopia digestiva fue confirmatoria, el test de ureasa y la biopsia fueron negativos para *Helicobacter pylori*. La hepatitis autoinmune se confirmó por el aumento de las transaminasas, la presencia de anticuerpos antimúsculo liso y la biopsia hepática en favor de este diagnóstico, así como por ausencia de serología para hepatitis viral A, B, y C. La leucopenia se consideró cuando los glóbulos blancos fueron inferiores a 4.000mm³. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se clasificaron de acuerdo con el esquema propuesto por Manthorpe et al (27) (Figura 1).

El registro empleado involucró también la presencia o ausencia de factores asociados y comorbilidad, tales como la hipertensión arterial, las enfermedades tromboticas, la ulcera péptica confirmada por endoscopia digestiva, la enfermedad renal no asociada al SS primario (ej. pielonefritis), la osteoporosis (definida por fractura vertebral, de cuello femoral o radial, dado que no se practicó osteodensitometría), la fibromialgia, definida por la queja de polialgia difusa y la presencia de dolor a la palpación de, al menos, 11 de los 18 puntos definidos para su clasificación diagnóstica (28). Se evaluó también el antecedente de aborto no voluntario ni iatrogénico.

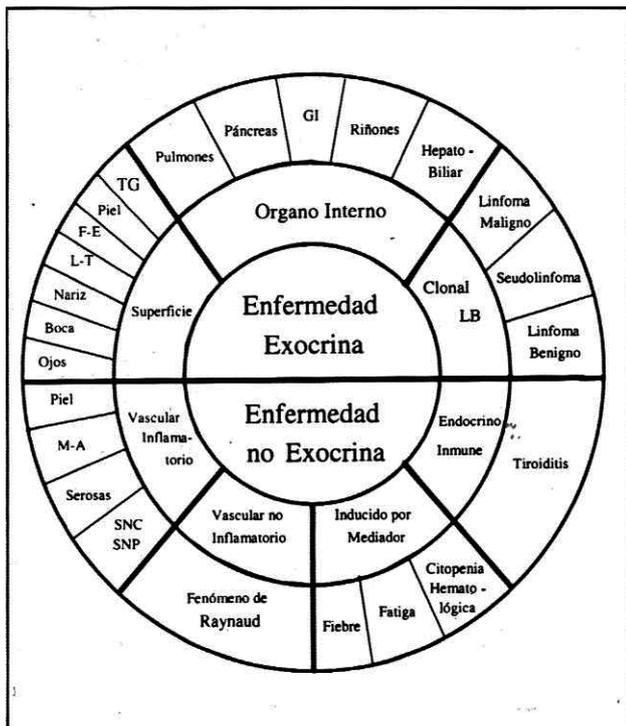


Figura 1. Clasificación de las manifestaciones clínicas del síndrome de Sjögren primario según Manthorpe et al (27).
 Abreviaciones: L-T: laringe-tráquea, F-E: faringe-esófago, T-G: tracto genital, GI: gastrointestinal, LB: linfocito B, SNC: sistema nervioso central, SNP: sistema nervioso periférico, M-A: músculos-nervios.

Muestras biológicas

Previa información sobre el carácter del presente estudio y una vez obtenido el consentimiento oral, a cada paciente y a cada control, se le tomaron 14 cc de sangre, la cual fue repartida así: 7 cc en tubo tratado con ácido etilen-diaminotetracético, para posterior extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) (29, 30), y 7 cc en tubo seco para extracción posterior de suero. Todas las muestras, incluyendo las biopsias de glándulas salivales, se procesaron y se analizaron en el laboratorio de la unidad de reumatología de la CIB.

Biopsia de glándula salival accesoria

La biopsia de las glándulas salivales accesorias se practicó, previo consentimiento oral, en todos los pacientes. Este procedimiento se hizo bajo anestesia local con lidocaína al 2% luego de una incisión en la mucosa del labio inferior. Se extrajeron, por lo menos, cuatro lóbulos. El análisis histológico de las biopsias de glándulas salivales se realizó en cortes de una a tres micras luego de haber fijado el tejido glandular en formol neutro al 10%, procesado en parafina y coloreado con hematoxilina-eosina. El resultado fue considerado en favor del compromiso oral del SS cuando se observó sialoadenitis focal con importante infiltrado linfoplasmocitario (Figura 2). Este infiltrado fue clasificado de acuerdo con puntaje por focos inflamatorios, en donde un foco equivale a 50 células mononucleares por 4 mm² (31). Un puntaje >1 es altamente específico para el diagnóstico del SS (32). La confirmación del puntaje por focos fue realizada mediante análisis semi-automático, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Puntaje por focos} = \frac{\text{número de focos inflamatorios} \times 4}{\text{área de glándulas salivales (mm}^2\text{)}}$$

La severidad del SS se definió mediante el índice entre el puntaje por focos y el tiempo de duración de la enfermedad (en años), a partir del momento en que aparecieron los primeros síntomas. Por estudios previos se sabe que el puntaje por focos progresa con el tiempo de duración de la enfermedad (33-35).

Autoanticuerpos

Los AAN fueron determinados por inmunofluorescencia indirecta en células HEp-2 (36). La detección de los anticuerpos específicos, tales como anti-DNA nativo, anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro y anti-La, se realizó por el método inmunoenzimático, utilizando el estuche comercial "EL-ANA Profiles" (INCSTAR, Stillwater, Minnesota, E.U.), previamente validado (37). En resumen, a los pozos con cada uno de los diferentes antígenos se les agregó una dilución 1:101 de las muestras de suero (100 µl), y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar los pozos, se agregó el anticuerpo secundario (anticuerpos de cabra anti-IgG humana) conjugado con peroxidasa de rábano y se incubó 30 minutos más. Luego de eliminar las

uniones inespecíficas mediante lavado, la unión antígeno-anticuerpo se reveló con tetrametilbenzidina en presencia de peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con ácido fosfórico. Los platos fueron leídos a 450 nm de longitud de onda (lector de ELISA BIO-RAD modelo 550). Se realizaron los controles apropiados de calidad, según las instrucciones del estuche. Los títulos se determinaron teniendo en cuenta la absorbancia y las unidades/ml de los calibradores. La seropositividad se estimó cuando el título de la muestra superó el umbral dado para cada clase de antígeno.

Estudio del HLA

Antes de la tipificación, se revisó el ADN en un gel de agarosa al 1%, para descartar la degradación de la muestra. La tipificación del HLA-DRB y DQB1 se realizó usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencia específica (PCR-SSP) tal como fue descrito previamente (30).

Análisis estadístico

Los resultados individuales se recolectaron en un banco de datos y se analizaron con el paquete WinSTAT 1.0 (38). Los resultados se muestran en promedios \pm error estándar de la media (SE), y en porcentajes. Las frecuencias alélicas evaluadas se calcularon de acuerdo con el método de Haldane (39). La asociación entre las características clínicas entre sí y los factores asociados se evaluaron por el test de χ^2 y el test exacto de Fisher a dos colas, de acuerdo con la prueba de normalidad. Las correlaciones entre los títulos de autoanticuerpos y las variables clínicas, incluyendo el puntaje por focos, se establecieron mediante la prueba de Spearman (40). La intensidad de las asociaciones se calculó mediante la razón de disparidad ["Odds Ratio" (OR)] (41). La evaluación de cuánto de la asociación entre el (los) alelo examinado(s) y el SS fue debida a la presencia de éste, se determinó mediante el cálculo de la fracción etiológica (41). En todos los casos se consideró significativo si el valor de ρ fuera menor de 0.05.

Tabla 2. Características clínicas del síndrome de Sjögren primario en 74 pacientes colombianos

Característica	
Género, f/m	72/2
Edad al momento de la consulta (años)	49.6 \pm 1.5 (14-75)
Edad al inicio (años)	44 \pm 1.6 (12-73)
Duración de la enfermedad (años)	5.7 \pm 0.6 (0.6-30)
Compromiso exocrino de superficie*	100 %
Compromiso inflamatorio vascular*	76 %
Compromiso exocrino interno*	30 %
Fenómeno de Raynaud*	31 %
Tiroiditis*	22 %
Leucopenia*	17 %
Linfoma*	0

* Durante el transcurso de la enfermedad (Figura 1)

Tabla 1. Criterios de clasificación diagnóstica del síndrome de Sjögren*

1. Síntomas oculares: <i>Definición:</i> respuesta positiva al menos a una de las siguientes: a. ¿Ha tenido usted diariamente, persistentemente, la molestia de ojos secos durante más de tres meses? b. ¿Tiene usted la sensación recurrente de arena en los ojos? c. ¿Usa usted lágrimas artificiales más de tres veces al día?
2. Síntomas orales: <i>Definición:</i> respuesta positiva al menos a una de las siguientes: a. ¿Ha tenido usted diariamente la sensación de boca seca durante más de tres meses? b. ¿Ha tenido usted persistentemente o recurrentemente aumento en las glándulas salivales? c. ¿Toma usted frecuentemente líquidos para facilitar la deglución de alimentos sólidos?
3. Signos oculares: <i>Definición:</i> evidencia objetiva de compromiso ocular, determinada por el resultado positivo de al menos una de las siguientes dos pruebas: a. Prueba de Schirmer (< 5 mm en 5 minutos). b. Prueba de Rosa de Bengala (> 4).
4. Características histopatológicas: <i>Definición:</i> puntaje por focos > 1 en la biopsia de glándulas salivales accesorias.
5. Compromiso de glándulas salivares <i>Definición:</i> evidencia objetiva de compromiso salival, determinada por el resultado positivo de al menos una de las siguientes tres pruebas: a. Gamagrafía salival (hipocaptación). b. Sialografía de parótida (dilatación de canales salivales) c. Flujo salival sin estímulo disminuido (< 1.5 ml en 15 minutos).
6. Autoanticuerpos <i>Definición:</i> presencia, en suero, de al menos uno de los siguientes: a. Anticuerpos antinucleares. b. Anti-Ro/SSA o anti-La/SSB c. Factor reumatoideo.

* Cuatro de los seis criterios se necesitan para clasificar un paciente con síndrome de Sjögren. Otras enfermedades tales como sarcoidosis, enfermedad del injerto contra el huésped, SIDA, y linfoma deben ser excluidas (Ref. 24). En el presente estudio todos los pacientes necesitaron tener el criterio 4. Ningún paciente presentó otra enfermedad autoinmune reumatológica (ver material y métodos).

Resultados

Características clínicas

Se involucraron 74 pacientes en este estudio, 72 mujeres y dos fueron hombres. Todos los pacientes presentaron al menos cuatro de los seis criterios para clasificación diagnóstica (Tabla 1). Todos los pacientes, excepto una,

Tabla 3. Forma de presentación del síndrome de Sjögren primario en 74 pacientes colombianos

Característica	N	%
Síntomas secos*	43	58
Parotidomegalia	8	11
Artralgias	6	8
Artritis	5	7
F. de Raynaud	5	6.7
Urticaria vasculítica	2	2.7
Vasculitis linfocítica	1	1.3
Púrpura hipergamaglobulinémica	1	1.3
Púrpura trombocitopénica autoinmune	1	1.3
Síndrome del túnel del carpo	1	1.3
Acidosis tubular renal tipo 2	1	1.3

* Xerostomía y/o xeroftalmía.

fueron mayores de 18 años. Las características clínicas de los pacientes están resumidas en la Tabla 2.

En 58% de los casos la enfermedad se manifestó por síntomas secos (xerostomia y/o xeroftalmía); en 11% la parotidomegalia bilateral fue el signo revelador de la enfermedad, mientras que en 31% de los casos la enfermedad fue revelada por una manifestación sistémica (Tabla 3).

Durante el transcurso de la enfermedad (5.7 ± 0.6 años), todos los pacientes presentaron compromiso exocrino de superficie, en particular xeroftalmía, xerostomia, xerodermia o xerotrquea. Esta última fue independiente del antecedente de tabaquismo. Veintidós pacientes (30%) presentaron compromiso exocrino interno, de los cuales diez presentaron compromiso pulmonar, nueve gastrointestinal, un paciente hepatopatía autoinmune y otro acidosis tubular renal tipo 2. Cincuenta y seis pacientes (76%) presentaron compromiso inflamatorio y/o vascular, de los cuales 53 (72%) presentaron artralgia (34 pacientes) y/o artritis (19 pacientes), en particular de articulaciones de las manos y las rodillas. La presencia de artralgia y/o artritis se asoció con el fenómeno de Raynaud ($p=0.01$) y de hipotiroidismo ($p=0.01$). En todos los casos de artritis, en las radiografías no se demostraron erosiones óseas. Un análisis detallado de las manifestaciones musculoesqueléticas de la enfermedad y su relación con el factor reumatoideo se presenta en otro informe.

El síndrome del túnel del carpo se observó en seis pacientes. En 33% de los pacientes se encontró fotosensibilidad. No observamos en estos pacientes compromiso del sistema nervioso central ni tampoco pacientes con miositis. El fenómeno de Raynaud, aunque se presentó en 23 pacientes (31%), no fue responsable de ulceraciones digitales en ningún caso. En 16 de 73 pacientes (22%) se observó una disfunción tiroidea. En todos los casos, excepto en uno, se trató de un hipotiroidismo ($TSH > 10$ mUI/ml). Una paciente presentó enfermedad de Graves asociada al SS. No se encontró aso-

Tabla 4. Comorbilidad y factores asociados en pacientes colombianos con síndrome de Sjögren primario

Característica	%
Hipertensión arterial	15
Úlcera gástrica	**9.4
Fibromialgia	12
Enfermedad renal	3.8
Antecedente de aborto	28.2
Historia de tabaquismo	7.7

Tabla 5. Características inmunogenéticas del síndrome de Sjögren primario en 74 pacientes colombianos

Característica	%
HLA-DRB1*0301, DRB3*0101, DQB1*0201	24
Anticuerpos antinucleares	85
Anticuerpos anti-Ro/SSA	58
Anticuerpos anti-La/SSB	39
Factor reumatoideo total	50

ciación entre la edad o la duración de la enfermedad y las manifestaciones sistémicas evaluadas.

La presencia de factores asociados y de comorbilidad se resume en la Tabla 4. La fibromialgia, observada en 12% de los pacientes, fue independiente de la presencia de hipotiroidismo.

Tabla 6. Frecuencias alélicas del HLA-DRB1 en pacientes colombianos con síndrome de Sjögren primario.

Alelos	Pacientes		Controles	
	N=74	Frecuencia alélica	N=76	Frecuencia alélica
*0101	6	0.081	11	0.145
*01012	0	0	1	0.013
*0103	2	0.027	0	0
*0102/04	1	0.014	3	0.040
15	7	0.094	18	0.237
*1602/5/6/7	3	0.041	2	0.026
*1601/3/4/8	4	0.054	2	0.026
0301	18	0.243	6	0.079
*03	2	0.027	2	0.026
*04	15	0.202	14	0.184
*11	15	0.202	12	0.158
*12	3	0.041	5	0.066
*13	10	0.135	13	0.172
*14	12	0.162	1	0.013
*0701	18	0.248	17	0.224
*08	16	0.216	16	0.211
*0901	3	0.041	2	0.026
*09012	3	0.041	2	0.026
*1001	1	0.014	3	0.040
Blanco	9	0.121	7	0.092

* Ver Tabla 8

Tabla 7. Frecuencias alélicas del HLA-DQB1 en pacientes colombianos con síndrome de Sjögren primario.

Alelos	Pacientes		Controles	
	N=74	Frecuencia alélica	N=76	Frecuencia alélica
0201	41	0.554	25	0.328
*0301	12	0.162	15	0.197
*0302	4	0.054	3	0.039
*0303	14	0.189	14	0.184
*0304	0	0	5	0.066
*0301/04	5	0.067	2	0.026
*0302/03	14	0.189	11	0.148
*03	2	0.027	2	0.026
*0401/02	9	0.121	9	0.118
*0501	5	0.067	4	0.053
*0503	6	0.081	4	0.053
*05	0	0	2	0.026
*0601	3	0.041	2	0.026
0602	9	0.121	23	0.303
*0603	0	0	0	0
*0607	4	0.054	0	0
*06	15	0.203	18	0.237
Blanco	6	0.081	13	0.171

* Ver Tabla 8

Características inmunogenéticas

Los AAN fueron observados en 85% de los pacientes. Los patrones homogéneo y moteado fueron los más frecuentes. El 58% de los pacientes presentaron anticuerpos anti-Ro y 39% anticuerpos anti-La (Tabla 5). Dos pacientes presentaron anticuerpos anti-RNP. Ningún paciente presentó anticuerpos anti-DNA nativo ni anti-Sm. Se observó una asociación entre los títulos de anticuerpos anti-Ro y las manifestaciones musculoesqueléticas ($p=0.01$) y las dermatológicas ($p=0.03$). Los títulos de los anticuerpos anti-Ro y anti-La estuvieron correlacionados entre sí ($r=0.8$, $p<0.01$). No se observaron correlaciones entre el título de

Tabla 8. Frecuencias alélicas del HLA-DRB1 y DQB1 asociados a la predisposición y protección del síndrome de Sjögren primario en población colombiana.

Haplotipo/Alelo	Pacientes N=74	Controles N=76	OR	IC 95%	p
DRB1*0301-DQB1*0201	0.240	0.066	4.3	1.6 – 11.9	0.002
DRB1*0301	0.243	0.079	3.6	1.4 – 9.2	0.006
DQB1*0201	0.554	0.328	1.9	1.1 – 3.4	0.02
DRB1*15	0.094	0.237	0.3	0.1 – 0.8	0.02
DQB1*0602	0.121	0.303	0.3	0.2 – 0.8	0.01
DRB1*15-DQB1*0602	0.04	0.131	0.3	0.07-1	0.07

Tabla 9. Influencia del haplotipo HLA-DRB1*0301-DQB1*0201 en el síndrome de Sjögren primario.

Variable	OR	IC 95%	p
Severidad $\geq 1^*$	15.5	1.8 – 129	0.001
Anticuerpos anti-La	4.3	1.3 – 14	0.01
Anticuerpos anti-Ro	3.8	1 – 15	0.04

* La severidad corresponde al índice entre el puntaje por focos y la duración de la enfermedad.

autoanticuerpos y el puntaje por focos inflamatorios. En el transcurso de este estudio, durante un promedio de 18 + 3 meses, se evaluó longitudinalmente el título de autoanticuerpos en 36 pacientes, observándose una ausencia de variación significativa.

Las frecuencias alélicas de los genes HLA-DRB1 están señaladas en la Tabla 6 y de los DQB1 en la Tabla 7. La enfermedad se asoció al haplotipo HLA-DRB1*0301, DRB3*0101, DQB1*0201, los cuales están en desequilibrio de enlace (42). Este haplotipo se observó en 18 pacientes (uno homocigoto) y en seis controles (OR: 4.3, IC 95%: 1.6-11.9, $p=0.002$) (Tabla 8). La fracción etiológica de este haplotipo fue de 18%, el cual se asoció con una enfermedad más severa y con la síntesis de autoanticuerpos anti-La y anti-Ro (Tabla 9). 93% de los pacientes que presentaron este haplotipo tuvo una severidad ≥ 1 (puntaje por focos/duración de la enfermedad en años). La frecuencia alélica del HLA-DQB1*0602 fue mayor en los controles (0.303) que en los pacientes (0.121) (OR: 0.3, IC 95%: 0.2 - 0.8,

$p=0.01$). Igualmente, el HLA-DRB1*15 fue observado con mayor frecuencia en los controles (Tablas 6 y 8).

Discusión

El presente estudio define las características clínicas e inmunogenéticas del SS primario en un grupo numéricamente importante de los pacientes colombianos. Las características clínicas fueron similares a las de pacientes colombianos informados previamente y a las de diferentes grupos étnicos (1,43,44), resaltando la homogeneidad de la expresión clínica de la enfermedad independientemente de la situación geográfica y raza. A pesar de ser una enfermedad que afecta principalmente al sexo femenino entre la cuarta y quinta décadas de la vida, el SS primario puede observarse con similares características clínicas tanto en hombres como en niños (5, 7). En una tercera parte de los pacientes, la enfermedad se manifiesta por compromiso sistémico, el cual puede aparecer hasta en 76% durante el transcurso de la misma, siendo las poliartralgias, la fotosensibilidad y el fenómeno de Raynaud los más frecuentes. Cerca de 20% de los pacientes puede desarrollar compromiso sistémico importante aun luego de varios años de haberse diagnosticado la enfermedad (45). Es probable que la frecuencia de éste sea muy inferior en pacientes atendidos en servicios de odontología y de oftalmología.

No observamos pacientes con linfoma, sin embargo no se realizaron biopsias de parótida en quienes presentaron parotidomegalia persistente. La ausencia de linfoma y de compromiso del sistema nervioso central en los sujetos de este estudio no es extensiva a todos los pacientes colombianos. En efecto, un caso de linfoma asociado al SS primario ha sido previamente informado en un paciente colombiano (46). A pesar de que el riesgo relativo de desarrollar linfoma en pacientes con SS sea alto, la frecuencia de éste es inferior a 10% (8).

En 15% de los casos se presentó al menos una segunda enfermedad (comorbilidad), de las cuales la hipertensión arterial fue la más frecuente, sin que existiera evidencia sugestiva de una asociación causal. La fibromialgia se observó en 12% de los casos, y fue independiente de la presencia de hipotiroidismo. Esta se encontró previamente en pacientes con SS primario hasta en 25% (extremos: 9-47) (47, 48), y en otras enfermedades autoinmunes reumatológicas tales como el lupus eritematoso sistémico (24%) (49, 50), y la artritis reumatoidea (14%) (51), así como también en la osteoartritis (70%) (47). De otra parte, a pesar de que algunos pacientes con fibromialgia puedan presentar síntomas secos, fenómeno de Raynaud, y AAN (52), la prevalencia de SS primario en pacientes con fibromialgia es inferior a 10% (53). Por lo tanto, en quienes se sospeche fibromialgia y presenten síntomas secos y/o AAN, la biopsia de glándulas salivales está indicada con el fin de establecer un diagnóstico correcto. Una biopsia de glándulas salivales con un puntaje por focos menor a uno es altamente específica del SS (32). El diagnóstico patológico

diferencial más frecuente es la sialoadenitis crónica (Figura 2), que puede observarse en pacientes con fibromialgia y síntomas secos que no corresponden al SS.

Se registraron antecedentes de aborto en 28% de los pacientes, confirmando estudios previos con elevada frecuencia de éste en SS primario (54, 55). La causa es desconocida (55). En nuestro estudio no se observó asociación entre las características clínicas o inmunogenéticas evaluadas y el antecedente de aborto.

La mayoría de los pacientes con SS primario (85%) presentaron AAN en el suero (Tabla 5). La prevalencia de los anticuerpos anti-Ro en pacientes con SS primario varía entre 50 y 80%, y la de los anticuerpos anti-La entre 30 y 60% (1). Estos rangos obedecen a los diferentes métodos usados para detectar dichos anticuerpos. El método utilizado en nuestro trabajo fue previamente validado e informado como altamente específico (37). No obstante, en 24% de los pacientes con AAN no se detectaron anticuerpos específicos. Todos los pacientes con anticuerpos anti-La presentaron anticuerpos

anti-Ro, tal como se señaló previamente, y se explica por la similitud antigénica de estas ribonucleoproteínas (1). Los anticuerpos anti-Ro se unen a dos proteínas relacionadas entre sí, de peso molecular de 60 y 52 kD unidas al ácido ribonucleico (ARN) en el citoplasma humano. La función biológica de las proteínas Ro es desconocida. Los anticuerpos anti-La reconocen una fosfoproteína nuclear de 47 kD, que funciona como factor auxiliar en la fase terminal de la transcripción, lo que resulta en cambios conformacionales en la ARN polimerasa III (56).

Los títulos de los anticuerpos anti-Ro se asociaron con las manifestaciones cutáneas y articulares de la enfermedad. Sin embargo, dado el carácter transversal del estudio, esta relación no debe ser considerada de predicción. Estos anticuerpos no variaron significativamente con la duración de la enfermedad ni se correlacionaron con el grado de infiltrado inflamatorio tisular. Por lo tanto, el valor clínico de éstos en el SS primario es de diagnóstico y no de actividad de la enfermedad (1). Recientemente se han descrito dos nuevos anticuerpos en pacientes con SS primario. Los anti-alfa-fodrina, una proteína del citoesqueleto (3), y los anti-receptores muscarínicos murinos (4). Se están realizando estudios confirmatorios con el fin de evaluar el valor patogénico de éstos.

Los resultados del presente estudio señalan que en la población colombiana, los haplotipos HLA-DRB1*0301, DRB3*0101, DQB1*0201 predisponen al SS primario. Esta predisposición es similar a la de la población caucásica (11, 15, 16, 20). Además, el estudio mostró que este haplotipo no sólo predispone al SS primario (OR: 4.3), sino que también influye en su severidad (OR: 15.5). La especificidad molecular DRB3*0101 corresponde a la especificidad serológica DR52, anteriormente reportada asociada al SS primario (57); sin embargo, este alelo está en desequilibrio de enlace tanto con los alelos DRB1*03 como con DRB1*11, *12, *13 y *14, estos últimos no asociados con el SS primario. Por lo tanto, consideramos que su asociación a la enfermedad es de carácter secundario. De otra parte, nuestros resultados muestran, por primera vez, un papel protector de los alelos HLA-DRB1*15 y DQB1*0602 (Tabla 8). La PCR-SSP utilizada en este trabajo no permitió discriminar los diferentes subtipos que corresponden al DRB1*15. Estudios posteriores son necesarios para determinar el alelo específico al que corresponde esta protección. En este sentido, es interesante recordar que existe un desequilibrio de enlace entre algunos alelos DRB1*15 (*1501 y 1502) y el HLA-DQB1*0602 (42). A continuación se considerarán las características moleculares e inmunopatológicas que permiten explicar la relación entre HLA clase II y el SS primario.

Las células epiteliales de glándulas salivales de pacientes con SS primario expresan anormalmente moléculas HLA de clase II y se comportan como células presentadoras de antígeno (58). Aunque este último es desconocido, un estudio reciente señaló a la alfa-fodrina como un eventual candi-

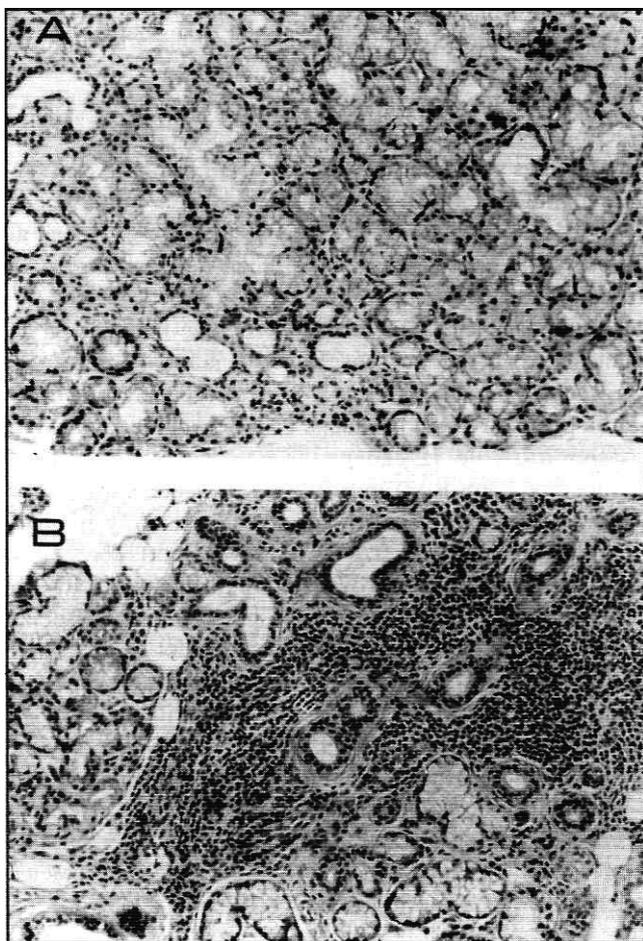


Figura 2. Biopsia de glándulas salivales.

A. Sialoadenitis crónica. Infiltración de células mononucleares en forma dispersa y poco abundante, con algunas lesiones de atrofia glandular (10x)

B. Sialoadenitis focal. Abundante infiltrado inflamatorio mononuclear, confluyente alrededor de canaliculos excretores, respetando el parénquima glandular. Esta lesión corresponde al compromiso oral del síndrome de Sjögren (10x).

dato (3). De acuerdo con la estructura cristalográfica del HLA-DR, el residuo de anclaje 4 (P4), conformado por los aminoácidos en las posiciones 13,70,71 y 74 de la cadena β , es crítico en la presentación antigénica (59). Los últimos tres residuos intervienen en el contacto con el receptor del linfocito T y, por lo tanto, son importantes en el reconocimiento del complejo péptido-molécula DR por parte de estos linfocitos. Los alelos DRB1 han sido clasificados en seis supertipos de patrón restrictivo ("supertype restrictive pattern", RSP) en función de la carga en las posiciones 70, 71 y 74 (60). Estos RSP pueden tener carga positiva o negativa o mixta, también pueden ser neutros. El alelo DRB1*0301 tiene una carga positiva en el P4 dada principalmente por una lisina en la posición 71 y una arginina en la posición 74, y corresponde al RSP R (60). Esta clasificación funcional permite unificar los diferentes resultados de asociación del HLA-DRB1 al SS primario en diferentes grupos étnicos. En efecto, los alelos DRB1 asociados con el SS primario en diferentes poblaciones, tales como el *0301 en caucásicos (11,15,16,20), *1101 y *1104 en judíos y griegos (21), *0405 en japoneses (20) y *0803 en chinos (20) comparten todos un residuo cargado positivamente en la posición 71, que corresponde ya sea a una lisina (*0301) o a una arginina (*1101, *1104, *0405 y *0803). Esta clasificación permite también una mejor comprensión del reconocimiento promiscuo de los linfocitos T, que pueden reconocer el mismo péptido cuando es presentado por diferentes moléculas de clase II. Los péptidos candidatos para ser presentados por el HLA-DRB1*0301 deben tener motivos de enlace hidrofóbico en la posición uno y una carga negativa en la posición cuatro del sitio de enlace de este péptido (60).

La asociación entre el HLA-DRB1*0301 y el SS primario no es específica, dado que se observa en otras enfermedades autoinmunes e infecciosas. El HLA-DRB1*0301 hace parte del haplotipo ancestral 8.1 (HLA-A1, Cw7, B8, C4A0, BfS, C4B1, DR3, DQ2) el cual se asocia con una respuesta inmune alterada, caracterizada por aumento en la respuesta linfocitaria B, aumento en la síntesis de autoanticuerpos, disminución en la respuesta linfocitaria T, síntesis aumentada de citoquinas proinflamatorias (TNF- α) y alteración de la apoptosis (61). La gran mayoría de estas anomalías se observan tanto en el SS primario como en otras enfermedades autoinmunes asociadas a este haplotipo ancestral (1, 2, 61). Por lo tanto es posible que este haplotipo ancestral actúe como un cofactor común en diversas enfermedades asociadas a él.

La alineación de la secuencia de aminoácidos de la cadena DQB de manera similar a la del DRB nos permitió observar que el HLA-DQB1*0201 comparte una lisina, con carga positiva, en la posición β 71 igual a la de la posición β 71 del HLA-DRB1*0301 (62). Por lo tanto, este residuo parece crítico en la susceptibilidad al SS primario en nuestra población. Otro residuo que parece importante en el HLA-DQB1*0201 es la leucina en el β 52, no observada en ninguno de los otros alelos DQB1. Esta hipótesis,

no obstante, no permite unificar los resultados observados en otras poblaciones, tales como la china, la japonesa y la judía en donde el DQB1*0601, el *0401 y el *0301, respectivamente, fueron asociados con la enfermedad (20), y cuya carga en la posición β 71 es ya sea polar sin carga o negativa (62).

En resumen, además del mecanismo de mimetismo molecular evocado en la mayoría de las discusiones sobre HLA y enfermedad (30), la participación del haplotipo HLA-DRB1*0301-DQB1*0201 en el SS primario en nuestra población está dada por su estructura molecular funcional (carga positiva en P4) y por su influencia en la respuesta inmune tanto humoral como celular.

Los alelos de protección al SS primario, HLA-DQB1*0602 y DRB1*15 comparten un ácido glutámico, con carga negativa, en la posición β 74. Nosotros consideramos que esta diferencia de cargas permite explicar, en parte, el papel que desempeñan las moléculas HLA descritas en la predisposición o protección a la enfermedad. El HLA-DQB1*0602 fue informado recientemente como un factor protector de la diabetes mellitus insulino dependiente (63), otra enfermedad autoinmune que comparte similitudes inmunogenéticas con el SS primario (2).

Estudios previos han señalado que otros genes HLA-DQ pueden predisponer a la enfermedad (13,16,21), aun en aquellas poblaciones en donde el SS primario es independiente del DRB1*0301 (20, 21). En poblaciones caucásica, judía y griega, la enfermedad se asoció al DQA*0501 (13, 16, 20, 21), el cual, de acuerdo con lo descrito, está en desequilibrio de enlace con el DQB1*0201 (42). Los genes DQ podrían participar también en la síntesis de autoanticuerpos. Reveille et al (64) mostraron la asociación de alelos HLA-DQ que poseen una glutamina en la posición 34 de la cadena DQ α 1 y una leucina en la posición 26 de la cadena DQ β 1 con la síntesis de anticuerpos anti-Ro y anti-La. No obstante, esta última observación no fue confirmada en este estudio y en otros (16). De una parte el HLA-DQB1*0602, portador de una leucina en la posición β 26, es un factor protector en nuestra población; y de otra parte, no observamos asociación entre aquellos pacientes portadores del DQB1*0602 y la síntesis de anticuerpos anti-Ro y anti-La. En la población japonesa el HLA-DQB1*0601 se asoció con la síntesis de anticuerpos anti-Ro (19). Esta última observación tampoco fue confirmada en nuestro estudio.

Finalmente, el haplotipo HLA-DRB1*0301-DQB1*0201 es responsable de cerca de 20% del SS primario en nuestra población (fracción etiológica), confirmando el carácter multifactorial de la enfermedad. Por lo tanto, además de los genes HLA-DR y DQ, aquellos que codifican para otras moléculas implicadas en la fisiopatología de la enfermedad, tales como las citoquinas, las moléculas chaperonas TAP1 y TAP2 (65-67), y las proteínas que regulan la apoptosis (68, 69), deben ser considerados en la inmunogenética del SS primario.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a los doctores Susana Restrepo y Stan McGuff por su ayuda técnica, y a aquellos colegas que nos confiaron algunos de los pacientes incluidos en este estudio. Paula A. Correa es becaria de Colciencias en el programa "Jóvenes Investigadores". Este trabajo fue financiado por Colciencias (2213-04-350-96), la Fundación Síndrome de Sjögren de Colombia y la empresa privada.

Summary

Objective. To analyze the clinical manifestations of primary Sjögren's syndrome (SS) in a hispanic population (Colombian) and to examine the influence of HLA-DRB 1 and DQB 1 genes in both susceptibility and severity of the disease.

Methods. This was a cross-sectional and comparative study. All patients met the European criteria for classification of primary SS including a positive salivary gland biopsy. Patients were evaluated using a questionnaire that sought information on exocrine and non-exocrine involvement. Antinuclear antibodies were measured by IIF on Hep-2 cells. IgG anti-Ro and anti-La antibodies were measured by ELISA. HLA typing was performed by PCR-SSP. Severity of disease was assessed by the index between focus score (by Daniels' method) and duration of disease (in years).

Results. Seventy-four patients (95% women) from Medellín and Bogotá (Colombia), and 76 healthy individuals were studied. Groups were matched for age, sex and geographic location. Clinical presentation was similar to that described in the literature. Primary SS was associated with the haplotype HLA-DRB1*0301-DQB1*0201 (OR: 4.3, 95%CI: 1.6-12, p=0.002), in turn this haplotype was associated with a severity ≥ 1 (OR: 15.5, 95%CI: 1.9-129, p=0.001), the presence of anti-Ro antibodies (OR: 3.8, 95% CI: 1-15, p=0.04) and anti-La antibodies (OR: 4.3, 95%CI: 1.3-14, p=0.01). Allelic frequency of HLA-DQB1*0602 was higher in controls (0.303) than in patients (0.121) (OR: 0.3, IC 95%: 0.2-0.8, p=0.01).

Conclusion. This study describes the clinical picture of primary SS in the Colombian population, confirming the homogeneity of the disease regardless of the geographical situation and ethnicity. HLA-DRB1*0301-DQB1*0201 is a marker of susceptibility to primary SS. Moreover, this haplotype not only predisposes to primary SS, but also affects the severity of the disease and the synthesis of autoantibodies. On the other hand, HLA-DQB1*0602 is a protective factor of disease in our population. A positive residue at β 71 of HLA-DRB1*0301 and DQB1*0201, and a negative residue at the β 74 of DQB1*0602 may explain our results.

Key words. Primary Sjögren's syndrome, autoimmunity, genetics, HLA.

Referencias

- Anaya JM, Talal N. Sjögren's syndrome and connective tissue diseases associated with other immunologic disorders. In: Koopman W. ed. *Arthritis and Allied Conditions*. 13th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1997:1561-1580.
- Anaya JM, Talal N. Sjögren's syndrome comes of age. *Semin Arthritis Rheum* 1999;28:353-358
- Haneji N, Nakamura T, Takio K, et al. Identification of alpha fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science* 1997;276:604-607.
- Bacman S, Perez CL, Sterin-Borda L, et al. Autoantibodies against lacrimal gland M3 muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:151-156.
- Anaya JM, Liu GT, D'Souza E, Ogawa N, Luán X, Talal N. Primary Sjögren's syndrome in men. *Ann Rheum Dis* 1995;54:748-751.
- Thomas E, Hay EM, Hajeer A, et al. Sjögren syndrome: a community-based study of prevalence and impact. *Br J Rheumatol* 1998;37:1069-1076.
- Anaya JM, Ogawa N, Talal N. Sjögren's syndrome in childhood. *J Rheumatol* 1995;22:1152-1158
- Anaya JM, McGuff HS, Banks PM, Talal N. Clinicopathological factors relating malignant lymphoma with Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 1996;25:337-346.
- Fye KH, Terasaki PI, Michalski JP, Daniels TE, Opelz G, Talal N. Relationship of HLA-Dw3 and HLA-B8 to Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1978;21:337-342.
- Vitali C, Tavoni A, Rizzo G, et al. HLA antigens in Italian patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1986;45:412-416.
- Fei HM, Kang H, Scharf S, Erlich H, Peebles C, Fox R. Specific HLA-DQA and HLA-DRB1 alleles confer susceptibility to Sjögren's syndrome and autoantibody production. *J Clin Lab Anal* 1991;5:382-391
- Morling N, Andersen V, Fugger L, et al. Immunogenetics of rheumatoid arthritis and primary Sjögren's syndrome: DNA polymorphism of HLA class II genes. *Dis Markers* 1991;9:289-296.
- Foster H, Walker D, Charles P, Kelly C, Cavanagh G, Griffiths I. Association of DR3 with susceptibility to and severity of primary Sjögren's syndrome in a family study. *Br J Rheumatol* 1992;31:309-314.
- Pease CT, Charles PJ, Shattles W, Markwick J, Maini RN. Serological and immunogenetic markers of extraglandular primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1993;32:574-577
- Kerttula TO, Collin P, Polvi A, Korpela M, Partanen J, Mäki M. Distinct immunologic features of Finnish Sjögren's syndrome patients with HLA alleles DRB1*0301, DQA1*0501, and DQB1*0201. Alterations in circulating T cell receptor gamma/delta subsets. *Arthritis Rheum* 1996;39:1733-1739
- Ruggenbuhl P, Jean S, Jengo P, et al. Primary Sjögren's syndrome: role of the HLA-DRB1*0301-1501 heterozygotes. *J Rheumatol* 1998;25:900-905
- Nahir AM, Scharf Y, Gidoni O, Koren L, Zonis S, Barzilai A. HL-A antigen in Sjögren's syndrome. *Ann Ophthalmol* 1980;12:1084-1086
- Roitberg-Tambur A, Brautbar C, Markitziu A, Ben-Chetrit E, Rubinow A, Friedmann A. Immunogenetics of HLA class II genes in primary Sjögren's syndrome in Israeli Jewish patients. *Isr J Med Sci* 1990;26:677-681.
- Miyagawa S, Shinohara K, Nakajima M, et al. Polymorphism of HLA class II genes and autoimmune responses to Ro/SS-A-La/SS-B among Japanese subjects. *Arthritis Rheum* 1998;41:927-934
- Kang HI, Fei HM, Saito I, et al. Comparison of HLA class II genes in Caucasoid, Chinese, and Japanese patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1993;150:3615-3623.
- Roitberg-Tambur A, Friedmann A, Sfirman C, et al. Molecular analysis of HLA class II genes in primary Sjögren's syndrome. A study of Israeli Jewish and Greek non-Jewish patients. *Hum Immunol* 1993;36:235-242.
- García Portales R, Belmonte Lope MA, Camps García MT, et al. Inmunogenética del síndrome de Sjögren en el sur de España. *An Med Intern (Madrid)* 1994;11:56-61.
- Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, et al. Nomenclature for factors of the HLA system. 1998. *Tissue Antigens* 1999;53:407-446
- Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European community. *Arthritis Rheum* 1993;36:340-347.
- Devulder B, Hatron PY, Vinckier L, Gosset D, Savinel P. Angéologie. Masson. Paris, Francia, 1988
- Caballero-Urbe CV, Kraus A, Villar R, Abasta M, Alarcón-Segovia D. Alteraciones renales del síndrome de Sjögren primario. Metabolismo anormal de calcio y fósforo. *Salud Uninorte* 1994;10:8-14
- Manthorpe R, Asmussen K, Oxholm P. Primary Sjögren's syndrome: diagnostic criteria, clinical features, and disease activity. *J Rheumatol* 1997;24(suppl. 50):8-12.
- Wolfe F, Smythe HA, Yunus R, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. Report of the multicenter criteria committee. *Arthritis Rheum* 1990;33:160-172.

29. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nuclear cells. *Nucleic Acids Res* 1988;161:1215-1218.
30. Anaya JM, Correa P, Mantilla RD, Jiménez F, Kuffner T, McNicholl JM. Prevalencia y severidad de la artritis reumatoidea en la población afrocolombiana de Quibdó. *Acta Med Colomb* 1998;23:322-333.
31. Daniels TE, Whitcher 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.
32. Vitali C, Moutsopoulos HM, Bombardieri S, et al. The European community study group on diagnostic criteria for Sjögren's syndrome. Sensitivity and specificity of test for ocular and oral involvement in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994;53:637-647.
33. Anderson LG, Cummings NA, Asosky R, et al. Salivary gland immunoglobulin and rheumatoid factor synthesis in Sjögren's syndrome. Natural history and response to treatment. *Am J Med* 1972;53:456-463.
34. Leroy JP, Pennec YL, Soulier C, Berthelot JM, Letoux G, Youinou P. Follow up study labial salivary gland lesions in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1992;51:777-780.
35. Jonson R, Kroneid U, Bäckman K, Magnusson B, Tarkowski A. Progression of sialoadenitis in Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1993;32:578-581.
36. Hollingsworth PN, Dawkins RL, Peter JB. Precise quantitation of antinuclear antibodies on HEp-2-cells without the need for serial dilution. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:374-377.
37. Froelich CJ, Wallman J, Skosey JL, Teodorescu P. Clinical value of an integrated ELISA system for the detection of 6 autoantibodies (ssDNA, dsDNA, Sm, RNP/Sm, SSA, and SSB). *J Rheumatol* 1990;17:192-200.
38. Fitch RF. WinSTAT. Versiön 3.0. Reference Manual. Cambridge, MA, Kalmia Company, Inc., 1994.
39. Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann Hum Genet* 1956;20:309-314.
40. Gross Portney L, Watkins MP. Foundations of Clinical Research. Norwalk, Connecticut, Appleton & Lange. 1993.
41. Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH. Fundamentals of Genetic Epidemiology. New York, NY, Oxford University Press, 1993.
42. Terasaki PI, Gjertson DW. HLA 1997. Los Angeles, CA, EU. UCLA Tissue Typing Laboratory, 1997.
43. Sánchez A, Chalem F. Síndrome de Sjögren primario. Aspectos clínicos e inmunológicos. *Acta Med Colomb* 1987;12:3-14.
44. Cañas C, Jiménez C, Restrepo JF, et al. Síndrome de Sjögren primario. *Rev Colomb Reumatol* 1997;4:126-130.
45. Kruize AA, Hené RJ, Van der Heide A, et al. Long-term followup of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:297-303.
46. Perez MT, Castillo A, Restrepo JF, Peña M, Iglesias A, Méndez O. Linfoma primario del pulmón asociado a síndrome de Sjögren primario. *Acta Med Colomb* 1991;16:222-226.
47. Vitali C, Tavoni A, Neri R, Castrigiovanni P, Pasero G, Bombardieri S. Fibromyalgia features in patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1989;18:21-27.
48. Anaya JM, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos H, Talal N. Primary Sjögren's syndrome in North-American and Greek patients. *Arthritis Rheum* 1995;38(suppl):300.
49. Morand EF, Miller MH, Whittingham S, Littlejohn GO. Fibromyalgia syndrome and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1994;3:187-191.
50. Middleton GD, McFarlin JE, Lipsky PE. The prevalence and clinical impact of fibromyalgia in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994;37:1181-1188.
51. Wolfe F, Cathey MA, Kleinheksel SM. Fibrositis (fibromyalgia) in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1984;11:814-818.
52. Dinerman H, Goldenberg DL, Felson DT. A prospective evaluation of 118 patients with the fibromyalgia syndrome: prevalence of Raynaud's phenomenon, sicca symptoms, ANA, low complement, and Ig deposition at the dermal-epidermal junction. *J Rheumatol* 1986;13:368-373.
53. Bonafede RP, Downey DC, Bennet RM. An association of fibromyalgia with primary Sjögren's syndrome: a prospective study of 72 patients. *J Rheumatol* 1995;22:133-136.
54. Anaya JM, D'Souza E, Talal N. Health status and gynecological assessment in women with primary Sjögren's syndrome (resumen). *Arthritis Rheum* 1995;38(suppl):S376.
55. Juikunen H, Kaaja R, Kurki P, Palosuo T, Friman C. Fetal outcome in women with primary Sjögren's syndrome. A retrospective case-control study. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:65-71.
56. Scofield RH, Farris AD, Horsfall AC, Harley JB. Fine specificity of the autoimmune response to the Ro/SSA and La/SSB ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum* 1999;42:199-209.
57. Wilson RW, Provost TT, Bias WB et al. Influence of multiple HLA-D region alloantigens on clinical and serologic expression. *Arthritis Rheum* 1984;27:1245-1253.
58. Fox RI, Bumol T, Fantozzi R, Bone R, Schreiber R. Expression of histocompatibility antigen HLA-DR by salivary gland epithelial cells in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986;29:1105-1111.
59. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with and influenza virus peptide. *Nature* 1994;368:215-221.
60. Ou D, Mitchell LA, Tingle AJ, et al. A new categorization of HLA DR alleles on a functional basis. *Hum Immunol* 1998;59:665-676.
61. Price P, Witt C, Allcock R, et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev* 1999;167:257-274.
62. <http://www.anthonynolan.com/HIG/data.html>.
63. Pugliese A, Gianini R, Moromisato R, et al. HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes* 1995;44:608-613.
64. Reveille JD, Macleod MJ, Whittington K, Arnett FC. Specific amino-acid residues in the second hypervariable region of HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro (SS-A)/La (SS-B) autoantibody responses. *J Immunol* 1991;146:3871-3876.
65. Jean S, Quelvenec E, Alizadeh M, et al. DRB1*15 and DRB1*03 extended haplotype interaction in primary Sjögren's syndrome genetic susceptibility. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16:725-730.
66. Kumagai S, Kanagawa S, Morinobu A, et al. Association of a new allele of the TAP2 gene, TAP2*Bky2 (Val577), with susceptibility to Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1997;40:1685-1692.
67. Perrier S, Coussediere C, Dubost JJ, Albuissou E, Sauvezie B. IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87:309-313.
68. Komaki S, Kohno M, Matsuura N, et al. The polymorphic 43Thr bcl-2 protein confers relative resistance to autoimmunity: an analytical evaluation. *Hum Genet* 1998;103:435-440.
69. Grønbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, et al. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 1998;92:3018-3024.